



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO CITOTÓXICO DE 7-HIDROXI-3,4-DIHI-DROCADALENO
AISLADO DE *HETEROTHECA INULOIDES* Y CADALENOS SEMI-
NATURALES SOBRE EL CÁNCER DE MAMA**

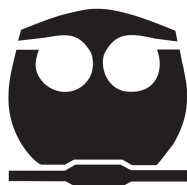
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ALAN MENDOZA FUENTES



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS
VOCAL: DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
SECRETARIO: DRA. DANIELA ARAIZA OLIVERA TORO
1ER SUPLENTE: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
2DO SUPLENTE: DRA. FRANCISCA MORAYNA GUTIÉRREZ LUNA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE BIOMACROMOLÉCULAS 1, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA: DRA. DANIELA ARAIZA OLIVERA TORO

SUSTENTANTE (S): ALAN MENDOZA FUENTES

I. AGRADECIMIENTOS:

Esta tesis se realizó gracias a:

El financiamiento brindado por el Instituto de Química (I. Q.) de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Daniela Araiza Olivera Toro del Laboratorio de Biomacromoléculas 1 y al Departamento de Presupuesto del I. Q. por haberme incluido en el programa de Becas Internas-2018.

La Secretaría de Educación Pública, la Coordinación Nacional de Becas de Educación Superior y la Dirección General de Cooperación e Internacionalización de la UNAM por haberme brindado la oportunidad de ser parte del Programa de Capacitación en Métodos de Investigación SEP-UNAM-FUNAM 2018.

El grupo de investigación “Farmacología de Productos Naturales” (UCM-920660) bajo la dirección de la Dra. Elena González Burgos y la Dra. M. Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado del Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

La Dirección de Becas y Enlace con la Comunidad-DGOAE por haberme brindado la Beca para Titulación-Extemporáneos correspondiente al ciclo escolar 2018-2019.

ÍNDICE GENERAL

1. Resumen	3
2. Introducción	4
3. Marco Teórico	5
3.1. Cáncer	5
3.1.1. Definición y generalidades.....	5
3.1.2. Proceso carcinogénico y modelo de establecimiento.....	7
3.1.3. Clasificación.....	10
3.2. Cáncer de mama	12
3.2.1. Definición	12
3.2.2. Clasificación.....	13
3.2.3. Epidemiología.....	18
3.2.4. Factores de riesgo	20
3.2.5. Tratamientos.....	24
3.3. <i>Heterotheca inuloides</i> (árnica)	25
3.3.1. Generalidades	25
3.3.2. Constituyentes químicos.....	27
3.3.3. Cadalenos.....	28
3.4. Especies reactivas de oxígeno (ROS)	29
3.4.1. Definición	29
3.4.2. Generación	30
3.4.3. Regulación.....	31
3.4.4. Estrés oxidante y carcinogénesis	33
4. Planteamiento del problema	36
5. Hipótesis	36
6. Objetivos	37
6.1. Objetivo general	37
6.2. Objetivos particulares.....	37
7. Metodología	38
7.1. Cultivo y tratamiento celular	38
7.2. Determinación de viabilidad celular por ensayo de MTT.....	38
7.3. Análisis <i>in silico</i>	39
7.4. Determinación de proliferación celular por ensayo del colorante de exclusión azul de tripano.....	40
7.5. Cuantificación de migración celular por ensayo de <i>wound-healing</i>	40
7.6. Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) por ensayo de 2',7' diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA)	41
7.7. Extracción proteica por lisis celular	42

7.8.	Cuantificación proteica por ensayo de ácido bicinchonínico (BCA)	42
7.9.	Determinación de peroxidación lipídica por ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	43
7.10.	Actividad de caspasas-3/9:.....	43
7.11.	Análisis estadístico	44
8.	Resultados	45
8.1.	Únicamente el compuesto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno posee efecto citotóxico tiempo-concentración dependiente contra la línea celular MCF7	45
8.2.	El producto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno tiene mejores propiedades fisicoquímicas con potencial citotóxico.....	46
8.3.	La IC ₅₀ del compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno disminuye la proliferación celular, provoca cambios morfológicos e inhibe significativamente la migración celular de la línea MCF7	48
8.4.	El compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno eleva significativamente los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y provoca peroxidación lipídica.....	51
8.5.	El compuesto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno aumenta significativamente la actividad de las caspasas 3 y 9.....	54
9.	Discusión	56
10.	Conclusiones	62
11.	Perspectivas	63
12.	Referencias	64

1. Resumen

La actividad citotóxica de un compuesto natural y dos seminaturales, aislados a partir de *Heterotheca inuloides* (árnica mexicana), fue evaluada sobre la línea celular de adenocarcinoma de glándula mamaria humana, MCF7. El cáncer de mama es la neoplasia más común diagnosticada en mujeres y la primera causa de muerte debida a esta patología. Se encontró que el compuesto natural, 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno, inhibe la viabilidad celular de MCF7 de una forma dependiente de la concentración y del tiempo. Adicionalmente, la proliferación y la migración celular disminuyen significativamente. En comparación con el producto natural, la potencia citotóxica de los derivados seminaturales 7-(fenilcarbamato)-3,4-dihidrocadaleno y 7-(fenilcarbamato)-cadaleno fue notablemente menor. Aparentemente, la incorporación del grupo fenilcarbamato en el carbono número 7 de los compuestos seminaturales no incrementa el efecto citotóxico de los mismos en la línea celular MCF7. Además, los estudios realizados *in silico* sugieren que el compuesto natural, y no así los derivados seminaturales, tiene propiedades fisicoquímicas óptimas para ser considerado como un agente citotóxico-anticancerígeno prometedor. Finalmente, se elucidó que el posible mecanismo por el cual la IC₅₀ del producto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno ejerce citotoxicidad es mediante la promoción de estrés oxidante. El compuesto natural aumentó significativamente los niveles de especies de reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares e indujo la peroxidación lipídica. Aunque se ha reconocido al 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno como un antioxidante, se demostró que este compuesto también actúa como pro-oxidante en ciertas condiciones. Además, este compuesto incrementó la actividad de la caspasa-3 y caspasa-9, indicando la posible muerte celular inducida por apoptosis. El conjunto de estos resultados muestra que el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno es un compuesto citotóxico eficaz contra el cáncer de mama que induce la muerte celular aparentemente mediada por apoptosis a través de la inducción de estrés oxidante.

2. Introducción

El cáncer de mama se refiere a varios tipos de neoplasias que surgen del tejido mamario y constituye una de las principales causas de muerte relacionadas con el cáncer. De acuerdo con la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), el cáncer de mama ocupa el primer lugar en prevalencia e incidencia, además de representar el segundo lugar en mortalidad sobre todos los sitios susceptibles a cáncer en México (International Agency for Research on Cancer, 2018). La mayoría de las células de cáncer de mama son receptores de hormona positivos (HR+), y por tanto responderán a la reducción de los estrógenos circulantes inducida por la terapia endócrina; sin embargo, los fármacos citotóxicos son la terapia de elección para los cánceres de alto riesgo (Senkus, et al., 2015).

La amplia gama de metabolitos encontrada en distintas especies de plantas ha sido blanco de estudio con el objetivo de emplearlos como agentes terapéuticos de diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer (Desai, et al., 2008; Alonso-Castro, et al., 2011; Greenwell & Rahman, 2015; Jain, Dwivedi, Jain, Satpathy, & Patra, 2016). Fármacos empleados para el cáncer y aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) como arglabín, paclitaxel y vinblastina son de origen natural aislados de las especies *Artemisia glabella*, *Taxus brevifolia* y *Catharanthus roseus*, respectivamente. En los últimos años se han investigado diversos aspectos relacionados con las propiedades etnomedicinales de los extractos y metabolitos secundarios de *Heterotheca inuloides* (mejor conocida como “árnica”). Entre sus principales propiedades terapéuticas se encuentran la analgésica, antiinflamatoria, antinociceptiva, antioxidante y antitumoral. Se han aislado más de 140 tipos distintos de compuestos del aceite esencial y extractos orgánicos de varias partes de esta especie, tales como compuestos polifenólicos, triterpenos, fitoesteroles y sesquiterpenos (Rodríguez-Chávez, et al., 2017). Demostrándose que de los distintos efectos terapéuticos de *H. inuloides*, mencionados anteriormente, el efecto citotóxico-anticancerígeno es debido a la presencia de cadalenos, específicamente el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno y el 7-hidroxicadaleno (Kubo, et al., 1996).

3. Marco Teórico

3.1. Cáncer

3.1.1. Definición y generalidades

El cáncer es una condición clínica manifestada por un grupo de más de cien enfermedades relacionadas a causa de la desregulación en los procesos implicados con la proliferación, muerte y diferenciación celular, que generalmente dan lugar a un crecimiento neoplásico o formación de masas tumorales que son capaces de diseminarse a los tejidos circundantes (Weinberg, 2014; American Cancer Society, 2015; National Cancer Institute, 2015).

La principal diferencia entre las células somáticas normales y las malignas radica en su potencial de proliferación (Mondello & Chiodi, 2013). Mientras que las células somáticas normales están sometidas al límite de Hayflick, que se refiere número de divisiones que puede sufrir una célula eucarionte antes de entrar en senescencia (Hayflick, 1965), las células tumorales pueden sostener señales con el fin de proliferar indefinidamente. Esta es una de las seis capacidades (o *hallmarks*) biológicas primordiales que una célula normal adquiere sucesivamente a través de múltiples etapas en el desarrollo de un estado neoplásico, además de evadir las señales supresoras de crecimiento, resistir a la muerte celular, inducir la angiogénesis, permitir la inmortalidad replicativa y tener gran potencial invasivo–metastásico (Hanahan & Weinberg, The Hallmarks of Cancer, 2000). Adicionalmente, se han propuesto dos *hallmarks* implicados con la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la respuesta inmune. Asimismo, se han descrito dos características cruciales que permiten la adquisición de todos los *hallmarks* antes mencionados, tales como la inestabilidad genómica y la inflamación crónica (Hanahan & Weinberg, 2011).

Los tumores, más allá de ser considerados como una entidad insular de células en constante proliferación, son tejidos complejos compuestos de distintos tipos celulares que participan en interacciones heterotípicas entre sí, por lo que es

de gran importancia destacar que las interacciones con el microambiente tumoral son cruciales para el fenotipo de cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011).

La **Tabla 1** resume otras propiedades de las células tumorales en cultivo celular o *in vivo*.

Tabla 1. Características de células malignas transformadas *in vitro* o *in vivo*

A. Alteraciones <i>in vitro</i>
1. Los cambios citológicos son similares a los de las células tumorales <i>in vivo</i> , incluido el aumento de la basofilia citoplasmática, el aumento en el número y el tamaño de los núcleos, el aumento de la proporción núcleo-citoplasma, pérdida de polaridad y la peculiar formación de grupos de células.
2. Alteración en las características de crecimiento.
a. "Inmortalidad" de las células transformadas (no aplica el límite de Hayflick).
b. Disminución de la inhibición dependiente de la densidad del crecimiento o pérdida de la "inhibición por contacto". Las células transformadas usualmente crecen a una densidad mayor que sus contrapartes normales, y pueden "acumularse" en el cultivo.
c. Disminución del requerimiento de suero. Las células transformadas generalmente requieren concentraciones más bajas de suero o de factores de crecimiento para replicarse en el cultivo respecto las células no transformadas.
d. Resistencia a la apoptosis (muerte celular programada).
3. Cambios en la estructura y función de la membrana celular, incluida alteración en la composición de las glicoproteínas de la superficie celular, proteoglicanos, glucolípidos y mucinas; aparición de antígenos asociados a tumores; y una mayor captación de aminoácidos, hexosas y nucleósidos.
4. Pérdida de interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular que favorecen la diferenciación celular.
5. Pérdida de respuesta a los agentes inductores de la diferenciación y alteración de los receptores celulares para estos agentes.
6. Mecanismos de transducción de señales alterados, incluida la función sostenida o suprimida en lugar de la función regulada de los receptores de factor de crecimiento, las cascadas de fosforilación y los mecanismos de desfosforilación.
7. Capacidad para producir tumores en animales experimentales. Si las células que se cree que están transformadas no producen tumores en el hospedero, no se pueden definir como "malignas". Sin embargo, la falla en el crecimiento en un modelo animal significa que pueden no ser tumorigénicas en un tipo diferente de animal.
B. Alteraciones <i>in vivo</i>
1. Aumento de la expresión de proteínas oncogénicas como consecuencia de la translocación, amplificación o mutación cromosómica.
2. Pérdida de función de productos de genes supresores de tumores debido a delección o mutación.
3. Alteraciones en los patrones de metilación del DNA.

4. Errores de “impresión” genética que conducen a la sobreproducción de factores procesadores del crecimiento.
5. Inestabilidad genética que conduce a la pérdida progresiva de la proliferación celular regulada, mayor invasividad y mayor potencial metastásico.
6. Alteración en los patrones enzimáticos. Las células malignas tienen niveles aumentados de enzimas involucradas en la síntesis de ácidos nucleicos y producen niveles más altos de enzimas líticas (por ejemplo, proteasas, colagenasas, glicosidasas).
7. Capacidad para evitar la respuesta inmune antitumoral del huésped.

Adaptado de Ruddon, 2003; Bast Jr. et al., 2017.

3.1.2. Proceso carcinogénico y modelo de establecimiento

El desarrollo del cáncer (o carcinogénesis) es un proceso lento y multifacético en el que distintos eventos de mutación somática y selección clonal producen variantes en la descendencia celular con propiedades desreguladas en la diferenciación, proliferación y supervivencia. La carcinogénesis consiste en cinco etapas distintas, pero estrechamente vinculadas: la iniciación, la promoción, la progresión, la invasión (**Figura 1A**) y la metástasis. Cada etapa juega un papel importante en la transformación de nuevas poblaciones celulares.

La primera fase de la carcinogénesis es la iniciación, la cual involucra la mutación de una sola célula del organismo inducida por la exposición a un agente carcinógeno o espontáneamente por daños epigenéticos. Estas alteraciones genéticas refuerzan la tendencia a desregular las vías de señalización asociadas con la proliferación y la supervivencia de la célula portadora respecto a las adyacentes, favoreciendo la posterior aparición y selección de nuevos clones de células con una mayor capacidad de división; sin embargo, en este paso, la célula iniciadora es fenotípicamente normal (**Figura 1B**), es decir, aún no presenta la transformación neoplásica (únicamente genética) y no prolifera.

La etapa de promoción se considera un proceso relativamente largo y reversible, caracterizada principalmente por la expansión clonal en donde las células preneoplásicas, aun fenotípicamente normales, proliferan constantemente provocando así la aparición y acumulación de una serie sucesiva de nuevas mutaciones en su descendencia y el aumento anormal del tamaño del órgano o

tejido (hiperplasia). Dentro de este período, el proceso puede ser alterado por agentes quimiopreventivos y afectar las tasas de crecimiento.

La progresión es considerada la etapa crítica de la carcinogénesis ya que las células sufren transformación neoplásica dando lugar a cambios fenotípicos (displasias), la formación de un tumor primario (tumorigénesis) y al incremento indefinido de su heterogeneidad. Esto implica un aumento en el tamaño del tumor, donde las células pueden sufrir otras mutaciones con potencial invasivo. La mayoría de dichos cambios genéticos son letales provocando la muerte celular; no obstante, aleatoriamente, algunas mutaciones son capaces de sostener la viabilidad celular (p. ej. resistiendo a la muerte celular) además de conferir a la célula la capacidad de sostener señales con el fin de proliferar indefinidamente, por lo que su descendencia acabará siendo mayoritariamente parte del tumor, dando lugar así un segundo suceso de clonalidad. Este proceso particular de la progresión, llamado selección clonal, se puede repetir numerosas veces, obteniéndose en cada paso clones celulares con mayor capacidad de división y cuya regulación está más alterada. Los agentes quimiopreventivos deben actuar de manera preferencial dentro de los procesos de iniciación y promoción de la carcinogénesis.

Mientras que las células neoplásicas no se hayan vuelto invasivas, es decir, que el crecimiento sea local sin invadir tejidos adyacentes, se dice que el tumor es benigno. Para la mayoría de los tipos de neoplasias de este tipo, la eliminación o destrucción local de la masa tumoral suele lograr una cura completa. Un tumor se considera un verdadero cáncer si es maligno, es decir, cuando las células han adquirido la capacidad de invadir el tejido circundante y generar metástasis. La invasión es la fase donde se diferencia un tumor benigno (p. ej. adenoma) y el desarrollo de una neoplasia maligna (p. ej. adenocarcinoma) (Cascales & Rodés, 1990; Santos, 2013; Weinberg, 2014; Siddiqui, Sanna, Ahmad, Sechi, & Mukhtar, 2015; Alberts, et al., 2015).

Finalmente, se puede llegar a instaurar el proceso de metástasis una vez que las células del tumor primario adquieren la capacidad de penetrar en los tejidos circundantes y movilizarse a través de la lámina basal y la matriz extracelular, promoviendo la intravasación a medida que las células se infiltran en la circulación

linfática o vascular. Las células metastásicas viajan a través del sistema circulatorio invadiendo la lámina basal vascular y la matriz extracelular de un nuevo sitio durante el proceso de extravasación. Estas células colonizarán un nuevo tejido u órgano y proliferarán para producir un tumor secundario (Martin, Ye, Sanders, Lane, & Jiang, 2013; Weinberg, 2014; Alberts, et al., 2015).

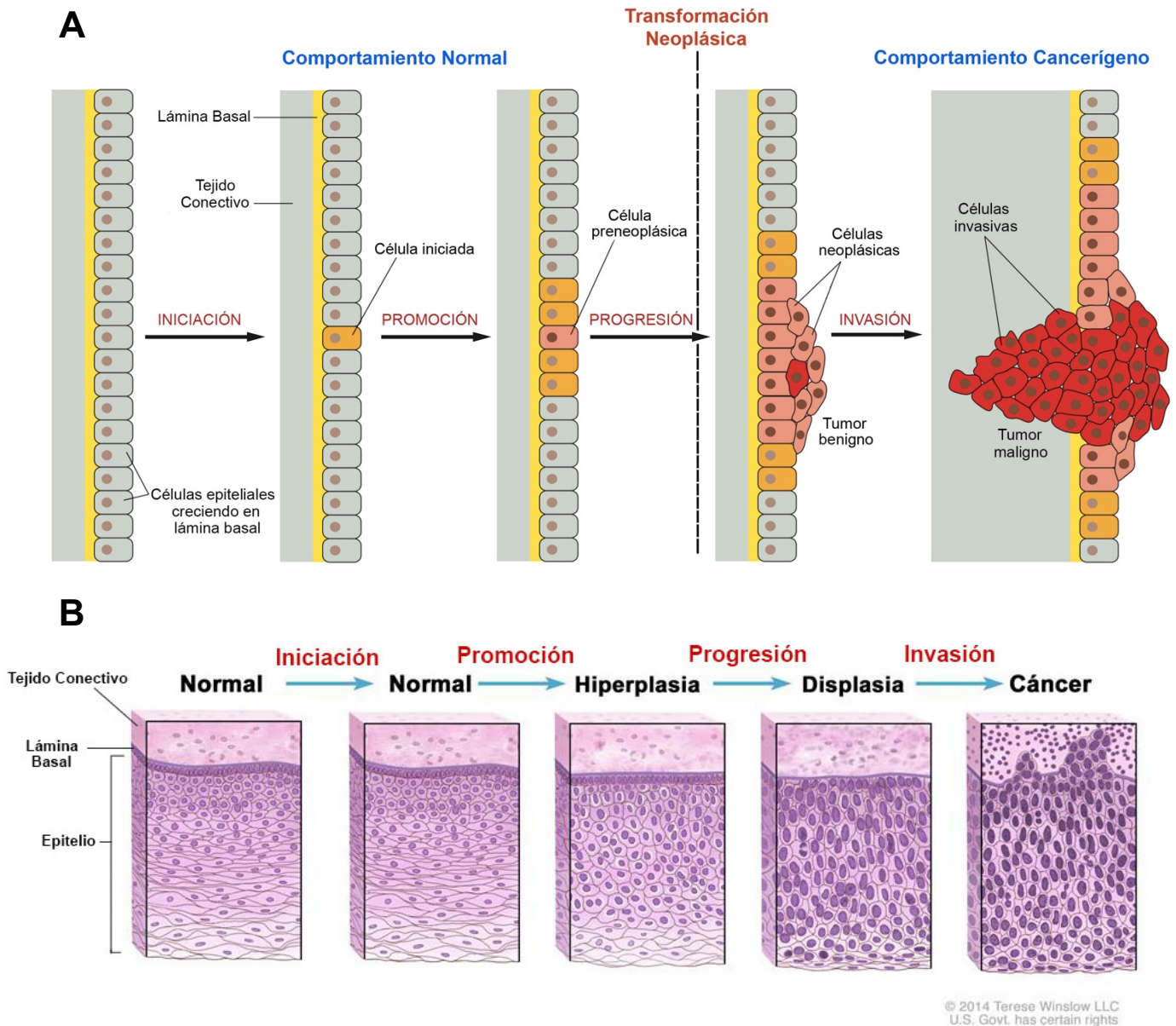


Figura 1. A. Las cuatro primeras fases de la carcinogénesis (iniciación, promoción, progresión e invasión) en un tejido epitelial. Adaptado de Alberts, et al., 2015; **B.** Cambios en el tejido epitelial a través de las cuatro primeras fases la carcinogénesis. Adaptado de Winslow, 2014.

3.1.3. Clasificación

Tradicionalmente, la nomenclatura del cáncer se basa principalmente en la ubicación del órgano o tejido, por ejemplo, "cáncer de pulmón" designa un tumor que se origina en estructuras pulmonares. Dentro de cada tipo específico de órgano, se pueden definir subgrupos más finos de acuerdo con la edad del paciente, el tipo de célula, los grados histológicos y, en ocasiones, con los marcadores moleculares, por ejemplo, el estado de un receptor hormonal en el cáncer de mama o la inestabilidad de un microsatélite en el cáncer colorrectal (Song, Merajver, & Li, 2015). En la **Tabla 2** se muestran algunas categorías de cánceres que comienzan en tipos específicos de células.

Tabla 2. Clasificación tradicional de algunos cánceres según el tipo de tejido y célula del que surgen

A. Carcinoma	Tumor maligno que se forma a partir del tejido epitelial de los órganos. Se trata del tipo de cáncer humano más común, siendo responsable de más del 80% de las muertes relacionadas con el cáncer en el mundo. La mayoría de los carcinomas se clasifican en dos categorías principales que reflejan las dos funciones biológicas principales asociadas con los epitelios.
1. Adenocarcinoma	Tumor maligno de un epitelio glandular (células especializadas que secretan sustancias en los conductos o cavidades que recubren). P. ej. pulmón, colon, mama, páncreas, estómago, esófago, próstata, endometrio y ovario.
2. Carcinoma de células escamosas o carcinoma epidermoide	Cáncer que surge de las células que forman capas de células protectoras; se encuentra en el tejido que forma la superficie de la piel (queratinocitos), el revestimiento de los órganos huecos del cuerpo y el revestimiento de los aparatos respiratorio y digestivo. P. ej. la cavidad nasal, la orofaringe, laringe, pulmón, esófago y cérvix.
3. Otros tipos de carcinoma	Carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renales, carcinoma de células de transición.
B. Sarcoma	Tumor maligno del tejido conjuntivo, de la musculatura y de los vasos sanguíneos (tejidos blandos). Es la primera clase importante de cánceres no epiteliales. Estos tumores constituyen solo el 1% de los tumores encontrados en la clínica.
1. Osteosarcoma	Cáncer de hueso que empieza en los osteoblastos (células formadoras de hueso).

2. Liposarcoma	Tipo de cáncer que empieza en los adipocitos (células grasas).
3. Fibrosarcoma	Tipo de sarcoma que comienza en el tejido fibroso (específicamente en los fibroblastos).
4. Angiosarcoma	Tipo de cáncer que comienza en las células que revisten los vasos sanguíneos o los vasos linfáticos (células endoteliales).
5. Leiomiomasarcoma	Tumor maligno que surge a partir de las células de los músculos lisos.
C. Leucemia	Grupo de cánceres no epiteliales que surge de diversos tipos de células que constituyen los tejidos hematopoyéticos en la médula ósea. Estos cánceres no forman tumores sólidos. En vez de eso, un gran número de glóbulos blancos anormales se acumulan en la sangre y en la médula ósea y desplazan a los glóbulos normales de la sangre. P. ej. leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC) y leucemia linfocítica crónica (LLC).
D. Linfoma	Grupo de cánceres no epiteliales que comprenden diversos tipos de células del sistema inmune, incluyendo los linajes linfoides (linfocitos B y T) que se agregan para formar masas tumorales sólidas, que se encuentran con mayor frecuencia en los ganglios linfáticos. P. ej. linfoma de Non-Hodgkin (LNH) y linfoma de Hodgkin (LH).
E. Tumores neuroectodérmicos	Tumores no epiteliales que surgen de células que forman diversos componentes de los sistemas nerviosos central y periférico. Aunque comprenden solo el 1.3% de todos los cánceres diagnosticados, estos son responsables de aproximadamente el 2.5% de las muertes relacionadas con el cáncer.
1. Astrocitoma	Tumor que comienza en el cerebro o la médula espinal, cuyas células (tipo gliales) se llaman astrocitos.
2. Glioblastoma multiforme	Tipo de tumor del sistema nervioso central de crecimiento rápido que se forma a partir del tejido glial (de sostén) del encéfalo y la médula espinal. También se llama astrocitoma de grado IV.
3. Meningioma	Tipo de tumor que se forma en las células aracnoidales de las meninges (tres capas finas de tejido que cubren y protegen el cerebro y la médula espinal).
4. Schwannoma	Tumor del sistema nervioso periférico que surge de las células de Schwann que son las que recubren a los axones.
5. Retinoblastoma	Cáncer que se presenta en los tejidos de la retina (células cónicas).
F. Melanoma	El melanoma es un cáncer que empieza con los melanocitos, los cuales son células especializadas en producir melanina (las células pigmentadas de la piel y la retina). La mayoría de los melanomas se forman en la piel, pero pueden formarse también en otros tejidos pigmentados, como en los ojos.
G. Otros tipos de tumores	Tumores de células germinativas, tumores neuroendocrinos, tumores carcinoides.

Adaptado de Weinberg, 2014; National Cancer Institute, 2015.

3.2. Cáncer de mama

3.2.1. Definición

El cáncer de mama se refiere a varios tipos de neoplasias que surgen del tejido mamario. Los dos tipos de cáncer de mama más comunes son el carcinoma lobulillar, que comienza en las células que componen la unidad terminal de los conductos lobulillares mamarios (**Figura 2A**) y el carcinoma ductal, que comienza en el revestimiento de los conductos galactóforos (**Figura 2B**) (National Cancer Institute, n.d.). Las diferencias entre estos dos tipos se enlistan en la **Tabla 3**.

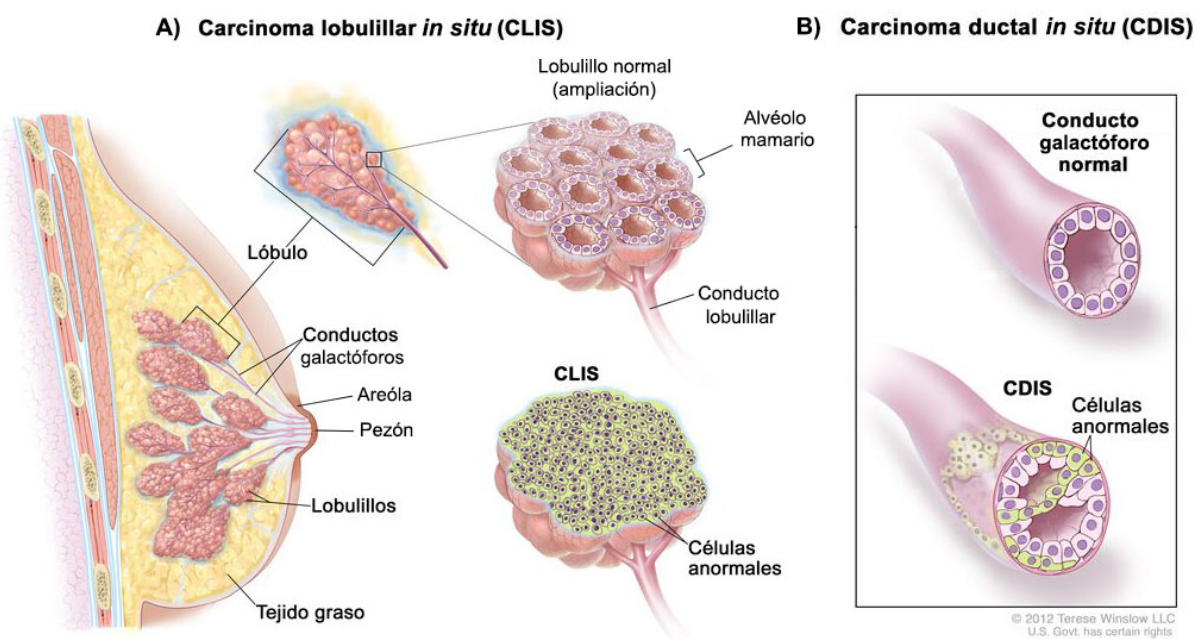


Figura 2. Anatomía de la glándula mamaria y los dos principales tipos de neoplasias que se originan a partir del tejido mamario. **A.** Las ramificaciones de las glándulas alveolares se organizan en estructuras llamadas lobulillos. Las células que forman los alvéolos (o acinos mamarios) son las susceptibles de generar un CLIS; **B.** Los lóbulos drenan su producto en un conducto galactóforo. Las células que recubren este conducto son las susceptibles de generar un CDIS. CLIS: Carcinoma lobulillar *in situ*; CDIS: Carcinoma ductal *in situ*. Adaptado de Winslow, National Cancer Institute, 2012.

Tabla 3. Diferencias histológicas e inmunohistoquímicas entre el cáncer de mama (preinvasivo) ductal y lobulillar

Subtipo histológico	Ductal	Lobulillar
<p>Carcinoma de mama <i>in situ</i> 20 % de nuevos diagnósticos de cáncer de mama</p> <p>Proliferación clonal de células epiteliales sin invadir el tejido conectivo o tejidos circundantes, es decir, las células están delimitadas por la lámina basal.</p>	<p>Carcinoma ductal <i>in situ</i> (CDIS) 20% –25% de todos los casos recién diagnosticados de cáncer de mama</p> <p>Está compuesto por la proliferación monoclonal de células epiteliales cohesivas dispuestas en túbulos, trabéculas y láminas, que exhiben pleomorfismo nuclear variable.</p> <p>Expresan E-cadherina en la membrana. Tamaño del tumor menor que en cáncer de mama lobulillar. Usualmente unilateral.</p>	<p>Carcinoma lobulillar <i>in situ</i> (CLIS) 1-2% de todos los cánceres de mama</p> <p>Es una proliferación monoclonal de células no cohesivas dispuestas en forma de un único <i>cluster</i> de células, sin la formación de túbulos o papilas y células con un pleomorfismo nuclear relativamente pequeño.</p> <p>No expresan E-cadherina en la membrana. Edad avanzada de inicio. Mayor riesgo de cáncer de mama bilateral.</p>

Adaptado de Henry-Tillman & Klimberg, 2000; Sprague & Trentham-Dietz, 2009; Kerlikowske, 2010; Pai, Baliga, & Shrestha, 2013; Li, et al., 2014; Cutuli, et al., 2015.

3.2.2. Clasificación

El grado de un tumor es la descripción basada en la forma de las células y el tejido tumoral al microscopio. El grado indica la rapidez con la que el tumor probablemente crecerá y se extenderá. Si la organización del tejido y las células tumorales están bien diferenciadas, significa que se asemejan a las células y a los tejidos normales. Estos tumores tienden a crecer y a extenderse más lentamente que los no diferenciados, los cuales tienen células anormales carentes de estructuras de tejido normal (National Cancer Institute, 2015).

Frecuentemente es utilizado el sistema de gradación Nottingham (llamado también modificación de Elston-Ellis del sistema de gradación de Scarff-Bloom-Richardson) para cáncer de mama (Edge & Compton, 2010). Este sistema otorga un grado a los tumores de mama basándose en las siguientes características:

- **Formación tubular:** Proporción del tejido tumoral con estructuras normales de conductos galactóforos.
- **Grado nuclear:** Evaluación del tamaño y la forma del núcleo en las células tumorales.
- **Rango mitótico:** Cantidad de células en división, lo cual es una medida de la rapidez con la que las células del tumor están creciendo y se están dividiendo.

Los tres grados posibles son: G1 (grado bajo o bien diferenciado), G2 (grado intermedio o moderadamente diferenciado) y G3 (grado alto o escasamente diferenciado) (**Figura 3**).

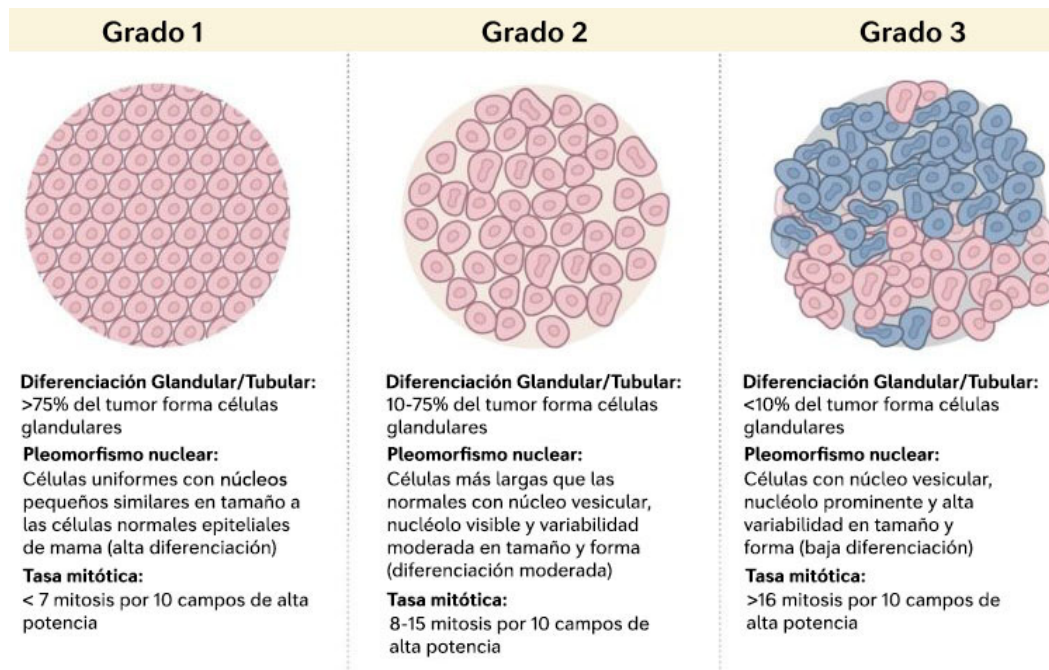


Figura 3. El grado de un cáncer de mama es un factor de pronóstico y es representativo del potencial agresivo del tumor. Adaptado de Johns Hopkins University, n.d.

Existe una diferencia entre el grado del tumor y el estado del cáncer. El estado del cáncer se refiere a la extensión (o etapa) del tumor primario y a si las células tumorales se han diseminado en el cuerpo. Se basa en factores como el lugar del tumor primario, el tamaño del tumor, la extensión del cáncer a los ganglios linfáticos cercanos y el número de tumores presentes (National Cancer Institute, 2013).

En el estado 0 hay células anormales presentes, pero no se han diseminado al tejido cercano; se llama también carcinoma *in situ*, o CIS (el CIS aún no es invasivo). En los estados I, II y III hay cáncer presente (es decir, ya existe invasión); cuanto más elevado es el estado, mayor es la masa tumoral y la diseminación a los tejidos cercanos. Finalmente, el estado IV indica la invasión del tumor a partes distantes del cuerpo (**Figura 4**).

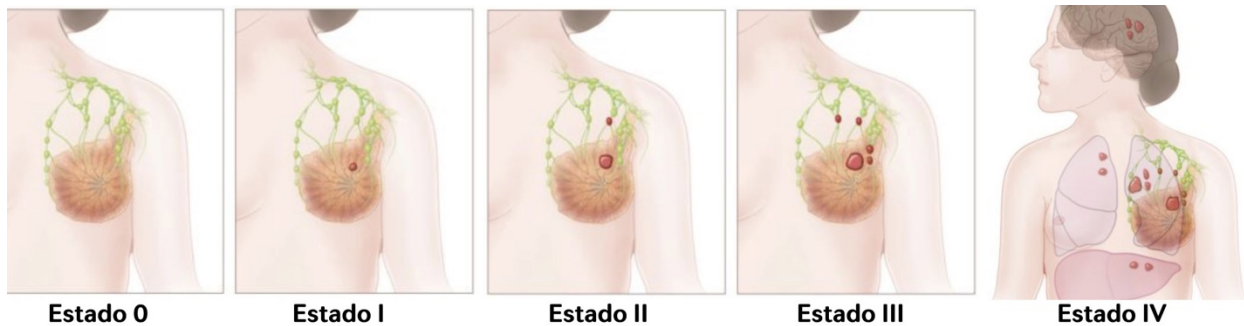


Figura 4. La etapa o el estado patológico del cáncer de mama es una medida de cuán avanzado está el tumor de un paciente. Adaptado de Johns Hopkins University, n.d.

Los avances en el análisis de los perfiles de expresión génica, utilizando técnicas genómicas, han revelado la alta heterogeneidad presente en los cánceres de mama (Perou, et al., 2000; Sørlie, et al., 2001; Sørlie, et al., 2003). Estos enfoques han servido para identificar diferentes subgrupos de cáncer de mama en función de los patrones de expresión, con características moleculares específicas que podrían subclasificar a estos tumores como carcinomas que expresan receptores de estrógenos (ER+) y tumores que no lo expresan (ER-) (Hergueta-Redondo, Palacios, Cano, & Moreno-Bueno, 2008). Además, el cáncer de mama se ha clasificado según la expresión del receptor de progesterona (PR), y la sobreexpresión/amplificación del oncogén *ERBB2* (también llamado *HER2/neu*) que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano-2 (HER2). Precisamente estos marcadores moleculares son particularmente importantes para predecir la respuesta clínica a tratamientos específicos y el pronóstico de la enfermedad (Sotiriou, et al., 2003; Nielsen, et al., 2004).

Para comprender la taxonomía molecular en la clasificación del cáncer de mama, es necesario introducir brevemente la organización anatómico–funcional de la glándula mamaria: este órgano se compone de un sistema túbulo–glandular, incrustado en el tejido conectivo–graso mamario que se extiende desde el pezón hacia los conductos y lóbulos (**Figura 3A**).

Los alvéolos mamarios se organizan en estructuras tubulares tridimensionales que dependen en gran medida de una morfología polarizada, uniones especializadas célula–célula y uniones específicas a una membrana basal subyacente (McGee, Lanigan, Gilligan, & Groner, 2006). Las estructuras tubulares están revestidas por dos capas celulares: la capa epitelial localizada en el lumen (células luminales) y la capa mioepitelial en contacto con la membrana basal (células basales) (**Figura 5**).

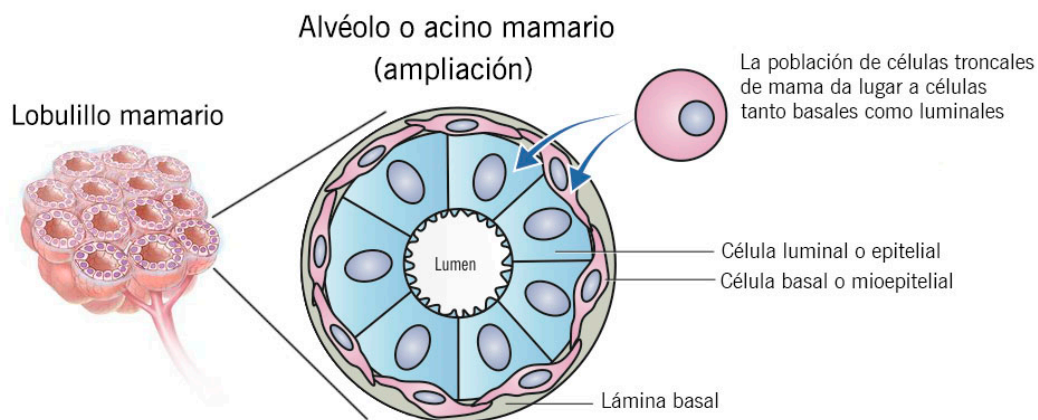


Figura 5. Estructura de alvéolo mamario. La capa externa conformada por las células basales o mioepiteliales proporciona soporte estructural a los alveolos y ayuda a la expulsión de la leche durante la lactancia, mientras que la capa interna formada por células luminales o epiteliales producen leche. Las células troncales pueden dar lugar a células tanto epiteliales como mioepiteliales. Adaptado de Wong & Rebelo, 2012; Winslow, National Cancer Institute, 2012.

En cuanto a los tumores de tipo basal o triple negativo típicamente muestran una baja o nula expresión de HER2, ER y PR. Los tumores HER2+ (es decir, el gen amplificado y/o la proteína sobreexpresada) se clasifican en al menos 2 grupos de expresión distintos: aquellos que son ER– (HER2+/ER–), que típicamente se agrupan cerca de los tumores de tipo basal, y aquellos que son ER+ (y que también pueden ser PR+), los cuales se agrupan con los tumores de origen de células

luminales como parte del subtipo luminal B. Los dos subtipos de tumores que expresan ER son el luminal A y luminal B. En comparación con los tumores luminales B, los tumores luminales A expresan niveles más altos de ER, mientras que los tumores luminales B expresan con mayor frecuencia el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano-1 (HER1) y HER2 (**Figura 6**) (Carey, et al., 2006).

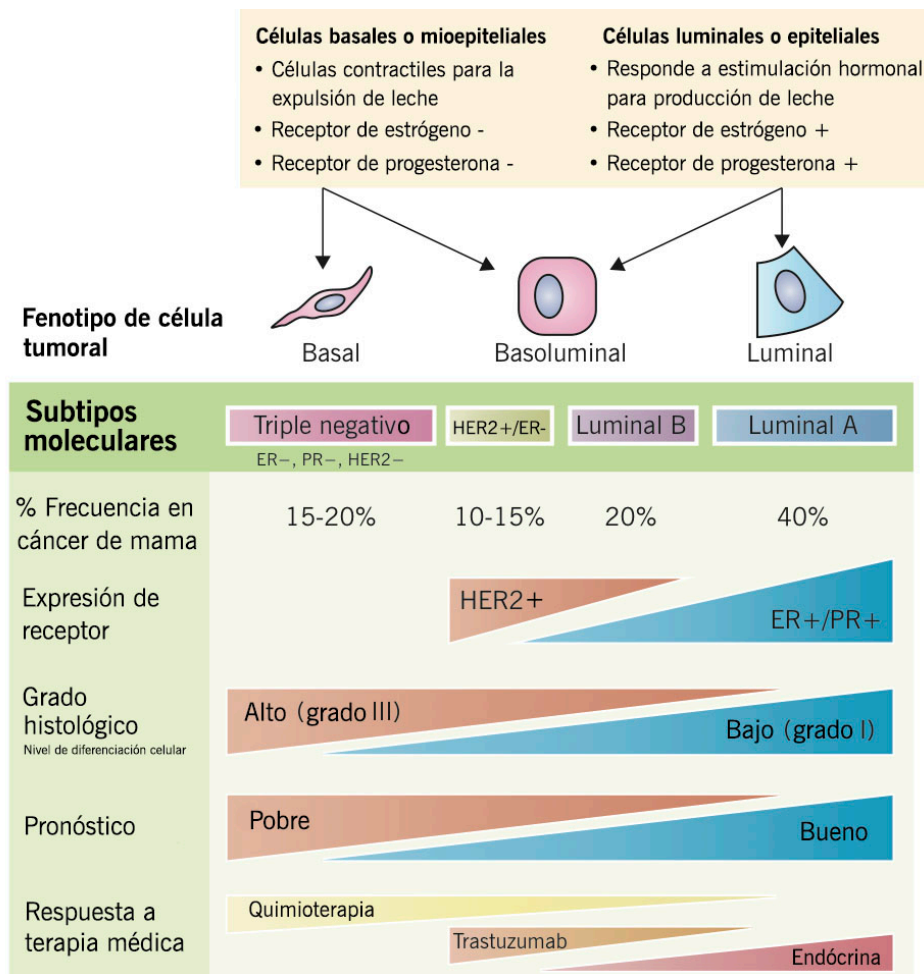


Figura 6. Subtipos moleculares en función de la histología celular de cáncer de mama. Luminal A (ER+, HER2-, PR+), luminal B (ER+, HER2+, PR+), de tipo basal o triple negativo (ER-, HER2-, PR-) y HER2+/ER- (ER-, HER2+ y PR-). ER: Receptor de estrógeno; HER2: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano-2; PR: receptor de progesterona. Adaptado de Sims, Howell, Howell, & Clarke, 2007; Wong & Rebelo, 2012.

3.2.3. Epidemiología

En 2013, el cáncer fue la cuarta causa de muerte en México con 75 229 defunciones que representan el 12.1% del total de muertes en el país (INEGI, 2013). En promedio, la proporción fue mayor para las mujeres y el 45.4% de todas las muertes por cáncer se produjeron en población trabajadora (15 a 64 años) (Mohar-Betancourt, Reynoso-Noverón, Armas-Texta, Gutiérrez-Delgado, & Torres-Domínguez, 2017). Actualmente, el cáncer de mama es el primer lugar en prevalencia a 1, 3 y 5 años (21 452, 56 595 y 83 287 casos, respectivamente) y en incidencia (41.6 nuevos casos por cada 100 000 personas), además de representar el segundo lugar en mortalidad (10.5 defunciones por cada 100 000 personas en riesgo) sobre los diversos tipos de cáncer en México (**Figura 7**).

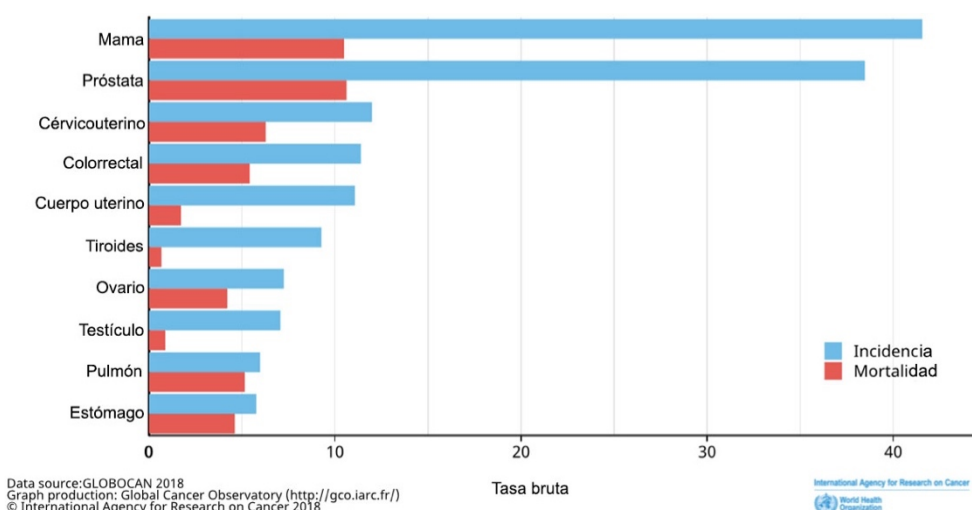


Figura 7. Tasas brutas de incidencia y mortalidad de cáncer considerando población mexicana, ambos sexos y todas las edades. Para cáncer, el resultado se expresa como una tasa anual por cada 100 000 personas en riesgo. Adaptado de International Agency for Research on Cancer, 2018.

Los datos de las series cronológicas para las tasas crudas de incidencia y mortalidad del cáncer de mama en México muestran un aumento continuo desde la década del 2000 hasta mediados del 2015 (**Figura 8A**). Este patrón contrasta radicalmente con el cáncer cervicouterino y de cuerpo uterino, en el que las tasas de mortalidad han disminuido continua y bruscamente desde mediados de la década

de 1980 (Chávarri-Guerra, et al., 2012). Esta proporción ha descendido en una razón mayor respecto al cáncer de mama por primera vez en 2005 y 2007, respectivamente (**Figura 8B**); posicionando al cáncer de mama en el primer lugar en incidencia y mortalidad entre todos los tipos de cáncer en el sexo femenino.

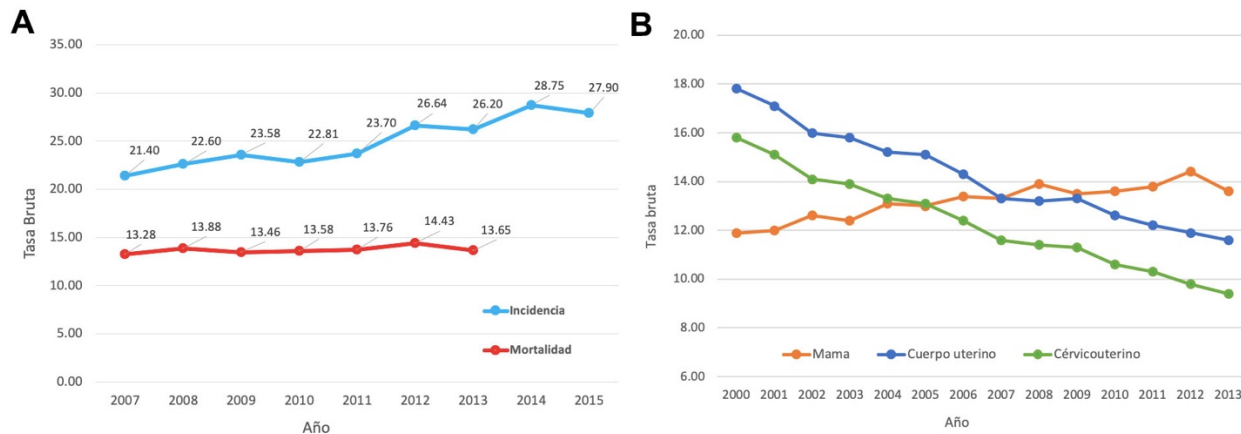


Figura 8. Cambio en las tasas crudas de **A.** incidencia y mortalidad de cáncer de mama en el periodo de 2007 a 2015; **B.** mortalidad de cáncer de mama, cuerpo uterino y cérvicouterino en el periodo de 2000 a 2013. Ambas gráficas consideran población mexicana, mayor a 20 años y sexo femenino. Los resultados se expresan como una tasa anual por cada 100 000 personas. Incidencia adaptada de CONAPO (2008, 2016), proyecciones de la población 2010-2050. Mortalidades adaptadas de Cancer Mortality Database (IARC), 2016.

Un estudio estadístico de cohorte señaló que, en pacientes mexicanas tratadas con cáncer de mama en etapa temprana, la supervivencia promedio (a cinco años) fue del 97%, mientras que para aquellas con enfermedad localmente avanzada fue del 82%, y para aquellas con enfermedad metastásica fue del 36% (Reynoso-Noverón, et al., 2017).

Asimismo, se demostró que los siguientes factores estaban asociados con una peor supervivencia: edad ≤ 40 años (**Figura 9A**), estado avanzado en el momento del diagnóstico (**Figura 9B**), tumores lobulillares, alto grado histológico (**Figura 9C**) y subtipo tumoral triple negativo (**Figura 9D**) (Reynoso-Noverón, et al., 2017).

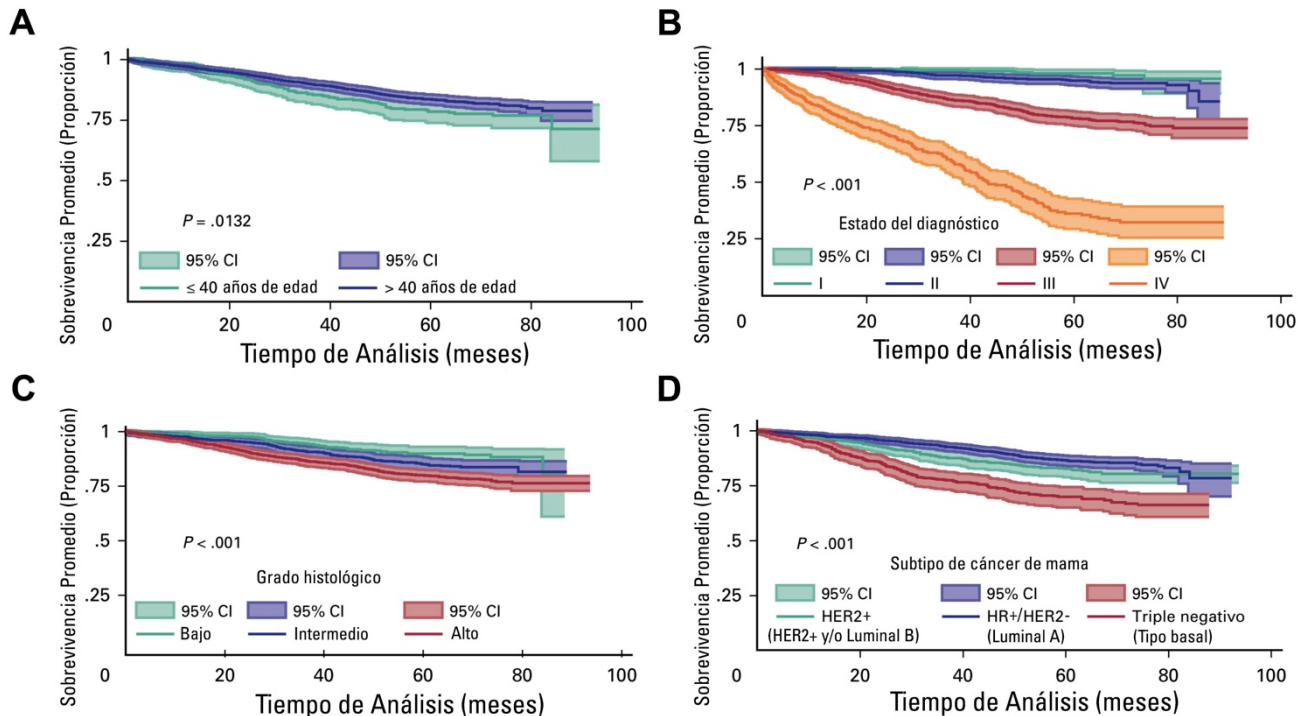


Figura 9. Sobrevivencia promedio (a 5 años) de acuerdo con las características clínicas y demográficas relevantes en pacientes con cáncer de mama tratadas en México de 2007 a 2013. **A.** Edad; **B.** Estado clínico en el momento del diagnóstico; **C.** Grado histológico; **D.** Subtipos de cáncer de mama. CI: intervalo de confianza; HER2: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano-2; HR: receptor hormonal (receptor de progesterona [PR] y receptor de estrógeno [ER]). Adaptado de Reynoso-Noverón, et al., 2017.

3.2.4. Factores de riesgo

Décadas de investigación básica, epidemiológica y clínica han llevado a la identificación de numerosos factores de riesgo de cáncer. Se sabe que más de la mitad de todos los casos de cáncer en el mundo son atribuibles a causas prevenibles, incluido el consumo de alcohol y tabaco, la mala alimentación, la inactividad física y la obesidad (Emmons & Colditz, 2017). Sin embargo, existen factores de riesgo específicos asociados con el cáncer de mama:

- **Género:** El género femenino es el principal factor de riesgo en el cáncer de mama. El riesgo de por vida para un hombre es de 1:833 (American Cancer Society, 2018) en comparación con 1:8 para una mujer (**Tabla 4**) (American Cancer Society, 2017).

- **Edad:** El riesgo incrementa conforme la edad avanza. Las probabilidades por edad para desarrollar cáncer de mama en un período de 10 años se proporcionan en la **Tabla 4**. El 81% de los cánceres de mama se diagnostican en mujeres de 50 años o más, y el 89% de las muertes por cáncer de mama también ocurren en este grupo de edad (**Tabla 5**). La edad media al diagnóstico para las mujeres con cáncer de mama es de 62 años (DeSantis, Ma, Sauer, Newman, & Jemal, 2017).

Tabla 4. Probabilidades por edad de desarrollar cáncer de mama invasivo para mujeres de Estados Unidos de América

EDAD	PROBABILIDAD A 10 AÑOS ^a	Ó 1 EN:
20	0.1%	1,567
30	0.5%	220
40	1.5%	68
50	2.3%	43
60	3.4%	29
70	3.9%	25
Riesgo de por vida	12.4%	8

a. La probabilidad está entre las personas libres de cáncer al comienzo de cada intervalo de edad según los pacientes diagnosticados desde 2012 hasta 2014. Adaptado de DeSantis, Ma, Sauer, Newman, & Jemal, 2017.

Tabla 5. Nuevos casos y muertes estimadas de mujeres con cáncer de mama por edad (Estados Unidos de América, 2017^a)

EDAD	CASOS CARCINOMA <i>IN SITU</i>		CASOS CÁNCER INVASIVO		MUERTES	
	NO.	%	NO.	%	NO.	%
<40	1,610	3%	11,160	4%	990	2%
40-49	12,440	20%	36,920	15%	3,480	9%
50-59	17,680	28%	58,620	23%	7,590	19%
60-69	17,550	28%	68,070	27%	9,420	23%
70-79	10,370	16%	47,860	19%	8,220	20%
80+	3,760	6%	30,080	12%	10,910	27%
Todas las edades	63,410		252,710		40,610	

a. Las estimaciones se redondean al 10 más cercano. Es posible que los porcentajes no sumen 100 debido al redondeo. Adaptado de DeSantis, Ma, Sauer, Newman, & Jemal, 2017.

- **Altura y peso:** La estatura adulta es un factor de riesgo para el cáncer de mama en las mujeres. Ciertos factores genéticos y vías biológicas que afectan la estatura

adulta tienen un papel importante en la etiología del cáncer de mama (Zhang, et al., 2015).

Los efectos del sobrepeso en el pronóstico del cáncer de mama parecen estar relacionados con el estado menopáusico (Sun, Zhu, Qian, & Tang, 2018). La obesidad se asocia con un mayor riesgo de cáncer de mama invasivo en mujeres posmenopáusicas (Neuhouser, et al., 2015); sin embargo, un alto índice de masa corporal (IMC) podría ser un factor protector en el riesgo de cáncer de mama para mujeres premenopáusicas (Liu, et al., 2018).

- **Historia reproductiva:** La edad temprana en la menarquia (<13) y la edad avanzada en la menopausia (≥ 50) aumentan el riesgo de contraer cáncer de mama (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2012).

La diferenciación celular inducida por el embarazo y otros cambios biológicos confieren una reducción a largo plazo del riesgo de cáncer de mama (**Figura 10**) (Russo & Russo, 2011; Meier-Abt, et al., 2013). La edad tardía en el primer parto y la nuliparidad estimulan preferentemente el crecimiento de los carcinomas de mama lobulillares (Newcomb, et al., 2011).

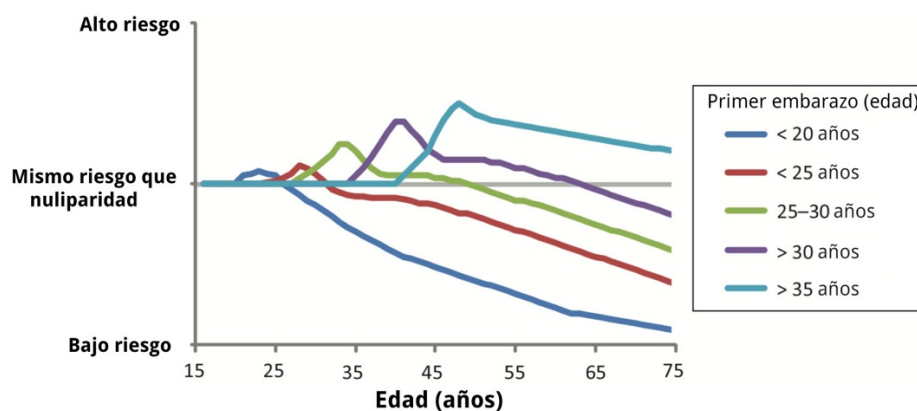


Figura 10. Efecto del embarazo y la edad de primer parto sobre el riesgo de cáncer de mama en humanos. Ilustración esquemática que demuestra: (I) el embarazo precoz disminuye el riesgo de cáncer de mama a largo plazo; (II) el efecto protector del embarazo sobre el cáncer de mama es mayor cuanto antes se haya producido el embarazo; (III) el embarazo conduce a un aumento transitorio en el riesgo de cáncer de mama después del parto; (IV) el aumento del riesgo de cáncer de mama asociado con el embarazo se hace más pronunciado con el aumento de la edad del primer embarazo. Adaptado de Meier-Abt & Bentires-Alj, 2014; Meier-Abt & Bentires-Alj, 2014.

- **Historia familiar:** Los antecedentes familiares son un factor de riesgo importante en casi todos los cánceres y presentan un patrón de herencia autosómico dominante (Daly, et al., 2016). Las mujeres con antecedentes familiares de cáncer de mama tienen un mayor riesgo de la enfermedad (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2001). Aproximadamente del 10% al 15% de todos los casos de cáncer de mama se consideran familiares (Foulkes, 2008).
- **Síndromes:** El cáncer de mama es el tumor más común en mujeres con síndrome de Li-Fraumeni, un síndrome de cáncer hereditario asociado con mutaciones de la línea germinal en el gen supresor de tumores *TP53* (Masciari, et al., 2012; Damini, et al., 2014). Como consecuencia de la regulación anormal del ciclo celular, aproximadamente el 50% de los portadores de mutación *TP53* desarrollan cáncer antes de los 30 años, con un riesgo acumulado de por vida de hasta el 70% en hombres y el 100% en mujeres (Chompret, et al., 2000; Nandikolla, Venugopal, & Anampa, 2017).

El diagnóstico de síndrome de Cowden implica un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama (Tan, et al., 2012; Seo, Cho, Ahn, & Moon, 2014). El síndrome de Cowden es un síndrome de cáncer hereditario autosómico dominante asociado con mutaciones de la línea germinal en *PTEN* (*Phosphatase and Tensin Homolog*), un gen supresor de tumores.

- **Mutaciones en *BRCA1/2*:** Aproximadamente del 3 al 5% de todos los cánceres de mama se deben a mutaciones en los genes de susceptibilidad al cáncer de mama *BRCA1* y *BRCA2* (Daly, et al., 2010; Hemel & Domchek, 2010), que están implicados en la reparación de ruptura de doble cadena por recombinación homóloga (Gudmundsdottir & Ashworth, 2006; O'Donovan & Livingston, 2010). Las mutaciones en *BRCA1* causan un riesgo de por vida de 60 a 80% de cáncer de mama; para *BRCA2* estas cifras son ligeramente más bajas, del 40% al 60% (Chen & Parmigiani, 2007; Mavaddat, et al., 2013).

3.2.5. Tratamientos

La elección de tratamiento (cirugía, radioterapia, terapia endócrina o quimioterapia) debe basarse en el estado del tumor (tamaño, ubicación del tumor primario, número de lesiones y grado de afectación de los ganglios linfáticos) y en la biología tumoral (patología, incluidos los biomarcadores y la expresión de genes), así como la edad y el estado general de salud del paciente (Senkus, et al., 2015). La decisión sobre las terapias sistémicas debe basarse preferentemente en el fenotipo intrínseco del cáncer de mama (**Tabla 6**).

Tabla 6. Recomendaciones de tratamientos sistémicos para los subtipos tempranos de cáncer de mama

Subtipo	Terapia recomendada
Luminal A	TE para la mayoría de los casos
Luminal B (HER2-)	TE y QT para la mayoría de los casos
Luminal B (HER2+)	TE, QT y anti-HER2 para todos los pacientes
HER2+/ER-	QT y anti-HER2
Basal o triple negativo	QT

ER: receptor de estrógeno; HER2: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano-2; QT: quimioterapia; TE: terapia endócrina. Adaptado de Senkus, et al., 2015.

El cáncer de mama es un cáncer dependiente de las hormonas. La mayoría de las células de cáncer de mama son receptores de hormona positivos (HR+) (**Figura 6**), y por tanto responderán a la reducción de los estrógenos circulantes inducida por la terapia endócrina (por lo que los cánceres de mama HR- no responderán a la terapia endócrina). Entre los tratamientos empleados en este tipo de terapia se encuentran:

- **Antiestrógenos:** se unen competitivamente a receptores de estrógenos (ER), inhibiendo la unión de los estrógenos. Por ejemplo: tamoxifeno y raloxifeno actúan en el ER isoforma alfa (ER α), mientras que TAS-108 actúa sobre el ER β .
- **Inhibidores de aromatasa:** La aromatasa, también conocida como estrógeno-sintasa, es una enzima responsable de la síntesis de estrógenos. Hay dos tipos:

esteroideo (tipo I) y no esteroideo (tipo II). El tipo esteroideo es un análogo andrógeno que se une permanentemente con la enzima aromatasa, lo que lleva a una inhibición a largo plazo y específica de la enzima; por ejemplo: exemestano. El tipo no esteroideo se origina a partir de un medicamento antiepiléptico que se une de manera reversible e inhibe la unidad del citocromo P450 en la aromatasa; por ejemplo: anastrozol y letrozol. Ambos tipos tienen buena eficacia y alta especificidad para la enzima aromatasa.

- **Supresión ovárica:** el agonista de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH, por sus siglas en inglés) se puede usar para suprimir reversiblemente la liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH) y, por tanto, la liberación de estrógenos. Por ejemplo: goserelina y leuprorelina.

Finalmente, la quimioterapia se recomienda en la gran mayoría de los cánceres de mama triple negativos, HER2+ y en los tumores luminales HER2– de alto riesgo (Senkus, et al., 2015). Los fármacos citotóxicos, como 5-fluorouracilo, arglabín, capecitabina, ciclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, metotrexato, paclitaxel, vinblastina, entre otros, y los fármacos anti-HER2 (como trastuzumab) se utilizan en los cánceres de mama HR– o HER2+ (Berry, et al., 2006; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2008; National Cancer Institute, 2018).

3.3. *Heterotheca inuloides* (árnica)

3.3.1. Generalidades

A lo largo de la historia de la humanidad, uno de los principales usos de las plantas ha sido el medicinal. Se ha documentado el uso de extractos vegetales en la medicina tradicional mexicana desde hace cinco siglos aproximadamente (Lira, Casas, & Blancas, 2016). La mayoría de los efectos terapéuticos de los remedios herbolarios se deben a la acción fisiológica que ejercen distintos compuestos orgánicos bioactivos sintetizados por las mismas plantas (Zhao, Davis, & Verpoorte, 2005). Dichos compuestos, mejor conocidos como metabolitos, incluyen ácidos fenólicos, alcaloides, cumarias, esteroides, flavonoides, lignanos, quinonas, taninos,

terpenoides (Bruneton, Fresno, Carretero-Accame, & Rebuelta-Lizabe, 2001; Yadav & Agarwala, 2011), entre otros. La amplia gama de metabolitos encontrada en distintas especies de plantas ha sido blanco de estudio con el objetivo de emplearlos como agentes terapéuticos de diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer (Desai, et al., 2008; Alonso-Castro, et al., 2011; Greenwell & Rahman, 2015; Jain, Dwivedi, Jain, Satpathy, & Patra, 2016). Durante el período comprendido entre la década de 1940 y el final de 2014, de las 136 moléculas (no biológicas) aprobadas por la *Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento del cáncer, 113 (o el 83%) son productos naturales *per se*, productos seminaturales derivados de un producto natural o productos sintéticos que han empleado como modelo un producto de origen natural (Newman & Cragg, 2016). Fármacos como arglabín, paclitaxel y vinblastina son de origen natural aislados de las especies *Artemisia glabella* (Lone, Bhat, & Khuroo, 2015), *Taxus brevifolia* (Wani, Taylor, Wall, Coggon, & McPhail, 1971) y *Catharanthus roseus* (Miura, Hirata, Kurano, Miyamoto, & Uchida, 1988), respectivamente.

En los últimos años se han investigado diversos aspectos relacionados con *Heterotheca inuloides* (mejor conocida como “árnica”) y las propiedades etnomedicinales, químicas y biológicas de los extractos y metabolitos secundarios de esta especie, los cuales demuestran potenciales beneficios terapéuticos, ecológicos y agronómicos. Entre sus principales propiedades terapéuticas se encuentran la analgésica, antimicrobiana, antiinflamatoria, antinociceptiva, antioxidante y antitumoral. Por lo que se ha empleado para tratar desórdenes gastrointestinales (diarrea, gastritis y úlceras gástricas), enfermedades de las vías biliares, dentales y vasculares, hematomas, infecciones, problemas dermatológicos (inflamación, cortes, protuberancias en la piel, quemaduras, picaduras de insectos y sarpullido), reumatismo, tos e incluso el cáncer (Winkelman, 1986; Zurita-Esquivel & Zolla, 1986; Juárez-Pérez, Reyes-Agüero, & Andrade-Aguilar, 1996; Hersch-Martínez, 1997; Ramos-Remus, et al., 1998; Ugent, 2000; Loredó-Medina, Rodríguez-Chávez, & Ramos-Espinosa, 2002; Navarro-Pérez & Avendaño-Reyes, 2002; Moreno-Salazar, Robles-Zepeda, & Johnson, 2008; Andrade-Cetto, 2009)

(Castillo-Juárez, et al., 2009; González-Stuart, 2010; Alonso-Castro, et al., 2011; Rosas-Piñón, et al., 2012; Monroy-Ortiz, et al., 2013; Bello-González, Hernández-Muñoz, Lara-Chávez, & Salgado-Garciglia, 2015; Esquivel-García, Pérez-Calix, Ochoa-Zarzosa, & García-Pérez, 2018),.

3.3.2. Constituyentes químicos

H. inuloides representa una fuente de compuestos químicos con diferentes patrones estructurales. Se han aislado más de 140 tipos distintos de compuestos del aceite esencial y extractos orgánicos de varias partes de esta especie (incluidas las raíces, las partes aéreas y las flores), tales como compuestos polifenólicos, triterpenos, fitoesteroles y sesquiterpenos (Rodríguez-Chávez, et al., 2017). En la **Tabla 7** se enlistan los compuestos principales aislados de *H. inuloides*.

Tabla 7. Principales compuestos químicos aislados a partir de extractos de *Heterotheca inuloides*

Extracto	Composición química (% en extracto)
Acetónico	Ácido cadalen-15-oico*
	7-hidroxicalaleno*
	7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno* (0.017)
	Quercetina ⁺ (0.028)
	β-sitosterol [#]
	Stigmasterol [#]
Metanólico	Quercetina ⁺ (0.19)
	Quercetina-3-O-glucósido ⁺
	Kaempferol ⁺
	Kaempferol-3-O-glucósido ⁺
	D-quirositol (0.09)
	Espinasterol [#] (0.04)
	Espinasterol-3-O-β-D-glucopiranosido [#] (0.05)
	7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno* (0.004)
	7-hidroxicalaleno* (0.002)

* sesquiterpeno; ⁺ compuesto polifenólico; [#] fitoesterol. Adaptado de Coballase-Urrutia, et al., 2010; Coballase-Urrutia, et al., 2011.

Los sesquiterpenos son una clase de terpenos que constan de tres unidades de isopreno y con frecuencia tienen la fórmula molecular $C_{15}H_{24}$. Se dividen en más de 100 subfamilias organizadas en tres familias: los farnesanos (**Figura 11A**), los farnesanos monocíclicos (p. ej. ciclofarnesanos, bisabolanos, germacranos, elemanos, humulanos) y los farnesanos policíclicos (p. ej. cariofilanos, guayanos, eudesmanos, chamigranos, daucanos, cadinanos) (Breitmaier, 2006). De esta última familia, la subfamilia de los cadinanos comprende distintos compuestos clasificados en función de la variación de su esqueleto básico (**Figura 11B**). Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, tales como, el muurolano, el bulgarano, el amorfano, el calameneno y el cadaleno (**Figura 11C**) (Bordoloi, Shukla, Nath, & Sharma, 1989).

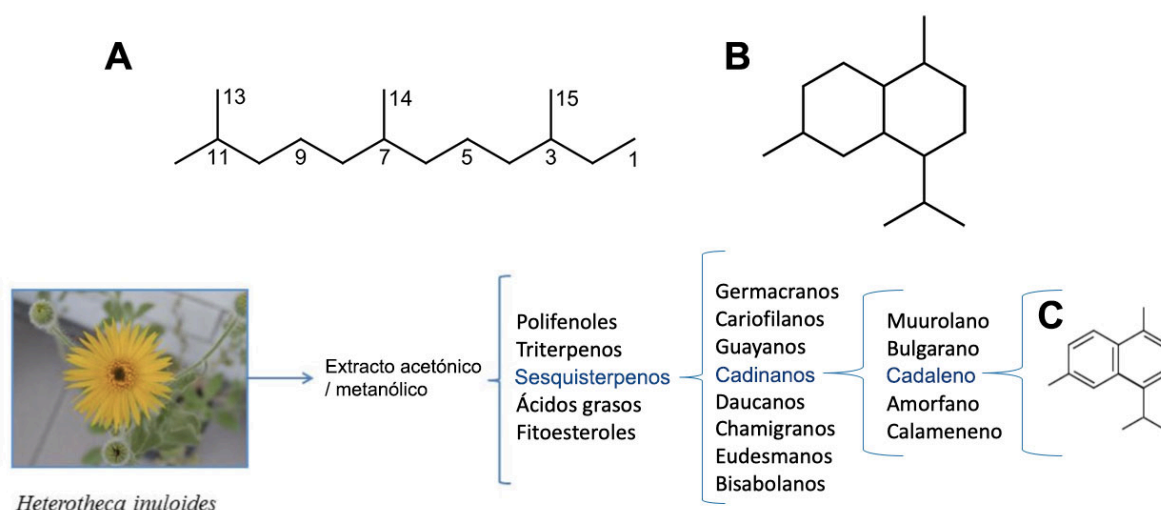


Figura 11. Composición química de *Heterotheca inuloides*. **A.** Estructura del farnesano (un sesquiterpeno); **B.** Esqueleto básico de los cadinanos; **C.** Esqueleto básico del cadaleno.

3.3.3. Cadalenos

Distintos análisis de las partes aéreas de *H. inuloides* demuestran la existencia de compuestos cadalenos como: el 4-metoxi-isocadaleno, el cadaleno (**Figura 11C**), 4-hidroxi-socadaleno, calacoreno, 2,3-epoxi-7-hidroxi- β -calacoreno, ácido cadalen-15-oico, dicadalenol, 7-hidroxi-14-cadalenal, 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno y 7-hidroxicadaleno (Bohlmann & Zdero, 1976; Sagrero-Nieves & Bartley, 1996;

Delgado, et al., 2001; Egas, et al., 2015; Rodríguez-Chávez, et al., 2017), entre otros. Se ha demostrado que de los distintos efectos terapéuticos de *H. inuloides* mencionados anteriormente, el efecto citotóxico-anticancerígeno es debido a la presencia de cadalenos, específicamente el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenos (**Figura 12A**) y el 7-hidroxicadalenos (**Figura 12B**) (Kubo, et al., 1996).

Por otra parte, se cree que la sustitución del grupo hidroxilo por un grupo fenilcarbamato en el carbono 7 de estos compuestos, podría mejorar su actividad con la formación de dos nuevos compuestos seminaturales: el 7-(fenilcarbamato)-3,4-dihidrocadalenos y el 7-(fenilcarbamato)-cadalenos (**Figura 12**) (Egas, et al., 2017).

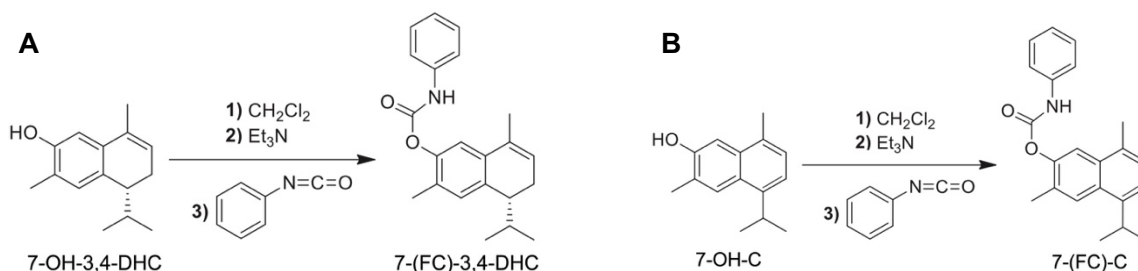


Figura 12. Cadalenos naturales y seminaturales aislados o sintetizados a partir de *H. inuloides*. **A.** Síntesis del derivado seminatural 7-(fenilcarbamato)-3,4-dihidrocadalenos (7-(FC)-3,4-DHC) a partir del compuesto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenos (7-OH-3,4-DHC); **B.** Síntesis del derivado seminatural 7-(fenilcarbamato)-cadalenos (7-(FC)-C) a partir del compuesto natural 7-hidroxicadalenos (7-OH-C). Adaptado de Egas, et al., 2017.

3.4. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

3.4.1. Definición

Los radicales libres son intermediarios reactivos de corta duración en las reacciones químicas. Entre estos radicales existen las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés). Las ROS son un grupo heterogéneo de iones y moléculas altamente reactivas derivadas del oxígeno molecular (O₂) que incluyen no sólo las especies con electrones no apareados (o especies radicales) como los radicales hidroxilo (OH•), anión superóxido (O₂^{•-}), óxido nítrico (NO•), radicales orgánicos

(R•), radicales peroxil (ROO•), radicales alcoxil (RO•) y radicales sulfonilo (ROS•), sino también moléculas en las que todos los electrones están apareados (o especies no radicales), como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), oxígeno singulete (¹O₂), ozono/trioxígeno (O₃), hidroperóxidos orgánicos (ROOH), hipoclorito (HOCl), peroxinitrito (ONO⁻), anión nitrosoperoxicarbonato (O=NOOCO₂⁻), anión nitrocarbonato (O₂NOCO₂⁻) y dióxido de dinitrógeno (N₂O₂) (Geou-Yarh & Storz, 2010).

3.4.2. Generación

Las ROS se forman continuamente en las células, principalmente como subproductos de la elaboración y almacenamiento de energía a través de una gran variedad de vías sintéticas o degradativas; por ejemplo, el O₂^{•-} puede ser dismutado rápidamente por la superóxido dismutasa (SOD) y formar H₂O₂. En presencia de Fe²⁺ o Cu²⁺, el H₂O₂ puede ser convertido en OH• mediante la llamada “reacción de Fenton”. Simultáneamente, el O₂^{•-} puede reaccionar con el H₂O₂ y generar OH• (D'Autréaux & Toledano, 2007). Las ROS tienen diferentes capacidades de difusión y reactividades hacia sus blancos; por ejemplo, el OH• es extremadamente reactivo y no difunde fuera de su sitio de formación, mientras que el O₂^{•-} es altamente activo y tiene una capacidad de difusión limitada. En contraste, el H₂O₂ difunde fácilmente a través de las membranas haciéndolo un candidato ideal para la señalización intracelular (Sena & Chandel, 2012).

Las ROS pueden formarse a través de diferentes factores, tanto exógenos como endógenos. En mamíferos, la cadena de transporte de electrones (CTE) mitocondrial es la mayor fuente intracelular de ROS (Saybaşili, Yüksel, Haklar, & Yalçin, 2001) ya que del O₂ mitocondrial total consumido, 1-2% se desvía a la formación de ROS, principalmente a nivel de complejo I y complejo III de la CTE, en donde el O₂^{•-} es formado por la reducción del O₂ (Staniek, Gille, Kozlov, & Nohl, 2002; Turrens, 2003; Muller, Liu, & Remmen, 2004; Murphy, 2009; Nickel, Kohlhaas, & Maack, 2014). No obstante, la CTE no es la única fuente de ROS, y se han identificado otras fuentes endógenas en donde participan las enzimas xantina

oxidasas (XO), NADPH oxidasas (NOX), lipooxigenasas (LOX) y el citocromo P450, de hecho, se han identificado hasta 10 sistemas mitocondriales potenciales generadores de ROS (Andreyev, Kushnareva, & Starkov, 2005) (Andreyev, Kushnareva, Murphy, & Starkov, 2015). Adicionalmente, la generación de ROS puede ser facilitada por factores exógenos como la radiación, agentes químicos, metales pesados, contaminantes, etc. (Bhattacharyya, Chattopadhyay, Mitra, & Crowe, 2014).

3.4.3. Regulación

El equilibrio entre la producción y la eliminación de ROS es de importancia crítica, ya que se han vinculado a numerosos procesos biológicos y enfermedades (Alfadda & Sallam, 2012; Briegera, Schiavonea, Jr., & Krause, 2012; Görlach, et al., 2015; Manoharan, et al., 2016). Niveles basales de algunas ROS pueden actuar en procesos biológicos esenciales como mediadores secundarios en la señalización intracelular para regular numerosas respuestas fisiológicas y biológicas (Sena & Chandel, 2012; Schieber & Chandel, 2014). Los ejemplos de estos procesos celulares incluyen la señalización de factores de crecimiento, la transducción de señales hipóxicas, la autofagia, las respuestas inmunes, la proliferación y diferenciación de las células troncales (Holmström & Finkel, 2014; Reczek & Chandel, 2015). Sin embargo, la falta de equilibrio entre los sistemas que generan y eliminan los radicales libres, condición llamada “estrés oxidante”, conduce a la acumulación de niveles más altos de ROS que interrumpen los procesos celulares al reaccionar de manera no específica con las biomoléculas cruciales: las proteínas, los lípidos (principalmente membranas celulares) y el DNA (Schumacker, 2015) (**Figura 13**). El equilibrio redox celular generalmente se mantiene mediante un potente sistema antioxidante con el fin de mantener la homeostasis redox (Birben, Sahiner, Sackesen, Erzurum, & Kalayci, 2012; Hanschmann, Godoy, Berndt, Hudemann, & Lillig, 2013; Pisoschi & Pop, 2015). Estos sistemas antioxidantes se pueden dividir en 1) enzimático: como el sistema SOD, la catalasa, las peroxirredoxinas (PRXs), el sistema de glutatión peroxidasa (GPX), las glutarredoxinas (GRXs), las tiorredoxinas (TRXs) (**Figura 14**), etc. y 2) no

enzimático: entre los antioxidantes exógenos se encuentran el ácido ascórbico, el α -tocoferol, β -caroteno, resveratrol, ácido caféico, flavonoides, etc., y de los antioxidantes endógenos, el glutatión (GSH), el ácido úrico, la bilirrubina, la coenzima Q, el ácido α -lipoico, la melatonina, entre otros.

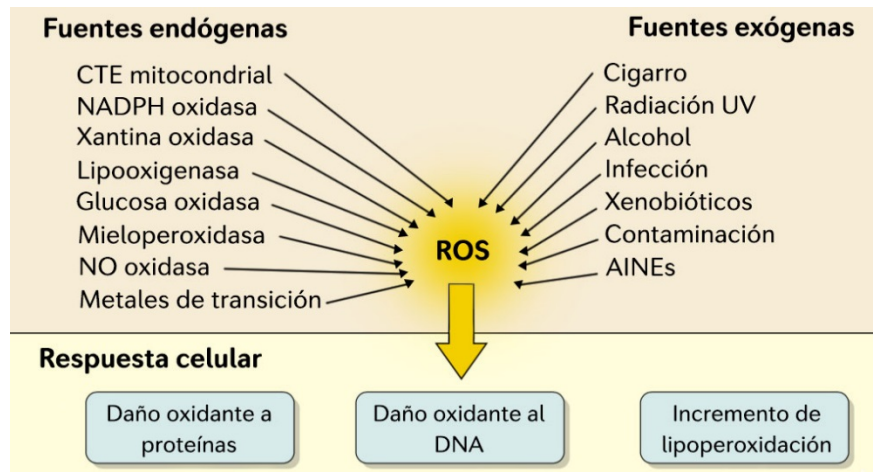


Figura 13. Factores endógenos y exógenos para la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y principales efectos celulares debido al estrés oxidante. AINE: antiinflamatorio no esteroideo; CTE: cadena de transporte de electrones; NO: óxido nítrico; UV: ultravioleta. Adaptado de Bhattacharyya, Chattopadhyay, Mitra, & Crowe, 2014.

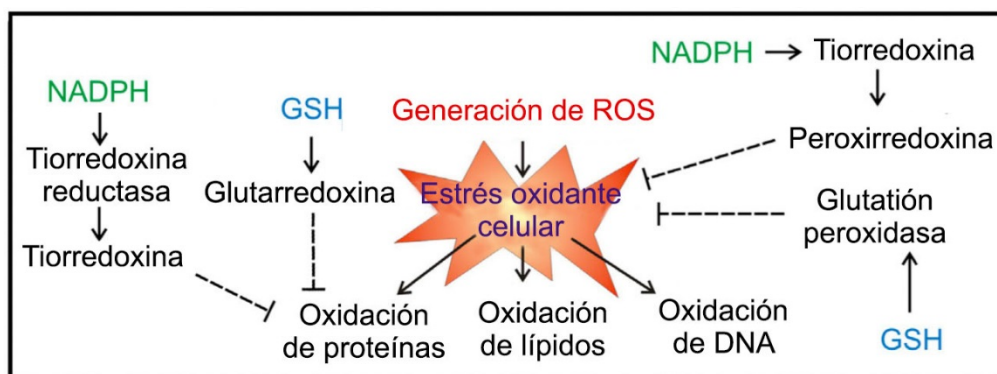


Figura 14. En respuesta al estrés oxidante, las peroxirredoxinas y la glutatión peroxidasa son las encargadas de eliminar los hidroperóxidos, mientras que las tiorredoxinas y las glutarredoxinas reparan las proteínas oxidadas. El glutatión (GSH) es importante para la función de algunas peroxidasa y para prevenir la oxidación excesiva de proteínas. Adaptado de Schumacker, 2015.

3.4.4. Estrés oxidante y carcinogénesis

Las células malignas tienen altos niveles de ROS en comparación con sus contrapartes normales. Esto puede deberse en parte al metabolismo oxidativo mitocondrial defectuoso (Tafari, et al., 2015). La señalización oxidativa elevada puede estar implicada en la promoción y progresión de diversos tipos de cáncer, incluidos el melanoma, el hepatoma, la leucemia, el glioma, los cánceres de mama, páncreas, vejiga, colon, pulmón y próstata (Prasad, Gupta, & Tyagi, 2017).

En procesos celulares normales, las ROS se generan de manera basal y se expresan antioxidantes para regular los niveles intracelulares de radicales de oxígeno. En el cáncer, las ROS juegan un papel doble. Por una parte, los eventos tumorigénicos pueden aumentar los niveles de ROS intracelulares y promover la progresión tumoral mediante el favorecimiento del ciclo celular, una mayor proliferación y señalización de supervivencia, la transición epitelio-mesénquima, una mayor motilidad e inestabilidad genómica. Este papel promotor de la señalización tumoral hace que las ROS se consideren oncogénicas; no obstante, puede ser regulado negativamente por antioxidantes terapéuticos. Por otra parte, el aumento excesivo de los niveles de ROS intracelulares puede inducir la detención del ciclo celular, la senescencia o la muerte celular de las células tumorales. En el contexto de este estado redox desequilibrado, las células malignas se adaptan y aumentan las vías y los reguladores antioxidantes, lo que lleva a un aumento del secuestro de ROS a fin de mantener niveles que permitan las vías de señalización pro-tumorigénicas sin inducir muerte celular (**Figura 15**) (Glasauer & Chandel, 2014; Galadari, Rahmana, Pallichankandy, & Thayyullathil, 2017).

Las estrategias terapéuticas que aumentan la generación de ROS y/o disminuyen la defensa antioxidante, pueden matar selectivamente las células tumorales suprimiendo el crecimiento y la progresión tumoral mediante la activación de diferentes vías de muerte celular, limitando la progresión del cáncer. La especificidad citotóxica preferente con la que actúan las ROS sobre las células malignas radica en el equilibrio redox de estas, ya que las células no tumorales

tienen un entorno redox diferente y, por tanto, son menos sensibles a la manipulación redox.

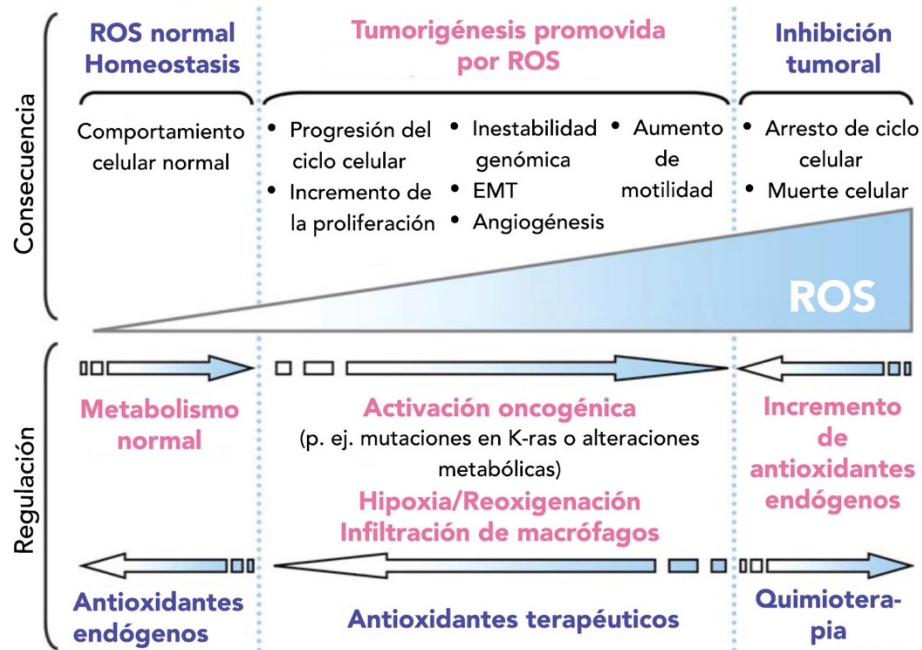


Figura 15. Generación, regulación y efectos de las ROS celulares. EMT: Transición epitelio-mesénquima; ROS: Especies reactivas de oxígeno. Adaptado de Liou & Storz, 2010.

En las células normales, la pérdida de ROS, o de antioxidantes, causa solo pequeños cambios en su homeostasis, lo que hace que las células sean viables y funcionales. Sin embargo, dado que las células malignas tienen más ROS y antioxidantes, pueden ser más susceptibles a los cambios en los niveles de estos. Por una parte, la prevención de la generación de ROS causará que las células malignas pierdan suficiente señal ROS para mantener el crecimiento; el resultado es la citostasis y posiblemente la senescencia. Por otro lado, la inhibición de los antioxidantes o el aumento de la generación de ROS, resultará en un exceso de ROS en las células malignas y la posterior muerte de estas (**Figura 16**).

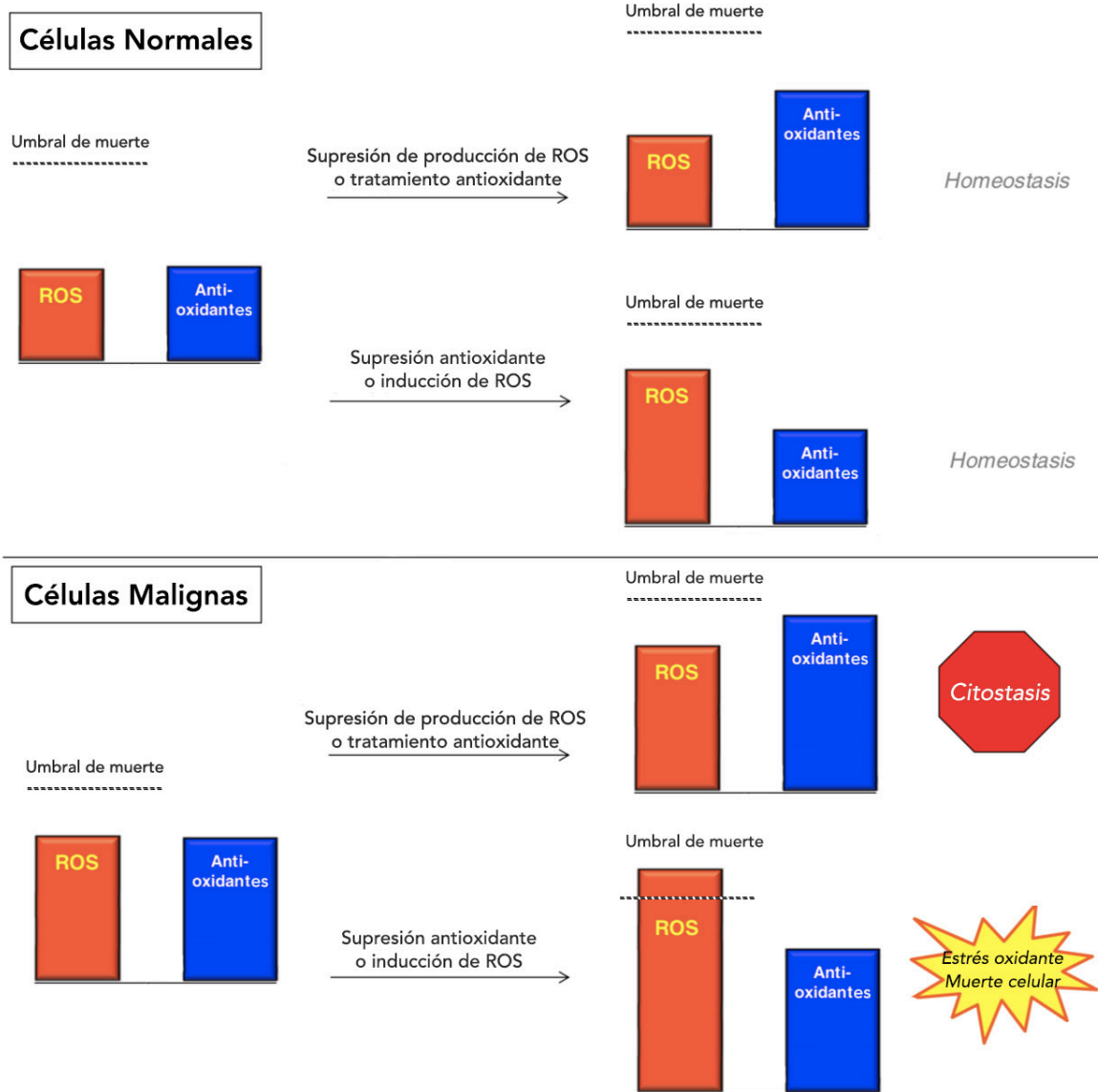


Figura 16. Modificar los niveles de ROS de las células malignas como blanco terapéutico. Adaptado de Sullivan & Chandel, 2014.

La propiedad de la "espada de doble filo" de las ROS permite la inducción de la supervivencia o muerte de las células malignas en función de los niveles de ROS intracelulares. Por lo tanto, las estrategias de manipulación del equilibrio redox, es decir, las formas de eliminar o producir ROS en las células tumorales, pueden ser potencialmente efectivas en las terapias contra el cáncer, mediante el uso de agentes pro-oxidantes sin causar una toxicidad significativa para las células normales.

4. Planteamiento del problema

A pesar de que se ha comprobado que el efecto citotóxico-anticancerígeno de *Heterotheca inuloides* se debe en gran parte a la presencia de los compuestos naturales 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno y 7-hidroxicadaleno, el mecanismo de acción por el cual actúan como agentes citotóxicos en distintas líneas tumorales y su regulación aún permanecen desconocidos. Además, se ha propuesto que la sustitución de su grupo hidroxilo por un grupo fenilcarbamato podría mejorar las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos y, por tanto, sus actividades citotóxicas.

5. Hipótesis

La incorporación del grupo fenilcarbamato en el carbono número 7 de los compuestos naturales 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno y 7-hidroxicadaleno, aislados a partir de *Heterotheca inuloides*, aumentará el efecto citotóxico de los mismos en la línea celular de adenocarcinoma de glándula mamaria humana (luminal A), MCF7.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Evaluar el efecto citotóxico del compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenol y de los derivados 7-(fenilcarbamato)-3,4-dihidrocadalenol y 7-(fenilcarbamato)-cadalenol en células derivadas de adenocarcinoma de glándula mamaria humana y elucidar el posible mecanismo de acción.

6.2. Objetivos particulares

- Determinar la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de los compuestos aislados en la línea celular MCF7.
- Identificar el compuesto con el mayor potencial citotóxico, determinando y analizando las propiedades fisicoquímicas *in silico* de los compuestos en estudio.
- Evaluar el efecto de la concentración y el tiempo de exposición de los compuestos aislados a partir de *Heterotheca inuloides* sobre la viabilidad, proliferación y migración en las células MCF7.
- Medir la concentración intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el nivel de peroxidación lipídica después de la exposición de los compuestos aislados en la línea celular MCF7.
- Discernir si el efecto citotóxico de los compuestos en estudio sobre la línea celular MCF7 es mediado a través de apoptosis.

7. Metodología

7.1. Cultivo y tratamiento celular

La línea celular MCF7, derivada de adenocarcinoma de mama humana (luminal A), fue obtenida de la *American Type Culture Collection* (ATCC, UK). Estas células se mantuvieron en condiciones estándar: medio *Roswell Park Memorial Institute-1640* (RPMI-1640, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) con rojo de fenol, NaHCO_3 2.0 g/L, enriquecido con suero fetal bovino al 10% (SFB, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) y gentamicina 50 mg/mL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) en una incubadora humidificada con 5% de CO_2 a 37°C.

Para los ensayos de MTT, colorante azul tripano y DCFH-DA, las células se cultivaron en una microplaca de 96 pozos hasta alcanzar una confluencia del 80-90%, por triplicado, con medio RPMI suplementado con SFB al 1% y 24 horas después fueron tratadas como se explica más adelante.

Los compuestos aislados 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenol, 7-(fenilcarbamato)-3,4-dihidrocadalenol y 7-(fenilcarbamato)-cadalenol fueron disueltos y filtrados en dimetilsulfóxido (DMSO, Panreac, Barcelona, España) obteniendo una concentración final de 40, 20 y 15 mM, respectivamente, y posteriormente diluidos en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Por otra parte, el control positivo (Z)-4-hidroxitamoxifen (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EUA) fue disuelto en etanol absoluto y posteriormente diluido en PBS.

7.2. Determinación de viabilidad celular por ensayo de MTT

Las células se trataron con los tres compuestos aislados empleando siete concentraciones diferentes (0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 y 100 μM) y con (Z)-4-hidroxitamoxifen (1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0 y 100 μM) como control positivo de la validación del método. La actividad metabólica se determinó mediante

el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a las 24, 48 y 72 horas después de aplicar el tratamiento. En el tiempo requerido, el medio de cultivo fue reemplazado por 100 μ L de MTT disuelto en medio RPMI (concentración final de 0.33 mg/mL) por pozo y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5% durante 1 hora en ausencia de luz. Después del tiempo de incubación, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 μ L de DMSO para disolver los cristales de formazán. El valor de absorbencia de cada muestra se midió con un lector de microplacas (SPECTROstar Nano, BMG Labtech) a una longitud de onda de 570 nm. Se realizaron las mediciones y la concentración requerida para inhibir el 50% de las células (IC₅₀) se determinó gráficamente empleando GraphPad Prism versión 7.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). El porcentaje de viabilidad celular de cada tratamiento se calculó comparando con el control, que contenían únicamente células con medio RPMI-1640 (SFB 1%), mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad celular} = (\text{células MCF7 tratadas} / \text{células MCF7 control}) \times (100)$$

7.3. Análisis *in silico*

Con el objetivo de predecir las propiedades fisicoquímicas (peso molecular, coeficiente de partición, solubilidad acuosa, coeficiente de distribución a pH=7.4, número de donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, área de superficie polar topológica y número de enlaces que pueden rotarse) de los compuestos aislados, se empleó el software Osiris Data Warrior (<http://www.openmolecules.org/datawarrior/>). La "Regla del cinco" propuesta por Lipinski, Lombardo, Dominy, & Feeney (1997), los dos criterios de Veber, et al. (2002) y Ghose, Viswanadhan, & Wendoloski (1999) y los ocho parámetros de propiedades fisicoquímicas moleculares de acuerdo con Singh (2016) fueron considerados para elegir el compuesto con mejor potencial anticancerígeno.

7.4. Determinación de proliferación celular por ensayo del colorante de exclusión azul de tripano

La proliferación celular se evaluó utilizando el ensayo del colorante de exclusión azul de tripano en diferentes tiempos de incubación (0, 2, 4, 8, 24, 48 y 72 h) empleando la IC₅₀ y la IC₅₀/2 del compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocaleno. En cada tiempo requerido, los medios de cultivo fueron drenados, las células se despegaron con tripsina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) y se lavaron por centrifugación. Posteriormente, se agregaron 0.9 mL de medio fresco para disolver el cúmulo celular y en seguida las células se tiñeron con 10 µL de azul de tripano (0.4% m/v en PBS). En cada preparación, el número de células viables y muertas se contó con un hemocitómetro Neubauer (E.leitz Wetzlar Thoma, Alemania) bajo un microscopio invertido. Se realizaron los recuentos y se calculó el porcentaje de proliferación celular de cada tratamiento comparando con el control, que contenían solo células con medio RPMI-1640 (SFB 1%), mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de proliferación celular} = \frac{[(\text{células MCF7 viables} \times 10^4) \times 100]}{\text{células MCF7 control}}$$

7.5. Cuantificación de migración celular por ensayo de *wound-healing*

Este ensayo se realizó para mimetizar la migración de la línea MCF7. Las células se sembraron por triplicado en placas de seis pozos en condiciones estándar hasta alcanzar una confluencia del 90-100%, seguido de la formación de una herida en la monocapa por la raspadura de una punta de micropipeta, posteriormente las células se trataron con H₂O₂ 1.0 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), la IC₅₀ y la IC₅₀/2 de compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocaleno en medio RPMI suplementado con SFB al 1%. Se monitorearon las áreas de las heridas en cuatro tiempos diferentes (0, 24, 48 y 72 h) utilizando el multilector de imágenes celulares Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc). Para determinar la tasa de migración de las células se cuantificaron las áreas de herida empleando el software ImageJ (Schneider,

Rasband, & Eliceiri, 2012). La variación entre el porcentaje de migración celular (en función del tiempo) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Migración} = 100 - [(\text{Área de herida tiempo } t / \text{Área de herida tiempo cero}) \times (100)]$$

7.6. Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) por ensayo de 2',7' diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares se detectaron mediante el compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). El DCFH-DA es oxidado por esterasas intracelulares produciendo diclorofluoresceína (DCF) que es un compuesto fluorescente en presencia de un oxidante. Las células se trataron con H₂O₂ 1.0 mM (como control positivo de la producción de ROS), IC₅₀ y la IC₅₀/2 del compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno. Después de 48 h de incubación, el medio de cultivo se reemplazó con 200 µL de DCFH-DA 20 µM (preparada en solución de glucosa 1.8 mg/mL en PBS) por pozo y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos. Las células se lavaron con solución de glucosa, el sobrenadante se eliminó y nuevamente se reemplazó con 200 µL de solución de glucosa. La intensidad de fluorescencia de DCF se midió utilizando un lector de fluorescencia de microplacas FLx800 (BioTek Instruments, Inc.) a longitudes de onda de excitación y emisión de 480 y 530 nm, respectivamente.

El porcentaje de ROS se calculó comparando el control, que contenían sólo las células con el medio, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ROS} = (\text{Fluorescencia de células tratadas} / \text{Fluorescencia de células control}) \times (100)$$

7.7. Extracción proteica por lisis celular

Se empleó el raspado mecánico para recolectar las células MCF7 después de 48 h de incubación en presencia de H₂O₂ 1.0 mM, IC₅₀ e IC₅₀/2 del 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno, posteriormente se centrifugaron (1500 rpm durante 5 min a 37°C) y los sobrenadantes fueron eliminados. Después de un lavado con 1 mL de PBS y posterior centrifugación, los cúmulos celulares se congelaron a -80°C.

Los precipitados celulares se lisaron agregando 300 µL de buffer de lisis (Tris·HCl 25 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 0.1%, leupeptina 1 mg/mL, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.5 mM y pepstatina 1 mg/mL) y manteniendo en hielo durante 20 minutos. Los lisados celulares se centrifugaron (2500 rpm durante 10 minutos a 4°C) y los sobrenadantes se recolectaron para ensayos posteriores.

7.8. Cuantificación proteica por ensayo de ácido bicinchonínico (BCA)

Las concentraciones de proteínas totales se midieron a través de espectrofotometría mediante el método descrito por (Smith, et al., 1985). Se construyó una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) con las concentraciones: 0.00, 0.08, 0.16, 0.24, 0.32, 0.40, 0.60, y 0.80 µg/µL por triplicado, a partir de un *stock* de BSA 1.0 µg/µL (con volumen final de 25 µL empleando *buffer* de lisis). Por otra parte, se añadieron 3 µL de cada lisado celular por triplicado y se añadió *buffer* de lisis hasta un volumen final de 25 µL. Finalmente, se agregaron 200 µL de solución reactiva de BCA/CuSO₄ (1:20) a cada preparación y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a 37°C. El valor de absorbencia de cada pocillo se midió con un lector de microplacas (SPECTROstar Nano, BMG Labtech) a una longitud de onda de 550 nm.

7.9. Determinación de peroxidación lipídica por ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Las concentraciones de TBARS se midieron colorimétricamente mediante el método descrito por (Uchiyama & Mihara, 1978), que se basa en la determinación espectrofotométrica de un complejo rosado formado después de la reacción del ácido 2-tiobarbitúrico (2-TBA) con el malondialdehído (MDA) como consecuencia de la peroxidación lipídica. Para la determinación, se homogeneizaron 125 μL de cada *pellet* tratado (congelado a -80°C y descongelado a temperatura ambiente) en 250 μL de solución de TBARS: 2-TBA 28.2 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) en ácido tricloroacético (16%) y HCl (0.27 N), refrigerado a 4°C durante no más de dos días. Posteriormente las mezclas se calentaron por 10 min a 100°C e inmediatamente se enfriaron en hielo para detener la reacción. El sobrenadante de cada muestra (100 μL) se separó por centrifugación (3000 rpm durante 10 min a 4°C) y se leyó en un lector de microplacas (SPECTROstar Nano, BMG Labtech) para medir la absorbencia (Abs) a 530 nm. Los valores de TBARS se expresaron como nmol/mg de proteína de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{TBARS (nmol/mg)} = [(\text{Abs}_{530} \times \text{volumen de muestra}) / (\epsilon_{\text{TBARS}} \times \text{volumen total} \times \text{mg de proteína/L})] \times 10^9$$

7.10. Actividad de caspasas-3/9:

Los ensayos fluorométricos de caspasa-3 y caspasa-9 se realizaron de acuerdo con las instrucciones proporcionadas con los kits de ensayo (ALEXIS Biochemicals, Enzo Life Sciences Inc., San Diego, CA). Este ensayo enzimático se basó en la hidrólisis de los sustratos peptídicos de las caspasas-3/9 (acetil-Asp-Glu-Val-Asp o Ac-DEVD 20 μM y acetil-Leu-Glu-His-Asp o Ac-LEHD 20 μM , respectivamente) conjugados a un fluorocromo (7-amido-4-metilcumarina o AMC) en el carbono terminal del Asp, dando como resultado la liberación del motivo fluorescente. Los sustratos Ac-DEVD-AMC y Ac-LEHD-AMC no son permeables a las células, por lo

tanto se emplearon 20 µg de lisados celulares para cada tratamiento. Después de incubar 1 h a 37°C, la fluorescencia se determinó utilizando un lector de microplacas FLx800 (BioTek Instruments, Inc.) a longitudes de onda de excitación y emisión de 380 y 460 nm, respectivamente.

7.11. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los ensayos de MTT, azul de tripano, migración, DCFH-DA, TBARS y actividad de caspasas-3/9 fueron analizados y graficados utilizando el software GraphPad Prism versión 7.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) y Microsoft Office Excel versión 16.17 para macOS, mientras que el análisis estadístico fue realizado utilizando la prueba de ANOVA de una o dos vías seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, de Dunnett o de Sidak. Los valores $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

8. Resultados

8.1. Únicamente el compuesto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno posee efecto citotóxico tiempo-concentración dependiente contra la línea celular MCF7

Inicialmente, se evaluó la viabilidad celular de la línea celular MCF7 tratada con diferentes concentraciones (de 0.1 μM a 100 μM) y tiempos de exposición (24, 48 y 72 horas) de los tres compuestos aislados mediante el ensayo de MTT con el objetivo de determinar la citotoxicidad de estos. Los resultados muestran diferencias en el porcentaje de viabilidad celular respecto a cada compuesto aislado (**Figura 17**). Como se aprecia en la **Figura 17A**, el compuesto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno posee una actividad citotóxica al reducir la viabilidad celular de una manera tiempo y concentración dependiente, cuyo mayor efecto se encuentra a las 48 y 72 horas sin diferencia significativa entre estos; sin embargo, existe diferencia significativa entre las 24-48 h y 24-72 h de exposición. El perfil citotóxico del 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno pudo ser linealizado para determinar las ecuaciones de la recta y calcular las IC_{50} a las 48 y 72 horas, siendo de 55.24 y 52.83 μM , respectivamente.

A diferencia del 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno, el efecto citotóxico de los compuestos seminaturales fue remarcablemente menor (**Figura 17B, C**). Tanto el 7-(fenilcarbamato)-3,4-dihidrocadaleno como el 7-(fenilcarbamato)-cadaleno no presentaron una tendencia lineal tiempo-concentración dependiente en la reducción de la viabilidad de la línea MCF7, por lo que no fue posible determinar las IC_{50} correspondientes.

El método de MTT fue validado empleando un inhibidor de receptores de estrógenos (altamente expresados en MCF7) y se encontró una IC_{50} a las 24 h de 16.50 μM (**Figura 17D**).

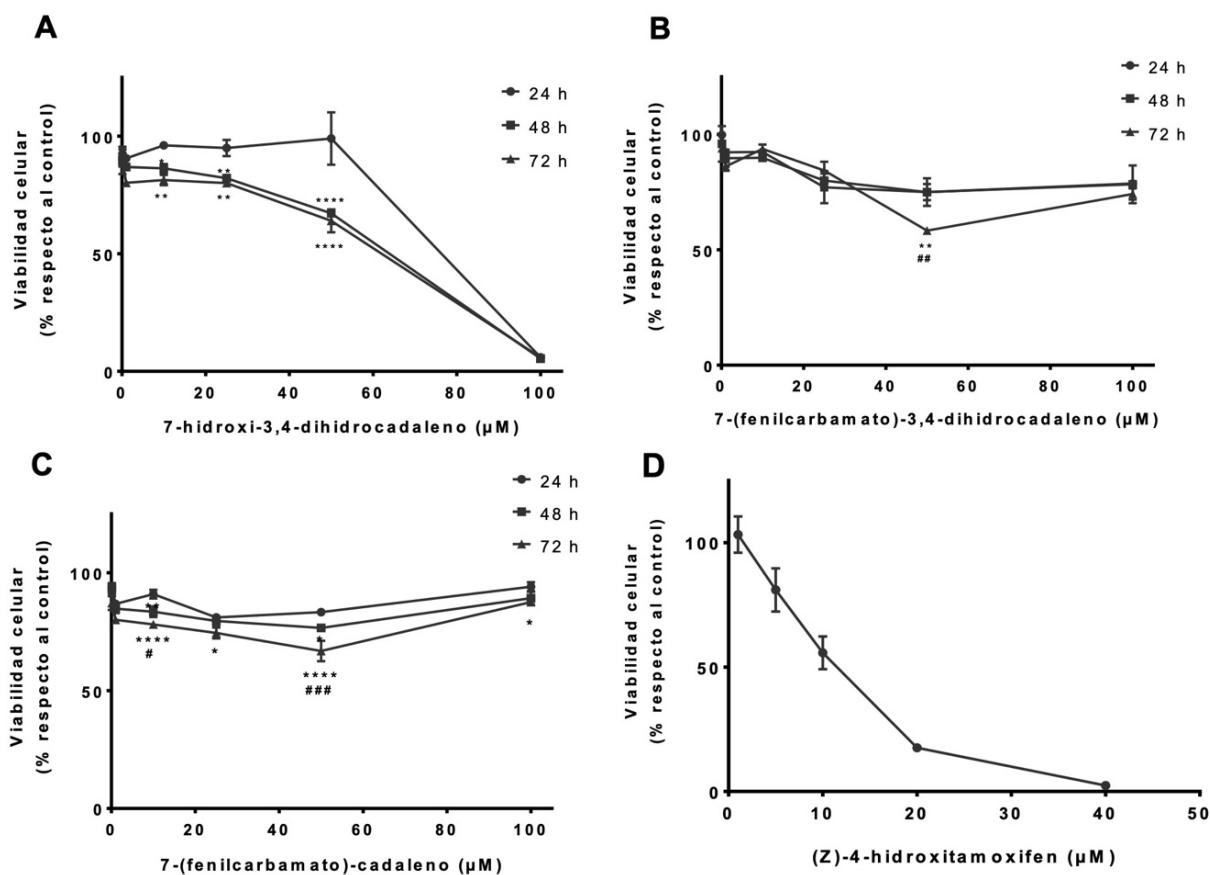


Figura 17. Efecto sobre la viabilidad celular. Las células de adenocarcinoma de mama humano (MCF7) se trataron con un intervalo de concentraciones de 0.1 µM a 100 µM durante 24, 48 y 72 horas con **A.** 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno, **B.** 7-(fenilcarbamato)-3,4-dihidrocadaleno y **C.** 7-(fenilcarbamato)-cadaleno antes de realizar el ensayo de MTT; **D.** Validación del método empleando como control positivo (Z)-4-hidroxitamoxifen en un intervalo de concentraciones de 1.0 µM a 100 µM durante 24 h. (* p<0.05, ** p<0.01 y **** p<0.0001 versus 24 h; # p<0.05, ## p<0.01 y #### p<0.001 versus 48 h).

8.2. El producto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno tiene mejores propiedades fisicoquímicas con potencial citotóxico

La farmacocinética es una de las principales limitaciones terapéuticas en la investigación y el desarrollo de nuevos medicamentos. Se han descrito propiedades fisicoquímicas clave relacionadas con la absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADME) para que los agentes anticancerígenos tengan una biodisponibilidad óptima y no sean tóxicos. Por lo tanto, utilizando estudios *in silico*,

predijimos diferentes características fisicoquímicas que limitaron la actividad anticancerígena incluyendo peso molecular (M_w), liposolubilidad ($\log P$), solubilidad acuosa ($\log S$ y S), número de aceptores y donadores de puentes de hidrógeno (HBA y HBD, respectivamente), superficie polar de área topológica (TPSA), número de enlaces giratorios (n_{Rot}) y coeficiente de distribución a $pH = 7.4$ ($\log D$). La **Tabla 8** muestra que el peso molecular de los tres compuestos estudiados fue menor a 350 g/mol, siendo especialmente inferior para el producto natural (216.3 g/mol). Observamos que ninguno de los compuestos estudiados tiene grupos ionizables, como lo demuestran los valores idénticos para $\log P$ y $\log D$. Además, los valores de $\log S$ fueron -4.23 para 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleño, -6.65 para 7-(fenilcarbamato)-3,4-dihidrocadaleño y -7.47 para 7-(fenilcarbamato)-cadaleño. El número de donadores de puentes de hidrógeno es idéntico para los tres compuestos, mientras que el número de aceptores de puentes de hidrógeno es 3 para compuestos seminaturales y 1 para el producto natural. También hay diferencias entre TPSA y n_{Rot} entre el producto natural y los compuestos seminaturales.

Tabla 8. Estimación del peso molecular (M_w), coeficiente de partición ($\log P$), solubilidad acuosa ($\log S$ y S), coeficiente de distribución a $pH=7.4$ ($\log D$), número de aceptores y donadores de puentes de hidrógeno (HBA y HBD), área de superficie polar topológica (TPSA) y número de enlaces que pueden rotarse (n_{Rot}) utilizando el software Osiris Data Warrior (<http://www.openmolecules.org/datawarrior/>).

	7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleño	7-(fenilcarbamato)-3,4-dihidrocadaleño	7-(fenilcarbamato)-cadaleño
Fórmula Molecular	$C_{15}H_{20}O$	$C_{22}H_{25}NO_2$	$C_{22}H_{23}NO_2$
M_w (g/mol)	216.323	335.446	333.430
LogP	4.548	6.122	6.699
LogS	-4.227	-6.657	-7.466
S (mg/mL)	12.817	0.074	0.011
LogD	4.55	6.12	6.70
HBA	1	3	3
HBD	1	1	1
TPSA (Å)	20.23	38.33	38.33
n_{Rot}	1	4	4

Se ha establecido que los compuestos anticancerígenos deben tener propiedades ideales de ADME según sus características fisicoquímicas.

Respecto a los compuestos evaluados, los derivados seminaturales no cumplen con uno de los parámetros descritos en la bibliografía para dos propiedades fisicoquímicas (logS y HBA) ni con tres de los rangos relacionados con el logP. Por lo tanto, de los tres compuestos, este estudio *in silico* sugiere que el producto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno tiene mejores propiedades fisicoquímicas para ser un prometedor agente anticancerígeno que los dos compuestos seminaturales.

8.3. La IC₅₀ del compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno disminuye la proliferación celular, provoca cambios morfológicos e inhibe significativamente la migración celular de la línea MCF7

Continuando con el estudio de la actividad citotóxica del producto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno, se evaluó el efecto sobre la proliferación (determinando cuenta celular con el colorante de exclusión azul de tripano) y sobre la morfología de la línea MCF7, utilizando un microscopio invertido y un lector de placas multimodal (Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader, BioTek) con las células tratadas con el valor de la IC₅₀ (48 h) y la IC₅₀/2. La **Figura 18A** muestra cómo la IC₅₀ reduce significativamente la proliferación celular de una manera dependiente del tiempo de exposición, convergiendo con el ≈50% de proliferación esperada. De igual manera la IC₅₀/2 produjo una proliferación del 68.7%, que fue cercano al 75% de la tasa de proliferación esperada. Además, cuando las células se trataron con el valor de la IC₅₀, IC₅₀/2 del 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno y peróxido de hidrógeno 1.0 mM (control positivo), se observaron tanto cambios morfológicos como en la confluencia respecto al control negativo y a la IC₅₀/2: las células se redondearon, la capacidad de adhesión disminuyó y las membranas protruyen después de los tratamientos (**Figura 18B**).

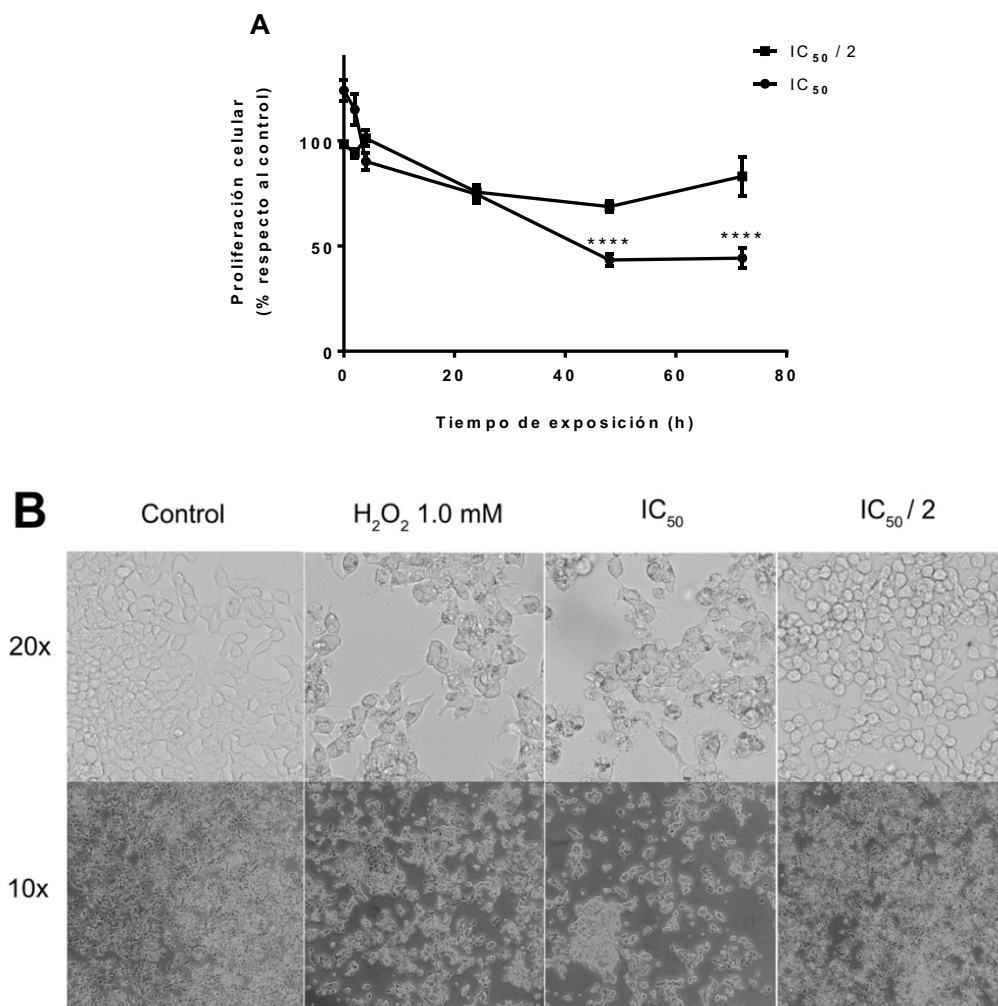
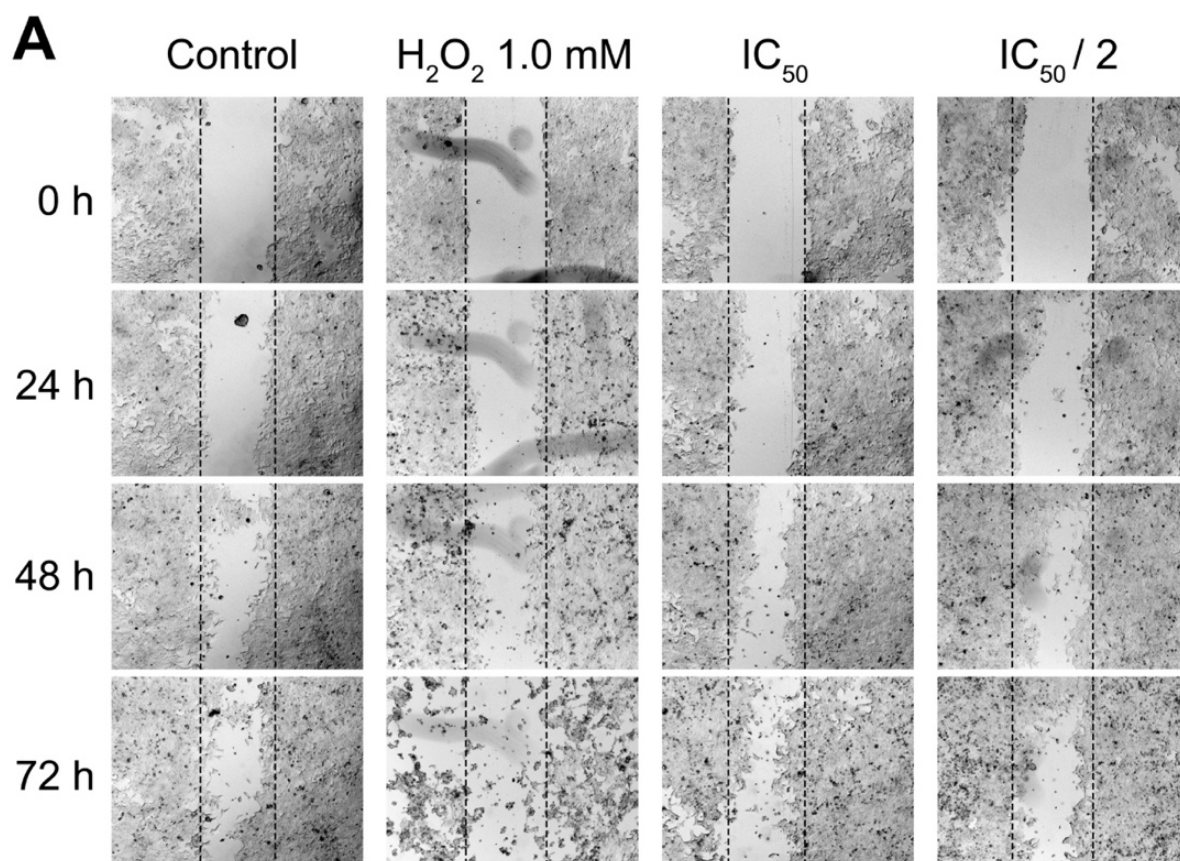


Figura 18. Efecto sobre la proliferación celular y la morfología celular. **A.** Las células de adenocarcinoma de mama humano MCF7 se trataron con valores de IC₅₀ e IC₅₀/2 del compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleño durante 48 h, y luego se realizó el ensayo del colorante de exclusión azul de tripano para medir la proliferación celular; **B.** Se utilizó un microscopio invertido y un lector de placas multimodal (Cytation 5, BioTek) para estudiar el cambio en la morfología celular de MCF7 después de los tratamientos indicados durante 48 h. Los resultados se muestran como medias \pm SD de al menos tres experimentos independientes (**** $p < 0.0001$ versus IC₅₀ / 2).

Asimismo, se evaluó el efecto del producto natural sobre la migración (empleando el ensayo de *wound-healing*) utilizando un lector de placas multimodal (Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader, BioTek) con el fin de monitorear la motilidad de las células tratadas con H₂O₂ 1.0 mM, el valor de la IC₅₀ (48 h) y la IC₅₀/2 del compuesto

natural. La **Figura 19A** ilustra el curso temporal representativo de la promoción o inhibición de la recuperación de la hendidura de la monocapa de células MCF7 expuestas a cada tratamiento, mientras que la **Figura 19B** muestra la cuantificación de la migración celular en función del tiempo y de cada tratamiento; cabe destacar que a las 72 h de exposición, el H_2O_2 1.0 mM desprendió por completo la monocapa celular y no fue capaz de cuantificarse.



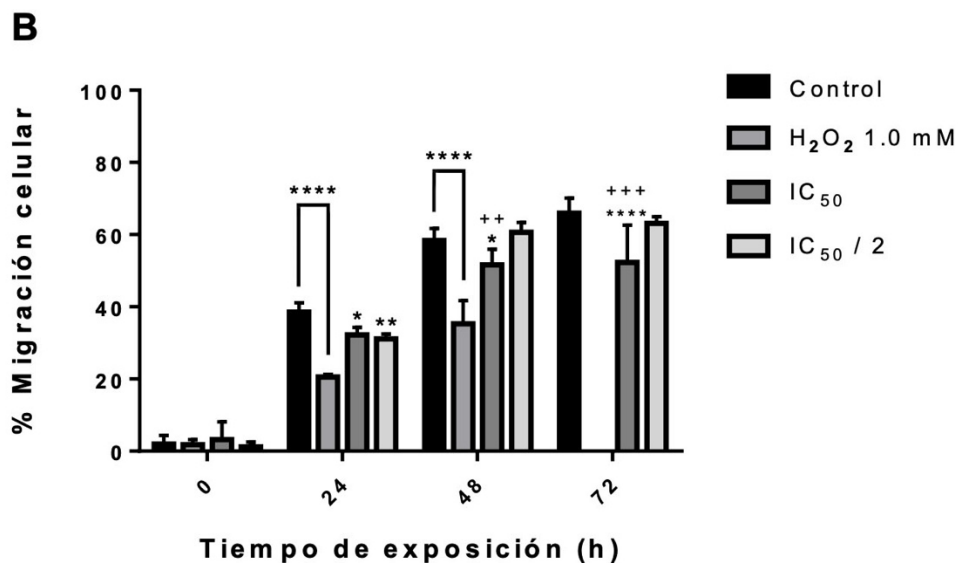
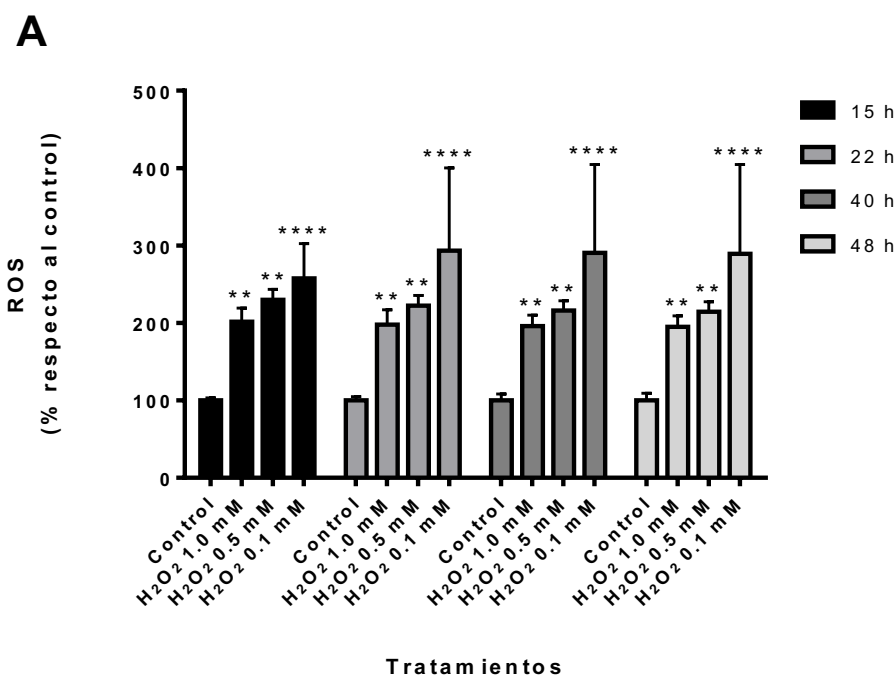


Figura 19. Efecto sobre la migración celular. A. Imágenes representativas de la migración celular (o el cierre de herida en la monocapa de MCF7) a las 0, 24, 48 y 72 h de realizar la herida y de colocar el tratamiento (10x). Las líneas punteadas indican el borde de la herida inicial; B. La migración celular se evaluó mediante la recuperación de la herida de acuerdo con el tiempo de exposición y del tratamiento. El área de separación se cuantificó en los tiempos mencionados de cada tratamiento y se compararon con el porcentaje de reducción del área inicial de la hendidura, es decir, el tiempo cero. Los resultados se expresaron como porcentaje de la capacidad de migración de las células respecto al tiempo cero de cada grupo. Los resultados se muestran como medias \pm SD de al menos tres experimentos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ versus Control y ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ versus IC₅₀/2).

8.4. El compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno eleva significativamente los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y provoca peroxidación lipídica

Inicialmente con el propósito de evaluar el estrés oxidante provocado por el H₂O₂ en la línea celular MCF7, se analizó si existían diferencias en la producción de los niveles de ROS intracelulares después de tratar a las células con distintas concentraciones de H₂O₂ (0.1, 0.5 y 1.0 mM) y a diferentes tiempos de exposición (15, 22, 40 y 48h) empleando el ensayo de 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). En la **Figura 20A** se aprecia cómo la producción de ROS es independiente de la concentración y del tiempo de exposición. Además, no se

observa disminución alguna al menos hasta las 48 horas de exposición. Esta conservación de los niveles constantes de ROS y la falta de diferencia significativa entre las concentraciones empleadas, permitió seleccionar la concentración de H₂O₂ 1.0 mM como control positivo de la producción de ROS ya que se evaluaría a la par con el valor de la IC₅₀ e IC₅₀/2 del producto natural durante 48 horas con la finalidad de conocer si el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno altera los niveles basales de ROS intracelulares en la línea celular MCF7. Como se aprecia en la **Figura 20B**, el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno aumentó significativamente los niveles de ROS intracelulares tratadas con el valor de la IC₅₀ a las 48 h (182% en comparación con las células de control), el cual es similar a los del H₂O₂ 1.0 mM (194.9% en comparación con las células de control). También se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos IC₅₀ e IC₅₀/2.



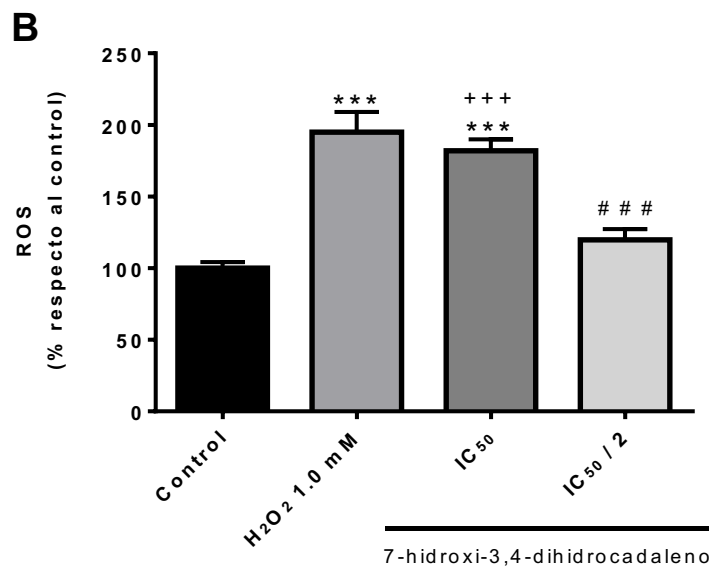


Figura 20. Efecto sobre la producción de ROS. **A.** Efecto del H₂O₂ (0.1, 0.5 y 1.0 mM) sobre la producción de ROS intracelulares hasta por 48 h de exposición; **B.** Efecto del 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno sobre la producción de ROS intracelulares. Las células MCF7 se incubaron con la IC₅₀ e IC₅₀/2 del compuesto natural y H₂O₂ 1.0 mM durante 48 h. La cuantificación de generación de ROS se llevó a cabo mediante un ensayo de 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Los resultados se muestran como medias \pm SD de al menos tres experimentos independientes (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ versus Control; ### $p < 0.001$ versus H₂O₂ 1.0 mM y +++ $p < 0.001$ versus IC₅₀/2).

Con la finalidad de verificar la actividad pro-oxidante del compuesto natural, se estudió el efecto del 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno en la peroxidación lipídica utilizando el ensayo de TBARS. Los niveles de peroxidación lipídica aumentaron significativamente con el valor de la IC₅₀ (48 h) del 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno (0.52 nmol/mg de proteína) en comparación con las células control (0.11 nmol/mg de proteína), IC₅₀/2 (0.23 nmol/mg de proteína) e incluso respecto al H₂O₂ 1.0 mM como control positivo (0.24 nmol/mg de proteína) (**Figura 21**).

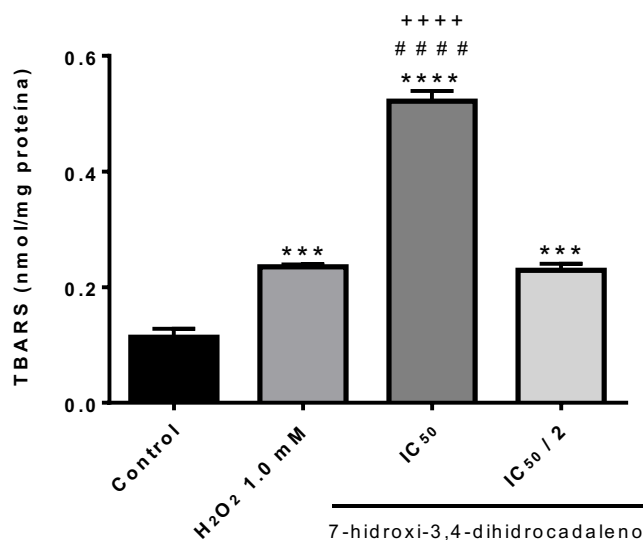


Figura 21. Efecto del 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno sobre la peroxidación lipídica. Las células MCF7 se trataron con la IC₅₀, IC₅₀/2 del compuesto y H₂O₂ 1.0 mM durante 48 h, y luego se midió la peroxidación de lípidos mediante el ensayo TBARS. Los resultados se muestran como medias \pm SD de al menos tres experimentos independientes (***p*<0.001 y *****p*<0.0001 *versus* Control; ####*p*<0.0001 *versus* H₂O₂ 1.0 mM y *****p*<0.0001 *versus* IC₅₀/2).

8.5. El compuesto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno aumenta significativamente la actividad de las caspasas 3 y 9

Se evaluó el efecto del 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno en la actividad de las caspasas 3 y 9. Como se muestra en la **Figura 22**, el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno aumentó significativamente la actividad de las caspasas-3/9 (valores de 118.42% y 24.17%, respectivamente en comparación con las células de control) de manera similar al detectado con H₂O₂ 1.0 mM (valores de 115.08% para caspasa 9 y 136.25% para caspasa 3). Sin embargo, no se observó efecto sobre la actividad de las caspasas-3/9 a la concentración de IC₅₀/2.

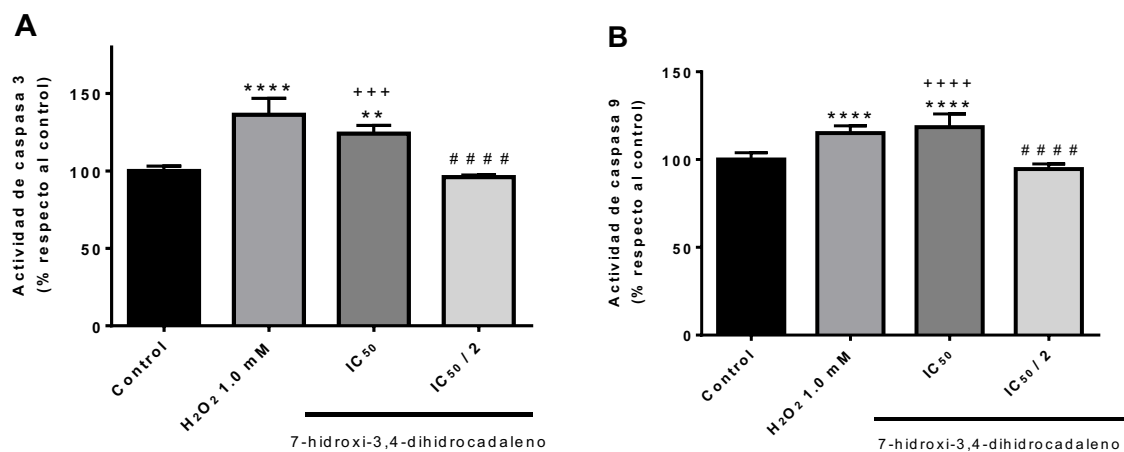


Figura 22. Efecto del 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno en la actividad de la caspasa-3/9. Las células MCF7 se trataron con la IC₅₀, IC₅₀/2 y H₂O₂ 1.0 mM como control positivo durante 48 h, y luego se midió la actividad de caspasa 3 (**A**) y caspasa 9 (**B**) utilizando el sustrato fluorimétrico Ac-DEVD-AMC y Ac-LEHD-AMC, respectivamente. Los resultados se muestran como medias \pm SD de al menos tres experimentos independientes (** $p < 0.01$ y **** $p < 0.0001$ *versus* control; #### $p < 0.0001$ *versus* H₂O₂ 1.0 mM; +++ $p < 0.001$ y ++++ $p < 0.0001$ *versus* IC₅₀/2).

9. Discusión

En el presente trabajo se evaluó la citotoxicidad del compuesto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno y de dos derivados seminaturales, 7-(fenilcarbamato)-3,4-dihidrocadaleno y 7-(fenilcarbamato)-cadaleno, en la línea celular de adenocarcinoma de glándula mamaria humana (luminal A), MCF7.

El ensayo de citotoxicidad de MTT reveló que el producto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno presenta un valor de IC_{50} (48 h) de $55.24 \mu\text{M}$; este valor es similar al reportado previamente para la misma línea celular por Rodríguez-Chávez, Coballase-Urrutia, Sicilia-Argumedeo, Ramírez-Apan, & Delgado (2015) de $61.37 \mu\text{M} \pm 4.3$; sin embargo, el cálculo de este valor se determinó utilizando el ensayo de citotoxicidad por sulforodamina B (SRB), el cual cuantifica el contenido de proteínas de células adherentes y no adherentes (Skehan, et al., 1990). Adicionalmente, este compuesto ha mostrado potencial citotóxico para las líneas celulares de cáncer cervicouterino humano HeLa ($IC_{50} = 10.3 \mu\text{M}$), carcinoma de mama humano BT-20 ($IC_{50} = 6.0 \mu\text{M}$), melanoma de humano B-16-FO ($IC_{50} = 8.2 \mu\text{M}$) y melanoma de ratón HTB-140 ($IC_{50} = 6.0 \mu\text{M}$) (Kubo, et al., 1996).

Por otro lado, la actividad citotóxica de los derivados seminaturales en la línea celular MCF7, determinada bajo las condiciones experimentales establecidas de este trabajo, contrasta con el efecto citotóxico reportado anteriormente (Egas, et al., 2017) evaluado mediante el ensayo de SRB. El empleo de diferentes ensayos no parece ser responsable de tal discrepancia ya que el uso de SRB arroja resultados comparables y que se correlacionan bien con el ensayo de MTT (Rubinstein, et al., 1990; Keepers, et al., 1991; Perez, Godwin, Handel, & Hamilton, 1993; Haselsberger, Peterson, Thomas, & Darling, 1996). Adicionalmente, el ensayo de MTT se validó empleando un control positivo ((Z)-4-hidroxitamoxifen) y se determinó la IC_{50} (24 h) de $16.50 \mu\text{M}$ la cual fue similar a la reportada por Hassan, Mohammed, El-Hiti, Alshanon, & Yousif (2018) de $4.506 \mu\text{g/mL}$ ($12.12 \mu\text{M}$).

La deficiencia farmacocinética es una de las principales limitaciones o fracasos terapéuticos en la investigación y desarrollo de nuevos fármacos. Las propiedades fisicoquímicas clave relacionadas con absorción, distribución,

metabolismo y eliminación (ADME) se han descrito para que los agentes anticancerígenos tengan una biodisponibilidad óptima y carezcan de toxicidad (Lipinski, Lombardo, Dominy, & Feeney, 1997; Ghose, Viswanadhan, & Wendoloski, 1999; Veber, et al., 2002; Singh, 2016).

Singh (2016) establece que el perfil fisicoquímico óptimo de los compuestos anticancerígenos es: $200 < M_W \leq 800$, $1 < \log P \leq 5$, $-6 \leq \log S \leq -1$, $5 \leq HBA \leq 13$, $1 \leq HBD \leq 5$, $50 \leq TPSA \leq 180 \text{ \AA}^2$, $0 \leq n_{Rot} \leq 10$ y $\log D = 2.8$. Por otra parte, Lipinski, Lombardo, Dominy, & Feeney (1997) consideran valores de $M_W < 500$, $\log P < 5$, $HBA < 10$ y $HBD < 5$. Además, para Veber, et al. (2002) es esencial valores de $TPSA \leq 140 \text{ \AA}^2$ y $n_{Rot} \leq 10$, mientras que Ghose, Viswanadhan, & Wendoloski (1999) atribuyen cierta importancia al peso molecular y la liposolubilidad ($160 \leq M_W \leq 480$ y $0.4 \leq \log P \leq 5.6$).

Respecto a los compuestos evaluados, los derivados seminaturales no cumplen con uno de los parámetros mencionados para dos propiedades fisicoquímicas ($\log S$ y HBA) ni con tres de los rangos relacionados con el $\log P$. El coeficiente de partición ($\log P$) indica el grado de liposolubilidad de un compuesto orgánico y ésta, a su vez, condiciona la solubilidad, permeabilidad, potencia, selectividad, toxicidad y las propiedades ADME (Gao, Gesenberg, & Zheng, 2017). La alta liposolubilidad frecuentemente contribuye a una baja solubilidad y mala absorción oral, además de disminuir la selectividad y por tanto mayor riesgo de toxicidad (Hughes, et al., 2008). La solubilidad de un compuesto se ve afectada por diversos factores incluidos tamaño, forma, polaridad e hidrofobia de la molécula (Wang, et al., 2007); se trata por tanto de una propiedad a considerar en las etapas iniciales de descubrimiento de fármacos ya que la absorción limitada afecta a la biodisponibilidad de los mismos y, en consecuencia, a la cantidad de principio activo que llega a su lugar de acción (Waterbeemd, Dennis, Beaumont, & Walker, 2001). Finalmente, los puentes de hidrógeno desempeñan un papel crucial en la unión de moléculas ya que intervienen en la expresión o supresión de la actividad/toxicidad debido a la interacción con residuos de aminoácidos de los receptores que contienen las funciones de aceptores y donadores de puentes de hidrógeno (HBA y HBD, respectivamente) (Roy, Kar, & Das, 2015).

Por lo tanto, el ensayo *in silico* sugiere que, de las tres moléculas en estudio, el compuesto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno tiene mejores propiedades fisicoquímicas para ser considerado como potencial agente citotóxico-anticancerígeno comparado con los compuestos 7-(fenilcarbamato)-3,4-dihidrocadaleno y 7-(fenilcarbamato)-cadaleno. Estas moléculas derivadas de cadalenos se caracterizan estructuralmente por tener un grupo fenilcarbamato en el carbono 7. Actualmente existen varios agentes anticancerígenos aprobados con grupos carbamato como irinotecan, mitomicina C, entinostat y capecitabina con buenas propiedades farmacocinéticas, capacidad para atravesar las membranas celulares y modular interacciones intra e intermoleculares con receptores o proteínas efectoras dada su estabilidad química y proteolítica (Ghosh & Brindisi, 2015). A pesar de ello, demostramos en nuestro estudio que el grupo hidroxilo en el C-7 del compuesto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno parece ser esencial para la actividad citotóxica de este compuesto. Se ha documentado que variaciones en el OH del C-7 en compuestos cadalenos, estructuralmente similares, modifican la actividad biológica por el precedente cambio en las propiedades fisicoquímicas, tal como la solubilidad acuosa (Lee, Kwon, Koh, Chob, & Park, 2007).

Dado que los derivados seminaturales no mostraron actividad citotóxica en la línea celular MCF7 y el estudio *in silico* demostró que estos dos compuestos no tienen las mejores condiciones fisicoquímicas para ser considerados candidatos anticancerígenos, se optó por continuar el estudio de la actividad citotóxica-anticancerígena sólo con el compuesto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno.

Simultáneamente a la inhibición de la viabilidad de la línea MCF7, el compuesto natural mostró actividad antiproliferativa. A diferencia de los ensayos de viabilidad, la cual se basa en el número de células vivas en una población, el ensayo de proliferación reveló que la IC_{50} y la $IC_{50}/2$ del compuesto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno reducen significativamente la tasa de división celular de MCF7. Aunque la proliferación puede interpretarse fácilmente como la viabilidad, la ausencia de proliferación no debe tomarse automáticamente como un signo de muerte celular (Aysun, Yağmur, & Yusuf, 2016). Conjuntamente al ensayo de

proliferación, la observación de las células sometidas a los diferentes tratamientos reveló un cambio morfológico, específicamente la aparición de ampollas en las células tratadas con la IC₅₀ y el H₂O₂ 1.0 mM, posiblemente tratándose de células apoptóticas. En respuesta a las señales intra y extracelulares, la remodelación del citoesqueleto submembranoso reorganiza constantemente la membrana plasmática de las células, dando lugar a la formación de protuberancias membranales, que se expanden hasta 2 µm desde la membrana plasmática y se definen por una morfología voluminosa y redondeada (Fackler & Grosse, 2008). El ampollamiento celular es visto principalmente como un subproducto de procesos necróticos o apoptóticos durante los cuales las células muestran estructuras denominadas *blebs* que no están relacionadas con la locomoción celular (Coleman, et al., 2001; Sebbagh, et al., 2001; Charras, 2008; Wickman, et al., 2013). Finalmente, a pesar de que la tasa de migración de línea celular MCF7 es baja (Comşa, Cîmpean, & Raica, 2015), y por ello ni siquiera la herida del control negativo logró cerrar por completo a las 72 h, la IC₅₀ fue capaz de inhibir la motilidad celular hasta las 72 h sin desprender la monocapa como en el caso del H₂O₂ 1.0 mM, indicando que se trata de un compuesto eficaz.

Se seleccionó el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como control positivo ya que se trata es una especie no radical que se difunde fácilmente a través de las membranas celulares y produce el radical hidroxilo (OH^{*}), que es la especie reactiva más dañina conocida (Halliwell & Gutteridge, 2015). Altas concentraciones de ROS, como H₂O₂, se han asociado con la activación de apoptosis (Kaminsky & Zhivotovsky, 2014). La apoptosis inducida por H₂O₂ ha sido relacionada con el aumento de expresión de p53 y de las proteínas pro-apoptóticas Puma, Noxa y Bad en distintas líneas celulares (Datta, Babbar, Srivastava, Sinha, & Chattopadhyay, 2002; McNeill-Blue, Wetmore, Sanchez, Freed, & Merrick, 2006; Palapati & Averill-Bates, 2010), además de promover la activación de caspasa-3/9, la liberación de citocromo c y la inducción de apoptosis a través de la vía intrínseca debido a la translocación mitocondrial de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bad (Chandra,

Samali, & Orrenius, 2000; Madesh & Hajnóczy, 2001; Circu & Aw, 2010; Pallepati & Averill-Bates, 2011; Circu & Aw, 2012).

Estudios previos demostraron que el 7-hidroxi-3,4-dihidrocajaleno actúa como compuesto antioxidante inhibiendo la lipoperoxidación microsomal y mitocondrial en hígado de rata (Haraguchi, et al., 1996). Posteriormente, se determinó que la actividad antioxidante era más potente frente a la peroxidación lipídica mitocondrial ($IC_{50} = 3.0 \mu M$) que frente a la microsomal ($IC_{50} = 9.2 \mu M$). Además, este compuesto inhibe la autooxidación del ácido linoleico y tiene una actividad secuestradora del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) pero no frente al anión superóxido (O_2^-) (Haraguchi, Ishikawa, Sanchez, Ogura, & Kubo, 1997); no obstante, un estudio posterior demostró que el 7-hidroxi-3,4-dihidrocajaleno actuaba como secuestrador del anión superóxido ($IC_{50} = 1.20 mM$) (Coballase-Urrutia, et al., 2010). Por otro lado, se ha documentado la incapacidad de este compuesto natural para secuestrar al ácido hipocloroso (HOCl) y al anión peroxinitrito ($ONOO^-$) y ser activo frente al peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , $IC_{50} = 4.38 mM$), al radical hidroxilo (OH^\bullet , $IC_{50} = 3.18 mM$) y al oxígeno singulete (1O_2 , $IC_{50} = 0.217mM$). Estos ensayos, aunque son útiles para evaluar las diferentes capacidades antioxidantes del 7-hidroxi-3,4-dihidrocajaleno, no proporcionan información sobre las reacciones antioxidantes que pueden ocurrir en modelos de cáncer *in vitro* o *in vivo* y, por tanto, tienen una relevancia cuestionable para los fines del trabajo actual.

A diferencia de las propiedades antioxidantes previamente señaladas, en el presente estudio se encontró que el compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocajaleno tiene efecto pro-oxidante en la línea tumoral MCF7 al encontrar una correlación entre el ensayo de 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) y el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Las ROS atacan el doble enlace carbono-carbono de los ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares, lo que lleva a cambios en su permeabilidad y fluidez y, por consiguiente, a la modificación de la integridad celular (Barrera, 2012). La capacidad de las membranas celulares como blancos comunes para la acción de las ROS y la formación de productos secundarios procedentes de la peroxidación lipídica, tales como hexanal, 4-

hidroxinonenal y malondialdehído (MDA) (Catalá, 2006), permitieron evidenciar el efecto pro-oxidante propuesto.

Estudios previos han determinado que la concentración o dosis de un compuesto determina su acción anti- o pro-oxidante. De hecho, son bien reportadas las propiedades duales anti- y pro-oxidantes de diversos metabolitos extraídos de productos naturales, como la pirroloquinolina quinona (PQQ), el resveratrol, β , α -caroteno, la pelargonidina acetilada y la (-)-epigallocatequina-3-galato (He, Nukada, Urakamib, & Murphy, 2003; Lastra & Villegas, 2007; Girard-Lalancette, Pichette, & Legault, 2009; Wang, et al., 2010; Forester & Lambert, 2011). Incluso, está demostrado que la mayoría de estos compuestos inhiben la viabilidad de ciertas líneas celulares tumorales por inducción de apoptosis y se ha propuesto que el mecanismo de acción implicado se debe al efecto pro-oxidante de los mismos (He, Nukada, Urakamib, & Murphy, 2003; Zheng, et al., 2006; Hadi, et al., 2007; Wang, et al., 2010; Li, et al., 2010). Además, cabe señalar que el mecanismo redox de ciertos compuestos puede verse alterado de acuerdo con las condiciones del modelo experimental, en este caso el modelo biológico *in vitro* utilizado depende de la línea celular, el estado basal redox, el microambiente celular y de otros factores no necesariamente relacionados con el estado intracelular, sino también con el entorno extracelular.

Si bien la propiedad citotóxica del 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno puede deberse conjuntamente a su actividad pro- y antioxidante, provocada en parte por muerte celular a través de la generación de ROS, o bien mediante la disminución de estrés oxidante, y previniendo el consecuente daño celular, la investigación enfocada en el tratamiento contra la carcinogénesis empleando antioxidantes con el fin de reducir los niveles de ROS no ha sido concluyente como estrategia terapéutica e incluso no existe evidencia de su uso terapéutico en la prevención del cáncer (Heinonen, Huttunen, & Albanes, 1994; Omenn, et al., 1996; Hennekens, et al., 1996; Lee, Cook, Manson, Buring, & Hennekens, 1999; Khaw, et al., 2001; Lonn, et al., 2005; Hercberg, et al., 2007; Gaziano, et al., 2009; Klein, et al., 2011; Sceneay, et al., 2013). Por tanto, se sugiere que el efecto antioxidante del compuesto 7-hidroxi-3,4-

dihidrocadaleno puede ser esencial mas no suficiente para el efecto citotóxico de la línea tumoral MCF7. En todo caso, la capacidad secuestradora de ROS del producto natural puede tener un efecto preventivo mas no terapéutico contra las células tumorales y, por tanto, se propone que la actividad citotóxica se debe principalmente a la acción pro-oxidante y que esta, a su vez, puede ser el mecanismo de acción implicado en la muerte celular por apoptosis dado el entrecruzamiento de ROS con distintas vías de señalización (Dolado, et al., 2007; Wang, et al., 2008; Heiden, Cantley, & Thompson, 2009; Kaminsky & Zhivotovsky, 2014; Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016; Galadari, Rahmana, Pallichankandy, & Thayyullathil, 2017); sin embargo, no se descarta que este mecanismo pueda ser llevado a cabo por otros factores no necesariamente relacionados con el estado redox celular, tales como el cambio en la naturaleza membranal como consecuencia de la peroxidación lipídica o por cambios en la regulación de receptores hormonales (Balan, et al., 2006).

10. Conclusiones

Bajo las condiciones experimentales de este estudio, se rechaza la hipótesis propuesta al encontrar que la incorporación del grupo fenilcarbamato en el carbono número 7 de los compuestos naturales 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno y 7-hidroxicadaleno, aislados a partir de *Heterotheca inuloides*, no incrementan el efecto citotóxico de los mismos en la línea celular de adenocarcinoma de glándula mamaria humana (luminal A), MCF7; no obstante, el compuesto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno exhibe citotoxicidad tiempo y concentración dependiente frente a la misma línea celular [IC_{50} (48 h) = 55.24 μ M e IC_{50} (72 h) = 52.83 μ M], además, la IC_{50} (48 h) es capaz de inhibir su proliferación y migración. Aunque se ha reconocido al 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno como un antioxidante, se demostró que este compuesto también actúa como pro-oxidante en ciertas condiciones, por tanto, se propone que la inducción de estrés oxidante es el mecanismo de acción potencial responsable de promover la muerte celular aparentemente mediada por apoptosis.

11. Perspectivas

Los resultados encontrados en el presente trabajo abren nuevas perspectivas con respecto al efecto pro-oxidante del compuesto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno frente a la línea celular MCF7, especialmente en conocer la causa por la cual este compuesto exhibe la propiedad dual anti- y pro-oxidante en diferentes condiciones.

Por otro lado, considerando que el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno es capaz de promover la generación de especies reactivas de oxígeno en la línea celular MCF7 y un consecuente efecto citotóxico, resultaría interesante evaluar si el compuesto natural puede ejercer de la misma manera el efecto citotóxico frente a diferentes líneas tumorales y así determinar si el producto natural es específico de la línea celular de adenocarcinoma de glándula mamaria humana o no. Adicionalmente, es necesario realizar pruebas de citotoxicidad en líneas no tumorales con el fin de contribuir en el perfil de toxicidad del 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno y asegurar su seguimiento como un potencial agente terapéutico en el cáncer de mama. Sin embargo, aún queda mucho por evaluar acerca del mecanismo de acción potencial descrito dada la amplia variedad con la que pueden interaccionar las especies reactivas de oxígeno, así como determinar si existen cambios en el perfil antioxidante en la línea celular.

12. Referencias

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Wilson, J., & Hunt, T. (2015). *Molecular Biology of the Cell (Sixth Edition)*. New York: Garland Science.
- Alfadda, A. A., & Sallam, R. M. (2012). Reactive Oxygen Species in Health and Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1-14.
- Alonso-Castro, A., Villarreal, M., Salazar-Olivo, L., Gómez-Sánchez, M., Domínguez, F., & García-Carranca, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal Of Ethnopharmacology*, 133(3), 945-972.
- American Cancer Society. (2015, Diciembre 8). Retrieved from What Is Cancer?: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>
- American Cancer Society. (2017, July 1). Retrieved from How Common Is Breast Cancer?: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/how-common-is-breast-cancer.html>
- American Cancer Society. (2018, April 27). Retrieved from Key Statistics for Breast Cancer in Men: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer-in-men/about/key-statistics.html#references>
- Andrade-Cetto, A. (2009). Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(1), 163-171.
- Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., & Starkov, A. A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)*, 70(2), 200-214.
- Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., Murphy, A. N., & Starkov, A. A. (2015). Mitochondrial ROS Metabolism: 10 Years Later. *Biochemistry (Moscow)*, 80(5), 517-531.
- Aysun, A., Yağmur, K., & Yusuf, B. (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1213-1221.
- Balan, K. V., Wang, Y., Chen, S. W., Chen, J.-C., Zheng, L.-F., Yang, L., Liu, Z.-L., Pantazis, P., Wyche, J.-H., & Han, Z. (2006). Proteasome-independent down-regulation of estrogen receptor- α (ER α) in breast cancer cells treated with 4,40-dihydroxy-trans-stilbene. *Biochemical Pharmacology*, 72, 573-581.
- Barrera, G. (2012). Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncology*, 2012, 1-21.
- Bast Jr., R. C., Croce, C. M., Hait, W. N., Hong, W. K., Kufe, D. W., Piccart-Gebhart, M. Pollock, R. E., Weichselba, R. R., Wang, H., & Holland, J. F. (2017). *Holland-Frei Cancer Medicine (Novena Edición)*. Wiley-Blackwell.
- Bello-González, M. A., Hernández-Muñoz, S., Lara-Chávez, M. B., & Salgado-Garciglia, R. (2015). Useful plants of indigenous community from Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. *Polibotánica*, 39, 175-215.
- Berry, D. A., Cirrincione, C., Henderson, I. C., Citron, M. L., Budman, D. R., Goldstein, L. J., Martino, S., Perez, E. A., Muss, H. B., Norton, L., Hudis, C., & Winer, E. P. (2006). Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with

- node-positive breast cancer. *Journal of the American Medical Association*, 295(14), 1658-1667.
- Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., & Crowe, S. E. (2014). Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiological Reviews*, 94(2), 329–354.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19.
- Bohlmann, F., & Zdero, C. (1976). Natürlich vorkommende Terpen-Derivate, 63. Über die Inhaltsstoffe von *Heterotheca inuloides* Cass. *Organische Chemie*, 109(6), 2021-2025.
- Bordoloi, M., Shukla, V. S., Nath, S. C., & Sharma, R. P. (1989). Naturally Occurring Cadinenes. *Phytochemistry*, 28(8), 2007-2037.
- Breitmaier, E. (2006). *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Briegera, K., Schiavonea, S., Jr., F. J., & Krause, K.-H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Medical Weekly*, 142, 1-14.
- Bruneton, J., Fresno, A. V., Carretero-Accame, E., & Rebuella-Lizabe, M. (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica y Plantas Medicinales (2da Edición)*. Zaragoza: Acribia.
- Cancer Mortality Database (IARC). (2016, September 22). Retrieved from Mexico Breast cancer, age 20-85+: <http://www-dep.iarc.fr/WHODb/WHODb.htm>
- Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M. A., Tse, C. K., Edmiston, S., Deming, S. L., Geradts, J., Cheang, M. C. U., Nielsen, T. O., Moorman, P. G., & Millikan, R. C. (2006). Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Journal of the American Medical Association*, 295(21), 2492-2502.
- Cascales, M., & Rodés, J. (1990). *Hepatología*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., & Romero, I. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2), 402-405.
- Catalá, A. (2006). An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38, 1482-1495.
- Chandra, J., Samali, A., & Orrenius, S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 29(3/4), 323-333.
- Charras, G. (2008). A short history of blebbing. *Journal of Microscopy*, 231(3), 466–478.
- Chávarri-Guerra, Y., Villarreal-Garza, C., Liedke, P., Knaul, F., Mohar, A., Finkelstein, D. M., & Goss, P. E. (2012). Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system. *Lancet Oncology*, 13, 335–343.
- Chen, S., & Parmigiani, G. (2007). Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *Journal of Clinical Oncology*, 25(11), 1329-1333.

- Chompret, A., Brugières, L., Ronsin, M., Gardes, M., Dessarps-Freichey, F., Abel, A., Hua, D., Ligot, L., Dondon, M. G., Paillerets, B. Bressac-de, Frébourg, T., Lemerle, J., Bonaïti-Pellié, C., & Feunteun, J. (2000). P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. *British Journal of Cancer*, 82(12), 1932–1937.
- Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 48, 749-762.
- Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2012). Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823, 1767-1777.
- Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., Cárdenas-Rodríguez, N., Huerta-Gertrudis, B., García-Cruz, M. E., Ramírez-Morales, A., Sánchez-González, D. J., Martínez-Martínez, C. M., Camacho-Carranza, R., & Espinosa-Aguirre, J. J. (2011). Hepatoprotective effect of acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63, 363–370.
- Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., Camacho-Carranza, R., Cárdenas-Rodríguez, N., Huerta-Gertrudis, B., Medina-Campos, O. N., Mendoza-Cruz, M., Delgado-Lamas, G., & Espinosa-Aguirre, J. J. (2010). Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites. *Toxicology*, 276, 41–48.
- Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., & Olson, M. F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nature Cell Biology*, 3(4), 339-345.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2001). Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. *The Lancet*, 358, 1389-1399.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2012). Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncology*, 13(11), 1141–1151.
- Comşa, Ş., Cîmpean, A. M., & Raica, M. (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research*, 35(6), 3147-3154.
- Cutuli, B., Lafontan, B. D., Kirova, Y., Auvray, H., Tallet, A., Avigdor, S., Brunaud, C., & Delva, C. (2015). Lobular carcinoma in situ (LCIS) of the breast: is long-term outcome similar to ductal carcinoma in situ (DCIS)? Analysis of 200 cases. *Radiation Oncology*, 10(110), 1-7.
- D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 813-824.
- Daly, M. B., Axilbund, J. E., Buys, S., Crawford, B., Farrell, C. D., Friedman, S., Garber, J. E., Goorha, S., Gruber, S. B., Hampe, H., Kaklamani, V., Kohlmann, W., Kurian, A., & Litton, J. (2010). Genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 8(5), 562-594.

- Daly, M. B., Pilarski, R., Axilbund, J. E., Berry, M., Buys, S. S., Crawford, B., Farmer, M., Friedman, S., Garber, J. E., Khan, S., & Klein, C. (2016). Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, Version 2.2015. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 14(2), 153-62.
- Damineni, S., Rao, V. R., Kumar, S., Ravuri, R. R., Kagitha, S., Dunna, N. R., Digumarthi, R., & Satti, V. (2014). Germline mutations of TP53 gene in breast cancer. *Tumor Biology*, 35(9), 9219-9227.
- Datta, K., Babbar, P., Srivastava, T., Sinha, S., & Chattopadhyay, P. (2002). p53 dependent apoptosis in glioma cell lines in response to hydrogen peroxide induced oxidative stress. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34, 148-157.
- DeSantis, C. E., Ma, J., Sauer, A. G., Newman, L. A., & Jemal, A. (2017). Breast Cancer Statistics, 2017, Racial Disparity in Mortality by State. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67, 439-448.
- Delgado, G., Olivares, M. d., Chávez, M. I., Ramírez-Apan, T., Linares, E., Bye, R., & Espinosa-García, F. J. (2001). Antiinflammatory constituents from *Heterotheca inuloides*. *Journal of Natural Products*, 64(7), 861-864.
- Desai, A. G., Qazi, G. N., Ganju, R. K., El-Tamer, M., Singh, J., Saxena, A. K., Bedi, Y. S., Taneja, S. C., & Bhat, H. K. (2008). Medicinal plants and cancer chemoprevention. *Current Drug Metabolism*, 9(7), 581-591.
- Dolado, I., Swat, A., Ajenjo, N., Vita, G. D., Cuadrado, A., & Nebreda, A. R. (2007). p38a MAP Kinase as a Sensor of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis. *Cancer Cell*, 11, 191-205.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. (1998). Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *The Lancet*, 351(9114), 1451-1467.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. (2008). Adjuvant chemotherapy in oestrogen-receptor-poor breast cancer: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, 371(9606), 29-40.
- Edge, S. B., & Compton, C. C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of Surgical Oncology*, 17(6), 1471-1474.
- Egas, V., Millán, E., Collado, J. A., Ramírez-Apan, T., Méndez-Cuesta, C. A., Muñoz, E., & Delgado, G. (2017). Effect of natural and semi-synthetic cadinanes from *Heterotheca inuloides* on NF- κ B, Nrf2 and STAT3 signaling pathways and evaluation of their in vitro cytotoxicity in human cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25, 3135-3147.
- Egas, V., Toscano, R. A., Linares, E., Bye, R., Espinosa-García, F. J., & Delgado, G. (2015). Cadinane-Type Sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*: Absolute Configuration and Anti-inflammatory Activity. *Journal of Natural Products*, 78(11), 2634-2641.
- Esquivel-García, R., Pérez-Calix, E., Ochoa-Zarzosa, A., & García-Pérez, M. E. (2018). Ethnomedicinal plants used for the treatment of dermatological affections on the Purépecha Plateau, Michoacán, México. *Acta Botánica Mexicana*, 125, 95-132.
- Fackler, O. T., & Grosse, R. (2008). Cell motility through plasma membrane blebbing. *Journal of Cell Biology*, 181(6), 879-884.

- Forester, S. C., & Lambert, J. D. (2011). The role of antioxidant versus pro-oxidant effects of green tea polyphenols in cancer prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55, 844-854.
- Foulkes, W. D. (2008). Inherited Susceptibility to Common Cancers. *The New England Journal of Medicine*, 359(20), 2143-2153.
- Galadari, S., Rahmana, A., Pallichankandy, S., & Thayyullathil, F. (2017). Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radical Biology and Medicine*, 104, 144-164.
- Gao, Y., Gesenberg, C., & Zheng, W. (2017). *Developing Solid Oral Dosage Forms (Second Edition) 17. Oral Formulations for Preclinical Studies: Principle, Design, and Development Considerations*. London: Academic Press.
- Gaziano, J. M., Glynn, R. J., Christen, W. G., Kurth, T., Belanger, C., MacFadyen, J., Bubes, V., Manson, J. E., Sesso, H. D., & Buring, J. E. (2009). Vitamins E and C in the Prevention of Prostate and Total Cancer in Men The Physicians' Health Study II Randomized Controlled Trial. *Journal of the American Medical Association*, 301(1), 52-62.
- Geou-Yarh, L., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, 44(5), 479-496.
- Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N., & Wendoloski, J. J. (1999). A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 1(1), 55-68.
- Ghosh, A. K., & Brindisi, M. (2015). Organic Carbamates in Drug Design and Medicinal Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 2895-2940.
- Girard-Lalancette, K., Pichette, A., & Legault, J. (2009). Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures: Analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chemistry*, 115, 720-726.
- Glasauer, A., & Chandel, N. S. (2014). Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 92(1), 90-101.
- González-Stuart, A. E. (2010). Use of Medicinal Plants in Monterrey, Mexico. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 2(4), 7-11.
- Greenwell, M., & Rahman, P. (2015). Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*, 6(10), 4103-4112.
- Gudmundsdottir, K., & Ashworth, A. (2006). The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene*, 25(43), 5864-5874.
- Görlach, A., Dimova, E. Y., Petry, A., Martínez-Ruiz, A., Hernansanz-Agustín, P., Rolo, A. P., Palmeira, Carlos M., & Kietzmann, T. (2015). Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved? *Redox Biology*, 6, 372-385.
- Hadi, S., Bhat, S. H., Azmi, A. S., Hanif, S., Shamim, U., & Ullah, M. (2007). Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: A putative mechanism for anticancer properties. *Seminars in Cancer Biology*, 17, 370-376.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press.

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674 .
- Hanschmann, E. M., Godoy, J. R., Berndt, C., Hudemann, C., & Lillig, C. H. (2013). Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins--molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(13), 1539-1605.
- Haraguchi, H., Ishikawa, H., Sanchez, Y., Ogura, T., & Kubo, Y. (1997). Antioxidative Constituents in *Heterotheca inuloides*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 5(5), 865-871.
- Haraguchi, H., Saito, T., Ishikawa, H., Sanchez, Y., Ogura, T., & Kubo, I. (1996). Inhibition of lipid peroxidation by sesquiterpenoid in *Heterotheca inuloides*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 48(4), 441-443.
- Hassan, F., Mohammed, G., El-Hiti, G. A., Alshanon, A., & Yousif, E. (2018). Cytotoxic effects of tamoxifen in breast cancer cells. *Journal of Unexplored Medical Data*, 3(3), 1-9.
- Haselsberger, K., Peterson, D. C., Thomas, D. G., & Darling, J. (1996). Assay of anticancer drugs in tissue culture: comparison of a tetrazolium-based assay and a protein binding dye assay in short-term cultures derived from human malignant glioma. *Anticancer Drugs*, 7(3), 331-338.
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37(3), 614-636 .
- He, K., Nukada, H., Urakamib, T., & Murphy, M. P. (2003). Antioxidant and pro-oxidant properties of pyrroloquinoline quinone (PQQ): implications for its function in biological systems. *Biochemical Pharmacology*, 65, 67-74.
- Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324, 1029-1033.
- Heinonen, O. P., Huttunen, J. K., & Albanes, D. (1994). The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *The New England Journal of Medicine*, 330(15), 1029-1035.
- Hemel, D., & Domchek, S. M. (2010). Breast cancer predisposition syndromes. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 24(5), 799-814.
- Hennekens, C. H., Buring, J. E., Manson, J. E., Stampfer, M., Rosner, B., Cook, N. R., Belanger, C., LaMotte, F., Gaziano, M., Ridker, Paul M., Willett, Walter, & Peto, R. (1996). Lack of Effect of Long-Term Supplementation with Beta Carotene on the Incidence of Malignant Neoplasms and Cardiovascular Disease. *The New England Journal of Medicine*, 334, 1145-1149.
- Henry-Tillman, R. S., & Klimberg, V. S. (2000). In situ breast cancer. *Current Treatment Options in Oncology*, 1(3), 199-209.
- Hercberg, S., Ezzedine, K., Guinot, C., Preziosi, P., Galan, P., Bertrais, S., Estaquio, Carla, Briançon, Serge, Favier, Alain, Latreille, Julie, & Malvy, D. (2007). Antioxidant Supplementation Increases the Risk of Skin Cancers in Women but Not in Men. *The Journal of Nutrition*, 137(9), 2098-2105.

- Hergueta-Redondo, M., Palacios, J., Cano, A., & Moreno-Bueno, G. (2008). "New" molecular taxonomy in breast cancer. *Clinical Translational Oncology*, 10, 777-785.
- Hersch-Martínez, P. (1997). Medicinal plants and regional traders in Mexico: physiographic differences and conservational challenge. *Economic Botany*, 51(2), 107–120.
- Holmström, K. M., & Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(6), 411-421.
- Hughes, J. D., Blag, J., Price, D. A., Bailey, S., DeCrescenzo, G. A., Devraj, R. V., Ellsworth, E., Fobian, Y. M., Gibbs, M. E., Gilles, R. W., Greene, N., Huang, E., Krieger-Burke, T., Loesel, J., Wager, T., Whiteley, L., & Zhang, Y. (2008). Physicochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(17), 4872-4875.
- International Agency for Research on Cancer. (2018). Retrieved from Cancer Today: <https://gco.iarc.fr/today/home>
- Jain, S., Dwivedi, J., Jain, P., Satpathy, S., & Patra, A. (2016). Medicinal Plants for Treatment of Cancer: A Brief Review. *Pharmacognosy Journal*, 8(2), 87-102.
- Johns Hopkins University. (n.d.). Retrieved from Staging & Grade: <https://pathology.jhu.edu/breast/my-results/staging-grade/>
- Juarez-Pérez, M. A., Reyes-Agüero, J. A., & Andrade-Aguilar, J. A. (1996). Flora útil de tres tipos de matorral en el altiplano potosino-zacatecano, México. *Rev. Geo. Agríc.*, 23-37.
- Kaminsky, V. O., & Zhivotovsky, B. (2014). Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(1), 86-102.
- Keepers, Y. P., Pizao, P. E., Peters, G. J., Ark-Otte, J. v., Winograd, B., & Pinedo, H. M. (1991). Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *European Journal of Cancer*, 27(7), 897-900.
- Kerlikowske, K. (2010). Epidemiology of Ductal Carcinoma In Situ. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 41, 139-141.
- Khaw, K.-T., Bingham, S., Welch, A., Luben, R., Wareham, N., Oakes, S., & Day, N. (2001). Relation between plasma ascorbic acid and mortality in men and women in EPIC-Norfolk prospective study: a prospective population study. *The Lancet*, 357(9257), 657-663.
- Klein, E. A., Thompson, I. M., Tangen, C. M., Crowley, J. J., Lucia, M. S., Goodman, P. J., Minasian, L. M., Ford, L. G., Parnes, H. L., Gaziano, J. M., Karp, D. D., Lieber, M. M., Walther, P. J., Klotz, L., Parsons, J. K., Chin, J. L., Darke, A. K., & Baker, L. H. (2011). Vitamin E and the Risk of Prostate Cancer The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial. *Journal of the American Medical Association*, 306(15), 1549-1556.
- Kubo, I., Chaudhuri, S. K., Kubo, Y., Sanchez, Y., Ogura, T., Saito, T., Ishikawa, H., & Haraguchi, H. (1996). Cytotoxic and Antioxidative Sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *PlantaMedica*, 62, 427-430.
- Lastra, C. A., & Villegas, I. (2007). Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1156-1160.

- Lee, H. Y., Kwon, J.-T., Koh, M., Chob, M.-H., & Park, S. B. (2007). Enhanced efficacy of 7-hydroxy-3-methoxycadalene via glycosylation in in vivo xenograft study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *17*, 6335-6339.
- Lee, I. M., Cook, N. R., Manson, J. E., Buring, J. E., & Hennekens, C. H. (1999). Beta-carotene supplementation and incidence of cancer and cardiovascular disease: the Women's Health Study. *Journal of the National Cancer Institute*, *91*(24), 2102-2106.
- Li, G.-X., Chen, Y.-K., Hou, Z., Xiao, H., Jin, H., Lu, G., Lee, M.-J., Liu, B., Guan, F., Yang, Z., Yu, A., & Yang, C. S. (2010). Pro-oxidative activities and dose–response relationship of (2)-epigallocatechin-3-gallate in the inhibition of lung cancer cell growth: a comparative study in vivo and in vitro. *Carcinogenesis*, *31*(5), 902-910.
- Li, X., Schwartz, M. R., Ro, J., Hamilton, C. R., Ayala, A. G., Truong, L. D., & Zhai, Q. (2014). Diagnostic utility of E-cadherin and P120 catenin cocktail immunostain in distinguishing DCIS from LCIS. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *7*(5), 2551-2557.
- Liou, G.-Y., & Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, *44*(5), 479–496.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *23*(1-3), 3-25.
- Lira, R., Casas, A., & Blancas, J. (2016). *Ethnobotany of Mexico: Interactions of People and Plants in Mesoamerica*. New York: Springer.
- Liu, K., Zhang, W., Dai, Z., Wang, M., Tian, T., Liu, X., Kang, H., Guan, H., Zhang, S., & Dai, Z. (2018). Association between body mass index and breast cancer risk: evidence based on a dose–response meta-analysis. *Cancer Management and Research*, *10*, 143–151.
- Lone, S. H., Bhat, K. A., & Khuroo, M. A. (2015). Arglabin: From isolation to antitumor evaluation. *Chemico-biological Interactions*, *240*, 180-198.
- Lonn, E., Bosch, J., Yusuf, S., Sheridan, P., Pogue, J., Arnold, J. M., Ross, C., Arnold, A., Sleight, P., Probstfield, J., & Dagenais, G. R. (2005). Effects of Long-term Vitamin E Supplementation on Cardiovascular Events and Cancer. *Journal of the American Medical Association*, *293*(11), 1338-1347.
- Loredo-Medina, O. L., Rodríguez-Chávez, J. M., & Ramos-Espinosa, M. G. (2002). Aprovechamiento de Recursos Vegetales en una localidad de la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca, Michoacán, México. *Etnobiología*, *2*, 32-60.
- Madesh, M., & Hajnóczky, G. (2001). VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *Journal of Cell Biology*, *155*(6), 1003-1015.
- Manoharan, S., Guillemin, G. J., Abiramasundari, R. S., Essa, M. M., Akbar, M., & Akbar, M. D. (2016). The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 1-15.
- Martin, T. A., Ye, L., Sanders, A. J., Lane, J., & Jiang, W. G. (2013). *Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective*. (Landes Bioscience) Obtenido de

- Masciari, S., Dillon, D. A., Rath, M., Robson, M., Weitzel, J. N., Balmana, J., Gruber, S. B., Ford, J. M., Euhus, D., Lebensohn, A., Telli, M., Pochebit, S. M., Lypas, G., & Garber, J. E. (2012). Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li-Fraumeni syndrome consortium effort. *Breast Cancer Research and Treatment*, *133*, 1125–1130.
- Mavaddat, N., Peock, S., Frost, D., Ellis, S., Platte, R., Fineberg, E., Evans, D. G., Izatt, L., Eeles, R. A., Adlard, J., Davidson, R., Eccles, D., Cole, T., & Cook, J. (2013). Cancer Risks for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: Results From Prospective Analysis of EMBRACE. *Journal of the National Cancer Institute*, *105*(11), 812–822.
- McGee, S. F., Lanigan, F., Gilligan, E., & Groner, B. (2006). Mammary gland biology and breast cancer. Conference on Common Molecular Mechanisms of Mammary Gland Development and Breast Cancer Progression. *EMBO Reports*, *7*(11), 1084–1088.
- McNeill-Blue, C., Wetmore, B. A., Sanchez, J. F., Freed, W. J., & Merrick, A. (2006). Apoptosis mediated by p53 in rat neural AF5 cells following treatment with hydrogen peroxide and staurosporine. *Brain Research*, *1112*, 1-15.
- Meier-Abt, F., & Bentires-Alj, M. (2014). How pregnancy at early age protects against breast cancer. *Trends in Molecular Medicine*, *20*(3), 143-153.
- Meier-Abt, F., Milani, E., Roloff, T., Brinkhaus, H., Duss, S., Meyer, D. S., Klebba, I., Balwierz, P. J., Nimwegen, E. van, & Bentires-Alj, M. (2013). Parity induces differentiation and reduces Wnt/Notch signaling ratio and proliferation potential of basal stem/progenitor cells isolated from mouse mammary epithelium. *Breast Cancer Research*, *15*(2), 1-17.
- Miura, Y., Hirata, K., Kurano, N., Miyamoto, K., & Uchida, K. (1988). Formation of Vinblastine in Multiple Shoot Culture of *Catharanthus roseus*. *Planta Medica*, *54*(1), 18-20.
- Mohar-Betancourt, A., Reynoso-Noverón, N., Armas-Texta, D., Gutiérrez-Delgado, C., & Torres-Domínguez, J. A. (2017). Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies. *American Society of Clinical Oncology*, *3*(6), 740-748.
- Mondello, C., & Chiodi, I. (2013). Cellular immortalization and neoplastic transformation. *Cell Cycle*, *12*(11), 1804-1805.
- Monroy-Ortiz, C., García-Moya, E., Romero-Manzanares, A., Sánchez-Quintanar, C., Luna-Cavazos, M., Uscanga-Mortera, E., Flores-Guido, J. S., & González-Romero, V. (2013). Plants of Local Interest for Medicinal and Conservation Purposes in Morelos, México. *Ethno-Medicine*, *7*(1), 13-26.
- Moreno-Salazar, S. F., Robles-Zepeda, R. E., & Johnson, D. E. (2008). Plant folk medicines for gastrointestinal disorders among the main tribes of Sonora, Mexico. *Fitoterapia*, *79*(2), 132-141.
- Muller, F. L., Liu, Y., & Remmen, H. V. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(47), 49064-49073.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, *417*(Pt 1), 1–13.

- Nandikolla, A. G., Venugopal, S., & Anampa, J. (2017). Breast cancer in patients with Li-Fraumeni syndrome – a case-series study and review of literature. *Breast Cancer - Targets and Therapy*, 9, 207–215.
- National Cancer Institute. (n.d.). Retrieved from NCI Dictionary of Cancer Terms: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/breast-cancer>
- National Cancer Institute. (2013). Retrieved from Tumor Grade: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/prognosis/tumor-grade-fact-sheet>
- National Cancer Institute. (2015, Febrero 9). Retrieved from What Is Cancer?: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- National Cancer Institute. (9 de March de 2015). Obtenido de Cancer Staging: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>
- National Cancer Institute. (2018, June 5). Retrieved from Drugs Approved for Breast Cancer: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/breast>
- Navarro-Pérez, L. d., & Avendaño-Reyes, S. (2002). Flora útil del municipio de Astacinga, Veracruz, México. *Polibotánica*, 14, 67-84.
- Neuhouser, M. L., Aragaki, A. K., Prentice, R. L., Manson, J. E., Chlebowski, R., Carty, C. L., Ochs-Balcom, Heather M., Thomson, Cynthia A., Caan, Bette J., Tinker, Lesley F., Peragallo, Rachel, Knudtson, J., & Anderson, G. L. (2015). Overweight, Obesity, and Postmenopausal Invasive Breast Cancer Risk A Secondary Analysis of the Women's Health Initiative Randomized Clinical Trials. *Journal of the American Medical Association Oncology*, 1(5), 611-621.
- Newcomb, P. A., Trentham-Dietz, A., Hampton, J. M., Egan, K. M., Titus-Ernstoff, L., Andersen, S. W., . . . Willett, W. C. (2011). Late age at first full term birth is strongly associated with lobular breast cancer. *Cancer*, 117(9), 1946–1956.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79, 629–661.
- Nickel, A., Kohlhaas, M., & Maack, C. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 73, 26-33.
- Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., Akslén, L. A., Ragaz, J., Gown, A. M., Gilks, C. B., Rijn, M. van de, & Perou, C. M. (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10(16), 5367-5374.
- O'Donovan, P. J., & Livingston, D. M. (2010). BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis*, 31(6), 961-967.
- Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., Keogh, J. P., Meyskens, F. L., Valanis, B., Williams, J. H., Barnhart, S., & Hammar, S. (1996). Effects of a Combination of Beta Carotene and Vitamin A on Lung Cancer and Cardiovascular Disease. *The New England Journal of Medicine*, 334, 1150-1155.

- Pai, K., Baliga, P., & Shrestha, B. L. (2013). E-Cadherin Expression: A Diagnostic Utility for Differentiating Breast Carcinomas with Ductal and Lobular Morphologies. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(5), 840-844.
- Pallepati, P., & Averill-Bates, D. (2010). Mild thermotolerance induced at 40 °C increases antioxidants and protects HeLa cells against mitochondrial apoptosis induced by hydrogen peroxide: Role of p53. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 495, 97-111.
- Pallepati, P., & Averill-Bates, D. A. (2011). Mild thermotolerance induced at 40 °C protects HeLa cells against activation of death receptor-mediated apoptosis by hydrogen peroxide. *Free Radical Biology & Medicine*, 50, 667-679.
- Perez, R. P., Godwin, A. K., Handel, L. M., & Hamilton, T. C. (1993). A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. *European Journal of Cancer*, 29A(3), 395-399.
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., Rijn, M. v., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Aksten, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., & Børresen-Dale, A. L. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406, 747-752.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.
- Prasad, S., Gupta, S. C., & Tyagi, A. K. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*, 387, 95-105.
- Ramos-Remus, C., Gámez-Nava, J. I., González-López, L., Skeith, K. J., Perla-Navarro, A. V., Galván-Villegas, F., & Suárez-Almazor, M. E. (1998). Use of alternative therapies by patients with rheumatic disease in Guadalajara, Mexico: prevalence, beliefs, and expectations. *Arthritis Care & Research*, 11(5), 411-418.
- Reczek, C. R., & Chandel, N. S. (2015). ROS-dependent signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*, 33, 8-13.
- Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977-2992.
- Reynoso-Noverón, N., Villarreal-Garza, C., Soto-Perez-de-Celis, E., Arce-Salinas, C., Matus-Santos, J., Ramírez-Ugalde, M. T., Alvarado-Miranda, A., Cabrera-Galeana, P., Meneses-García, A., Lara-Medina, F., Bargalló-Rocha, E., & Mohar, A. (2017). Clinical and Epidemiological Profile of Breast Cancer in Mexico: Results of the Seguro Popular. *Journal of Global Oncology*, 3(6), 757-764.
- Rodríguez-Chávez, J. L., Coballase-Urrutia, E., Sicilia-Argumedo, G., Ramírez-Apan, T., & Delgado, G. (2015). Toxicological evaluation of the natural products and some semisynthetic derivatives of *Heterotheca inuloides* Cass (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 175, 256-265.
- Rodríguez-Chávez, J. L., Egas, V., Linares, E., Bye, R., Hernández, T., Espinosa-García, F. J., & Delgado, G. (2017). Mexican Arnica (*Heterotheca inuloides* Cass. Asteraceae: Astereae): Ethnomedical uses, chemical constituents and biological properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 195, 39-63.

- Rosas-Piñón, Y., Mejía, A., Díaz-Ruiz, G., Aguilar, M. I., Sánchez-Nieto, S., & Rivero-Cruz, J. F. (2012). Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *Journal of Ethnopharmacology*, *141*, 860–865.
- Roy, K., Kar, S., & Das, R. N. (2015). *Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment*. Academic Press.
- Rubinstein, L. V., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Simon, R. M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D. A., Monks, A., & Boyd, M. R. (1990). Comparison of In Vitro Anticancer-Drug-Screening Data Generated With a Tetrazolium Assay Versus a Protein Assay Against a Diverse Panel of Human Tumor Cell Lines. *Journal of the National Cancer Institute*, *82*(13), 1113-1118.
- Ruddon, R. W. (2003). *Holland-Frei Cancer Medicine (Sexta Edición) What Makes a Cancer Cell a Cancer Cell?* BC Decker.
- Russo, I. H., & Russo, J. (2011). Pregnancy-Induced Changes in Breast Cancer Risk. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, *16*, 221–233.
- Sagrero-Nieves, L., & Bartley, J. P. (1996). Volatile Components from the Leaves of *Heterotheca inuloides* Cass. *Flavour and Fragrance Journal*, *11*(1), 49-51.
- Santos, E. (2013). *Biología Molecular del Cáncer: del Laboratorio a la Clínica*. Salamanca: Real Academia de Medicina de Salamanca.
- Saybaşılı, H., Yüksel, M., Haklar, G., & Yalçın, A. S. (2001). Effect of mitochondrial electron transport chain inhibitors on superoxide radical generation in rat hippocampal and striatal slices. *Antioxidants & Redox Signaling*, *3*(6), 1099-1104.
- Sceneay, J., Liu, M. C., Chen, A., Wong, C. S., Bowtell, D. D., & Möller, A. (2013). The Antioxidant N-Acetylcysteine Prevents HIF-1 Stabilization under Hypoxia In Vitro but Does Not Affect Tumorigenesis in Multiple Breast Cancer Models In Vivo. *PLOS ONE*, *8*(6), 1-15.
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*, *24*(10), R453-R462.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, *9*, 671-675.
- Schumacker, P. T. (2015). Reactive Oxygen Species in Cancer: A Dance with the Devil. *Cancer Cell*, *27*, 1-2.
- Sebbagh, M., Renvoizé, C., Hamelin, J., Riché, N., Bertoglio, J., & Bréard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature Cell Biology*, *3*(4), 346-352.
- Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell*, *48*(2), 158-167.
- Senkus, E., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., Rutgers, E., Zackrisson, S., & Cardoso, F. (2015). Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *26*(Supplement 5), 8-30.
- Seo, M., Cho, N., Ahn, H. S., & Moon, H.-G. (2014). Cowden Syndrome Presenting as Breast Cancer: Imaging and Clinical Features. *Korean Journal of Radiology*, *15*(5), 586–590.

- Siddiqui, I. A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M., & Mukhtar, H. (2015). Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1348, 20–31.
- Sims, A. H., Howell, A., Howell, S. J., & Clarke, R. B. (2007). Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. *Nature Clinical Practice Oncology*, 4(9), 516-525.
- Singh, D. (2016). Defining desirable natural product derived anticancer drug space: optimization of molecular physicochemical properties and ADMET attributes. *ADMET and DMPK*, 4(2), 98-113.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., & Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107-1112.
- Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, G., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E. K., Goeke, E. K., Olson, B. J., & Klenk, D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85.
- Song, Q., Merajver, S. D., & Li, J. Z. (2015). Cancer classification in the genomic era: five contemporary problems. *Human Genomics*, 9(27), 1-8.
- Sotiriou, C., Neo, S. Y., McShane, L. M., Korn, E. L., Long, P. M., Jazaeri, A., Martiat, P., Fox, S. B., Harris, A. L., & Liu, E. T. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(18), 10393-10398.
- Sprague, B. L., & Trentham-Dietz, A. (2009). Prevalence of Breast Carcinoma In Situ in the United States. *Journal of the American Medical Association*, 302(8), 846–848.
- Staniek, K., Gille, L., Kozlov, A. V., & Nohl, H. (2002). Mitochondrial Superoxide Radical Formation is Controlled by Electron Bifurcation to the High and Low Potential Pathways. *Journal Free Radical Research*, 36(4), 381-387.
- Sullivan, L. B., & Chandel, N. S. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer & Metabolism*, 2(17), 1-12.
- Sun, L., Zhu, Y., Qian, Q., & Tang, L. (2018). Body mass index and prognosis of breast cancer. *Medicine (Baltimore)*, 97(26), 1-9.
- Sørli, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., Rijn, M. van de, Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E., & Børresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS*, 98(19), 10869-10874.
- Sørli, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C. M., Lønning, P. E., Brown, P. O., Børresen-Dal, A. L., & Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNAS*, 100(14), 8418–8423.
- Tafari, M., Sansone, L., Limana, F., Arcangeli, T., Santis, E. D., Polese, M., Fini, M., & Russo, M. A. (2015). The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-18.

- Tan, M.-H., Mester, J. L., Ngeow, J., Rybicki, L. A., Orloff, M. S., & Eng, C. (2012). Lifetime Cancer Risks in Individuals with Germline PTEN Mutations. *Clinical Cancer Research*, *18*(2), 400–407.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, *15*(552(Pt 2)), 335-344.
- Uchiyama, M., & Mihara, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, *86*(1), 271-278.
- Ugent, D. (2000). Medicine, myths and magic the folk healers of a mexican market. *Economic Botany*, *54*(4), 427–438.
- Veber, D., Johnson, S., Cheng, S., Smith, B., Ward, K., & Kopple, K. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, *45*(12), 2615-2623.
- Wang, L., Azad, N., Kongkaneramt, L., Chen, F., Lu, Y., Jiang, B.-H., & Rojanasakul, Y. (2008). The Fas Death Signaling Pathway Connecting Reactive Oxygen Species Generation and FLICE Inhibitory Protein Down-Regulation. *Journal of Immunology*, *180*(5), 3072-3080.
- Wang, L.-S., Sun, X.-D., Cao, Y., Wang, L., Li, F.-J., & Wang, Y.-F. (2010). Antioxidant and pro-oxidant properties of acylated pelargonidin derivatives extracted from red radish (*Raphanus sativus* var. *niger*, Brassicaceae). *Food and Chemical Toxicology*, *48*, 2712-2718.
- Wang, J., Krudy, G., Hou, T., Zhang, W., Holland, G., & Xu, X. (2007). Development of Reliable Aqueous Solubility Models and Their Application in Druglike Analysis. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *47*, 1395-1404.
- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., & McPhail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, *93*(9), 2325–2327.
- Waterbeemd, H. v., Dennis, A. S., Beaumont, K., & Walker, D. K. (2001). Property-Based Design: Optimization of Drug Absorption and Pharmacokinetics. *Journal of Medicinal Chemistry*, *44*(9), 1313-1333.
- Weinberg, R. A. (2014). *The Biology of Cancer (Second Edition)*. New York: Garland Science.
- Wickman, G. R., Julian, L., Mardilovich, K., Schumacher, S., Munro, J., Rath, N., Zander, Z. A. L., Mleczak, A., Sumpton, D., Morrice, N., Bienvenut, W. V., & Olson, M. F. (2013). Blebs produced by actin–myosin contraction during apoptosis release damage-associated molecular pattern proteins before secondary necrosis occurs. *Cell Death and Differentiation*, *20*, 1293–1305.
- Winkelman, M. (1986). Frequently used medicinal plants in Baja California Norte. *Journal of Ethnopharmacology*, *18*, 109-131.
- Winslow, T. (2012). *National Cancer Institute*. Retrieved from NCI Dictionary of Cancer Terms: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/ductal-carcinoma-in-situ>
- Winslow, T. (2014). *National Cancer Institute*. Retrieved from NCI Dictionary of Cancer Terms: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/dysplasia>

- Wong, E., & Rebelo, J. (2012). *McMaster Pathophysiology Review*. Retrieved from Breast Cancer: <http://www.pathophys.org/breast-cancer/>
- Yadav, R., & Agarwala, M. (2011). Phytochemical Analysis of Some Medicinal Plants. *Journal Of Phytology*, 3(11), 10-14.
- Zhang, B., Shu, X. O., Delahanty, R. J., Zeng, C., Michailidou, K., Bolla, M. K., Wang, Q., Dennis, J., Wen, W., Li, C., & Dunning, A. M. (2015). Height and Breast Cancer Risk: Evidence From Prospective Studies and Mendelian Randomization. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(11), 1-17.
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333.
- Zheng, L.-F., Wei, Q.-Y., Cai, Y.-J., Fang, J.-G., Zhou, B., Yang, L., & Liu, Z.-L. (2006). DNA damage induced by resveratrol and its synthetic analogues in the presence of Cu (II) ions: Mechanism and structure-activity relationship. *Free Radical Biology & Medicine*, 41, 1807-1816.
- Zurita-Esquivel, M., & Zolla, C. (1986). Enfermedades dermatológicas en la medicina tradicional de México. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 101(4), 339-347.