



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**LA ASPIRINA COMO UN POSIBLE FARMACO DE INTERFERENCIA EN LA
METASTASIS EXPERIMENTAL, PROVOCADA POR CÁNCER DE GLÁNDULA
MAMARIA EN UN MODELO *IN VITRO***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ELIZABETH CAMACHO ZAVALA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

DR. JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2014



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**LA ASPIRINA COMO UN POSIBLE FARMACO DE INTERFERENCIA EN LA
METASTASIS EXPERIMENTAL, PROVOCADA POR CÁNCER DE GLÁNDULA
MAMARIA EN UN MODELO *IN VITRO***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ELIZABETH CAMACHO ZAVALA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

DR. JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2014

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 28 de abril de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **CAMACHO ZAVALA ELIZABETH** con número de cuenta **405003204**, con la tesis titulada "**LA ASPIRINA COMO UN POSIBLE FÁRMACO DE INTERFERENCIA EN LA METÁSTASIS EXPERIMENTAL, PROVOCADA POR CÁNCER DE GLÁNDULA MAMARIA EN UN MODELO *IN VITRO***", realizada bajo la dirección de la **DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA**:

Presidente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Vocal: DR. MARCO ANTONIO VELASCO VELÁZQUEZ
Secretario: DR. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA
Suplente: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS
Suplente: DR. JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de septiembre de 2014



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la formación académica brindada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto con la beca No. 263525.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por el apoyo otorgado para la impresión de la tesis.

Agradezco a los doctores Carlos Pérez Plasencia y Javier Espinoza Aguirre, por aceptar ser miembros del comité tutor. A la Dra. Nadia Jacobo Herrera por aceptar ser el tutor principal.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Dra. Nadia Jacobo Herrera, por su paciencia, dedicación y confianza en toda mi estancia en la maestría.

Dr. Carlos Plasencia y a su equipo de laboratorio tanto del INCAN como de la FES Iztacala (UNAM), por los medios para la realización del trabajo experimental.

M. en C. Laura Ventura por sus comentarios constructivos, confianza y su apoyo incondicional.

M. en C. José Luis Ventura G. por sus enseñanzas, tiempo y medios para la realización del presente trabajo.

Dr. Alejandro Zentella D. y su laboratorio (colaboradores y compañeros) por el espacio y el tiempo brindado para mi formación.

Al M. en C. Luis Sánchez Sánchez y a su equipo de laboratorio de la FES Zaragoza (UNAM), por su espacio y tiempo para la realización de algunos ensayos.

Dra. Rebeca López Marure por su conocimiento aportado para la realización de esta tesis.

Dr. Javier Espinoza Aguirre por su tiempo, objetividad y aportaciones para la realización de este trabajo y mi formación.

Dra. Leticia Rocha Zavaleta, Dra. Vilma Maldonado Lagunas y a el Dr. Marco Antonio Velasco Velázquez por aceptar ser parte del jurado de examen, por sus observaciones y enriquecimiento de este trabajo de tesis.

DEDICADA

A mí querida familia

Amigos

Y mi incondicional y cómplice Moisés.

La imaginación humana es un sexto sentido utilizado para comprender las verdades que han existido siempre. Como estrellas en el firmamento, estas verdades están por ahí, esperando que nuestra imaginación extrasensorial las localice.

MICHAEL GUILLEN

No conozco hecho más alentador que el de la cuestionable capacidad del hombre para elevar su vida mediante un esfuerzo constante.

HENRY DAVID THOREAU

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción.....	4
Cáncer.....	4
Participación del microambiente tumoral.....	6
Cáncer de mama.....	7
Estadificación del cáncer de mama.....	9
Clasificación de cáncer de mama	9
Metástasis	10
Mecanismos moleculares y celulares de la metástasis	12
Tratamiento	13
Muerte celular	14
Apoptosis	14
Necrosis	16
Autofagia	17
El papel de las Cicloxigenasas (COX) en cáncer	19
Aspirina y cáncer	22
Farmacocinética de la aspirina	29
Antecedentes	30
Hipótesis	31
Objetivos	31
Objetivos específicos	31
Metodología	32
Resultados	38
Discusión	48
Conclusiones	55
Perspectivas	55

Literatura citada	56
Anexo	
Anexo 1. Pruebas estadísticas	66
Anexo 2. Cuantificación de bandas western blot	74
Anexo 3. Prueba de caspasa 3 por citometría de flujo	77
Índice de tablas	
Tabla I. Tabla comparativa de estudios asociados al uso de aspirina o AINEs y riesgo de cáncer	23
Índice de figuras	
Fig. 1 Estadística de mortalidad por cáncer	8
Fig. 2 Organos blanco de metástasis para cáncer de mama	11
Fig. 3 Apoptosis, vía extrínseca e intrínseca	16
Fig. 4 Diferencia entre muerte apoptótica y necrótico	17
Fig. 5 Micrografía electrónica de transmisión, autofagia	19
Fig. 6 Oxidación del ácido araquidónico, obteniención de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos	20
Fig. 7 Prostaglandinas y el cáncer	21
Fig. 8 Aspirina como inhibidor de COX (tomado de Nelson y Cox, 2008)	29
Fig. 9 Determinación de la IC 50 de AAS en células MDA-MB-231, (Técnica de cristal violeta)	38
Fig. 10 Determinación de la IC 50 de AAS en las células MDA-MB-231 (Técnica de SRB)	39
Fig. 11 Histogramas representativos del ciclo celular. WINmdí	41
Fig. 12 AAS en la distribución del ciclo celular	42
Fig. 13 Evaluación de la inducción de autofagia en presencia de AAS	44
Fig. 14 Muerte celular por apoptosis en la línea celular MDA-MB-231 inducida por AAS	45
Fig. 15 Ensayo de invasión celular (microheridas o wound healing)	46
Fig. 16. Análisis del área abierta (análisis con el software TScratch)	47
Fig. 17. Gráficas del porcentaje de migración de la línea celular MDA-MB-23 (Transwell)	48

Fig. 18 Evaluación de caspasa-3 por citometría de flujo 77

Resumen

El cáncer de glándula mamaria en México representa la primera causa de muerte por enfermedades oncológicas en mujeres, debido a que, la mayoría de las pacientes llegan a los servicios oncológicos con estadios avanzados o cercanos al desarrollo de metástasis. En países industrializados se han adoptado diferentes estrategias, tales como las mejoras en la detección, diagnóstico temprano y el tratamiento sistémico adyuvante, y la disminución de la terapia de reemplazo hormonal, lo que resulta en la disminución de la incidencia y la mortalidad; aunque los números en todo el mundo en general están aumentando. En los últimos años se ha observado que los fármacos antiinflamatorios no esteroideos y particularmente la aspirina, podrían tener un efecto favorable en mujeres con cáncer de mama, debido a que sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes actúan como agentes quimiopreventivos, reductores de masa tumorales y antimetastásicos. En diversos estudios epidemiológicos se ha encontrado una asociación entre el consumo de la aspirina y la disminución del riesgo de recurrencia de la enfermedad y muerte en distintos tipos de cáncer. Por lo que se sugiere, que el mecanismo de acción de la aspirina en distintas etapas del cáncer, está relacionado con la inhibición de los productos de las ciclooxigenasas quienes se encuentran sobre expresadas en diferentes tipos de cáncer.

En este proyecto se estudió el mecanismo de acción de la aspirina (AAS, ácido acetil salicílico) como un fármaco de interferencia en un modelo *in vitro* de migración provocada por las células de cáncer de mama triple negativo (CMTN) MDA-MB-231, altamente invasivas. Los resultados reflejan inhibición de la proliferación celular en un 40% por el método de cristal violeta de la línea MDA-MB-231 a una concentración de 10 mM de AAS a 24 horas y, un 50% de inhibición celular (IC₅₀) a una concentración de 8.5 mM de AAS a 48 horas. Por otra parte, la concentración requerida para la inhibición de la proliferación celular por medio de la técnica de sulforrodamina-B fue menor que con cristal violeta, 6 y 4 mM de AAS a 24 y 48 horas, respectivamente. Al analizar la distribución del ciclo celular, se observó detención del ciclo celular en la fase G₂/M del ciclo celular a 24 y 48 horas a partir de concentraciones de 4 mM y de ahí a concentraciones más altas. Además se llevaron a cabo experimentos por western blot para conocer el tipo de muerte celular

provocado por la AAS. Los resultados mostraron promoción de autofagia en las primeras 8 horas de tratamiento por sobreexpresión de Atg4b, y a partir de 24 y hasta 48 horas de tratamiento, se observó muerte por apoptosis a través de la expresión de caspasa-3 y PARP para apoptosis. Finalmente, para conocer si la AAS tenía algún efecto sobre la migración celular se llevaron a cabo dos ensayos diferentes, “transwell” y el cierre de herida o “wound healing”, en ambos casos se observó inhibición de la migración celular con AAS. En el ensayo de transwell se observó una inhibición del 20% en células tratadas con 2 mM de AAS, 30% con 4 mM y 50% con 6 mM, todos estos tratamientos en presencia de suero fetal bovino al 20% como quimioatrayente; mientras que las células tratadas sin suero no presentan diferencia significativa entre ellos y los controles. En el ensayo de wound healing, al transcurrir 24 horas de tratamiento el porcentaje de área abierta fue superior al 80% para todos los tratamientos uncluyendo los controles, no obstante al llegar a 48 horas de tratamiento el porcentaje de área abierta disminuyó, dejando un 45% de área abierta en el control y 50% en el vehículo, 70% en las células tratadas con 3.5 mM y 90% con 5 mM de AAS. Este trabajo de tesis aporta evidencia sobre el papel de la aspirina como inhibidor de la proliferación, inductor de detención del ciclo celular, inductor de muerte por autofagia y apoptosis e inhibidor de la migración, en una línea celular triple negativa.

Abstract

Nowadays, breast cancer is the first cause of death among women due to neoplasia in Mexico and around the world. Different strategies have been taken in industrialized countries such as improvements in screening, early diagnosis and adjuvant systemic therapy, and the decline of hormone replacement therapy, resulting in the diminishing of incidence and mortality; although the numbers in general worldwide are increasing. In our country, the major problem is related to late diagnosis and the presence of metastasis in patients. Several studies have shown that NSAIDs, and particularly aspirin, can have a favorable effect in women with breast cancer, since their anti-inflammatory and antioxidant properties act as chemopreventive agents, reducing tumor mass and metastasis process. Epidemiologic reports have found an association between aspirin consumption and risk of disease recurrence and death in various types of cancer. Evidence so far suggests

that the mechanism of action of aspirin in different stages of carcinogenesis is related to the inhibition of cyclooxygenase products that are overexpressed in various cancers.

In the present research work, it was evaluated the aspirin's performance as anti-metastatic drug *in vitro*, with the human triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231, which is highly invasive. Results showed that cell proliferation was inhibited by aspirin at a concentration of 10 mM (40%) after 24 h of treatment; at 8.5 mM the inhibition was of 50% after 48 h of treatment, both determined by crystal violet technique. Moreover, IC50 values for aspirin were calculated according to the sulforhodamine B method, 6 mM and 4 mM for 24 and 48 hours, respectively. In addition, it was analyzed the effect of aspirin on the cell cycle arrest by flow cytometry. Genetic material was found in the G2 / M phase of the cell cycle at 24 and 48 hours, when employing concentrations of 4 mM and higher. Furthermore, western blot experiments were performed in order to elucidate the type of cell death induced by aspirin in this cell line. The results showed induction of autophagy within the first 8 hours of treatment, and apoptosis death from 24 to 48 hours of treatment, through the expression of caspase-3 and PARP in apoptosis and Atg4b in autophagy. Finally, to determine whether the aspirin had any effect on cell migration, two assays were carried out, transwell and wound closure or wound healing. In the transwell assay, an inhibition of the 20% was observed in treated cells with aspirin at 2mM, 30% at 4 mM, and 50% at 6 mM, all of these treatments in presence of fetal bovine serum at 20% as a chemoattractant; while no serum-treated cells showed any significant difference in comparison with controls. In the wound healing assay, after 24 hours of treatment the percentage of open area was greater than 80% for all treatments even for controls. However, after 48 hours of treatment the percentage of open area decreased, leaving a 45% of open area in the control, 50% for the vehicle, 70% in cells treated with aspirin at 3.5 mM, and 90% at 5 mM. This thesis provides evidence *in vitro* suggesting that aspirin has a role as inhibitors of proliferation, promoter of cell cycle arrest, induce autophagy and apoptosis, and as migration inhibitor in a triple negative breast cancer cell line.

Introducción

Cáncer

El cáncer es considerado como un conjunto de enfermedades, surge como resultado de cambios genéticos que tienen efectos en las funciones básicas de proliferación celular a través de la promoción de la división celular y / o la inhibición de la muerte celular así como otras capacidades funcionales que permitan a las células cancerosas sobrevivir, proliferar y diseminarse. Es un proceso de múltiples pasos, mediante el cual los eventos genéticos pueden llegar a expresarse como resultado de la activación de proto-oncogenes o la inactivación de genes supresores de tumores (Felsher, 2008).

Por un lado los oncogenes son versiones alteradas de genes normales conocidos como proto-oncogenes, desempeñan un papel directo en la regulación de los interruptores de seguridad fisiológicos que regulan la mortalidad / la auto-renovación, la diferenciación, y / o la reparación del daño a DNA. Los mecanismos por los cuales se transforman en oncogenes son la amplificación génica, rearrreglos génicos, mutaciones puntuales y en algunos casos la participación de agentes virales. Por otro lado, los genes supresores de tumor (ST) promueven la formación de un tumor cuando existe una pérdida o inactivación de éstos o de sus productos proteicos. En términos generales, hay dos tipos de genes ST: “*gatekeepers*” o vigilantes y “*caretakers*” o cuidadores. A diferencia de los *gatekeepers*, los genes *caretaker* no regulan directamente proliferación, pero si actúan para prevenir la inestabilidad genómica. Por lo que, la mutación de los genes *caretaker*, aceleran la conversión de una célula normal a una célula neoplásica (Levitt y Hickson, 2002), y los dos alelos de los genes ST deben ser perturbados para observar un efecto fenotípico. No obstante, para que se lleve a cabo el proceso de carcinogénesis, se requiere la interacción tanto de factores genéticos como de factores externos (físicos, químicos y/o biológicos), que producen la degeneración de las células con lo que se originan lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos. Dichos tumores suelen estar localizados, pero eventualmente pueden diseminarse colonizando otros órganos en un evento conocido como metástasis (Massagué, 2009).

Por otro lado, aunque el cáncer es una enfermedad en la que predominan anomalías genéticas, los estudios moleculares han demostrado que alteraciones epigenéticas comparten un papel protagónico en su desarrollo. Por ejemplo, la metilación del ADN ocurre en sitios específicos y su ausencia en un islote CpG es un indicador de que el sitio de transcripción está activado y que es capaz de ser transcrito de ADN a ARN de manera normal. En las células cancerosas se pierde este patrón de metilación, los islotes CpG de algunos genes muestran un patrón de metilación inusualmente elevado en las regiones promotoras (Jones y Baylin, 2007). Estas modificaciones interactúan con factores que modifican la estructura de la cromatina, dando como resultado el silenciamiento del gen, por ejemplo en gen BRECA 1 en cáncer de mama. Otras alteraciones pueden ser la modificación de histonas mediante acetilación o metilación y los cambios en la estructuración jerárquica de la cromatina de orden mayor (Lagos y Soto, 2007).

Además, las capacidades biológicas adquiridas por las células cancerosas durante el desarrollo multipasos del cáncer (proceso denominado carcinogénesis) pueden resumirse en los *Hallmarks* descritos por los investigadores Douglas Hanahan y Robert A. Weinberg (2011) de manera general. En su primera publicación en el año 2000 incluyeron como atributos de la célula tumoral a las señales de proliferación sostenida, evasión de los mecanismos de supresores de crecimiento, resistencia a muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, activación de la invasión y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000). La evasión de las células de cáncer a los procesos de destrucción del sistema inmune por linfocitos B y T y las células asesinas (NK por sus siglas en inglés; natural killer) así como la modificación o reprogramación de la energía metabólica para una mayor eficiencia y el soporte de la proliferación neoplásica, son características que han sido incluidas en la última década como parte de los *Hallmarks* de una célula tumoral. Además, se han considerado dos características consecuenciales que facilitan el desarrollo de neoplasia, la primera es la inestabilidad genómica y mutación a partir de ST, que dotan a las células de alteraciones genéticas que conducen a la progresión tumoral (Hanahan y Weinberg, 2011).

Por otra parte, la inflamación, en la cual las células del sistema innato están designadas a eliminar infecciones y cicatrizar heridas, bien, pueden involucrarse con otros de los *Hallmarks* o atributos al suministrar moléculas bioactivas al microambiente tumoral, incluyendo factores de crecimiento, factores de supervivencia, factores proangiogénicos y enzimas que modifican la matriz extracelular y facilitan la angiogénesis, invasión y metástasis por la acumulación al azar de inestabilidad genéticas en las células cancerosas (Colotta *et al.* 2009). Las funciones biológicas adquiridas o *Hallmarks* junto con la participación de células normales del entorno, crean un microambiente tumoral molecular y bioquímico coordinado, que aumenta la capacidad de sobrevivencia y complejidad de las células cancerosas (Hanahan y Weinberg, 2011).

Participación del microambiente tumoral

Las células cancerosas están rodeadas por un complejo microambiente que comprende numerosas células incluyendo células endoteliales de la circulación sanguínea y linfática, fibroblastos estromales y una variedad de células derivadas de medula ósea (BMDCs, por sus siglas en inglés), incluyendo macrófagos, células supresoras derivadas de células mieloides (MDSCs, por sus siglas en inglés), monocitos y células madre mesenquimales (MSCs) (Mantovani *et al.* 2008). La asociación entre células de cáncer y células estromales que las rodean, generan la secreción de una multitud de quimosinas, factores de crecimiento y citocinas, entre otras moléculas que direccionan la migración, proliferación y diferenciación de células vasculares en una red de trabajo que sostiene el tumor y el microambiente tumoral. Asimismo, factores asociados como hipoxia, inflamación, isquemia y cambios genéticos y epigenéticos en tumores promueve la movilización de BMDCs, cambiando el microambiente del tejido local a un estado de promoción y crecimiento (Hayashi *et al.* 1991), para iniciar una cascada de eventos en los cuales las células inmunes son progresivamente amplificadas, dependiendo del contexto del tejido y estímulo celular (Medzhitov, 2008).

Por otro lado, la participación de las células inmunes infiltradas en tumores ha servido como indicador de pronóstico, por ejemplo infiltración de células T CD8+ y células

dendríticas maduras correlacionan con un favorable pronóstico en cáncer colorectal, cabeza y cuello (Talmadge *et al.* 2007). Mientras que la infiltración de macrófagos, correlaciona con un pobre pronostico en 80% de los cánceres analizados, incluyendo cáncer de seno, tiroides y vejiga, además de una asociación positiva con metástasis (Bingle *et al.* 2002).

Un ejemplo de la participación de las células estromales en la progresión de la tumorigenesis se puede observar en el trabajo de Olumi *et al.* (1999), quienes en un cultivo experimental de fibroblastos asociados a carcinoma (CAF, por sus siglas en ingles), epitelio prostático humano normal (NHPE, por sus siglas en ingles) y epitelio prostático humano inmortalizado antígeno-SV40 (TAg-HPE, por sus siglas en inglés) analizaron la modulación de la progresión maligna de células epiteliales no transformadas, y demostraron que CAF, estimulan la progresión del tumor de células epiteliales no tumorigénicas *in vivo* e *in vitro* al medir cambios en indicadores tumorigenicos (morfología, muerte celular y proliferación), respectivamente.

Cáncer de mama

El cáncer de glándula mamaria es la principal manifestación oncológica en mujeres en todo el mundo (Jemal *et al.* 2011). En México esta forma de cáncer presenta tasas de muerte que van en aumento sin que se sepa con certeza la razón de este incremento. En el más reciente reporte del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, consultado el 30 de agosto 2014), se destaca en cuestión de salud pública, que el cáncer de mama (CM) es la principal causa de muerte por tumores malignos en mujeres a partir de 20 años (13.8%) seguido por el cáncer-cérvicouterino (10.4 %) (Fig.1). Mientras que la tasa de morbilidad hospitalaria más alta es debida a CM y afecta principalmente a las mujeres en un intervalo de edad de 60 a 64 años y de 50 a 59 años (158 y 156 de cada 100 mil mujeres de cada grupo de edad, respectivamente). Es claro que la aplicación de procedimientos y pruebas diagnósticas que permitan la identificación temprana son las mejores aproximaciones para reducir la mortalidad. En este sentido, la autoexploración juega un papel importante como técnica de detección temprana de las primeras etapas de desarrollo de la enfermedad, seguida de la mastografía, la cual es recomendada para todas las mujeres de 45 años en adelante. Afortunadamente, cuando el cáncer se detecta en sus etapas

iniciales, los esquemas terapéuticos existentes son muy eficientes; no es así para las etapas invasivas y el pronóstico es pobre para las pacientes con metástasis (INEGI, consultado el 30 de agosto 2014).

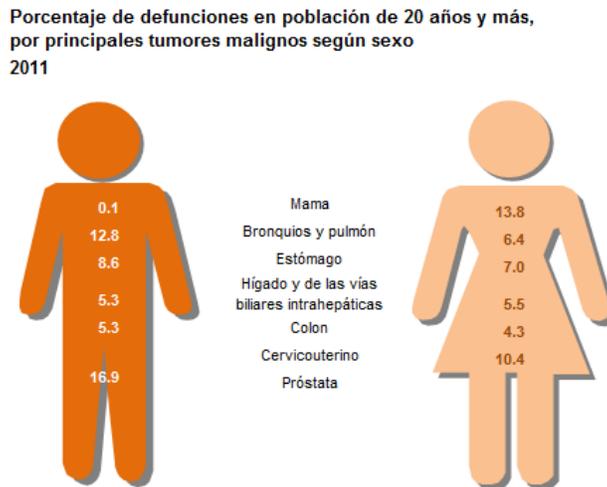


Fig.1 Estadística de mortalidad por cáncer. Tomado de INEGI, consultado el 30 de agosto 2014.

Estudios clínicos han evidenciado una serie de oncogenes que participan en el desarrollo del CM como por ejemplo el receptor Her-2/Neu o las ciclinas D1, D3 y E, así como los genes supresores o que participan en la reparación del DNA, incluyendo a p53, ATM, PTEN, BRCA1 y BRCA2, además de la expresión de receptores a hormonas esteroides como el receptor de estrógenos y de progesterona (Fanale *et al.* 2012). Estos genes y otros se emplean ya rutinariamente en el diagnóstico del cáncer de glándula mamaria. Por ejemplo, la prueba Mammaprint® analiza un panel pronóstico de 70 genes y Oncotype Dx™ examina 21 genes que son de utilidad en el pronóstico de la evolución de la enfermedad y su tratamiento (Morris y Carey, 2007).

Antecedentes familiares de CM han sido considerados como un factor de riesgo para la enfermedad. No obstante, la mayoría de las mujeres diagnosticadas con CM no tienen antecedentes familiares de enfermedad, y sólo del 5% al 10% tienen una verdadera predisposición hereditaria al CM. En estudios familiares se han identificado genes de alta penetrancia como son BRCA1, BRCA2, PTEN y TP53, los cuales son considerados como responsables de los síndromes hereditarios (De Vita *et al.* 2008).

Estadificación del cáncer de mama

Según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2012, consultado el 30 de agosto 2014) y de la Norma Oficial Mexicana de 2011(consultado el 9 de agosto 2014), ésta neoplasia comprende cinco estadios: 0) corresponde a pacientes con un crecimiento canceroso *in situ*; I) generalmente involucra un tumor en etapas tempranas de vascularización menor a 2 cm de diámetro, ausente de los ganglios y sin metástasis; II) son pacientes con un tumor vascularizado, con un diámetro mayor de 2 cm y menor a 5 cm, que está presente en ganglios, pero que aún no presenta metástasis; III) pacientes con un tumor con un diámetro mayor a 5 cm y que ya se encuentra presente en nódulos supraclaviculares y IV) pacientes que ya presentan focos de crecimiento metastásico (OMS, 2012 y NORMA Oficial Mexicana, 2011).

Clasificación del cáncer de mama

Debido a las grandes variaciones fenotípicas y diversidad de patogenia del CM, los sistemas de clasificación incluyen criterios morfológicos, inmunofenotípicos y marcadores moleculares (Holliday y Speirs, 2011). El sistema de clasificación molecular ordena los cánceres de mama humanos con base en su perfil de expresión génica (Sorlie *et al.* 2001; Perou *et al.* 2000) en al menos cinco subtipos: 1) luminal A y 2) luminal B, los cuales expresan receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), ambos subtipos responden a tratamiento hormonal; 3) el subtipo HER2 que sobre expresa HER2 y puede presentar baja expresión o carece de ER y PR, y que responde a tratamiento con trastuzumab; 4) el subtipo con baja claudina, de clasificación más reciente, éste tipo de tumores además de un mal pronóstico, tienen desregulación de claudina-3 y claudina-4, baja expresión del marcador de proliferación Ki67, enriquecimiento de los marcadores asociados con la transición epitelio-mesénquima y la expresión de las características asociadas con las células madre del cáncer de mama (CSC) (por ejemplo, fenotipo CD44⁺ CD24^{-low}); 5) subtipo basal (carecen de ER, PR, y HER2), es el más agresivo, las pacientes tienden a tener un mal pronóstico con un alto riesgo de metástasis a distancia y muerte dentro de los primeros 3 a 5 años después del

diagnóstico. Hasta el momento no se ha encontrado ningún tratamiento eficaz (Wiese *et al.* 2013).

Este último subtipo ha generado interés y controversia entre los subtipos moleculares de cáncer de mama identificados a través de perfiles de expresión génica. Debido a que no todos los cánceres tipo basal determinados por perfiles de expresión génica carecen de ER, PR y HER2 y por el contrario, no todos los cánceres triple negativos muestran un fenotipo tipo basal. Por ejemplo, de 8-29% de los cánceres triple negativos no muestran un subtipo basal y 18-40% de los cánceres basal definidos por perfiles de expresión génica no se comportan con un fenotipo triple negativo (Badve *et al.* 2011, Parker *et al.* 2009).

Particularmente el CMTN, se define por su falta de expresión de ER, PR y HER2. Comprende el 15% de los casos de CM, y afecta frecuentemente a pacientes premenopáusicas y jóvenes (<50 años) y se ha visto que su prevalencia es más alta en mujeres afroamericanas (Ismail-Khan y Bui, 2010). El CMTN tiene un curso clínico agresivo y un alto riesgo de recurrencia y muerte comparado con otros fenotipos tumorales, particularmente en los primeros cinco años, se ha asociado con el cáncer de mama tipo basal por todas las similitudes que guardan entre sí, sin embargo, no son sinónimos. La histología de CMTN incluye una alta tasa de proliferación y alto grado de necrosis. También existe mayor riesgo de metástasis hacia órganos viscerales y tejidos blandos como el pulmón, y menor incidencia de metástasis a hueso (Minn *et al.* 2005).

Metástasis

El CM metastásico se define por la diseminación del tumor en otros tejidos como la pared torácica y los ganglios linfáticos regionales (De Vita *et al.* 2008). La diseminación tumoral puede ocurrir a través de la sangre y los vasos linfáticos y a través de la extensión directa de la pared torácica. Los sitios más comunes de metástasis para tumores sólidos de cáncer de mama incluyen el hueso, pulmón, hígado y el cerebro (Massagué *et al.* 2009) (Fig. 2). Aunque, también se han documentado casos de difusión del cáncer de mama a casi

todos los órganos del cuerpo (De Vita *et al.* 2008). Sin embargo, en la última década se han descrito preferencias de metástasis por los órganos según el subtipo de cáncer de mama, por ejemplo, subtipo basal tiene tendencia hacia vísceras (Rodríguez *et al.* 2006); los tumores con receptores hormonales positivos tienen más probabilidades de propagarse a los huesos como el sitio inicial de la metástasis; los tumores con receptores hormonales negativos y positivos para HER-2 tienen más probabilidades de recurrir inicialmente en las vísceras (Vincent *et al.* 2008) y el subtipo CMTN hacia pulmón (Minn *et al.* 2005).

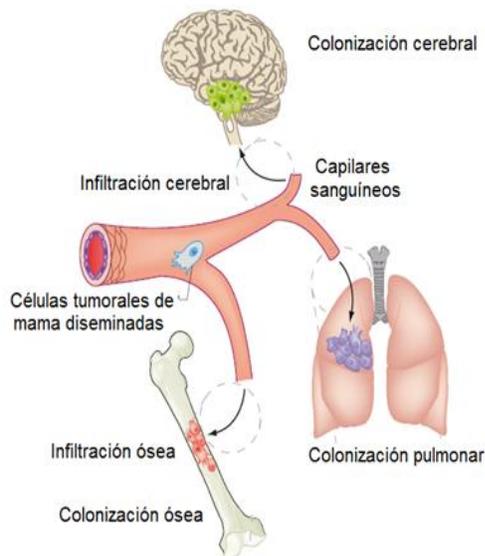


Fig. 2 Organos blanco de metástasis para cáncer de mama: pulmón y hueso (tomada y modificada de Massagué, 2009)

La síntesis y secreción de varios factores proangiogénicos por el tumor y células del entorno, así como la ausencia de factores antiangiogénicos juegan un papel clave para establecer una red de trabajo capilar alrededor del tejido después de una transformación inicial de células cancerosas, crecimiento de la masa tumoral e invasión local del estroma circundante este último como una consecuencia del aumento de expresión de una serie de enzimas (por ejemplo colagenasa) (Fidler, 2002). Una vez que las células invasoras penetran el canal vascular o linfático, pueden crecer allí, o una sola célula o grupos de células pueden desprenderse y ser transportadas dentro del sistema circulatorio experimentando una transición epitelio a mesénquima (TEM) (Lian *et al.* 2013). Una vez en la circulación, las células de cáncer deben sobrevivir ante la defensa del sistema inmune y turbulencias de

la circulación. Y posteriormente, deben detenerse en el capilar del órgano receptor, donde las células cancerosas pueden interactuar con el endotelio a través de selectinas, en una manera similar a los leucocitos en un proceso inflamatorio, donde pueden extravasarse en un proceso inverso de transición de mesénquima a epitelio (TME) para sobrevivir en el nuevo entorno del órgano blanco, proliferar y establecer un tumor secundario (Kuldeep Singh *et al.* 2012).

Mecanismos celulares y moleculares involucrados en la metástasis

El proceso metastásico involucra pasos limitantes que son influenciados por células no malignas (células estromales) del microambiente tumoral, muchas de estas células son derivadas de medula ósea, particularmente de linaje mieloide, y son reclutadas por células cancerosas para aumentar su supervivencia, crecimiento, invasión y diseminación (Joyce *et al.* 2009). Además, la inducción de angiogénesis es crucial en estados tempranos en el desarrollo y crecimiento de tumores sólidos, y necesaria para la diseminación hematológica de las células de cáncer. Asimismo, células mieloides derivadas de medula ósea, incluyendo macrófagos, expresión de monocitos TEMs (TIE2, de Tie-2 expressing monocytes, por sus siglas en inglés), neutrófilos y mastocitos han mostrado contribuir a la angiogénesis del tumor a través de la producción de factores de crecimiento, citocinas y proteasas tales como: factor de crecimiento endotelio vascular A (VEGFA), citocina PROK2 (conocida como BV8) y metaloproteinasas (MMPs) respectivamente. Por otro lado varios de estos tipos celulares también han sido implicados en estados tardíos de la progresión tumoral (Murdoch *et al.* 2008).

Para poder invadir los vasos sanguíneos es necesaria la degradación proteolítica de la membrana basal, para ello las células cancerosas producen proteasas, aunque en muchos casos las células derivadas de medula ósea incluyendo macrófagos, han mostrado ser los mejores tipos celulares que suministran dichas proteasas al microambiente tumoral. Las proteasas derivadas de células estromales incluyen metaloproteinasas específicas de matriz (Egeblad *et al.* 2002; Lynch *et al.* 2002), cisteína catepsina (Mohamed *et al.* 2006; Gocheva *et al.* 2007) y serinproteasas. El mecanismo por el cual las proteasas promueven invasión e

intravasación involucra la fragmentación de moléculas de adhesión, tales como (E)-caderina, llevando a la pérdida de contacto entre célula-célula y con ello facilitando la migración celular, además pueden actuar en la degradación y movimiento de proteínas de matriz extracelular, procesamiento y activación de citocinas y factores de crecimiento, e incrementando significativamente la quimioatracción, migración celular y metástasis (Egeblad *et al.* 2002).

Tratamiento

Los tratamientos de quimioterapia y los procedimientos quirúrgicos aplicados a las etapas tempranas de la enfermedad son muy exitosos para curar a estas pacientes. Sin embargo, el panorama es menos favorable cuando se aplica a pacientes con formas que presentan invasividad y metástasis.

Las terapias blanco están orientadas a interferir en forma selectiva con la función incrementada que se asocia con un oncogén. Por ejemplo, el uso de anticuerpos monoclonales humanizados contra el receptor Her2, que se sobreexpresan en el 20-25 % de las formas invasivas de cáncer de glándula mamaria, cuyo nombre comercial es trastuzumab o herceptina, al unirse al receptor Her2 promueve la muerte por apoptosis de las células de cáncer de glándula mamaria (Martini *et al.* 2011). Sin embargo, sus efectos citotóxicos no son suficientes para que pueda ser usado como una monodroga, por tanto, el trastuzumab se emplea, con muy buenos resultados, en combinación con inhibidores de la función de los microtúbulos como el taxol o la vincristina o con agentes que dañan al DNA como la doxorubicina, con el objetivo de debilitar al tumor antes de una cirugía (terapia neoadyuvante). Por otra parte, el trastuzumab tiene efectos secundarios como el broncoespasmo pulmonar semejante al del asma, alteraciones cardíacas, en particular disfunción sistólica, sin que hasta la fecha se comprendan las bases moleculares de estos los efectos colaterales adversos (Piotrowski, *et al.* 2012; Vahid *et al.* 2008).

Cabe mencionar que para el cáncer de glándula mamaria la radioterapia no forma parte de los tratamientos convencionales. Los tratamientos de quimioterapia, en general,

son relativamente inespecíficos ya que están dirigidos a todas las células con alta tasa de división celular, llegando a afectar a aquellas células que se dividen lentamente, generando múltiples efectos colaterales como la caída del cabello o la inflamación y disfunción de los epitelios de la cavidad oral y del tracto gastrointestinal conocida como mucocitis. Estos fármacos incluyen antimetabolitos como la 5-fluorouridina (5-FUR), agentes que producen daño oxidativo, o aquellos que producen alquilación del DNA como la doxorrubicina, fármaco que en el cáncer de glándula mamaria constituye la primera línea de tratamiento, seguida del taxol y la vincristina (Romond *et al.* 2005). El potencial curativo de la quimioterapia sigue justificando sus efectos nocivos colaterales por ser la forma más efectiva de atacar el avance del cáncer.

Si bien hay un extenso conocimiento sobre los genes que dan origen al cáncer y sobre las funciones que se encuentran alteradas, faltan tratamientos blanco. Principalmente para los subtipos basal y triple negativos (Olaya, 2010). Y la investigación en general, abre espacio a aquellos tratamientos que puedan actuar sobre eventos que generalmente son dañados en la célula tumoral y que pudieran ser nuevamente redireccionados a su buen funcionamiento, como por ejemplo el proceso de muerte celular.

Muerte celular

La muerte celular es de gran importancia en la regulación del desarrollo de un organismo, la homeostasis tisular y la respuesta a estrés, además de ser la interconexión entre supervivencia y proliferación celular. La muerte celular puede ser a consecuencia de procesos como apoptosis, necrosis, autofagia o senescencia.

Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es esencial para mantener la homeostasis tisular, con un papel central en el desarrollo embrionario, en la eliminación de las células dañadas o envejecidas. Cuando el delicado balance entre la tasa normal de apoptosis y el exceso de apoptosis se rompe, surgen condiciones degenerativas y fallas que contribuyen a trastornos autoinmunes, hiperplasia e incluso cáncer (Elinos-Báez *et al.* 2003).

La apoptosis es actualmente vista como la modalidad cuantitativa de muerte mas importante, morfológicamente se caracteriza por la pérdida de contacto célula-célula, la contracción celular (pérdida de K^+ y agua), la formación de ampollas en la membrana celular y autofragmentación en cuerpos apoptóticos, que son eliminados rápidamente por los fagocitos profesionales como macrófagos y células dendríticas, además de células vecinas (atraídos por la exposición de fosfatidilserina en la membrana) (Yassin *et al.* 2006), puede ser activada ya sea por receptores de muerte de superficie o liberación de citocromo c de la mitocondria bajo condiciones, tratamientos o eventos que provoquen estrés celular (Galluzzi *et al.* 2012) (Fig. 3). A nivel bioquímico es caracterizada por permeabilización de la membrana mitocondrial y/o activación masiva de caspasas.

Las caspasas son proteasas específicas que fragmentan proteínas intracelulares de reparación, proteínas estructurales, factores de transcripción entre otras proteínas (Kuldeepsinh *et al.* 2012). Se encuentran en la célula como precursores inactivos que necesitan ser cortados para iniciar su actividad. Existen dos grandes grupos de caspasas, las denominadas iniciadoras (caspasa 8, 9 y 10) y las ejecutoras (caspasa 3 y 7). Por un lado las caspasas iniciadoras son activadas por autoproteólisis cuando son translocadas a compartimientos específicos o mediante adaptadores/activadores, mientras que las caspasas ejecutoras son activadas a través del corte específico mediado por las caspasas iniciadoras (Elinos-Báez *et al.* 2003).

Dentro de la participación de las caspasas en el proceso de apoptosis se ha documentado como esencial la participación de la caspasa-3, para la fragmentación del ADN y los cambios morfológicos asociados con apoptosis (Jänicke *et al.* 1998). La caspasa 3 es clave para el desensamble celular intrínseco, y tienen como blanco láminas nucleares, la Cinasa PAK2 (Serina / treonina-proteína Cinasa), el sistema de fragmentación de DNA ICAD/DFF45 (inhibidor de DNasa activada por caspasa, por sus siglas en inglés), el cual permite a la proteína CAD (desoxirribonucleasa activada por caspasa, por sus siglas en inglés) entrar en el núcleo y fragmentar el DNA, originando la característica "escalera de DNA" que se observa en células apoptóticas (Boland *et al.* 2013; Jänicke *et al.* 1998) y PARP (poli-ADP-ribosa-polimerasa). Este último blanco, es una proteína nuclear abundante

que influye en la reparación del ADN, replicación de ADN y modulación de la estructura de la cromatina, en respuesta a estrés genotóxico PARP-1 cataliza la transferencia de unidades ADP-ribosa a partir de NAD^+ como sustrato a moléculas aceptoras incluyendo la cromatina (Timmer y Salvensen, 2007).

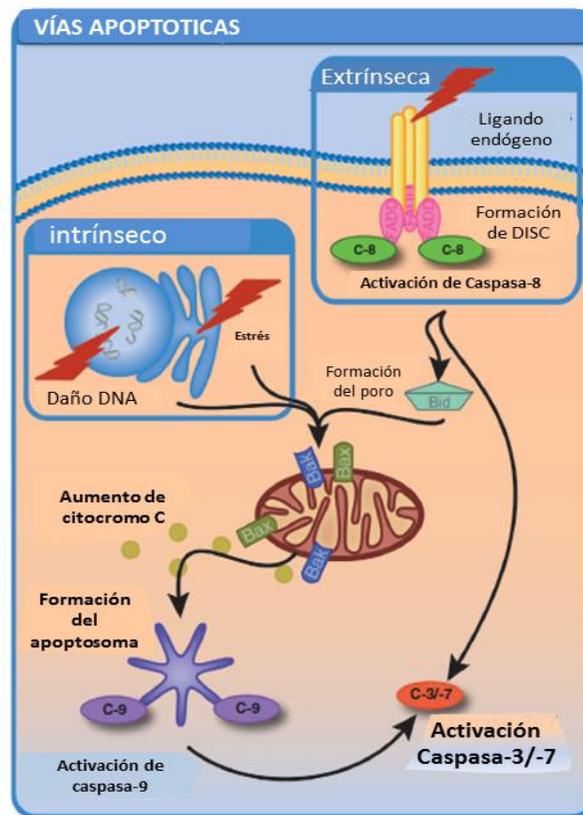


Fig. 3 Apoptosis, vía extrínseca e intrínseca. (Imagen tomada y modificada de Boland *et al.* 2013).

Necrosis

La necrosis se caracteriza morfológicamente por una ganancia en volumen de la célula (oncosis), hinchazón de los orgánulos, ruptura de la membrana plasmática y la subsiguiente pérdida de contenido intracelular (Fig. 4) (Vandenabeele *et al.* 2010). La necrosis había sido considerada como un mecanismo de muerte accidental, sin control y sólo en circunstancias patológicas. No obstante, se están acumulando pruebas que sugieren que la ejecución de la muerte celular necrótica puede ser regulada sutilmente por un conjunto de vías de transducción de señal y mecanismo catabólico (Galluzzi *et al.*

2012). Varios factores desencadenantes pueden provocar necrosis regulada, incluyendo daño en el DNA de alquilación, excitotoxinas y la ligación de receptores de muerte, por lo menos en circunstancias seleccionadas. Cuando las caspasas (y, en particular, la caspasa-8) se inhiben por manipulaciones genéticas (por ejemplo, por gen no-caut o RNA de interferencia, iRNA) o son bloqueadas por agentes farmacológicos por ejemplo, inhibidores de la caspasa química, RIP1 y sus homólogos RIP3, no se degradan, en su lugar participan en interacciones físicas y funcionales que en última instancia, activan la ejecución de la muerte celular necrótica formando un necrosoma (Jain *et al.* 2013).

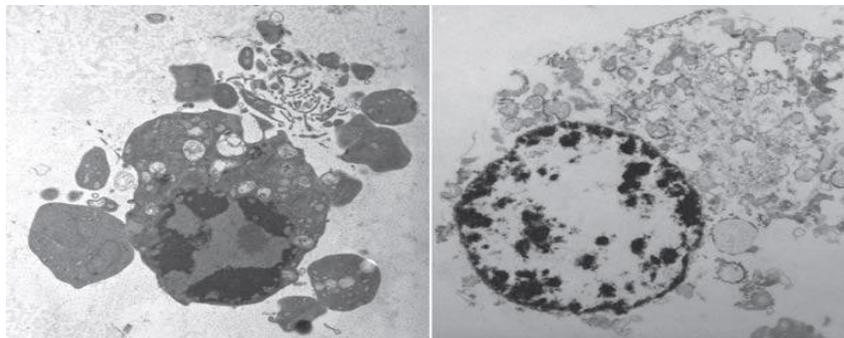


Fig. 4 Diferencia entre muerte apoptótica y necrótica (tomada de Vandenabeele *et al.* 2010).

La apoptosis y necrosis programada invariablemente contribuye a la muerte celular, mientras que la autofagia puede jugar tanto a favor de la supervivencia como a favor de la muerte.

Autofagia

Por otro parte, la autofagia es un proceso catabólico conservado en la evolución que realizan las células eucariontas, cuya función principal es la eliminación de proteínas de vida media larga y orgánulos dañados, como la mitocondria (Galluzzi *et al.* 2012). Es una respuesta de protección y reciclaje, a favor de la supervivencia al principio, sin embargo, si es hiperactivada, en última instancia, lleva a la destrucción la célula “muerte autofagica”. Se trata de una respuesta celular a una variedad de estímulos de estrés internos y externos como la deficiencia de nutrientes, la hipoxia o el estrés oxidativo (Jain *et al.* 2013). La muerte celular por autofagia se produce en ausencia de condensación de la cromatina, pero se acompaña de vacuolización masiva del citoplasma. Existen tres formas principales de

autofagia para introducir el material citoplásmico al lisosoma: autofagia mediada por chaperonas, microautofagia y macroautofagia (Loos *et al.* 2013).

En la autofagia mediada por chaperonas se degradan determinadas proteínas citoplásmicas que son introducidas a los lisosomas molécula por molécula (Sahu *et al.* 2011). Las proteínas blanco se identifican por contener una secuencia semejante al motivo formado por los aminoácidos Lisina (K), Fenilalanina (F), Ácido glutámico (E), Arginina (R) y Glutamina (Q), que es reconocida por un complejo citoplásmico formado por la chaperona hsc70 y las co-chaperonas hip, hop, bag-1, hsp40 y hsp90 (proteína de choque térmico, por sus siglas en inglés). Este complejo interactúa con un receptor en la membrana lisosomal (proteína de LAMP-2A membrana asociada a lisosoma 2, por sus siglas en inglés), compuesto por varias subunidades que forman un poro, a través del cual pasa la proteína a degradar por enzimas hidrolíticas. Posteriormente el complejo de las chaperonas hsp70 se despega de la membrana lisosomal para unirse a otra proteína citoplásmica (Loos *et al.* 2013). En la microautofagia el material citoplásmico a degradar es engullido directamente por el lisosoma, ya sea por invaginación o extensión de la membrana lisosomal que rodea el material a degradar y eventualmente, se fusiona formando una vesícula dentro del lisosoma (Sahu *et al.* 2011). La macroautofagia se caracteriza por la presencia de vesículas especializadas que se forman a partir de unos sacos que se encuentran en el citoplasma, llamados “fagóforos” o “membranas de aislamiento”, que se elongan rodeando el material citoplásmico a degradar como si fueran macrófagos intracelulares. Los extremos de estos sacos eventualmente se fusionan, formando una vesícula de doble membrana conocida como autofagosoma, dentro de la cual queda secuestrado el material a degradar catabólicamente. (Fig.5) (Eskelinen y Saftig, 2009).

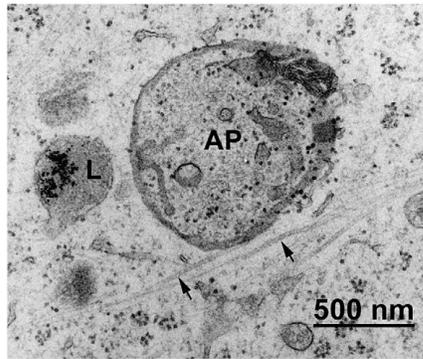


Fig. 5 Micrografía electrónica de transmisión, autofagia. La imagen muestra un autofagosoma (AP) y un lisosoma (L) en un fibroblasto de ratón (Imagen tomada de Eskelinen y Saftig, 2009).

El papel de las ciclooxigenasas (COX) en cáncer

Las COX y prostaglandinas en condiciones fisiológicas se ubica en una gran variedad de tejidos como de ovarios, útero, riñón (regulando la presión sanguínea), en la medula ósea y en sistema nervioso central (Rao y Knaus, 2008). La síntesis de las prostaglandinas comienza cuando el ácido araquidónico es liberado de los fosfolípidos de la membrana celular al producirse una lesión tisular por acción de la fosfolipasa A2. Este proceso es mediado por las isoenzimas COX en sus dos isoformas 1 y 2 (COX-1 y COX-2), moléculas que catalizan la oxidación del ácido araquidónico, obteniendo prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos (Fig. 6) (Nilanjan *et al.* 2010). COX-1 se expresa en un gran número de tejidos y es importante para la producción de prostaglandinas que regulan la homeostasis celular, como el flujo renal, y en circunstancias donde las prostaglandinas poseen una acción protectora como en la mucosa gástrica. COX-2 se expresa en células endoteliales, macrófagos, fibroblastos sinoviales, mastocitos, codrocitos y osteoblastos después de un traumatismo tisular, desempeñando un papel importante en la inflamación, ya que es responsable de las elevadas concentraciones de eicosanoides que se hayan en los tejidos inflamados (Cuzick *et al.* 2009).

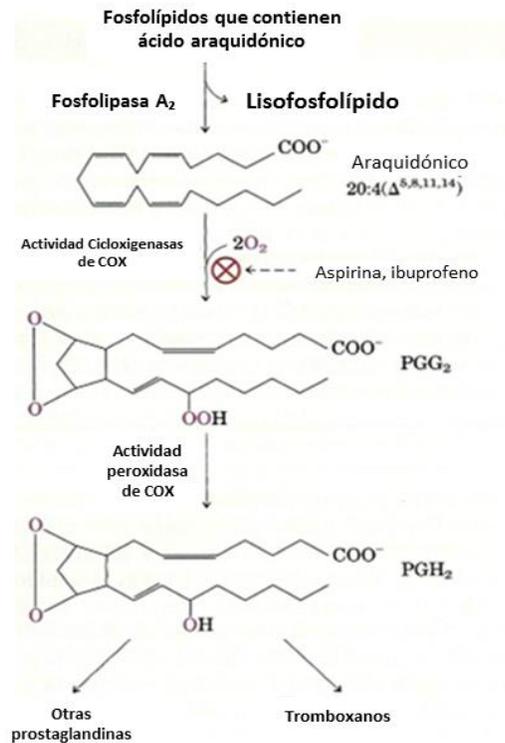


Fig. 6 Oxidación de ácido araquidónico, obtención de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos (Imagen tomada y modificada de Nilanjan *et al.* 2010)

Numerosos estudios indican que la COX-2 se encuentra sobreexpresada en una variedad de cánceres humanos, incluyendo colorrectal, de próstata y de mama (Holmes *et al.* 2011). Esta sobreexpresión de COX-2 se asocia con el avance de la enfermedad, al tamaño del tumor, a un estado de receptor hormonal negativo, a una alta tasa de proliferación, a una alta expresión de p53 y a la presencia de la amplificación del oncogen HER-2 (Ristimäki *et al.* 2002); lo que sugiere que puede servir como un biomarcador pronóstico para CM (Larkins *et al.* 2006). Además, se ha observado su presencia en líneas celulares de cáncer de mama altamente invasivas como por ejemplo MDA-MB-231 y Hs578T, mientras que en líneas celulares poco invasiva dependientes de estrógenos como la MCF-7, no lo expresan (Liu y Rose, 1996).

Debido a que también se han detectado niveles elevados de prostaglandinas, en particular PGE₂, en líneas celulares de cáncer de mama invasivo y no invasivo, se ha correlacionado a los productos finales de la actividad de la COX-2, como las principales

mediadoras de cambios en la progresión de las células de cáncer, (Fig.7) (Nilanjan *et al.* 2010). Por ejemplo, la presencia de PGE₂ aumenta la proliferación celular al estimular células indirectamente, mediante el aumento de los niveles de estrógeno y la inducción de la expresión del gen de aromatasa (Rao y Knaus, 2008). Además, se ha demostrado que la PGE₂, la prostaciclina y los tromboxanos A₂ contribuyen a la angiogénesis tumoral por medio de la migración celular endotelial, y a través de la integrina avβ₃ y ayudando en la producción de factores de crecimiento angiogénicos (Larkins *et al.* 2006). Asimismo, en estudios de ratones transgénicos que sobreexpresan COX-2 en las células epiteliales mamarias, se promueve la tumorigénesis de glándula mamaria y la disminución de la apoptosis mediante la reducción de los niveles de expresión de los genes proapoptóticos (Ristimäki *et al.* 2002).

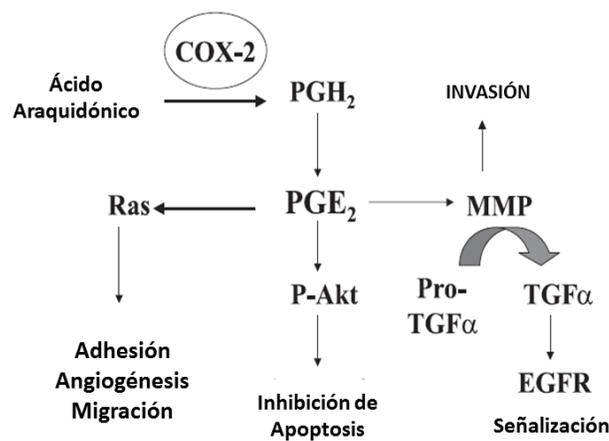


Fig. 7 Prostaglandinas y el cáncer (Tomada y modificada de Nilanjan *et al.* 2010)

El resultado de trabajos de investigación tanto de laboratorio, como clínicos y epidemiológicos, sugieren que la administración de inhibidores de COX-2 como la aspirina, indometacina y otros AINEs, reducen la incidencia de cáncer de colon, próstata y seno, así como el proceso de carcinogénesis (Eliassen *et al.* 2009). Mediante la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas como el principal mecanismo de acción, a través de múltiples vías incluyendo la interferencia con la formación de aductos de DNA, disminución de la proliferación celular, la angiogénesis, la metástasis y la producción de aromatasa, y a través del aumento de la apoptosis (Hu *et al.* 2012).

En este sentido, en el trabajo de Larkins *et al.* (2006), se encontró una correlación entre la inhibición de COX-2 y PGE2, observándose disminución de la proliferación celular, migración, invasión y expresión de metaloproteasas, en células cáncer de seno (líneas MDA-MB-23, Hs578T y MCF7), mediante ensayos *in vitro*, y usando como tratamiento inhibidores específicos de COX-2 (NS-398 y ácido niflumico “AN”).

A pesar del éxito de los inhibidores selectivos de la COX-2 y su menor efecto gastrointestinal a diferencia de los tradicionales AINEs, en diferentes estudios se ha planteado preocupación con respecto a sus eventos cardiovasculares adversos. Por ejemplo, se ha demostrado de forma concluyente que los inhibidores selectivos de la COX-2 pueden inclinar el equilibrio natural entre A2 protrombótico tromboxano (TXA2) y prostaciclina antitrombótica (PGI2) que podría aumentar la posibilidad de un evento cardiovascular trombótico. Asimismo, en abril de 2005, el comité asesor de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) de EE.UU., llegó a la conclusión de que los coxibs inhibidores específicos de COX-2, aumentan el riesgo de eventos cardiovasculares, y recomendó la suspensión de Bextra ® (valdecoxib) de Pfizer, al celecoxib se le permitió permanecer en el mercado, con una advertencia de recuadro negro que indica un riesgo de eventos cardiovasculares adversos (Administración de Alimentos y Medicamentos, consultado el 30 de Agosto 2014).

Aspirina y Cáncer

Particularmente el AAS o aspirina, conocido fármaco con efecto antipirético y analgésico, ha sido objeto de considerable interés como agente preventivo del cáncer debido a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes en diversos tipos de cáncer, incluyendo colon, mama y pulmón (Bosetti *et al.* 2006). Se ha sugerido a la aspirina como el AINE más ponderable para uso quimiopreventivo y terapéutico (Cuzick *et al.* 2009, Elwood *et al.* 2009) debido a sus datos disponibles de seguridad y eficacia, y principalmente por su beneficio cardiovascular a diferencia de otros AINEs tradicionales e inhibidores selectivos de COX que actualmente son dados a pacientes con riesgo de

desarrollo cáncer colorectal, y no proveen cardioprotección (Chell *et al.* 2006, Rao *et al.* 2008).

Hoy en día existe evidencia epidemiológica que sugiere la disminución del riesgo de recurrencia (probabilidad de que el cáncer reaparezca) y el aumento de la tasa de supervivencia en pacientes con cáncer de colon, pulmón, próstata y estómago, principalmente (Chan *et al.* 2005). En la tabla 1, se observa una recopilación de estudios epidemiológicos, del uso de la aspirina y AINEs en CM.

Tabla I. Tabla comparativa de estudios asociados al uso de aspirina o AINEs y riesgo de CM.

Estudio	No. pacientes	RR/RM/RIE	95% (IC)	Comentario	Autor y año de publicación
Caso-control	3,133 pacientes 3,062 control	RM=0.76 RM= 0.68	0.66-0.88 0.54-0.86	Uso de AINES por lo menos durante 2 meses Uso de AINES por más de 8 años	Cotterchio <i>et al.</i> 2001
Estudio de cohorte	27,616 mujeres postmenopáusicas	RR=0.71 RR=1.01	0.58-0.87 0.83-1.25	Uso de aspirina por lo menos 6 veces/semana. Uso de otros AINEs por lo menos 6 veces/semana	Johnson <i>et al.</i> 2002
Estudio de cohorte	29,470 participantes (ambos sexos)	RIE=0.9	0.8-1.1	Aspirina durante 9 años (150 mg)	Friis <i>et al.</i> 2003
Estudio de cohorte	80,741 mujeres postmenopáusicas	RR=0.79 RR=0.72 RR=.79	0.60-1.0 0.56-0.91 0.60-1.03	Uso de AINEs (dos o más tabletas/semana; por 5-9 años) Uso de AINEs (≥ 10 años) Uso prolongado de Aspirina (>100 mg/día)	Harris <i>et al.</i> 2003
Estudio de cohorte	734,899	RM=0.77	0.62-0.95	Dosis diarias de 75 mg de aspirina (por 1 año o más)	García-Rodríguez and González Pérez, 2004
Caso-control	1,442 casos 1,429 control	RM=0.8 RM= 0.72 RM= 0.74	0.66-0.97 0.58-0.90 0.60-0.93	Usuarios de aspirina u otros AINEs (una vez por semana, 6 meses o más) Usuarios frecuentes (más de 7 tabletas/semana) Usuarios de aspirina con tumores RH ⁺	Terry <i>et al.</i> 2004

Aspirina como posible fármaco de interferencia en la metástasis experimental, provocada por
cáncer de glándula mamaria en un modelo in vitro

		RM= 0.97	0.67-1.40	Usuarios de aspirina con tumores RH ⁻	
Estudio de cohorte	22,834 individuos	RR=0.98	0.84-1.14	Uso de aspirina y mortalidad en ambos sexos	Ratnasinghe <i>et al.</i> 2004
		RR=0.82	0.49-1.36	Mortalidad en mujeres (usuarias de aspirina)	
Caso-control	1,478 casos 3,838 controles	RM= 0.84	0.64-0.97	Uso regular (una tableta/semana)	Swede <i>et al.</i> 2005
		RM= 0.80	0.67-0.96	Usuarios ocasionales	
Estudio de cohorte	19,934 pacientes con aspirina (100 mg) 19,942 pacientes con placebo	RR= 1.01	0.94-1.08	Diferentes tipos de cáncer	Cook <i>et al.</i> 2005
		RR= 0.98	0.87-1.09	Cáncer de seno (1230 casos)	
Caso-control	7,006 incidencias de cáncer se seno	RM= 0.78	0.63-0.97	Uso regular de AINEs	Zhang <i>et al.</i> 2005
		RM= 0.86		Uso regular de aspirina	
Estudio de cohorte	114,460 pacientes	RR= 0.98	0.86-1.13	Uso regular de aspirina	Marshall <i>et al.</i> 2005
		RR= 1.09	0.97-1.21	Uso regular de AINEs	
		RR= 0.80	0.62-1.03	Cáncer de seno RE ⁺ y RP ⁺ (mínimo de 5 años)	
		RR= 1.81	1.12-2.92	Cáncer de seno RE ⁻ y RP ⁻ (mayor de 5 años)	
Estudio de cohorte	77,413 pacientes	RR*= 1.05	0.88-1.26	Uso regular por periodos largos de AINEs comparado con el no uso (≥ 30 pastilla/mes)	Jacobs <i>et al.</i> 2005
		RR*= 0.88	0.69-1.12	Uso regular por periodos largos de aspirina comparado con el no uso (≥ 30 pastillas/ mes ≥ 5 años)	
Estudio de cohorte	22,507 mujeres postmenopáusicas	RR= 0.84	0.77-0.90	Incidencia de cáncer de los usuarios de aspirina	Bardia <i>et al.</i> 2007
		RR= 0.87	0.76-0.99	Mortalidad de los usuarios de aspirina	
Estudio de cohorte	98,920 mujeres	RTR= 1.05	0.88-1.25	Estudio multiétnico (afroamericanas, caucásicas, japonesas-americanas, latinas y mujeres hawaianas)	Gill <i>et al.</i> 2007
		RTR = 1.04	0.84-1.27	Usuarias recurrentes de aspirina (≥ 6 años de uso) Ex usuarias de	

Aspirina como posible fármaco de interferencia en la metástasis experimental, provocada por cáncer de glándula mamaria en un modelo in vitro

		RTR = 0.70 RTR = 0.90	0.51-0.95 0.62-1.30	aspirina (≥ 6 años de uso) Usuarías recurrentes de otros AINEs (≥ 6 años de uso) Ex usuarias de otros AINEs (≥ 6 años de uso)	
Estudio de cohorte	76,303 mujeres	RR*=0.83	0.63-1.10	Cáncer de seno; uso prolongado diariamente de aspirina en mujeres (325 mg/día)	Jacobs <i>et al.</i> 2007
Caso-control	1,527 MBNH cases 1,601 MBNH control 798 MNH cases 924 MNH control	RM= 0.56	0.33-0.96	Disminución del riesgo en MNH	Slattery <i>et al.</i> 2007
Caso-control	3,125 casos 3,062 controles	RM= 0.76 RM= 0.71 RM= 0.80	0.66- 0.88 0.60-0.84 0.62-1.03	Uso de AINEs RE ⁺ /RP ⁺ RE ⁻ /RP ⁻	Kirsh <i>et al.</i> 2007
Estudio de cohorte	28,695 mujeres	RT= 1.27 RT= 1.38	1.10-1.45 1.12-1.69	Incremento de usuarias vs no usuarias de AINEs, Usuarías solo de aspirina, mayor incidencia de cáncer d seno que AINEs	Friis <i>et al.</i> 2008
Estudio de cohorte	35,323 mujeres postmenopáusicas	HTR= 0.65 HTR= 0.78	0.43-0.97 0.61-0.98	Bajas dosis de aspirina (≥ 4 días/semana, al menos 10 años) Moderado uso de AINEs, 10 años, ≥ 3 días/semana	Ready <i>et al.</i> 2008
	4,164 mujeres	RR= 1.07 RR= 0.29 RR= 0.36 RR= 0.91 RR= 0.40 RR= 0.57	0.70-1.63 0.16-0.52 0.24-0.54 0.62-1.33 0.24-0.65 0.39-0.82	Aspirina asociada con la disminución del riesgo de muerte por cáncer de seno 1 día/semana 2-5 días/semana 6-7 días/semana Asociación de aspirina con recurrencia distante 1 día/semana 2-5 días/semana 6-7 días/semana	Holmes <i>et al.</i> 2010

Mujeres blancas no hispanas (MBNH), Mujeres hispanas nativas (MHN); RR: Riesgo relativo; RM: Razón de Momios o Tasa de probabilidad; RIE= Razón de Incidencia Estandarizada; RT= Razón de Tasas; RTR= Razón de Tasa de Riesgo; IC: intervalo de confianza; AINEs = Antiinflamatorios No Esteroides; RP: Receptor de Progesterona; RE: Receptor de Estrógenos.

En la tabla podemos encontrar el trabajo de Johnson *et al.* 2002, donde se realizó un estudio cohorte para revisar el efecto de la aspirina y otros AINEs en una población de 27,616 mujeres postmenopáusicas en Estados Unidos. De las mujeres que participaron en el estudio, menos del 4% fueron diagnosticadas con cáncer de seno (RR=0.80) después de 6 años de seguimiento. En particular para la aspirina, el riesgo relativo fue de 0.71 (IC del 95%) para aquellas mujeres que utilizaban el fármaco mínimo seis veces por semana, independientemente del estadio de desarrollo en el que se encontraba la enfermedad. Por el contrario, el uso de otros AINEs bajo las mismas condiciones, las pacientes no presentaron ninguna ventaja (RR= 1.01, con IC del 95%). Un año después la Iniciativa de Salud para la Mujer (WHI, por sus siglas en inglés), llevó a cabo un estudio más grande con 80,741 pacientes, por un tiempo de 10 años. Durante este periodo menos del 2% de las pacientes fueron diagnosticadas con cáncer de seno. Sus resultados mostraron que el uso regular de aspirina reduce la incidencia de cáncer de seno en un 21% (RR=0.79; 95% CI, 0.60-1.04), tomando más de dos tabletas por semana (dosis mayor a 100 mg/día). El efecto de los AINEs fue más significativo en mujeres que presentaban características como una masa corporal alta, falta de ejercicio, paridad tardía, historia familiar de CM y que habían sido sometidas a terapia hormonal de reemplazo. De acuerdo con estos resultados, las mujeres que presenten dichas características, es decir, con una mayor propensión al desarrollo de CM, pueden recibir protección utilizando los AINEs (Harris *et al.* 2003).

En otro estudio realizado por Ratnasinghe *et al.* en el 2004, se encontró que para el cáncer en general, el uso de aspirina favorece la protección al desarrollo de la enfermedad, sin embargo ésta depende del tipo de cáncer diagnosticado, el sexo y la edad del paciente. Para CM se encontró en éste trabajo, una disminución en la mortalidad por el uso de aspirina reportando un RR de 0.82. Este estudio cohorte tomó como fuente de información la base de datos de los Estudios de Salud y Evaluación Nutricional I y II (de 1971 a 1975 y de 1976 a 1980, respectivamente) en Estados Unidos. El seguimiento de los pacientes se hizo por poco más de 20 años, tomando los datos sobre mortandad del Índice Nacional de Muerte (NDI, por sus siglas en inglés). Los resultados mostraron una reducción en la tasa de mortalidad en hombres y mujeres que usaban aspirina (RR=0.88, 95% CI, 0.85-0.99). Particularmente para mujeres con cáncer de seno y ovario se encontró reducción en la

mortalidad en pacientes que usaban aspirina (RR=0.82, 95% CI, 0.49-1.36), en hombres el uso de aspirina redujo la mortalidad para cáncer de pulmón (RR=0.69, 95% CI, 0.49-0.96).

Por otro lado Marshall y su equipo en el 2005 trabajaron con 114,640 maestras de California e investigaron la asociación entre el uso de AINEs y el riesgo de CM. Los medicamentos evaluados fueron la aspirina, el ibuprofeno y el acetaminofén. A diferencia de otros estudios, aquí los autores dividieron en dos grupos a las pacientes con CM: localizado y no localizado, además, incluyeron como criterio de clasificación el estado hormonal en receptores de estrógeno y progesterona positivos y negativos. Los autores reportaron que ni el uso diario de aspirina, ni el uso de otros AINEs como el paracetamol, estuvieron asociados al riesgo de CM (RR= 0.98, 1.09 y 0.99, respectivamente). Entre usuarios regulares de aspirina, no se encontró relación con la duración o frecuencia de uso. Sin embargo, aquellas mujeres con receptor de hormonas positivo y que tenían un patrón de consumo diario de aspirina durante un mínimo de 5 años, con un RR de 0.80 (95% CI: 0.63-1.03) se observó una disminución aunque no fue estadísticamente significativa. En conclusión, el uso de aspirina no estuvo asociado al riesgo de desarrollar CM. Además, el grupo de CM con receptores hormonales negativos (RE y RP) tuvo un incremento en el riesgo de CM (RR=1.81, 95% CI=1.12-2.92) con el uso diario de aspirina por un periodo mayor a 5 años. El trabajo de Terry *et al.* 2004 coincide con los datos anteriores de receptores hormonales, observándose una disminución en el riesgo de desarrollo en todos los subgrupos estudiados (RE+ RP+, ER+ RP-, RE- RP+), excepto para pacientes con receptores de estrógeno y progesterona negativos. Para aquellas usuarias que tomaban aspirina una vez por semana durante seis meses o más su riesgo relativo fue de 0.80.

Por otra parte, en Canadá se llevó a cabo un estudio con pacientes con cáncer de mama en el que se reportó que la ingesta de AINEs y de ácido acetilsalicílico a una concentración de 325 mg de manera regular, no difiere significativamente en relación a la presencia o ausencia de receptores hormonales (progesterona y estrógenos) (Kirsh *et al.* 2007). Asimismo, en un estudio sobre la relación entre la ingesta de aspirina y la supervivencia al cáncer de mama de Holmes *et al.* (2010) encontró disminución del riesgo de recurrencia y muerte de acuerdo al uso de la aspirina (de 1, 2 - 5 días/semana; 6 -7

días/semana o no uso) en mujeres diagnosticadas en los estadios I, II o III, monitoreadas a partir de un año después del diagnóstico hasta su muerte o hasta el 2006 (datos colectados a partir de 1976 hasta 2002). Esta asociación no fue diferente para estadios, estatus menopáusico, índice de masa corporal o estado de receptor de estrógenos.

Los datos recopilados de las observaciones clínicas como de investigación epidemiológica muestran resultados encontrados, en donde existe tanto evidencia positiva de su efecto, como actividad nula en las pacientes. No obstante de manera general el efecto es visible con el uso prolongado, por lo que investigadores como Agrawal y Fentiman (2008) proponen que los AINEs y en particular la aspirina, pueden ser empleados como coadyuvantes o tratamientos paliativos junto con terapia hormonal, en mujeres diagnosticadas con cáncer de seno. Aunque, el fármaco ideal, la dosis y el tiempo de administración aún se encuentran en investigación.

Por otro lado, en estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha demostrado que la aspirina puede inducir la apoptosis en diferentes tipos de cáncer a través de vías dependientes e independientes de COX (Elwood *et al.* 2009). Los efectos independientes incluyen alteración de la transcripción génica, la inhibición de la función del proteasoma, la detención del ciclo celular y la modulación de varias proteínas cinasas. Además de sensibilizar a las células de cáncer de colon y próstata a TRAIL, para posteriormente inducir apoptosis por desregulación de Bcl-2 o survivina (Lu M. *et al.* 2008).

El interés de la aspirina como agente terapéutico en diversos eventos resulta de su capacidad de inhibición de las dos isoformas de ciclooxigenasas y en consecuencia de sus derivados. Por un lado, la inhibición de la COX-1 en plaquetas tiene un efecto terapéutico en infarto al miocardio, este efecto se atribuye a la unión del grupo acetilo de la aspirina al sitio activo de la enzima en el grupo serina 530, como consecuencia el acceso del ácido araquidónico al sitio activo del enzima queda bloqueado y por tanto inhibiendo la síntesis de tromboxanos y la agregación plaquetaria (Fig.8) (Nelson y Cox, 2008). Por el contrario, la inhibición de la COX-2 por la aspirina puede no ser causada por la acetilación de su sitio activo debido a que el sitio activo de COX-2 es mayor que el de COX-1 de tal forma que

puede aceptar ácido araquidónico incluso cuando esta acetilado. Sin embargo, se ha documentado que el principal metabolito de la aspirina, ácido salicílico, podía suprimir la expresión de la COX-2 durante la transcripción porque a concentraciones terapéuticas (10^{-5} - 10^{-4} moles / L), se suprime el ARN mensajero (ARNm) de COX-2 y la síntesis de proteínas en células endoteliales humanas y fibroblastos (Elwood *et al.* 2009).

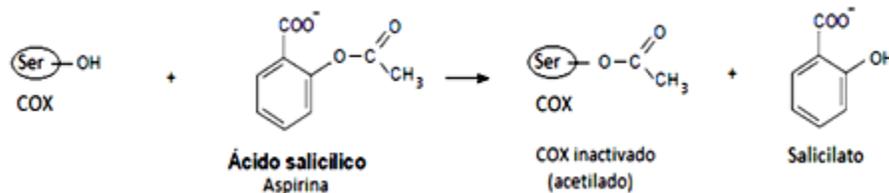


Fig. 8 Aspirina como inhibidor de COX (tomado de Nelson y Cox, 2008).

Farmacocinética de la aspirina:

Absorción. El AAS se absorbe rápida y completamente en el tracto gastrointestinal, siendo después hidrolizado a ácido salicílico con una vida media de 15-20 min dependiendo de la dosis. La aspirina después de ser ingerida, se absorbe como tal, pero parte penetra en la circulación general en la forma de ácido salicílico, por la hidrolisis que ejercen las esterasas de la mucosa gastrointestinal y el hígado (Vademecum, consultado el 30 de agosto 2014).

Distribución. Una vez absorbido, los salicilatos se distribuyen en todos los tejidos corporales y líquidos transcelulares, en primer lugar por procesos pasivos que dependen del pH. Los compuestos en cuestión son transportados activamente por un sistema saturable de baja capacidad (Vademecum, consultado el 30 de agosto de 2014). El ácido acetilsalicílico se une parcialmente con proteínas séricas y principalmente con albúmina, el valor normal de esta unión es del 80-90% administrado en concentraciones plasmáticas terapéuticas y disminuye conforme aumenta las concentraciones en plasma. Por ejemplo a concentraciones bajas (<100 µg/mL) aproximadamente el 90% del salicilato en plasma se une a albúmina, mientras que a concentraciones más altas (> 400 µg/mL), sólo el 75% se une a albúmina (Vademecum, consultado el 30 de agosto de 2014).

La intoxicación temprana (salicilismo), se observa en concentraciones plasmáticas que se aproximan a los 200 µg/mL. Sin embargo, los efectos tóxicos severos se asocian a niveles plasmáticos que rondan los 400 µg/mL. En adultos la acción analgésica-antipirética es de 500 mg/4-6 h vía oral hasta un máximo de 4g/día y la acción antiinflamatoria es de 3-8 g/día y en niños es de 10-25 mg/kg/día en dosis fraccionadas cada 4-6 horas. La dosis letal en adultos oscila entre 10 y 30 g y en niños, se estima en 4 g (Plan Nacional para la Enseñanza y Formación en Técnicas y Tratamiento del Dolor, FDA 2014).

Excreción. Los salicilatos se excretan por la orina en la forma de ácido salicílico libre (10%), ácido salicílico (75%), salicifenólico (10%) y acilo (5%) y ácido gentísico (menos de 1%). Sin embargo, la excreción de salicilato libre es muy variable y depende de la dosis y el pH de la orina. En orina alcalina, puede eliminarse en forma de salicilato libre, más de 30% del fármaco ingerido, en tanto que en orina ácida puede disminuir incluso a 2% (Tischendorf, 2009).

Biotransformación. Los salicilatos son biotransformados en muchos tejidos, aunque dicho fenómeno ocurre sobre todo en estructuras como el retículo endoplásmico y mitocondrias de hígado. Los tres productos metabólicos principales son el ácido salicílico (conjugado con glicina), el glucurónido de éter o fenólico, y el glucurónido de éster o acilo. Además se oxida una pequeña fracción hasta dar ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) y ácidos 2,3-dihidroxibenzoico y 2,3,5-trihidroxibenzoico, también se forma ácido gentísico que es el conjugado glicínico del ácido gentísico (Tischendorf, 2009).

Antecedentes

El cáncer de mama actualmente es considerado como la principal causa de muerte por enfermedades oncológicas a nivel mundial y nacional en la población femenina. Para combatir esta enfermedad existen diversas alternativas de tratamientos, sin embargo, éstos son ineficientes en pacientes con cáncer triple negativo y en estadios avanzados o metástasis, generando la necesidad de buscar nuevas rutas de información para su

prevención y tratamiento. En la actualidad existe un fuerte interés en los AINEs como inhibidores de COX-2 y por tanto de las prostaglandinas. Dentro de estos inhibidores se encuentra la aspirina, la cual ha demostrado tener actividad biológica, en diferentes tipos de cáncer, además de su papel cardiovascular, antipirético y antiinflamatorio, a diferencia de los inhibidores selectivos de COX-2 quienes han mostrado eventos cardiovasculares adversos.

Hipótesis

La aspirina, conocido fármaco con efecto anti-inflamatorio y antipirético favorecerá el proceso de muerte celular e interferirá en el evento de migración de la línea celular humana de cáncer de glándula mamaria MDA-MB-231 en un modelo *in vitro*.

Objetivo

Evaluar la actividad de la aspirina como inhibidor de la migración celular y su capacidad de detener la proliferación celular en una línea de cáncer de mama triple negativo *in vitro*, así como su actividad inductora de muerte sobre la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama.

Objetivos específicos

- Determinar la concentración de AAS, requerida para disminuir en un 50% (IC50) el número celular en la línea tumoral MDA-MB-231, mediante cristal violeta.
- Determinar el efecto citotóxico de AAS, requerida para inhibir en un 50% la proliferación celular, por sulforrodamina B.
- Conocer el efecto del AAS en el ciclo celular de línea tumoral MDA-MB-231 a través de la distribución de DNA en las fases del ciclo celular, por citometría de flujo.
- Evaluar muerte celular apoptótica mediante la expresión de caspasa-3 y PARP, y autofagia mediante Atg4b, a través de la técnica de western blot.

- Evaluar el efecto del AAS en la migración experimental de células de cáncer de mama *in vitro*.

Metodología

Línea celular

La línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, USA). Dicha línea celular se mantuvo en cajas Petri de 100mm (Corning, USA), con 10 ml de volumen final de medio DMEM Gibco® con L-glutamina y bencilpenicilina, suplementado al 10% de suero fetal bovino (SFB) Gibco®, en condiciones estériles en incubadora a 37 °C, 5 % de CO₂ y 100% de humedad. El número de células empleado varió dependiendo del tipo de ensayo.

Agentes químicos

0.02 g ácido acetilsalicílico (AAS) (Sigma-Aldrich St. Louis, USA) fueron diluidos en 125µl etanol absoluto (J T. Baker, USA) y llevado a un volumen de 5 ml con PBS para una solución stock de 22.22 mM. El AAS fue preparado en fresco para cada ensayo.

Método de cristal violeta para la determinación del número celular

Las células de cáncer de mama fueron sembradas y expuestas a tratamiento con AAS (concentraciones ascendentes a partir de 2.5 a 10 mM) para establecer los valores IC50 (la inhibición de la población celular en un 50%). Los ensayos se realizaron mediante la siembra de 2.2×10^4 células/cm² en un área de 0.032 cm² en un volumen de 200 µl de medio de cultivo DMEM al 10 % de SFB. Las células se dejaron adherir durante 24 h antes de la exposición con AAS y se evaluaron a 24 y 48 h por cristal violeta y SRF-B, para conocer el número celular y su viabilidad, respectivamente.

El método de cristal violeta se empleó para conocer la IC50 de la línea MDA-MB-231 expuesta a AAS. Este ensayo consiste en la capacidad de medir el contenido nuclear principalmente en células adherentes. Las células fueron previamente fijadas en glutaraldehído al 1.1% en medio DMEM suplementado al 1% con SFB de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente fueron secadas y teñidas con 0.1 % de cristal violeta en solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6, durante 20 minutos y lavadas con agua para eliminar el colorante no fijado. Finalmente, el colorante unido a las células viables fue extraído con ácido acético al 10% (Sigma-Aldrich St. Louis, USA) y leído a una absorbancia de 590 nm en un lector de ELISA (Opsys MRTM, USA) (Kueng *et al.* 1989).

Ensayo de citotoxicidad por sulforrodamina-B (SRB)

Con el fin de establecer el efecto citotóxico del AAS y su IC50 para la línea celular MDA-MB-231, se empleó el método colorimétrico de SRB establecido por Vichai y Kirtikara (2006), el cual está basado en la capacidad de medir el contenido de proteína celular en células adherentes en platos de 96 pozos. La SRB es un colorante de aminooxantano, rosado brillante que posee dos grupos sulfónicos $-\text{SO}_3^-$ cargados negativamente, capaces de unirse electrostáticamente a cationes. En condiciones ácidas (disuelta en ácido acético) la SRB aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas y se fija selectivamente a estos proporcionando un índice del contenido de proteína celular. Para este ensayo, al término del tratamiento con AAS, las células fueron fijadas con ácido tricloroacético al 10% (TCA, Sigma-Aldrich® USA) a 4⁰C por 1 hora, posteriormente lavadas con agua cuatro veces y secadas a temperatura ambiente. En seguida fueron teñidas con la SRB (0.4% disuelta 1% de ácido acético) durante 30 minutos en agitación constante a temperatura ambiente y lavadas con ácido acético al 1% para eliminar el colorante no fijado. El colorante unido a las células viables fue extraído con medio alcalino (solución de Tris pH 10.5, Sigma-Aldrich®, USA) y fue leído a una absorbancia de 490 nm en un lector para ELISA (Opsys MRTM, USA). Al inicio del ensayo se sembró una placa con la misma densidad celular que el resto de los tratamientos, denominada tiempo cero o basal, las células una vez adheridas a los pozos se fijaron con

TCA y se procedió con el protocolo de SRB (células no tratadas). El valor obtenido de la placa cero se restó a la densidad óptica (DO) de los tiempos de tratamiento. Es decir, en cada experimento se calculó la fracción de supervivencia como el cociente de DO entre las células tratadas y la DO de las células control (sin tratamiento).

La DO arrojada por el lector Opsy MR Dynex technologies, y el programa Revelation Quicklink, fueron procesados en el programa Microsoft Office Excel 2007, obteniendo las curvas dosis respuesta, que muestran el efecto del compuesto sobre la población celular y sus IC50.

Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo

En placas de 6 pozos fueron sembradas 2.6×10^4 células/cm² en un área de 9.6 cm² en medio DMEM suplementado al 10% con SFB. Se dejaron 24 horas para permitir su adherencia y fueron tratadas con AAS a diferentes concentraciones (2, 4 y 6 mM). Posteriormente, las células fueron despegadas con verseno, centrifugadas y lavadas con PBS. El botón celular fue fijado en 500 µl de metanol al 70% por 20 minutos a 4 °C. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos y se lavaron con PBS. Al botón celular se le adicionaron 500µl de RNAsa:PBS (2.5 U/ml) y se incubó por 30 minutos a 37 °C. Transcurrida la incubación se adicionaron 10 µl de una solución de yoduro de propidio (0.2 g/ml), se mezcló y se protegió de la luz para ser leídas en un citómetro de flujo FACS-Canto II (Becton-Dickinson, San Jose California, USA) con el software FACSDIVA™, de la misma casa comercial. Las poblaciones celulares se centraron atendiendo el tamaño y complejidad celular (Forward Scatter, por sus siglas en ingles FSC: volumen de la partícula/ Side Scatter, y SSC complejidad interna de la partícula). El análisis de la distribución de DNA se realizó con el programa WINmdi versión 2.8.

Western blot

Tratamientos y extracción de proteínas: células MDA-MB-231 fueron sembradas en cajas Petri de 100 mm a una confluencia de 70 a 80% y tratadas con AAS con concentraciones de 4, 6 y 10 mM por 4, 8, 16, 24 y 48 horas.

Tratamiento para control de caspasa-3 y PARP: se expusieron las células a luz UV (dosis de 9000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) durante 10 minutos en PBS y expuestas directamente en la campana de flujo, transcurrido este tiempo se reemplazó el PBS por medio fresco al 10% de SFB y se dejaron incubar por 24 horas antes de su extracción.

Tratamiento para control de autofagia: las células fueron estimuladas con cloroquina a una concentración de 10 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (disuelta en solución salina) por 24 h para la inducción de autofagia.

Extracción con RIPA: Las cajas con el cultivo celular fueron lavadas con PBS frío (3ml) y tanto el medio como PBS se colectaron en tubos de 15 ml, y centrifugaron a 1300 rpm por 7 minutos. Las cajas fueron escurridas unos segundos para posteriormente adicionar RIPA/Complit (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) (200 μl para cajas de 100mm). Se dejó actuar unos minutos y procedió a raspar con gendarme, posteriormente se colectó el lisado y resuspendió junto con el botón obtenido del sobrenadante. Nuevamente se centrifugó a 12000 rpm por 20 minutos y se tomó el sobrenadante. Las muestras fueron guardadas a -20 $^{\circ}\text{C}$ para su posterior cuantificación. El proceso de extracción se hizo a una temperatura de 4 $^{\circ}\text{C}$.

Cuantificación de proteínas: Para la cuantificación se partió de un stock de albúmina a 2mg/ml y se realizó una curva de proteína (2, 4, 8 y 16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), estas muestras junto con las obtenidas de los extractos de AAS se leyeron mediante el método de Bradford al igual que su blanco (agua más Bradford) en un lector de ELISA (Opsys MRTM, USA). Una vez obtenida la curva se interpolaron los datos de las muestras de AAS. Posteriormente, se

agregó a las muestras un buffer de carga 5X (Laemmli Sample Buffer, BIO-RAD, USA) dejando una relación final de 1X, para finalmente ser cargadas en el gel.

Preparación del gel: se preparó un gel SDS-PAGE al 15% de acrilamida para caspasa-3, actina y cloroquina, y 6% de acrilamida para PARP (Sambrook Russell). Las muestras se cargaron y corrieron a 70 volts y aproximadamente por 2 horas hasta salir el frente de corrida. Previamente las muestras fueron sometidas a desnaturalización por 10 minutos a 96°C en un termo bloc.

Para la transferencia se empleó una membrana de PVDF (AmershamTM Blotting Membranes, EG Healthcare, 0.45 mm), la transferencia se realizó semi-humeda (Trans-blotTM Turbo Transfer System, Bio-RAD, USA) en un Turbo Blot, por 35 minutos para geles de 15% y 30 minutos para geles de 8% a 25 volts. Después de transferir las membranas fueron bloqueadas con leche svelty al 5% en TBS-Tween 0.01% por 1 hora a temperatura ambiente y en agitación, posteriormente fueron lavadas 3 veces por 10 minutos con TBS-Tween 0.01% y 2 veces más por 5 minutos. Los anticuerpos utilizados fueron de Santa Cruz Biotechnology, USA. Para caspasa-3 se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo a una dilución (1:500), para PARP-1 un anticuerpo monoclonal de ratón (1:500), actina monoclonal de ratón (1:5000) y para autofagia Atg4b policlonal de conejo (1:3000). La incubación fue durante toda la noche a 4°C; al término de la incubación se lavaron nuevamente las membranas e incubaron con el anticuerpo secundario también de Santa Cruz Biotechnology INC, anti-conejo para caspasa-3 y Atg4b, anti-ratón para PARP-1 y actina. Todos los anticuerpos secundarios se manejaron a una concentración de 1:5000. Finalmente, se lavaron 3 veces por 10 minutos y 2 veces por 5 minutos en PBS-Tween 0.01%, y un último lavado con TBS.

Para revelar las bandas de proteínas expresadas en las membranas, se expusieron con Super Signal[®] West Femto Maximum Sensitivity substrate Thermo scientific y colocaron en el equipo de escaneo (C-DiGit[®] Blot Scanner- Li-COR Biosciences) por 12 minutos; para su análisis se empleó el programa Image Studio Lite versión 3.1.

Cierre de herida

Los ensayos de cierre de herida o “wound healing” se realizaron en platos de 24 pozos donde fueron sembradas 1.25×10^5 células/cm² en un área de 2 cm² en DMEM suplementado con 10% de SFB, formando una monocapa con una confluencia del 90%. Transcurridas 24h, se procedió a realizar la microherida con una punta de 200 μ l. Posteriormente, se lavó 5 veces con PBS con Ca²⁺ y Mg²⁺ adicionados (JT Baker®) para retirar las células despegadas e iniciar el tratamiento con AAS (2, 4 y 6 mM) durante 24 y 48 horas bajo condiciones de incubadora con medio suplementado al 2% de SFB. Al término de cada tiempo las células se fijaron y se procedió a tomar fotografías en un microscopio inverso marca NIKON (aumento 10X) para su análisis. El cálculo de porcentaje de área abierta se realizó con el software TScratch (www.cse-lab.ethz.ch/software.html).

Ensayo de migración por microceldas “Transwell”

Las células fueron sembradas en insertos de 6.5 mm de diámetro, con poros de 3 μ m (Corning, NY, USA) a una concentración de 7.8×10^5 células/cm² en un área de 0.32 cm² en 250 μ l de medio libre de SFB en la cámara superior del inserto. En la cámara inferior, se colocó 1ml de tratamiento: medio suplementado con 20% de SFB, 10% de SFB y 30ng de VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular) respectivamente para determinar el quimioatrayente. Para el resto de los ensayos se usó 20% de SFB como quimioatrayente. Los tratamientos con AAS fueron los siguientes: medio sin suero y medio suplementado con 20% de SFB (controles), medio con 2, 4 y 6 mM AAS sin SFB (grupo 1) y medio con 20% de SFB con 2, 4 y 6mM (grupo 2). Transcurridas 24 horas de tratamiento, las células en la parte superior del filtro se retiraron con la punta de un hisopo. La migración de las células en el lado inferior de la membrana se determinó mediante la técnica de cristal violeta.

El análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SPSS versión 11.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media y se analizaron por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnett o Tukey considerando como significativo $p < 0.05$

Resultados

Proliferación celular

Con la finalidad de evaluar el efecto del AAS así como determinar IC50, cultivos de células tumorales provenientes de cáncer de mama (MDA-MB-231) fueron tratadas con diferentes concentraciones de AAS (Fig.9).

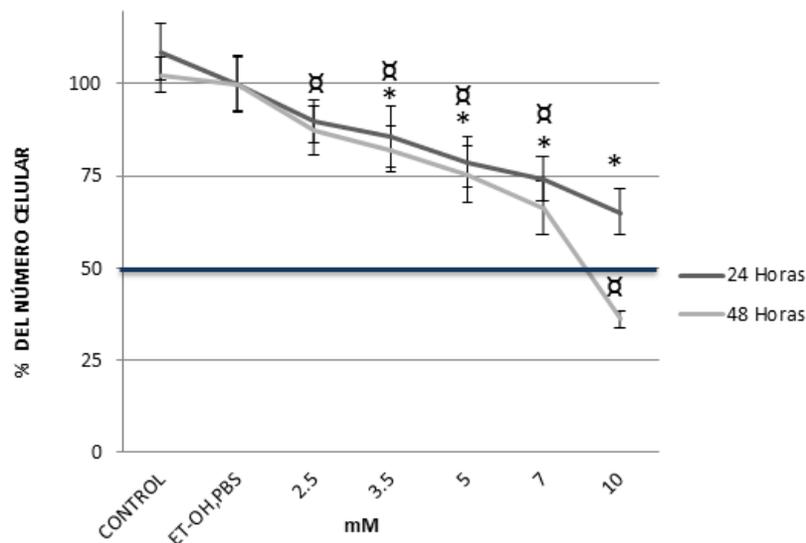


Fig. 9 Curva dosis-respuesta. Efecto antiproliferativo del AAS en la línea celular MDA-MB-231 proveniente de cáncer de mama. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de AAS de manera ascendente desde 2.5 hasta 10 mM, excepto el control negativo (células sin tratamiento) y todas fueron evaluadas a 24 y 48 horas. El ET-OH y PBS fueron utilizados como vehículo. El número celular fue evaluado con la técnica de cristal violeta. Los gráficos representan tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por quintuplicado. Diferencia significativa de los tratamientos con respecto al controles a 24 h * y a 48 h \square (Análisis de varianza de un factor ANOVA, Prueba de Dunnett, diferencia significativa de 0.05, programa SPSS).

Los resultados de la figura 9 muestran un efecto que depende de la dosis, no así del tiempo de exposición del AAS sobre el potencial proliferativo de las células tumorales MDA-MB-231, a excepción de 7 y 10 mM a 48 h donde si hay diferencia con respecto al tiempo. Existe diferencia significativa entre control y tratamientos, marcada con un asterisco, mientras que el vehículo no tiene diferencia significativa con la concentración de 2.5 mM pero si con el resto, marcado con el símbolo \boxtimes . En el gráfico podemos observar que a una concentración de 10 mM se inhibe únicamente el 40% de la población celular, lo cual indica que se requiere una mayor concentración de AAS para obtener una IC50 a 24 horas de tratamiento, mientras que con una concentración de 8.5 mM (valor promedio a partir del cálculo matemático de los ensayos independientes, R^2 de 0.9838) se obtiene una IC50 a las 48 horas de tratamiento.

Bajo las mismas condiciones de siembra y cultivo se evaluó la IC50 mediante la técnica de Sulforrodamina-B para conocer el efecto citotóxico del AAS (Fig. 10).

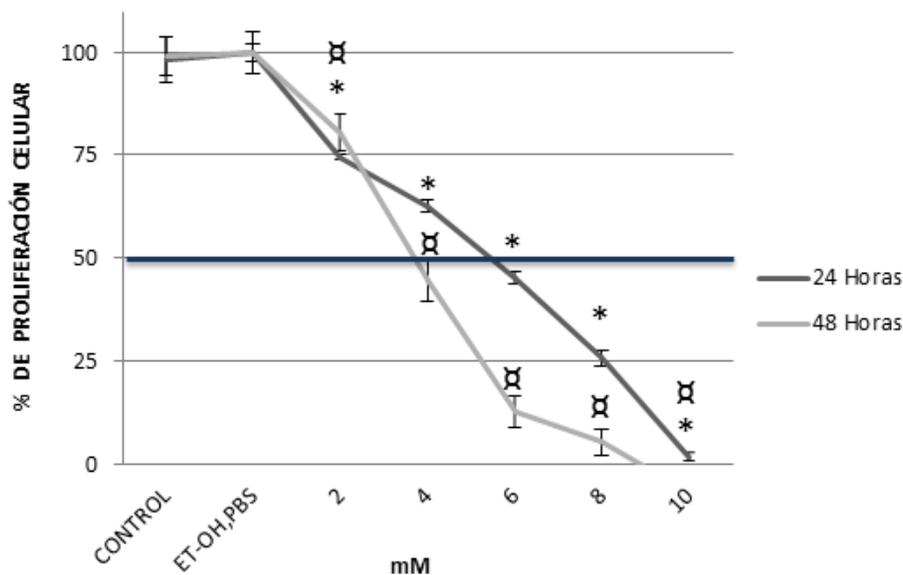


Fig. 10 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de AAS en las células MDA-MB-231. Las células fueron tratadas con concentraciones ascendentes desde 2-10 mM, excepto el control negativo (células sin tratamiento). ET-OH y PBS como vehículo y evaluadas a 24 y 48 horas con la técnica de SRB. Los gráficos representan tres ensayos independientes, donde cada condición fue evaluada por quintuplicado. Diferencia significativa de los tratamientos con respecto al controles a 24 h * y a 48 h \boxtimes (Análisis de varianza de un factor ANOVA, Prueba de Dunnett, diferencia significativa de 0.05, programa SPSS).

Los resultados muestran concentraciones que dependen de la dosis y el tiempo de exposición, existe diferencia significativa entre los controles y los tratamientos para ambos tiempos. La IC50 a 24 horas es de 6 mM, mientras que a 48 horas es de 4 mM. Siendo ambas IC50 menores comparadas con cristal violeta.

Las concentraciones usadas para el resto de los ensayos, están dentro de un rango que va de 2 mM hasta 10 mM, dependiendo de los objetivos de cada técnica, y tomando como referencia 6 mM por ser el valor intermedio de las IC50 obtenidas. Usamos una concentración mayor a 6 mM para observar un mayor efecto y empleamos concentraciones menores de 6 mM de AAS para describir a partir de qué concentración el fármaco comienza a ejercer cambio en el comportamiento de las células.

Ciclo celular

Para mantener la estabilidad genómica y monitorear la estructura de los cromosomas, las células eucariotas han desarrollado un mecanismo de vigilancia llamado punto de control del ciclo celular, que bloquea la progresión del ciclo, como una respuesta al daño de la integridad del material genético, permitiendo la reparación o eliminación de la célula dependiendo de la magnitud del daño. (Luciani y Cols. 2007). En la literatura hay evidencia que propone que la aspirina causa arresto del ciclo celular en diferentes líneas celulares como consecuencia de su efecto antiproliferativo (Hsieh *et al.* 2010; Lu M. *et al.* 2008; Hu LX *et al.* 2012; Luciani *et al.* 2007). En este sentido, se evaluó el efecto del AAS a diferentes concentraciones y tiempos para conocer si había alguna alteración en la progresión del ciclo celular al ser añadido el fármaco (Fig. 11).

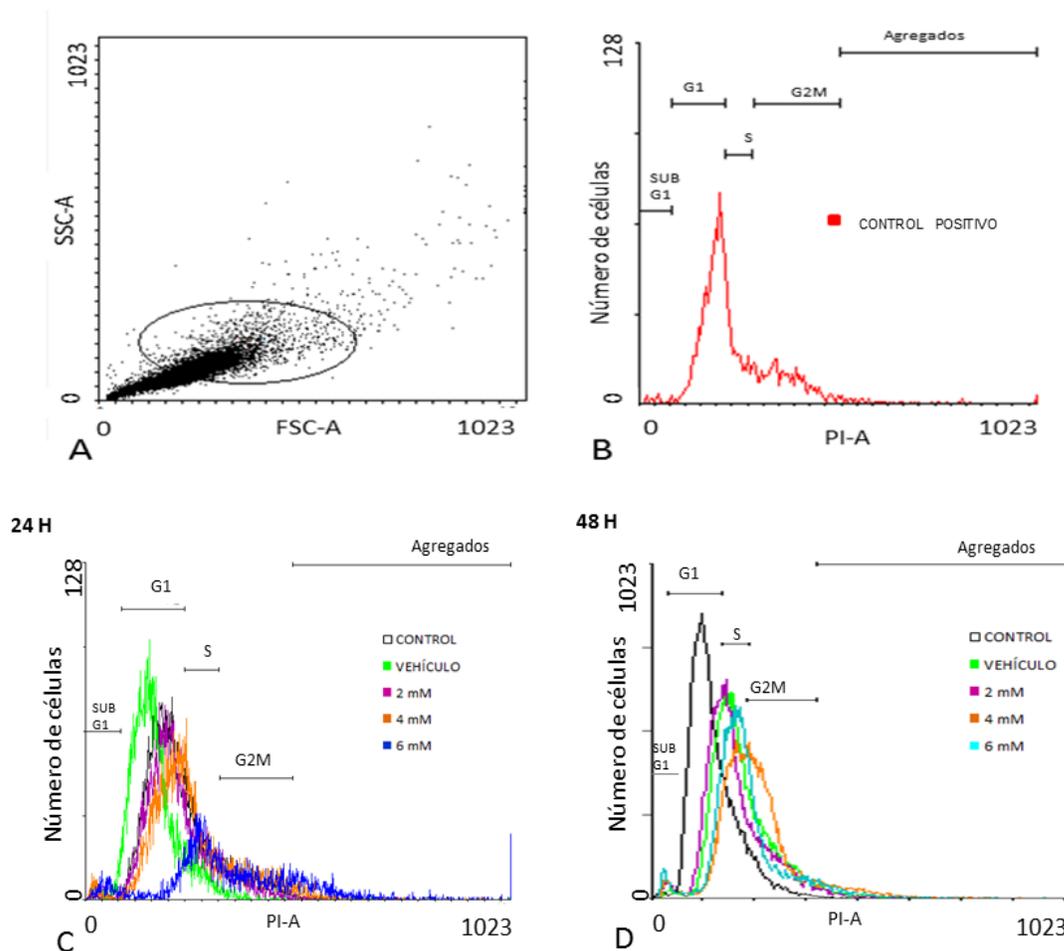


Fig. 11 Histogramas representativos del ciclo celular. Las células fueron tratadas con 2, 4 y 6 mM de AAS por 24 y 48 horas. A y B establecimiento de las fases del ciclo celular dotplot e histograma respectivamente de células con medio libre de suero por 24 h; C: sobre posición de los tratamientos y distribución del DNA a 24 horas; D: sobre posición de los tratamientos y distribución del DNA a 48 horas. Los resultados fueron analizados con el software WINmdi 2.9.

En la imagen A y B, representan el establecimiento de las fases del ciclo celular a partir del dotplot de células con medio sin suero por 24 h como control (imagen A) y su respectivo histograma (imagen B). La imagen C, muestra el traslape y desplazamiento de los histogramas que representan las diferentes condiciones de tratamiento a 24 horas. Como puede apreciarse en la figura, es evidente que el material genético tiende a desplazarse conforme aumenta la concentración de AAS hacia la fase G2/M del ciclo celular, pudiéndose ver de forma clara a 6mM (histograma de color azul rey). La imagen D muestra la línea celular después de 48 horas de tratamiento, manteniendo la tendencia del efecto de 24 horas. Sin embargo, los histogramas son más definidos en la fase S a las 48 horas de

estímulo. En la figura 12, se graficaron los valores obtenidos de la distribución del porcentaje de células de los tratamientos.

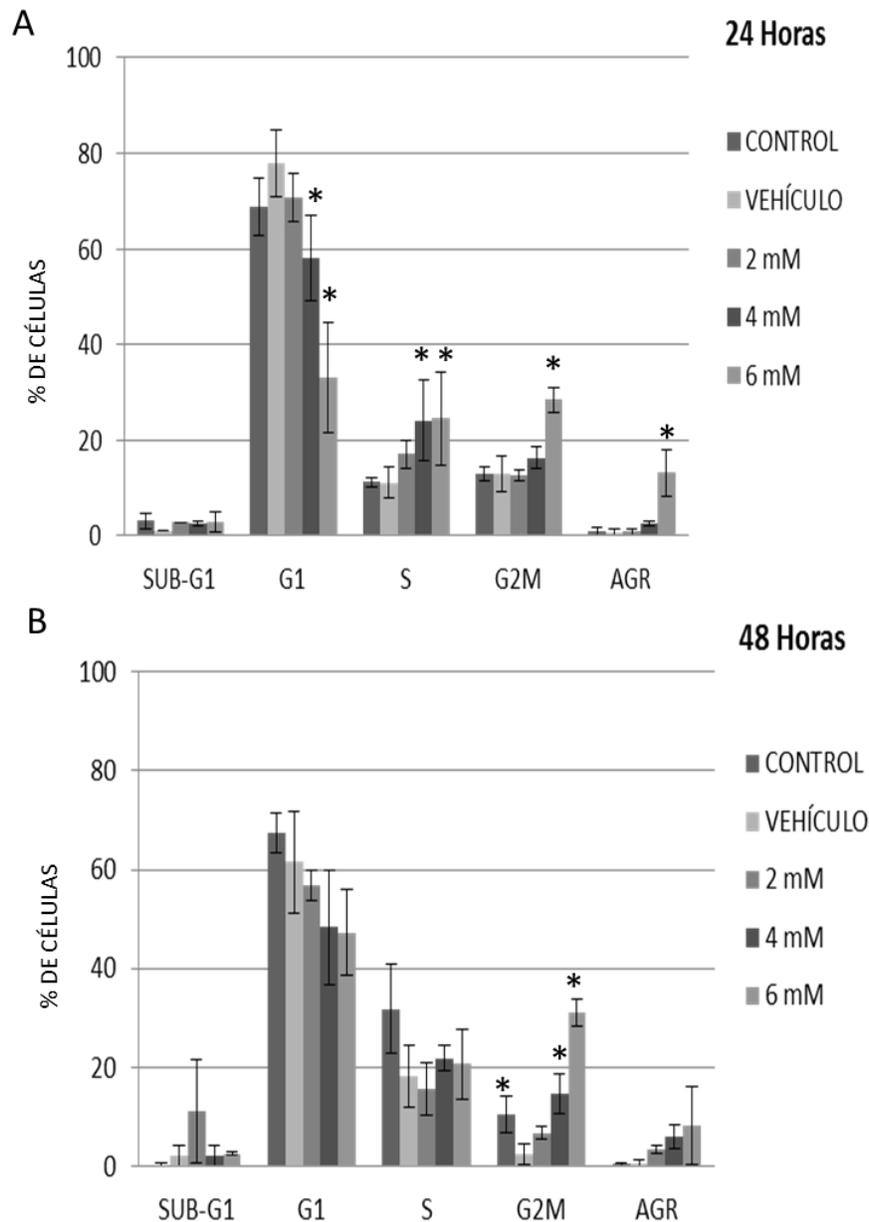


Fig. 12. AAS en la distribución del ciclo celular. Las células fueron tratadas con 2, 4 y 6 mM de AAS por 24 y 48 horas. A: porcentaje de células en las fases del ciclo celular a 24 horas; B: porcentaje de células en las fases del ciclo celular a 48 horas. *Diferencia significativa de los tratamientos con respecto al vehículo como control (Análisis de varianza de un factor ANOVA, prueba de Dunnett, diferencia significativa de 0.05, programa SPSS).

El porcentaje de células en la fase G1 es mayor, tanto a 24 horas como a 48 horas. No obstante, al aumentar la concentración de AAS este disminuye de 70% en los controles

hasta 30% y 50% a una concentración de 6 mM a 24 y a 48 horas, respectivamente. La disminución del material genético en la fase G1 se ve reflejada en el incremento de las subsecuentes fases, a 24 horas con 4 y 6 mM aumenta significativamente la fase S, y para G2/M únicamente con 6 mM, la concentración más alta. Sin embargo, a 48 horas no solo disminuye la fase G1, también lo hace la fase S, y su disminución se refleja en el aumento significativo de la fase G2/M, aunque el control de células sin tratamiento también es significativamente diferente al vehículo. En general, los gráficos sugieren que al tratar las células con AAS, las células tienden a concentrar el mayor contenido de DNA en la fase G2/M donde es detenido el ciclo celular.

Por otro lado tanto en la figura 11 como la figura 12 muestran una región de agregados que son células que tienden a agruparse de manera normal, sin que resulte significativo su porcentaje, a excepción de 6 mM a 24 h, en donde si existe diferencia significativa.

Muerte celular

Generalmente las células detienen su ciclo celular cuando se produce daño ya sea en su DNA o en la estructura celular, en primera instancia la célula manda señales de supervivencia que al ser persistentes activan un tipo de muerte celular dependiendo de la magnitud.

Para conocer el efecto del AAS dentro del proceso de supervivencia y muerte, se evaluaron diferentes proteínas clave dentro de los procesos de autofagia (Atg4b) y apoptosis (PARP-1, caspasa-3) respectivamente, mediante la técnica de western blot. La figura 13 muestra la expresión de las isoformas de Atg4. La expresión de éstas isoformas se mantiene muy similar durante las primeras ocho horas y en las tres concentraciones probadas, sin embargo a partir de las 16 horas su expresión disminuye. Los resultados demuestran que la actividad del AAS es dependiente de tiempo y no de la concentración utilizada para la generación de autofagia.

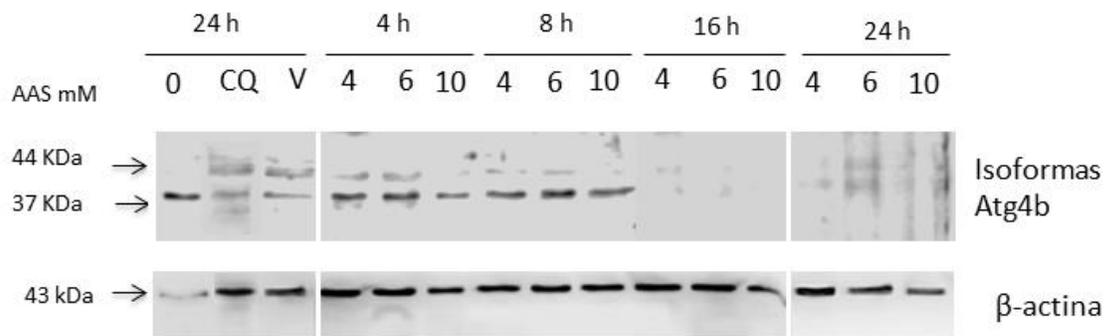


Fig. 13. Evaluación de la inducción de autofagia en presencia de AAS. 0 (control sin tratamiento), CQ control positivo (10 μ g/ml de Cloroquina), V (vehículo, ET-OH; DMEM), 4, 6 y 10 mM concentraciones de AAS, Atg4b (autophagy protein 4b). Los ensayos se realizaron en cuatro tiempos 4, 8, 16 y 24 horas. La imagen es representativa de 2 ensayos independientes de la expresión de Atg4b en la línea celular MDA-MB-231.

En cuanto a la expresión de las bandas, es mayor la expresión de la isoforma de 37 KDa en las células tratadas con AAS dentro de las primeras ocho horas comparada con los controles de CQ, vehículo y células sin tratamiento (0). Mientras que la expresión de la isoforma de 44 KDa es menor en todos los tratamientos y prácticamente ausente en el control 0. Para 16 y 24 h la expresión de ambas isoformas es menor que los controles. Ver valores de cuantificación en el anexo 2.

La figura 14 A muestra la activación de procaspasa-3 a caspasa-3 activa y la figura 14 B muestra la fragmentación de PARP-1 al tratar las células con AAS. Al comparar los tratamientos de AAS con el control positivo (UV), se puede observar una mayor expresión tanto de procaspasa-3 (32 KDa) como de la subunidad de caspasa-3 activa (17 KDa) en todos los tratamientos a excepción de 48 h en la subunidad de caspasa-3. Mientras que la expresión de PARP-1 es similar a 24 y 48 horas en su fragmento de 116 Kda, a excepción de 6 y 10 mM a 48 h donde es menor, así como el fragmento de 89 KDa. Sin embargo, la expresión en general del fragmento de 89 KDa es menor en todos tratamientos comparado con el control positivo (UV) no así para 10 mM 24 h que es la expresión más cercana al control positivo.

Estos resultados indican que se está llevando a cabo un proceso de muerte celular por apoptosis a partir de 24 horas de tratamiento. Datos similares a los obtenidos mediante citometría de flujo, ver anexo 3.

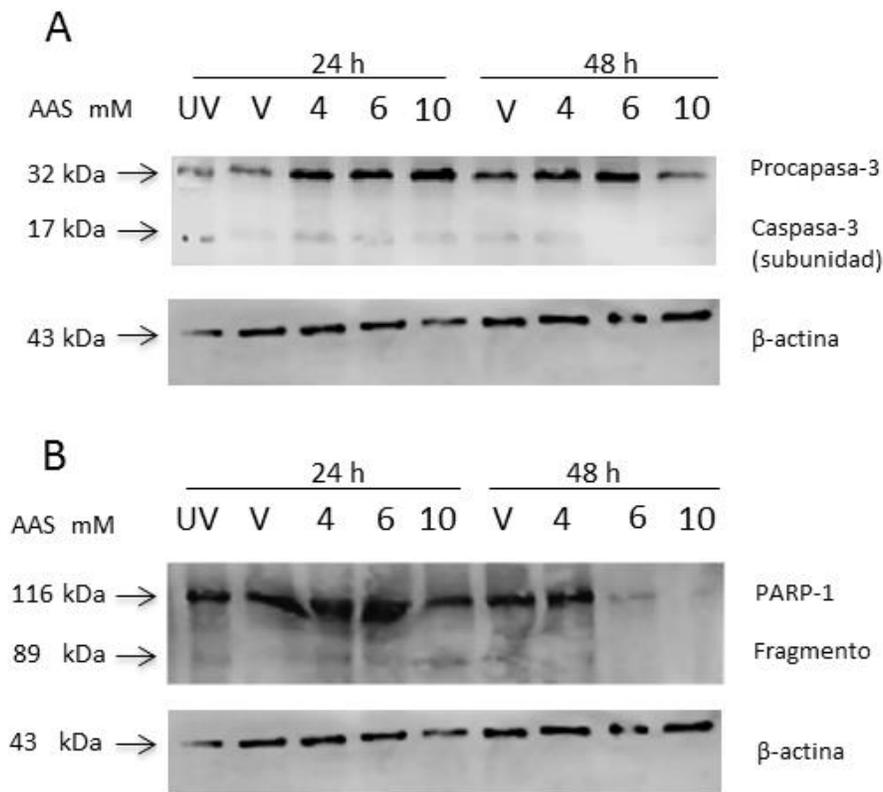


Fig. 14. Muerte celular por apoptosis en la línea celular MDA-MB-231 inducida por AAS. A: caspasa 3 y B: PARP, a 24 y 48 horas. UV control positivo (células expuestas a luz UV por 10 minutos), V (vehículo, ET-OH; DMEM); 4, 6 y 10 mM concentraciones del AAS. Los ensayos se realizaron a 24 y 48 horas. Imagen es representativa de 4 ensayos independientes.

Migración

Ante el creciente número de estudios de la posible participación de los AINEs en los procesos de cáncer como inhibidores de la metástasis y dado que las células triple negativas tienden a formar tumores secundarios a partir de procesos de invasión y metástasis, se evaluó el efecto del AAS como inhibidor de la invasión celular en un modelo de microherida o “wound healing”, asimismo, a través de ensayo de migración por medio de

microceldas o “transwell” se evaluó su capacidad para detener la migración celular (Figuras 15, 16 y 17).

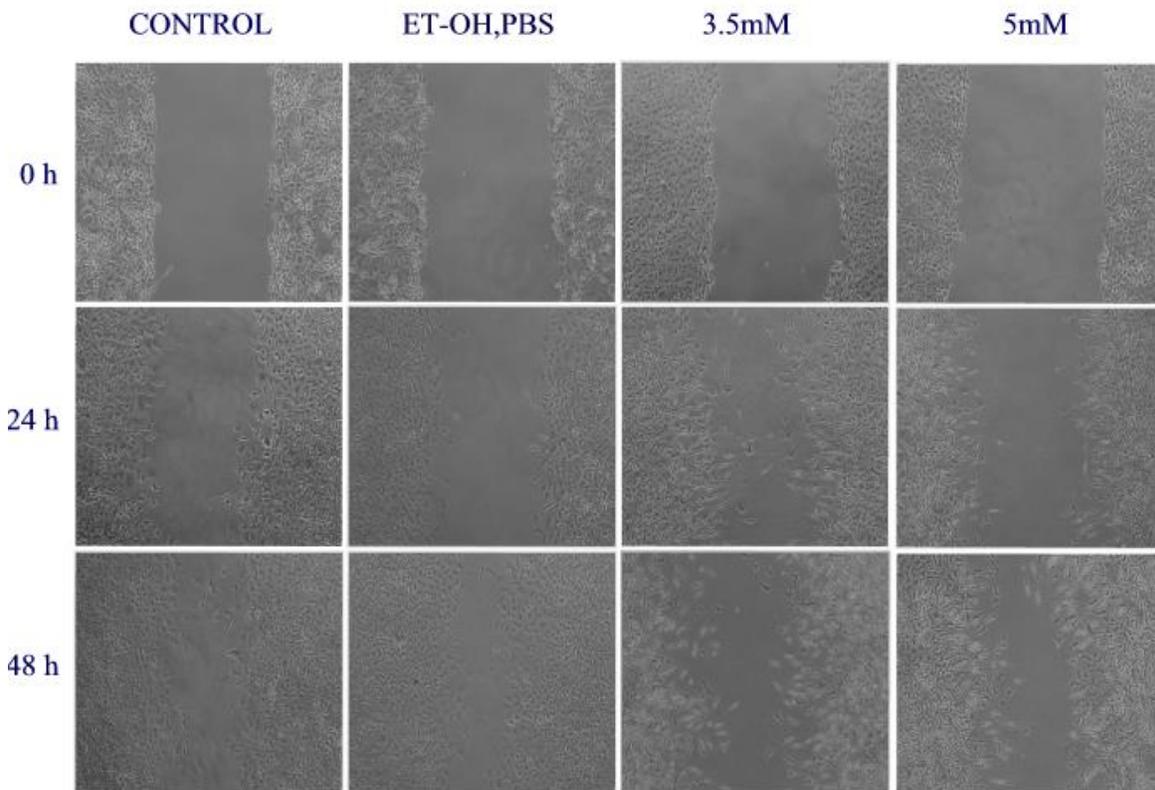


Fig. 15 Ensayo de invasión celular. Fotos representativas de los experimentos de cierre de herida o wound healing para la determinación del porcentaje de área abierta tratadas con concentraciones diferentes de AAS. En platos de 24 pozos fueron sembradas 1.25×10^5 células/cm² MDA-MB-231. Transcurridas 24 h y una vez adheridas las células, se realizó la microherida con una punta de 200 μ l. Posteriormente, se lavó con PBS para retirar las células despegadas y trataron con AAS a 3.5 y 5 mM durante 24 y 48 h bajo condiciones de incubadora y con medio suplementado al 2% de SFB. Al término de cada tiempo las células fueron fijadas y se procedió a tomar fotografías en un microscopio inverso marca NIKON (aumento 10X) para su análisis. Los resultados se obtuvieron de 6 ensayos independientes. El cálculo de porcentaje de área abierta se realizó con el software TScratch (www.cse-lab.ethz.ch/software.html).

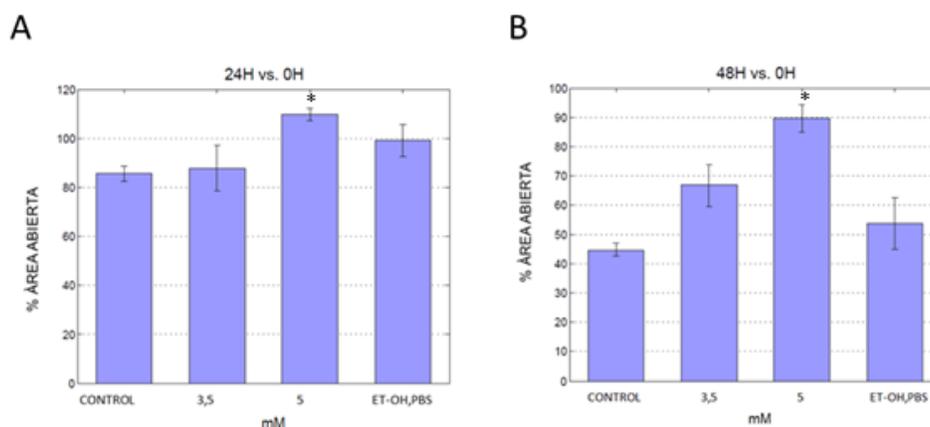


Fig. 16. Análisis del área abierta. Las gráficas muestran el porcentaje de área abierta a 24 y 48 horas después del tratamiento, tomando como 100% de área abierta el tiempo cero. El análisis se hizo con el software TScratch, diferencia significativa de 0.05.

La imagen 16 A muestra un porcentaje de área abierta mayor al 80% para todos los tratamientos transcurridas 24 horas. Por otra parte en la imagen 16 B se muestran los porcentajes de área abierta después de 48 horas de tratamiento con AAS. Al llegar a este tiempo las células del control alcanzan un área abierta del 45%, el vehículo 55%, mientras que células tratadas con 3.5 mM de AAS mantienen un área abierta de 70% y a 5 mM de AAS un 90% de área abierta. Es decir, aquellas células tratadas con AAS detuvieron su capacidad invasiva para cerrar el área provocada por la micropunta después de 48 horas de contacto con el fármaco.

Finalmente, se llevó a cabo el ensayo de transwell para la determinación de la migración celular (Fig. 17). El gráfico A muestra el comportamiento de migración de las células MDA-MB-231 dependiendo de la cantidad de suero presente en el medio. En la columna de la izquierda están las células tratadas con VEGF como control positivo, es decir el 100% de migración celular; las tres siguientes columnas son células con medio DMEM suplementado al 20% y 10 % de SFB y sin suero. La migración, es evidentemente menor conforme disminuye la cantidad de suero empleado, reduciendo hasta 30% sin nutrientes en el medio. En el gráfico B se observa el efecto inhibitorio del AAS sobre la migración

celular. En presencia de AAS se presenta una disminución de la migración dependiente de la concentración, independientemente de la presencia o ausencia de SFB.

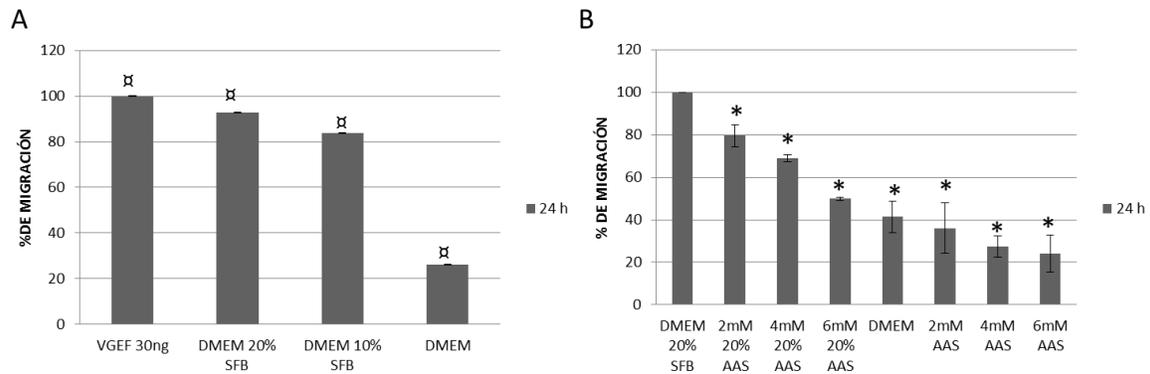


Fig. 17. Gráficas que representan el porcentaje de migración de la línea celular MDA-MB-231. Se sembraron 2.5×10^5 células por inserto (poro de $3 \mu\text{m}$ de diámetro) sin suero en la cámara superior del inserto y 1ml de medio con tratamiento en la cámara inferior. Las barras del gráfico A representa (de izquierda a derecha): 30ng de VEGF, medio con SFB al 20%, medio con SFB al 10%, y medio sin suero. El grafico B representa (de izquierda a derecha): medio suplementado con 20% SFB, medio suplementado con SBF al 20% y con AAS a 2, 4 y 6 mM respectivamente, medio sin suero, medio sin SFB con AAS a 2, 4 y 6 mM respectivamente. Análisis de varianza de un factor ANOVA, prueba de Tukey con una diferencia significativa de 0.05α y Dunnett diferencia significativa 0.05^* , programa SPSS.

Discusión

La alta agresividad y resistencia terapéutica de los tumores de mama independientes de estrógeno han motivado el desarrollo de nuevas estrategias para su prevención y / o tratamiento. En este sentido, la ciencia también recurre a fármacos conocidos utilizados para otros padecimientos, pero que debido a su mecanismo de acción, pueden estar involucrados en rutas metabólicas del cáncer. Tal es el caso de la aspirina (principio activo ácido acetil salicílico), fármaco con una gran ventana terapéutica como antiinflamatorio, analgésico, antipirético y, particularmente por sus beneficios en el tratamiento de reumatismo y prevención de enfermedades cardiovasculares (Sutcliffe *et al.* 2013). Además, de la creciente evidencia epidemiológica en donde la aspirina tiene un efecto quimiopreventivo y reductor del riesgo para algunos tipos de cáncer como en cáncer colorectal, cáncer de seno y cáncer de próstata entre otros (Chan *et al.* 2005).

En este estudio, nuestros resultados indican que la aspirina inhibe el crecimiento celular, induce arresto del ciclo celular en la fase G2/M e inhibe la migración de las células MDA-MB-231 (línea celular triple negativa), y que estos efectos son dependientes de la concentración.

Nosotros investigamos el efecto anti proliferativo de la aspirina en la línea MDA-MB-231 mediante dos técnicas, cristal violeta y SRB. Para el caso de cristal violeta, la IC50 encontrada fue mayor que con SRB, el valor aproximado a la IC50 a 24 horas es de 10 mM (concentración más alta empleada) y 8.5 mM a 48 horas, a diferencia de SRB de 6 y 4 mM a 24 y 48 horas, respectivamente. La diferencia entre las concentraciones se atribuye a las propiedades de cada técnica. Por una parte, el colorante de cristal violeta se utilizó para teñir núcleos principalmente, pues es un colorante catiónico, afin a ácidos nucleicos presentes en el núcleo en su mayoría, mientras que el colorante de SRB tiene dos grupos sulfónicos que se unen a residuos de aminoácidos básicos y tiñe en su mayoría citoplasma. Aunque ambas técnicas se fundamentan en la medición del contenido proteico celular en células adheridas, presentan diferencia en cuanto a sensibilidad y objetivos, el cristal violeta lo utilizamos para determinar el número celular y la SRB para examinar citotoxicidad. Probablemente, el valor de IC50 con SRB es menor debido a que el AAS afecta a la población celular a nivel citoplasmico más que nuclear (Kueng *et al.* 1989; Vichai y Kirtikara, 2006; Martín y Clynes, 1993). Debido a esto para el resto de los ensayos, empleamos valores dentro del rango obtenido de las dos IC50. Por otro lado, las IC50 reportadas en la literatura con aspirina en cáncer son muy diversas, por ejemplo en líneas celulares de cáncer de colon, los valores aproximados a la IC50 con aspirina son de 0.62 mM y 1.25 mM (IC60) para HCT116 y HT29, respectivamente (Luciani *et al.* 2007); en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 la IC50 reportada es de 1 mM (Hu LX *et al.* 2012) y en la línea MDA-MB-231 se reporta una IC50 de 1.7 mM (Hsieh *et al.* 2010), todas estas líneas celulares son evaluadas a 72 h mediante un ensayo con MTT mide el metabolismo de la célula. El valor más aproximado a nuestros resultados (6 mM a 24 h, SRB) es el reportado en la línea celular HeLa de cáncer cervicouterino donde la IC50 es de 5 mM, y en el cual el tiempo de exposición es de 24 h aunque bajo la técnica de MTT (Xiang *et al.* 2010). Estas diferencias en los valores son debidas al tipo de tejido y tiempo de exposición.

Sin embargo, a pesar de las diferencias en las técnicas, las concentraciones que obtuvimos se encuentran dentro del rango reportado para uso clínico de la aspirina (Plan Nacional para la Enseñanza y Formación en Técnicas y Tratamiento del Dolor, 2014).

La aspirina ha sido reportada como inductor de detención del ciclo celular en la fase G1. En el trabajo de Lu M. *et al.* (2008) en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-435 se evaluó el efecto de AAS en ciclo celular empleando dos concentraciones diferentes, 1 y 5 mM a 48 horas de exposición. Sus resultados sugieren que el AAS detiene el ciclo celular en la fase G1 a 5 mM, no así para 1 mM, concentración en donde no se presentó cambio en su distribución del material genético. Asimismo, en el trabajo realizado por Luciani *et al.* en el 2007 con las líneas celulares HCT116 y HT29 de cáncer colorectal, bajo las mismas condiciones de tiempo pero a diferentes concentraciones (2.5, 5, y 10 mM) muestra el mismo resultado en la fase G1 a 2.5 y 5 mM, mientras que a concentraciones de 10 mM incrementa la fase S, G2/M y principalmente sub/G1 sugiriendo muerte celular por apoptosis. En contraste, nuestros resultados sugieren disminución del porcentaje de células en la fase G1 e incremento en la fase G2/M del ciclo celular a 24 y 48 horas de tratamiento en la línea celular MDA-MB-231, a partir de 4 mM de AAS.

Mientras que a concentraciones de 2 mM existe detención del ciclo en la fase G1, dato que coincide con lo reportado en esta misma línea por Hsieh *et al.* (2010), en donde se encontró arresto del ciclo celular en la fase G1 a una concentración cercana (1.7 mM valor obtenido mediante MTT pero con 72 horas de tratamiento). Por tanto, la detención del ciclo celular es dependiente de la concentración como se mostró en la figura 11 y 12, y en el trabajo de Hsieh *et al.* 2010. Por otra parte, la evaluación de la aspirina en la detención de ciclo celular se ha extendido a formulaciones similares como por ejemplo NO-aspirin (por sus siglas en inglés) en donde un grupo de óxido nítrico fue añadido a la molécula y que se ha visto le confiere un efecto potenciador a sus propiedades terapéuticas (Kodela *et al.* 2012). Este fármaco se ha estudiado en diferentes líneas de cáncer y los resultados hasta ahora son alentadores, por ejemplo los reportados en el trabajo de Gao y Williams (2012), que tras evaluar en diferentes líneas celulares de cáncer encontraron detención del ciclo celular en la fase G2/M, al igual que nuestro trabajo, pero con concentraciones de 133-268

μM de AAS. Lo que estos autores sugieren es que el óxido nítrico potencia el efecto de AAS, de tal manera que se requieren concentraciones más pequeñas para alcanzar los beneficios de la aspirina, no solo en cáncer sino también en enfermedades cardiovasculares.

Cuando la célula detiene su ciclo celular, bajo circunstancias metabólicas o estrés citotóxico, es para reparar deficiencias o daños tanto internos como externos a través de mecanismos de señalización, que activan procesos de supervivencia o muere, como son autofagia, apoptosis o necrosis dependiendo de las necesidades celulares. Por un lado documentación existente con respecto a la relación entre autofagia, cáncer y AINEs incluyendo a la aspirina, ha captado el interés de investigadores en los últimos años, dado que la autofagia juega un papel central en la integración de muchas señales de estrés para determinar el destino de las células (Macintosh y Ryan, 2013). Por ejemplo, Din *et al.* en el 2012, investigó si la aspirina inducía autofagia mediante la inhibición de mTOR y activación de AMPK, en la línea celular de cáncer colorectal CHT116 a una concentración de 5 mM de aspirina. Al evaluar diferentes proteínas involucradas en la vía mTOR, se encontró que a las 8 y 16 horas de tratamiento hubo una disminución significativa de la fosforilación de S6K1 y de 4E-BP1 (promotores de crecimiento de tumor por aumento de transcripción y síntesis de proteínas) ejerciendo un efecto inhibitor sobre la señalización mTORC1. Además, se observó inhibición de mTOR a través del incremento de la fosforilación de AMPK y su activación mediante acetyl-CoA carboxilasa (ACC). En este mismo trabajo, también se evaluó LC3-II después de un tratamiento con un inhibidor de los lisosomas (bafilomicina A) y se observó el incremento de LC3-II en las células cancerosas HCT116, sugiriendo una inducción de autofagia.

Nuestro trabajo concuerda con este estudio en cuanto a tiempos y concentración requerida para inducir el flujo de autofagia en tiempos cortos antes de las 24 horas, y a pesar de que la proteína empleada en nuestro trabajo fue Atg4b, podemos relacionar los resultados debido a que Atg4 es una proteína esencial para la formación de autofagosoma, previo a la fragmentación de LC3. El presente trabajo aporta información de la activación del flujo autofágico mediante la expresión de Atg4b al ser expuesta la línea celular MDA-

MB-231, seguida de un proceso de muerte apoptótico. La primera se presentó en tiempos cortos, de 4 a 8 horas, y la apoptosis de 24 a 48 horas después del tratamiento con AAS.

Encuanto a muerte celular programada, se ha explorado a la aspirina como inductor de apoptosis en varias líneas celulares de cáncer (Hossain *et al.* 2012). Por ejemplo, el trabajo de Levels en el 2008 reportó en la misma línea celular que nosotros trabajamos (MDA-MB-231), un nulo o escaso porcentaje de apoptosis con 5mM de AAS obteniendo 3.5% de apoptosis con anexina V. Dichos resultados concuerdan con nuestros datos de citometría a la figura 18 del anexo 3 (debido a que es únicamente un ensayo), donde el porcentaje de caspasa-3 alcanza un 5% a una concentración de 4 mM y sugiere apoptosis.

En nuestro trabajo, a mayor concentración de AAS (6 mM) el porcentaje de muerte aumenta a 11% a diferencia de concentraciones menores, esto evaluado con la técnica de caspasa-3 por citometría de flujo, lo cual sugiere un efecto que depende de la concentración de AAS. No obstante, se requieren de más ensayos de caspasa-3 por citometría de flujo para que sea concluyente. En el trabajo de Xiang y colaboradores en la línea celular HeLa, también se demuestra inducción de apoptosis (12.51% de anexina V en la región de apoptosis tardía, a 24 horas con 5 mM de AAS), aunado a la inhibición de Bcl-2 mediante western blot. También en la línea HepG2, de hepatocarcinoma, con 15 μ M de AAS se observó la expresión de caspasa-3 y PARP a 24 horas mediante western blot (Hossain *et al.* 2012), lo cual concuerda con nuestros resultados obtenidos a 24 horas de tratamiento. Por tanto, nuestros resultados sugieren la inducción de autofagia en células MDA-MB-231 expuestas a AAS, seguido muerte celular programada o apoptosis. Cabe mencionar que nuestro trabajo coincide con los reportes de una muerte celular mediada por autofagia, y seguida de muerte programada, como se menciona en el trabajo de Boya *et al.* 2005, quien encontró una inducción de vacuolización autofagica (mediante deprivación de nutrientes) previa a muerte programada en células HeLa. Además un substancial cuerpo de literatura sugiere que bajo ciertas circunstancias la autofagia puede promover muerte, aun que recientes evidencias indican que la propia autofagia puede ser un mecanismo de muerte celular (Debnath *et al.* 2005).

Se ha investigado la interconexión entre autofagia y apoptosis, suriendo dos candidatos el primero p62, una proteína que es importante para tumorigenesis inducida por Ras, y el segundo el supresor tumoral Beclina-1. p62 juega un papel clave en la degradación selectiva de muchas proteínas (y mitocondria), y se sabe interactúa directamente con varias proteínas de sobrevivencia y apoptosis, incluyendo caspas-8, TRAF6 (las cuales modulan vías de supervivencia NF-kB), y ERK (Moscat y Diaz-Meco, 2009). Beclina-1 es un regulador crucial de autofagia que interactua directament con la proteina anti-apoptodica Bcl-2. Cuando Bcl-2 y Beclina-1 estan ligadas, Beclina-1 es incapaz de activar autofagia. Autofagia es inducida por el aumento de Beclina-1 de Bcl-2 por proteínas BH3 pro-apoptoticas, fosforilación de Beclina-1 por DAP cinasa (DAPK), o forforilación por JNK (Erlich *et al.* 2007).

Por otro lado el mecanismo de acción de la aspirina como agente quimiopreventivo aún no está determinado debido a la gran diversidad de efectos moleculares que involucra, su vía de acción continúa en debate; tanto procesos celulares independientes como dependientes de COX son documentados. Sin embargo, la explicación más aceptada es su participación en la inhibición de COX-1 y -2 dando lugar a eventos como la apoptosis, reducción de la proliferación y la inhibición de la carcinogénesis. Particularmente porque se ha visto una relación entre una elevada síntesis de prostaglandinas y diferentes eventos en el desarrollo de neoplasias, por ejemplo la PGE2 tiene efecto en la inducción de Bcl-2 quien tiene un papel en la inhibición de apoptosis, además, esta prostaglandina presenta una influencia en la biosíntesis de estrógenos por inducción del gen de aromatasa y está involucrada en eventos de angiogénesis. Estos eventos se han observado principalmente en líneas celulares de cáncer de mama positivas a receptores hormonales como MCF-7 (Hu LX. *et al.* 2012).

Asimismo, se ha reportado que COX-2 se encuentra frecuentemente sobreexpresada en cáncer de seno invasivo (Larkins *et al.* 2006). Por lo cual la participación de COX-2 ha surgido como componente necesario para el mecanismo celular y molecular de invasión y motilidad de diferentes células de cáncer. En esta dirección investigadores como Lu *et al.* 2013, han demostrado que la aspirina inhibe la invasión de células de cáncer hepatocelular

(HCC por sus siglas en inglés) al desregular HTATIP2 (gen supresor de tumor, presente en este tipo de cáncer) mediante la inhibición de COX-2, a dosis bajas (0.1-0.5 mM AAS). Además, también se ha observado que la aspirina, puede ejercer un efecto antimetastásico en cáncer de ovario influyendo en la expresión de genes asociados a metástasis (Sonnemann *et al.* 2008). De esta forma nuestro trabajo se suma a los estudios que muestran una participación de la aspirina como inhibidor de migración celular en una línea celular de cáncer de seno triple negativa, y es relevante por los pocos datos experimentales existentes sobre el papel de la aspirina en cáncer de seno triple negativo, aunque su participación como inhibidor de COX-2 requiere ser evaluado al igual que en apoptosis, para demostrar si es o no dependiente de esta vía. Su evaluación puede realizarse a través de un ensayo donde la expresión de COX-2 esté ausente “knockout de la línea MDA-MB-231” y al tratar con aspirina ver si se repite o no los resultados obtenidos.

Otra posible participación de la aspirina como inhibidor de la migración, se encuentra en la inhibición de metaloproteína 2 (MMP-2) e incremento de moléculas de adhesión como E-caderina en células de hepatocarcinoma al ser tratadas con aspirina (Jiang *et al.* 2001), esto resulta ser interesante debido a que las gelatinas como MMP-2 y MMP-9 tienen un papel importante en la progresión del tumor por su capacidad de degradación de los componentes de la matriz extracelular como lamininas, colágeno y moléculas de adhesión (Larkins *et al.* 2006). Aunque en nuestro trabajo no se miden estas moléculas, pueden ser consideradas para describir las rutas de inhibición de la migración en un futuro.

Sin embargo, a pesar de la gran evidencia de la aspirina como un agente benéfico para el tratamiento del cáncer en estudios epidemiológicos (tabla 1), la capacidad quimiopreventiva de la aspirina es controversial y su aplicación se está direccionado como un coadyuvante por sus capacidades antiproliferativas, inductoras de apoptosis y detención del ciclo celular, aunque la dosis y tiempo aún no han sido establecidos. También se está explorando su potenciación en sinergia con otros fármacos, observándose resultados prometedores. Tal es el caso de la aspirina y lunasina (Hsieh *et al.* 2010) al incrementar la inducción de apoptosis de un 10% únicamente con aspirina a 18.33% en sinergia en células MDA-MB-231. En otro trabajo con células MDA-MB-435, la sinergia de la combinación

de 5 mM de AAS con 0.1µg/mL de TRAIL induce apoptosis, al aumentar la concentración de TRAIL a 2.5µg/ml y mantener al AAS en 5 mM provoca la muerte por apoptosis en un 70%, además esta combinación de tratamiento induce una clara fragmentación proteolítica de caspasa-8, caspasa-3 y PARP, en contraste con una pequeña activación o fragmentación de los sustratos caspasas observados en células tratadas con cada uno de los compuesto (Lu M. *et al.* 2008). En conjunto estos trabajos sugieren que la combinación de la aspirina con otras drogas con potencial quimioterapéutico puede tener un efecto sinérgico como agente quimiopreventivo y anticancerígeno, sin embargo se requieren de estudios adicionales para que pueda ser empleada clínicamente en el tratamiento contra el cáncer.

Conclusión

Nuestros resultados muestran evidencia *in vitro* sobre el papel de la aspirina como inhibidora de la proliferación celular en la línea de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 en un rango de concentración de 2-6 mM actuando después de las 24 de exposición, además, detiene el ciclo celular en la fase G2/M. También observamos que el AAS induce autofagia en las primeras horas de tratamiento y posteriormente muerte celular por apoptosis. En este trabajo no podemos concluir que haya muerte por autofagia pero si una inducción de flujo autofágico y muerte por apoptosis por via de caspasas. Además, inhibe la migración celular en un 50%, a las 24 horas de tratamiento. Dichos hallazgos son relevantes para su posible uso en la clínica como agente anticancerígeno.

Perspectivas

- Es necesario ampliar el estudio con más líneas celulares principalmente con triple negativas.
- Se requiere evaluar proteínas del ciclo celular dentro de los puntos de control, particular mente de G2/M para confirmar la detención del ciclo en esta fase.
- Se requiere evaluar otras proteínas involucradas en autofagia como son LC3-II, S6K1 y mTOR, para confirmar este tipo de muerte y explorar la vía involucrada, además de la conexión con muerte por apoptosis.

Literatura citada

Administración de Alimentos y Medicamentos. Disponible en <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/COX2/default.htm>, consultado el 30 de Agosto 2014.

Agrawal, A. y Fentiman, I. S. 2008. NSAIDs and breast cancer: a possible prevention and treatment strategy. *Int J Clin Pract.* 62: 444-449.

Badve, S., Dabbs, D. J., Schnitt, S. J., Baehner, F. L., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S. B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S. R., Palacios, J., Rakha, E. A., Richardson, A. L., Schmitt, F. C., Tan P. H., Tse, G. M., Weigelt B., Ellis, I. O. y Reis-Filho, J. S. 2011. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol.* 24(2):157-67.

Bardia, A., Ebbert, J. O., Vierkant, R. A., Limburg, P. J., Anderson, K., Wang, A. H., Olson, J. E., Vachon, C. M. y Cerhan, J. R. 2007. Association of aspirin and nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs with cancer incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst.* 99(11):881-9.

Bingle, L., Brown, N. J. y Lewis, C. E. 2002. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol.* 196:254-265.

Bosetti, C., Gallus, S. y La Vecchia, C. 2006. Aspirin and cancer risk: an updated quantitative review to 2005. *Cancer Causes Control* 17: 871-888.

Boland, K., Flanagan, L. y Prehn, J. H. 2013. Paracrine control of tissue regeneration and cell proliferation by Caspase-3. *Cell Death and Disease.* 4, e725.

Boya, P., González, P. R. A., Casares, N., Perfettini, J. L., Dessen, P., Larochette, N., Métivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., Codogno, P. y Kroemer, G. 2005. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol.* 25(3):1025-40.

Chan, A. T., Giovannucci, E. L., Meyerhardt, J. A., Schernhammer, E. S., Curhan, G. C. y Fuchs, C. S. 2005. Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. *JAMA.* 294(8):914-23.

- Chell, S., Kadi, A., Williams, A. C. y Paraskeva, C. 2006.** Mediators of PGE2 synthesis and signalling downstream of COX-2 represent potential targets for the prevention/treatment of colorectal cancer *Biochim Biophys Acta*. 104–119.
- Cook, N. R., Lee, I. M., Gaziano, J. M., Gordon, D., Ridker, P. M., Manson, J. E., Hennekens, C. H., y Buring, J. E. 2005.** Low-dose aspirin in the primary prevention of cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 294(1):47-55.
- Colotta F., Allavena P., Sica A., Garlanda C. y Mantovani A. 2009.** Cancer related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 30(7):1073-81.
- Cotterchio, M., Kreiger, N., Sloan, M. y Steingart, A. 2001.** Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 10(11):1213-7
- Cuzick, J., Otto, F., Baron, J. A., Brown, P. H., Burn, J., Greenwald, P., Jankowski, J., La Vecchia, C., Meyskens, F., Senn, H. J. y Thun, M. 2009.** Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. *The Lancet*. 10: 501-507.
- Debnath, J., Baehrecke, E. H. y Kroemer, G. 2005.** Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy*. 1(2):66-74.
- De Vita, Jr. V. T., Lawrence, T. S. y Rosenberg, S. A. 2008.** Cancer Principles y Practice of Oncology. Rev. ed. Of :cancer 8th edition.
- Din, F. V., Valanciute, A., Houde, V. P., Zibrova, D., Green, K. A., Sakamoto, K., Alessi, D. R. y Dunlop, M. G. 2012.** Aspirin inhibits mTOR signaling, activates AMP-activated protein kinase, and induces autophagy in colorectal cancer cells. *Gastroenterology*. 142(7):1504-15.
- Egeblad, M. y Werb, Z. 2002.** New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Rev Cancer*. 2:161–174.
- Eskelinen, E. L. y Saftig, P. 2009.** Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 1793(4):664-73.
- Eliassen, A. H., Chen, W. Y. Spiegelman, D., Willett, W. C., Hunter, D. J. y Hankinson, S. E. 2009.** Use of aspirin, other nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and

acetaminophen and risk of breast cancer among premenopausal women in the Nurses' Health Study II. *Arch Intern Med.* 169(2):115-21.

Elinos-Báez C. M., Maldonado V. y Meléndez-Zajgla J. 2003. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gac Méd Méx.* 139(5):493-499.

Elwood, P. C., Gallagher, A. M., Duthie, G. G., Murl, A. J. y Morgan, G. 2009. Aspirin, salicylates, and cancer. *The Lancet.* 373: 1301-1309.

Erlich, S., Mizrachy, L., Segev, O., Lindenboim, L., Zmira, O., Adi-Harel, S., Hirsch, J. A., Stein, R. y Pinkas-Kramarski, R. 2007. Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members. *Autophagy.* 3(6):561-8.

Fanale, D., Amodeo, V., Corsini, L. R., Rizzo, S., Bazan, V. y Russo, A. 2012. Oncogene. Breast cancer genome-wide association studies: there is strength in numbers. *Oncogene.* 31: 2121–2128.

Felsher, D. W. 2008. Oncogene Addiction versus Oncogene Amnesia: Perhaps More than Just a Bad Habit? *Cancer Res.* 68:3081-3086.

Fidler, I. J. 2002. Critical determinants of metastasis. *CANCER BIOLOGY,* 12:89–96.

Friis, S., Thomassen, L., Sørensen, H. T., Tjønneland, A., Overvad, K., Cronin-Fenton D. P., Vogel, U., McLaughlin, J. K., Blot, W. J. y Olsen, J. H. 2008. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and breast cancer risk: a Danish cohort study. *Eur J Cancer Prev.* 17(2):88-96.

Friis, S., Sørensen, H. T., McLaughlin, J. K., Johnsen, S. P., Blot, W. J., Olsen, J. H. 2003. A population-based cohort study of the risk of colorectal and other cancers among users of low-dose aspirin. *Br J Cancer.* 88(5):684-8.

García, R. L. A. y González, A. 2004. Risk of breast cancer among users of aspirin and other anti-inflammatory drugs. *British Journal of Cancer* 91(3):525-529

Gao, L. y Williams, J. L. 2012. Nitric oxide-donating aspirin induces G2/M phase cell cycle arrest in human cancer cells by regulating phase transition proteins. *Int J Oncol.* 41(1):325-30.

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry W. S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Kepp, O., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nuñez, G., Peter, M. E., Piacentini, M.,

- Rubinsztein, D. C., Shi, Y., Simon, H. U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G. y Kroemer, G. 2012.** Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 19(1):107-20.
- Gill, J. K., Maskarinec, G., Wilkens, L. R., Pike, M. C., Henderson, B. E., y Kolonel, L. N. 2007.** Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and Breast Cancer Risk The Multiethnic Cohort. *Am J Epidemiol.* 166(10):1150-8.
- Gocheva, V. y Joyce, J. A. 2007.** Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle.* 6:60–64.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. 2000.** The hallmarks of cancer. *Cell.* 100(1):57-70.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. A. 2011.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144(5):646-74.
- Harris, R. E., Chlebowski, R. T., Jackson, R. D., Frid, D. J., Ascenseo, J. L., Anderson, G., Loar, A., Rodabough, R. J., White, E., McTiernan, A. y Women's Health Initiative. 2003.** Breast Cancer and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Prospective Results from the Women's Health Initiative. *Cancer Res.* 63(18):6096-101.
- Hayashi, N. y Cunha G. R. 1991.** Mesenchyme-induced changes in the neoplastic characteristics of the Dunning prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 51:4924–4930.
- Holliday, D.L. y Speirs, V. 2011.** Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 13(4):215.
- Holmes, M. D., Chen, W. Y., Li, L., Hetzmark, E., Spiegelman, D. y Hankinson, S. 2010.** Aspirin take and survival alter breast cancer. *J Clin Oncol.* 28: 1467-1472.
- Holmes, M. D., Chen, W. Y., Schnitt S. J., Collins, L., Colditz, G. A., Hankinson S. E. y Tamimi, R. M. 2011.** COX-2 expression predicts worse breast cancer prognosis and does not modify the association with aspirin. *Breast Cancer Res Treat.* 130 (2):657-662.
- Hossain, M A., Kim, D. H., Jang, J. Y., Kang, Y. J., Yoon, J. H., Moon, J. O., Chung, H. Y., Kim, G. Y., Choi, Y. H., Copple, B. L. y Kim, N. D. 2012.** Aspirin induces apoptosis in vitro and inhibits tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells in a nude mouse xenograft model. *Int J Oncol.* 40(4):1298-304.

- Hsieh, C. C., Hernández-Ledesma B. y de Lumen B. O. 2010.** Lunasin, a novel seed peptide, sensitizes human breast cancer MDA-MB-231 cells to aspirin-arrested cell cycle and induced apoptosis. *Chem Biol Interact.* 186(2):127-34.
- Hu, L. X., Du, Y Y., Zhang, Y. y Pan, Y. Y. 2012.** Synergistic effects of exemestane and aspirin on MCF-7 human breast cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 13(11):5903-8.
- INEGI 2014. ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DE DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO) DATOS NACIONALES,** <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/cancer0.pdf>, consultado el 30 de agosto 2014.
- Ismail-Khan R., y Bui M. M. 2010.** A review of triple-negative breast cancer. *Cancer Control.* 17:173–176.
- Jacobs, E. J., Thun, M. J., Bain, E. B., Rodriguez, C., Henley, S. J. y Calle, E. E. 2007.** A Large Cohort Study of Long-Term Daily Use of Adult-Strength Aspirin and Cancer Incidence J Natl Cancer Inst. 99(8):608-15.
- Jacobs, E. J., Thun, M. J., Connell, C. J., Rodriguez, C., Henley, S. J., Feigelson, H. S., Patel, A. V., Flanders, W. D. y Calle, E. E. 2005.** Aspirin and Other Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs and Breast Cancer Incidence in a Large U.S. Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14(1):261-4.
- Jain, M. V., Paczulla, A. M., Klonisch, T., Dimgba, F. N., Rao, S. B., Roberg, K., Schweizer, F., Lengerke, C., Davoodpour, P., Palicharla, V. R., Maddika, S. y Los M. 2013.** Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *J Cell Mol Med.* 17(1):12-29.
- Jänicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R. y Porter, A. G. 1998.** Caspase-3 Is Required for DNA Fragmentation and Morphological Changes Associated with Apoptosis. *J Biol Chem.* 273(16):9357-60.
- Jemal, A., Bray, F. y Center, M. M. 2011.** Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 61, 69-90.
- Jiang, M. C., Liao, C. F. y Lee, P. H. 2001.** Aspirin inhibits matrix metalloproteinase-2 activity, increases E-cadherin production, and inhibits in vitro invasion of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 282(3):671-7.

- Johnson, T. W., Anderson, K. E., Lazovich, D. y Folsom, A. R. 2002.** Association of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs use with breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 1586-1592.
- Joyce, J. A. y Pollard, J. W. 2009.** Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 9(4): 239–252.
- Kirsh, V. A., Kreiger, N., Cotterchio, M., Sloan, M. y Theis, B. 2007.** Nonsteroidal Antiinflammatory Drug Use and Breast Cancer Risk: Subgroup Findings. *Am J Epidemiol*. 166(6):709-16.
- Kodela, R., Chattopadhyay, M. y Kashfi, K. 2012.** NOSH-Aspirin: A Novel Nitric Oxide-Hydrogen Sulfide-Releasing Hybrid: A New Class of Anti-inflammatory Pharmaceuticals. *ACS Med Chem Lett*. 3(3):257-262.
- Kueng, W., Silver, E. y Eppenber, V. 1989.** Quantification of cells cultured on 96-wells plates. *Anal Biochem*. 186:16-19.
- Larkins, T. L., Nowell, M., Singh, S. y Sanford, G. L. 2006.** Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression. *BMC Cancer*. 6:181.
- Levitt, N. C. y Hickson, I. D. 2002.** Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. *Trends Mol Med*. 8(4):179-86.
- Lian, L., Li, W., Li, Z. Y., Mao, Y. X., Zhang, Y. T., Zhao, Y. M., Chen, K., Duan, W. M. y Tao, M. 2013.** Inhibition of MCF-7 breast cancer cell-induced platelet aggregation using a combination of antiplatelet drugs. *Oncol Lett*. 5(2):675-680.
- Liu, X. H. y Rose, D. P. 1996.** Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Res*. 56(22):5125-7.
- Loos, B., Engelbrecht, A. M., Lockshin, R. A., Klionsky, D. J. y Zakeri, Z. 2013.** The variability of autophagy and cell death susceptibility: Unanswered questions. *Autophagy*. 9(9):1270-85.
- Lu, M., Strohecker, A., Chen, F., Kwan T., Bosman, J., Jordan, V. C., Cryns, V. L. 2008.** Aspirin sensitizes cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by reducing survivin levels. *Clin Cancer Res*. 14(10):3168-76).

- Luciani, M. G., Campregher, C. y Gasche, C. 2007.** Aspirin blocks proliferation in colon cells by inducing a G1 arrest and apoptosis through activation of the checkpoint kinase ATM. *Carcinogenesis*. 10:2207-17.
- Lynch, C. C. y Matrisian, L. M. 2002.** Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation*. 70:561–573.
- Macintosh, R. L. y Ryan, K. M. 2013.** Autophagy in tumour cell death. *Semin Cancer Biol*. 23(5):344-51.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. y Balkwill, F. 2008.** Cancer-related inflammation. *Nature*. 454:436–444.
- Marshall, S. F., Bernstein, L., Anton-Culver H., Deapen, D., Horn-Ross P. L., Mohrenweiser, H., Peel, D., Pinder, R., Purdie, D. M., Reynolds, P., Stram, D., West, D., Wright, W. E., Ziogas, A. y Ross, R. K. 2005.** Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and breast cancer risk by stage and hormone receptor status. *J Nat Cancer Institute*. 97 (11): 805-812.
- Martin, A. y Clynes, M. 1993.** Comparison of 5 microplate colorimetric assays for *in vitro* cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology*. 11(1):49-58.
- Massagué, J. 2009.** Evolución y metástasis del cáncer. *Dossier Científico SEBBM*. 160: 22-25.
- Martini, M., Vecchione, L., Siena, S., Tejpar, S. y Bardelli, A. 2011.** Targeted therapies: how personal should we go? *Nat Rev Clin Oncol*. 9(2):87-97.
- Medzhitov, R. 2008.** Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 454:428–435.
- Minn, A. J., Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., Viale, A., Olshen, A. B., Gerald, W. L. y Massagué, J. 2005.** Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 436(7050):518-24.
- Mohamed, M. M. y Sloane, B. F. 2006.** Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nature Rev Cancer*. 6:764–775.
- Morris, S. R. y Carey, L. A. 2007.** Molecular profiling in breast cancer. *Rev Endocr Metab Disord*. 8(3):185-98.
- Moscat, J. y Diaz-Meco M. T. 2009.** p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell*. 137(6):1001-4.

- Nelson, L. y Cox, M. 2008.** Lehninger Principles of Biochemistry, Cuarta Edition. pp.1130
- Nilanjan, G., Rituparna, C., Vivekananda, M. y Subhash C. M. 2010.** COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacological Reports*. (62)233-244.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2011.** Disponible en http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5194157&fecha=09/06/2011, consultado el 09 de agosto del 2014.
- Olaya G. E. J. 2010.** Cáncer de mama triple negativo, estado actual. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*. 15(4):228-236.
- Olumi, A. F., Grossfeld, G. D., Hayward, S. W., Carroll, P. R., Tlsty, T. D. y Cunha, G. R. 1999.** Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*. 59:5002–5011.
- Organización Mundial de la Salud OMS, 2012.** Disponible en http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html, consultado 30 de agosto 2014.
- Plan Nacional para la Enseñanza y Formación en Técnicas y Tratamiento del Dolor.** http://www.plandolor.grupoaran.com/pdfs/Uni3_2.pdf, consultado el 30 de agosto 2014.
- Parker, J. S., Mullins, M., Cheang, M. C., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., Quackenbush, J. F., Stijleman, I. J., Palazzo, J., Marron, J. S., Nobel, A. B., Mardis, E., Nielsen, T. O., Ellis, M. J., Perou, C. M. y Bernard, P. S. 2009.** Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 27(8):1160-7.
- Piotrowski G., Gawor R., Stasiak A., Gawor Z., Potemski P. y Banach M. 2012.** Cardiac complications associated with trastuzumab in the setting of adjuvant chemotherapy for breast cancer overexpressing human epidermal growth factor receptor type 2 a prospective study. *Arch Med Sci*. 8(2):227-35.
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B, van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O. y Botstein, D. 2000.** Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 406(6797):747-52.

- Rao, P. y Knaus, E. E. 2008.** Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci.* 11(2):81s-110s.
- Ratnasinghe, L. D., Graubard, B. I., Kahle, L., Tangrea, J. A., Taylor, P. R. y Hawk, E. 2004.** Aspirin use and mortality from cancer in a prospective cohort study. *Anticancer Res.* 24: 3177-3184.
- Ready, A., Velicer, C. M., McTiernan, A. y White, E. 2008.** NSAID use and breast cancer risk in the VITAL cohort. *Breast Cancer Res Treat.* 109: 533-543.
- Rodríguez, P. S. M., Sarrió, D., Honrado, E., Hardisson, D., Calero, F., Benitez, J., Palacios, J. 2006.** Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 12(5):1533-9.
- Romond, E. H., Pérez, E. A., Bryant, J., Suman, V. J., Geyer, C. E. Jr., Davidson, N. E., Tan-Chiu E., Martino, S., Paik, S., Kaufman, P. A., Swain, S. M., Pisansky, T. M., Fehrenbacher, L., Kutteh, L. A., Vogel, V. G., Visscher, D. W., Yothers, G., Jenkins, R. B., Brown, A. M., Dakhil, S. R., Mamounas, E. P., Lingle, W. L., Klein, P. M., Ingle, J. N. y Wolmark, N. 2005.** Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 353(16):1673-84.
- Rao, Praveen y Knaus, E. E. 2008.** Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond P. N. *J Pharm.* 11 (2): 81s-110s.
- Ristimäki, A., Sivula, A., Lundin, J., Lundin, M., Salminen, T., Haglund, C., Joensuu, H. y Isola, J. 2002.** Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res.* 62(3):632-5.
- Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C. C., Cannizzo, E. S., Scharf, B., Follenzi, A., Potolicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A. M. y Santambrogio, L. 2011.** Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell.* 20(1):131-9.
- Sambrook Russell.** Molecular Cloning a laboratory Manual, Tercera Edición, vol. 3.
- Slattery, M. L., Curtin, K., Baumgartner, R., Sweeney, C., Byers, T., Giuliano, A. R., Baumgartner, K. B. y Wolff, R. R. 2007.** IL6, Aspirin, Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, and Breast Cancer Risk in Women Living in the Southwestern United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16(4):747-55.

- Sonnemann, J., Hüls, I., Sigler, M., Palani, C. D., Hongle, T. T., Völker, U., Kroemer, H. K. y Beck, J. F. 2008.** Histone deacetylase inhibitors and aspirin interact synergistically to induce cell death in ovarian cancer cells. *Oncol Rep.* 20(1):219-24.
- Sørli, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., 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. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:10869-10874.
- Sutcliffe, P., Connock, M., Gurung, T., Freeman, K., Johnson, S., Kandala, N. B., Grove, A., Gurung, B., Morrow, S. y Clarke, A. 2013.** Aspirin for prophylactic use in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: a systematic review and overview of reviews. *Health Technol Assess.* 17(43):1-253.
- Swede, H., Mirand, A. L., Menezes, R. J. y Moysich, K. B. 2005.** Association of regular aspirin use and breast cancer risk. *Oncology.* 68: 40-47.
- Talmadge, J. E., Donkor, M. y Scholar, E. 2007.** Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer Metastasis Rev.* 26:373-400.
- Tischendorf, N., Medina, G. J. A., Pozuelo, R. M. R., Armendáriz, C. R. y Hardisson, de la Torre A. 2009.** Intoxicación por salicilatos. *MEDICAMENTOS Y SERVICIOS PROFESIONALES.*
- Terry, M. B., Gammon, M. D., Zhang, F. F., Tawfik, H., Teitelbaum, S. L., Britton, J. A., Subbaramaiah, K., Dannenberg, A. J. y Neugut, A. I. 2004.** Association of Frequency and Duration of Aspirin Use and Hormone Receptor Status With Breast Cancer Risk. *JAMA.* 291(20):2433-40.
- Timmer, J. C. y Salvesen, G. S. 2007.** Caspase substrates. *Cell Death Differ.* 14(1):66-72.
- Vademecum.** Disponible en <http://www.vademecum.es/principios-activos-acetilsalicilico+acido-n02ba012>, consultado el 30 de agosto 2013.
- Vahid, B. y Marik, P. E. 2008.** Pulmonary complications of novel antineoplastic agents for solid tumors. *Chest.* 133(2):528-38.

Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden, B. T. y Kroemer, G. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(10):700-14.

Vichai, V. y Kirtikara, K. 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols.* 3(1)112-116.

Wiese, D. A., Thaiwong, T., Yuzbasiyan-Gurkan V. y Kiupel, M. 2013. Feline mammary basal-like adenocarcinomas: a potential model for human triple-negative breast cancer (TNBC) with basal-like subtype. *BMC Cancer.* 13(1):403.

Xiang, S., Sun, Z., He, Q., Yan, F., Wang, Y., Zhang, J. 2010. Aspirin inhibits ErbB2 to induce apoptosis in cervical cancer cells. *Med Oncol.* 27(2):379-87.

Yassin, L. M., García, L. F., Rojas, M. y Vásquez, G. 2006. Fallas en la remoción de cuerpos apoptóticos, una fuente de autoantígenos. *Rev. Colombiana de Reumatología.* 1(13): 76-84

Zentella, D. A., Frías, S., Galicia, V. G., Ruiz, M. E. J., Córdova A. J., Ventura, G. J. L., Ramírez, V. J. R., Castro, S. N., Móntes, S. D G. y Ibarra, S. M. J. G2007. Cáncer de glándula mamaria y metástasis: un creciente problema de salud pública en México. *Mensaje Bioquímico UNAM.* 31: 172-195.

Zhang, Y., Coogan, P. F., Palmer, J. R., Strom, B. L. y Rosenberg, L. 2005. Use of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and Risk of Breast Cancer: The Case-Control Surveillance Study Revisited. *Am J Epidemiol.* 162(2):165-70.

Anexos

Anexo 1. Pruebas estadísticas

Proliferación celular

1.- Cristal violeta 24 h, figura 9.

Comparaciones múltiples					
Variable dependiente: Absorbancia					
t de Dunnett (bilateral)					
(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%

Aspirina como posible fármaco de interferencia en la metástasis experimental, provocada por cáncer de glándula mamaria en un modelo in vitro

					Límite inferior	Límite superior
CONTROL	VEHÍCULO	.01383	.00607	.124	-.0025	.0302
2.5 mM	VEHÍCULO	-.01600	.00607	.058	-.0324	.0004
3.5 mM	VEHÍCULO	-.02283*	.00607	.003	-.0392	-.0065
5 mM	VEHÍCULO	-.03417*	.00607	.000	-.0505	-.0178
7 mM	VEHÍCULO	-.04150*	.00607	.000	-.0579	-.0251
10 mM	VEHÍCULO	-.05617*	.00607	.000	-.0725	-.0398
*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.						
a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.						

2.-Cristal violeta 48 h, figura 9.

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Absorbancia						
t de Dunnett (bilateral)						
(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CONTROL	VEHÍCULO	.00700	.01041	.961	-.0220	.0360
2.5 mM	VEHÍCULO	-.03175*	.01041	.029	-.0608	-.0027
3.5 mM	VEHÍCULO	-.04250*	.01041	.003	-.0715	-.0135
5 mM	VEHÍCULO	-.05875*	.01041	.000	-.0878	-.0297
7 mM	VEHÍCULO	-.08150*	.01041	.000	-.1105	-.0525
10 mM	VEHÍCULO	-.15475*	.01041	.000	-.1838	-.1257
*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.						
a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.						

1.-Sulforrodamina 24 h, figura 10.

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Absorbancia						
t de Dunnett (bilateral)						
(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior

Aspirina como posible fármaco de interferencia en la metástasis experimental, provocada por cáncer de glándula mamaria en un modelo in vitro

					inferior	superior
CONTROL	VEHÍCULO	-.00080	.00135	.979	-.0045	.0029
2 mM	VEHÍCULO	-.01240*	.00135	.000	-.0161	-.0087
4 mM	VEHÍCULO	-.01820*	.00135	.000	-.0219	-.0145
6 mM	VEHÍCULO	-.02660*	.00135	.000	-.0303	-.0229
8 mM	VEHÍCULO	-.03600*	.00135	.000	-.0397	-.0323
10 mM	VEHÍCULO	-.04780*	.00135	.000	-.0515	-.0441
*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.						
a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.						

2.-Sulforrodamina 48 h, figura 10.

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Absorbancia						
t de Dunnett (bilateral)						
(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CONTROL	VEHÍCULO	-.00067	.00249	1.000	-.0076	.0063
2 mM	VEHÍCULO	-.01633*	.00249	.000	-.0233	-.0094
4 mM	VEHÍCULO	-.04633*	.00249	.000	-.0533	-.0394
6 mM	VEHÍCULO	-.07333*	.00249	.000	-.0803	-.0664
8 mM	VEHÍCULO	-.07933*	.00249	.000	-.0863	-.0724
10 mM	VEHÍCULO	-.08967*	.00249	.000	-.0966	-.0827
*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.						
a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.						

Citometría de flujo

1.-Ciclo celular 24 h, figura 12 A.

Fase Sub- G1

Comparaciones múltiples					
Variable dependiente: SUBG1					
t de Dunnett (bilateral)					
(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%

Aspirina como posible fármaco de interferencia en la metástasis experimental, provocada por cáncer de glándula mamaria en un modelo in vitro

					Límite inferior	Límite superior
CONTROL	VEHÍCULO	-.29600	1.02436	.995	-3.0116	2.4196
2 mM	VEHÍCULO	-.40800	1.02436	.983	-3.1236	2.3076
4 mM	VEHÍCULO	-.29800	1.02436	.995	-3.0136	2.4176
6 mM	VEHÍCULO	.99400	1.02436	.734	-1.7216	3.7096

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

Fase G1

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: G1 t de Dunnett (bilateral)						
(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CONTROL	VEHÍCULO	6.73083	4.33996	.365	-4.7746	18.2362
2 mM	VEHÍCULO	-.57583	4.33996	1.000	-12.0812	10.9296
4 mM	VEHÍCULO	-13.14917*	4.33996	.022	-24.6546	-1.6438
6 mM	VEHÍCULO	-42.54917*	4.33996	.000	-54.0546	-31.0438

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

Fase S

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: S t de Dunnett (bilateral)						
(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CONTROL	VEHÍCULO	.42500	3.30300	1.000	-8.3314	9.1814
2 mM	VEHÍCULO	2.86750	3.30300	.799	-5.8889	11.6239
4 mM	VEHÍCULO	8.92250*	3.30300	.045	.1661	17.6789
6 mM	VEHÍCULO	11.79417*	3.30300	.007	3.0378	20.5506

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

Fase G2/M

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: G2M						
t de Dunnett (bilateral)						
(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CONTROL	VEHÍCULO	3.04600	3.23603	.753	-5.5328	11.6248
2 mM	VEHÍCULO	3.35500	3.23603	.690	-5.2238	11.9338
4 mM	VEHÍCULO	8.38500	3.23603	.057	-.1938	16.9638
6 mM	VEHÍCULO	22.92000*	3.23603	.000	14.3412	31.4988
*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.						
a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.						

Agregados

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: AGREGADOS						
t de Dunnett (bilateral)						
(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CONTROL	VEHÍCULO	-.97400	2.03982	.969	-6.3816	4.4336
2 mM	VEHÍCULO	-.28100	2.03982	1.000	-5.6886	5.1266
4 mM	VEHÍCULO	.73800	2.03982	.988	-4.6696	6.1456
6 mM	VEHÍCULO	7.38200*	2.03982	.006	1.9744	12.7896
*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.						
a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.						

2.-Ciclo celular 48 h, figura 12 B.

Fase Sub-G1

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: SUBG1						
t de Dunnett (bilateral)						

Aspirina como posible fármaco de interferencia en la metástasis experimental, provocada por cáncer de glándula mamaria en un modelo in vitro

(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CONTROL	VEHÍCULO	-1.67000	3.95811	.979	-13.1108	9.7708
2 mM	VEHÍCULO	9.11667	3.95811	.129	-2.3242	20.5575
4 mM	VEHÍCULO	.09667	3.95811	1.000	-11.3442	11.5375
6 mM	VEHÍCULO	.56833	3.95811	1.000	-10.8725	12.0092

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

Fase G1

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: G1						
t de Dunnett (bilateral)						
(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CONTROL	VEHÍCULO	6.02333	6.64459	.777	-13.1827	25.2294
2 mM	VEHÍCULO	-4.65500	6.64459	.888	-23.8611	14.5511
4 mM	VEHÍCULO	-13.18000	6.64459	.211	-32.3861	6.0261
6 mM	VEHÍCULO	-14.24667	6.64459	.165	-33.4527	4.9594

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

Fase S

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: S						
t de Dunnett (bilateral)						
(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CONTROL	VEHÍCULO	13.55333	5.24213	.082	-1.5990	28.7056
2 mM	VEHÍCULO	-2.59667	5.24213	.963	-17.7490	12.5556
4 mM	VEHÍCULO	3.50000	5.24213	.903	-11.6523	18.6523
6 mM	VEHÍCULO	2.43667	5.24213	.970	-12.7156	17.5890

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

Fase G2/M

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: G2M						
t de Dunnett (bilateral)						
(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CONTROL	VEHÍCULO	7.94667*	2.35186	.023	1.1487	14.7447
2 mM	VEHÍCULO	4.26333	2.35186	.271	-2.5347	11.0613
4 mM	VEHÍCULO	12.19000*	2.35186	.001	5.3920	18.9880
6 mM	VEHÍCULO	28.48667*	2.35186	.000	21.6887	35.2847
*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.						
a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.						

Agregados

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: AGREGADOS						
t de Dunnett (bilateral)						
(I) TRATAMIENTO	(J) TRATAMIENTO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CONTROL	VEHÍCULO	-.18000	3.67867	1.000	-10.8131	10.4531
2 mM	VEHÍCULO	6.06667	3.67867	.340	-4.5665	16.6998
4 mM	VEHÍCULO	4.86667	3.67867	.515	-5.7665	15.4998
6 mM	VEHÍCULO	7.72333	3.67867	.177	-2.9098	18.3565
a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.						

Transwell

1.-Quimioatrayente, figura 17 A.

Comparaciones múltiples					
Variable dependiente: Absorbancia					
HSD de Tukey					
(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%

Aspirina como posible fármaco de interferencia en la metástasis experimental, provocada por cáncer de glándula mamaria en un modelo in vitro

					Límite inferior	Límite superior
VGEF 30ng	20% SFB	.05200*	.01221	.043	.0023	.1017
	10% SFB	.15300*	.01221	.001	.1033	.2027
	DMEM	.75050*	.01221	.000	.7008	.8002
20% SFB	VGEF 30ng	-.05200*	.01221	.043	-.1017	-.0023
	10% SFB	.10100*	.01221	.004	.0513	.1507
	DMEM	.69850*	.01221	.000	.6488	.7482
10% SFB	VGEF 30ng	-.15300*	.01221	.001	-.2027	-.1033
	20% SFB	-.10100*	.01221	.004	-.1507	-.0513
	DMEM	.59750*	.01221	.000	.5478	.6472
DMEM	VGEF 30ng	-.75050*	.01221	.000	-.8002	-.7008
	20% SFB	-.69850*	.01221	.000	-.7482	-.6488
	10% SFB	-.59750*	.01221	.000	-.6472	-.5478

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

2.-Tratamiento con AAS, figura 17 B.

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Absorbancia						
t de Dunnett (bilateral)						
(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
DMEM SOLO	DMEM 20% SFB	-58.61000*	6.35745	.000	-79.5369	-37.6831
2 mM AcAs	DMEM 20% SFB	-63.93500*	6.35745	.000	-84.8619	-43.0081
4 mM AcAs	DMEM 20% SFB	-72.49000*	6.35745	.000	-93.4169	-51.5631
6 mM AcAs	DMEM 20% SFB	-75.93000*	6.35745	.000	-96.8569	-55.0031
2 mM AcAs C/SFB	DMEM 20% SFB	-20.42500	6.35745	.056	-41.3519	.5019
4 mM AcAs C/SFB	DMEM 20% SFB	-31.04500*	6.35745	.006	-51.9719	-10.1181
6 mM AcAs C/SFB	DMEM 20% SFB	-50.06500*	6.35745	.000	-70.9919	-29.1381

Aspirina como posible fármaco de interferencia en la metástasis experimental, provocada por
cáncer de glándula mamaria en un modelo in vitro

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

Anexo 2. Cuantificación de bandas, western blot

Actina Atg4b					Atg4b					Atg4b/Actina	Normalización Atg4b/ CQ
Nombre	Señal	Total	Área	Bkgnd.	Nombre	Señal	Total	Área	Bkgnd.	Normalización	Expresión relativa
0 mM Atg4b	14000	25100	432	25.6	0 24 h banda superior	2.05	1060	429	2.47	0.0001464	0.003848
					0 24 h banda inferior	2440	3490	429	2.47	0.1742857	0.929916
CQ	31800	47200	429	35.9	CQ banda superior	1210	2320	429	2.58	0.0380503	1.000000
					CQ banda inferior	596	1870	429	2.97	0.0187421	1.000002
Vehículo 24 h	57100	79800	432	52.7	Vehículo 24 h banda superior	866	1920	429	2.47	0.0151664	0.398587
					Vehículo 24 h banda inferior	596	1660	429	2.47	0.0104378	0.556918
					Banda superior						
4 mM 4 h	42900	55500	432	29.2	4 mM 4 h	396	1460	429	2.47	0.0092308	0.242594
6 mM 4 h	39000	48700	432	22.6	6 mM 4 h	476	1530	429	2.47	0.0122051	0.320763
10 mM 4 h	19900	26300	432	14.8	10 mM 4 h	26.7	1090	429	2.47	0.0013417	0.035261
4 mM 8 h	28300	34600	432	14.7	4 mM 8 h	146	1210	429	2.47	0.0051590	0.135584
6 mM 8 h	28500	34300	432	13.3	6 mM 8 h	148	1210	429	2.47	0.0051930	0.136477
10 mM 8 h	29000	35400	432	14.8	10 mM 8 h	23.9	1080	429	2.47	0.0008241	0.021659
					Banda inferior						
					4 mM 4 h	2250	3310	429	2.47	0.0524476	2.798382
					6 mM 4 h	2640	3700	429	2.47	0.0676923	3.611778
					10 mM 4 h	935	1990	429	2.47	0.0469849	2.506919
					4 mM 8 h	2030	3080	429	2.47	0.0717314	3.827290
					6 mM 8 h	3010	4070	429	2.47	0.1056140	5.635123
					10 mM	2060	3120	429	2.47	0.0710345	3.790103

Aspirina como posible fármaco de interferencia en la metástasis experimental, provocada por cáncer de glándula mamaria en un modelo in vitro

					8 h							
					Banda inferior							
4 mM 16 h	38500	48100	432	22.2	4 mM 16 h	60.8	1170	429	2.58	0.0015792	0.041504	
6 mM 16 h	34500	45100	432	24.5	6 mM 16 h	80.2	1190	429	2.58	0.0023246	0.061094	
10 mM 16 h	12900	19900	432	16.1	10 mM 16 h	10.4	1120	429	2.58	0.0008062	0.021188	
6 mM 24 h	59000	78100	432	44.4	4 mM 24 h	195	1300	429	2.58	0.0033051	0.086861	
4 mM 24 h	72600	95100	432	52	6 mM 24 h	644	2130	429	3.47	0.0088705	0.233126	
10 mM 24 h	39500	57500	432	41.5	10 mM 24 h	157	1650	429	3.48	0.0039747	0.104459	
					Banda superior							
					4 mM 16 h	118	1220	429	2.58	0.0030649	0.163532	
					6 mM 16 h	22.9	1130	429	2.58	0.0006638	0.035416	
					10 mM 16 h	1.4	1110	429	2.58	0.0001085	0.005791	
					4 mM 24 h	64.4	1170	429	2.58	0.0010915	0.058239	
					6 mM 24 h	683	2200	429	3.54	0.0094077	0.501956	
					10 mM 24 h	167	1630	429	3.42	0.0042278	0.225580	
Actina PARP					PARP					PARP/Actina	Normalización PARP/UV	
					Frag. de 116 KDa							
Nombre	Señal	Total	Área	Bkgnd.	Nombre	Señal	Total	Área	Bkgnd.	Normalización	Expresión relativa	
UV	29500	85500	429	131	UV	23500	57300	700	48.3	0.79661017	1	
Vehículo 24 h	83700	145000	429	143	Vehículo 24 h	26400	70900	700	63.6	0.31541219	0.3959429	
4 mM 24 h	88600	147000	429	135	4 mM 24 h	23000	70300	700	67.6	0.25959368	0.3258729	
6 mM 24 h	76400	132000	429	130	6 mM 24 h	31400	76700	700	64.7	0.41099476	0.515929	
10 mM 24 h	50400	99700	429	115	10 mM 24 h	15100	54400	700	56.2	0.29960317	0.3760976	
vehículo 48 h	101000	153000	429	122	Vehículo 48 h	21600	59700	700	54.4	0.21386139	0.2684642	
4 mM 48 h	112000	169000	429	132	4 mM 48 h	28400	63700	700	50.4	0.25357143	0.3183130	
6 mM 48 h	81000	134000	429	123	6 mM 48 h	3760	32700	700	41.3	0.04641975	0.0582716	
10 mM 48 h	113000	174000	429	142	10 mM 48 h	1270	25100	700	34.1	0.01123894	0.0141084	
					Frag. de 89 KDa					PARP/ Actina	Normalización PARP/ UV	
					UV	2790	20800	429	42	0.09457627	1	
					Vehículo 24 h	905	18300	429	40.5	0.01081243	0.1143249	

Aspirina como posible fármaco de interferencia en la metástasis experimental, provocada por cáncer de glándula mamaria en un modelo in vitro

					4 mM 24 h	2200	23300	429	49.1	0.0248307	0.2625468
					6 mM 24 h	2120	21400	429	44.9	0.02774869	0.2934001
					10 mM 24 h	3460	22200	429	43.7	0.06865079	0.7258775
					Vehículo 48 h	4100	21600	429	40.8	0.04059406	0.4292203
					4 mM 48 h	1100	18300	429	40.2	0.00982143	0.1038466
					6 mM 48 h	229	14400	429	33.1	0.00282716	0.0298929
					10 mM 48 h	334	12000	429	27.3	0.00295575	0.0312525
Actina Caspasa -3					Pro caspasa- 3 32 KDa					Procaspasa- 3/Actina	Normalización Procaspasa-3/ UV
Nombre	Señal	Total	Área	Bkgnd.	Nombre	Señal	Total	Área	Bkgnd.	Normalización	Expresión relativa
UV	29500	85500	429	131	UV	5020	7410	429	5.57	0.17016949	1
Vehículo 24 h	83700	145000	429	143	Vehículo 24 h	22900	47200	429	56.8	0.27359618	1.6077863
4 mM 24 h	88600	147000	429	135	4 mM 24 h	53600	86800	429	77.4	0.60496614	3.5550799
6 mM 24 h	76400	132000	429	130	6 mM 24 h	53400	87100	429	78.6	0.69895288	4.1073924
10 mM 24 h	50400	99700	429	115	10 mM 24 h	67300	107000	429	92	1.33531746	7.8469851
vehículo 48 h	101000	153000	429	122	vehículo 48 h	36600	69000	429	75.7	0.36237624	2.1295018
4 mM 48 h	112000	169000	429	132	4 mM 48 h	49400	88700	429	91.8	0.44107143	2.5919536
6 mM 48 h	81000	134000	429	123	6 mM 48 h	52400	91300	429	90.8	0.64691358	3.8015838
10 mM 48 h	113000	174000	429	142	10 mM 48 h	23700	52600	429	67.4	0.20973451	1.2325036
					Caspasa- 3 17 KDa.					Caspasa-3/ Actina	Normalización Caspasa-3/ UV
					UV	1180	3570	429	5.57	0.04	1
					vehículo	3190	12900	429	22.7	0.03811231	0.9528076
					4 mM 24 h	8960	22900	429	32.5	0.10112867	2.5282167
					6 mM 24 h	5790	19200	429	31.2	0.07578534	1.8946335
					10 mM 24 h	4810	19600	429	34.5	0.09543651	2.3859127
					vehículo 48 h	4730	22700	429	41.9	0.04683168	1.1707920
					4 mM 48 h	3850	18900	429	35	0.034375	0.859375
					6 mM 48 h	-1180	3860	429	11.7	-0.0145679	-0.364197
					10 mM 48 h	2510	14800	429	28.5	0.02221239	0.5553097

Anexo 3. Prueba de caspasa 3 por citometría de flujo los resultados son los siguientes.

Después de tratar las células MDA-MB-231 con 2, 4 y 6 mM fueron tripsinizadas, lavadas y fijadas en etanol al 70% por 20 minutos a 4°C, posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario de caspasa-3 toda la noche, al finalizar, incubaron con un anticuerpo secundario, lavaron y leyeron en el citómetro de flujo. Este resultado es positivo a caspasa 3, por si solas las células expresan 2.2% (células sin tratamiento histograma b) del total de células leídas e incrementa gradualmente con la concentración alcanzando un 11.8% a 6 mM (histograma f). Sin embargo estos datos forman parte del anexo debido a que representan un solo ensayo, no obstante apoya el resultado de los western blot de caspasa 3 (fig. 18)

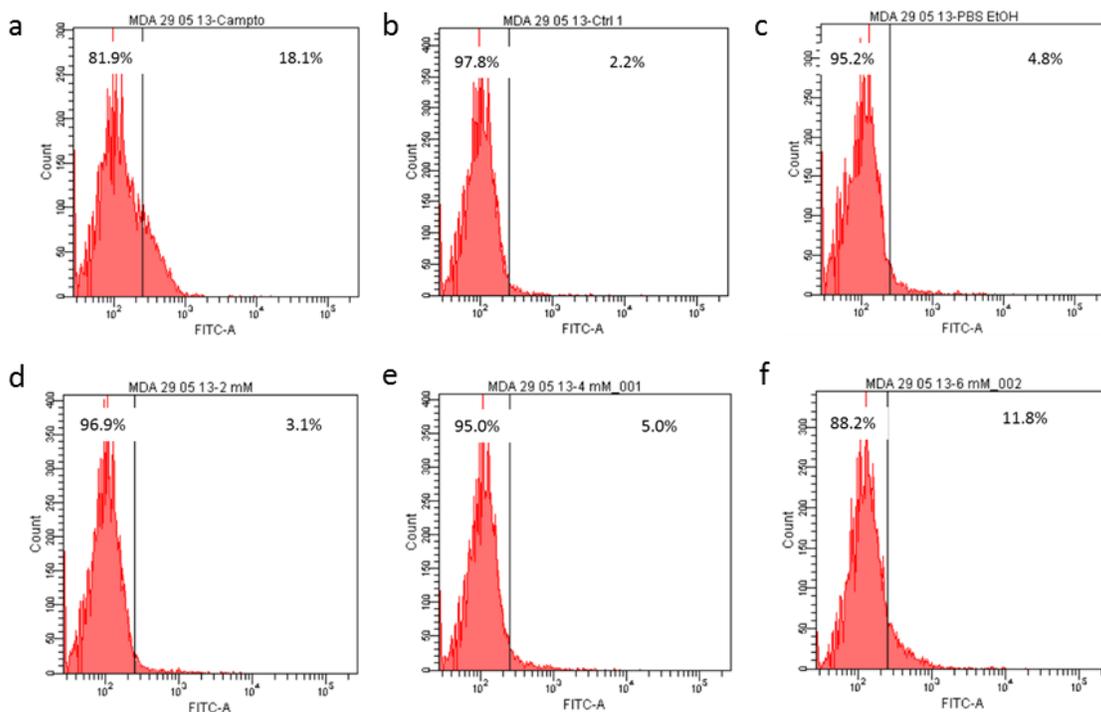


Fig. 18 Se sembraron $2,5 \times 10^5$ células / pozo en placas de 6 pozos, DMEM al 10% de SFB evaluado a las 48h de tratamiento con 2, 4 y 6mM AAS. a) células positivas a caspasa 3 (camptotecina); b) células sin tratamiento; c) vehículo (ET-OH, PBS); d) 2mM; e) 4mM; f) 6mM.