



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGIA

**Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de los
compuestos Quercetina, Patuletina y Quercetagetina en la línea
celular de cáncer de mama MCF-7**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE: LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA:
EHECATL ANTONIO DEL
MORAL SANTILLAN

JURADO DE EXAMEN

DIRECTORA: DRA. MARIA LUISA ESCOBAR SANCHEZ

ASESOR: DR. LUIS SANCHEZ SANCHEZ

ASESOR: DR. HUGO LOPEZ MUÑOZ

SINODAL: M. EN C. GERARDO DIAZ VAZQUEZ

SINODAL: DR. OCTAVIO DANIEL REYES HERNANDEZ



FES
ZARAGOZA

CIUDAD DE MÉXICO

OCTUBRE 2023



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
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
CARRERA DE BIOLOGÍA
FORMATO F-5



OFICIO DE FECHA DE EXAMEN

QFB GRACIELA ROJAS VÁZQUEZ
JEFA DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
Presente

Le comunico que al alumno: DEL MORAL SANTILLAN EHECATL ANTONIO con número de cuenta 316228787 de la carrera BIOLOGÍA se le ha fijado el día 18 de Octubre de 2023 a las 11:00 hrs., para presentar la réplica oral de su examen profesional, que tendrá lugar en esta facultad, ante el siguiente jurado:

CARGO	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE DR.	SANCHEZ SANCHEZ LUIS	
VOCAL DRA.	ESCOBAR SANCHEZ MARIA LUISA	
SECRETARIO M. EN C.	DIAZ VAZQUEZ GERARDO	
SUPLENTE DR.	LOPEZ MUÑOZ HUGO	
SUPLENTE DR.	REYES HERNANDEZ OCTAVIO DANIEL	

El título del trabajo escrito que se presenta es:

Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de los compuestos Quercetina, Patuletina y Quercetagetina en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

En la modalidad de: TESIS

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
CDMX, a 28 de Agosto de 2023

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA

*El mundo es un lugar maravilloso. El mundo está lleno de belleza y misterio.
El mundo está lleno de posibilidades y esperanza. El mundo está esperando a
ser descubierto.*

-Dmitry Glukhovsky, Metro 2035

Agradecimientos Institucionales

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM por la adquisición de materiales y reactivos necesarios para el desarrollo de esta investigación a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica con los proyectos: PAPIIT IN219221 y PAPIIT IN215922.

Así mismo, quisiera agradecer al Dr. Israel Muñoz Velasco del Laboratorio De Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, por su asistencia técnica durante la adquisición de imágenes de microscopía de fluorescencia.

Agradecimientos

A mi familia, que me ha apoyado y guiado durante todo el proceso de realización y culminación de mi tesis. Sin su aliento, comprensión y consejo, no habría podido superar los obstáculos y dificultades que se presentaron en este camino. Gracias por creer en mí y por darme la oportunidad de cumplir este sueño.

A mi novia Ximena, quien ha estado para mí en este largo proceso, cuyo apoyo me ha inspirado a luchar por nuevas metas y a culminar viejas metas, cuyo cariño me ha dado la fuerza para poder superarme día tras día.

A los doctores del laboratorio donde realicé mi tesis, gracias a su profesionalismo, paciencia y dedicación, he podido superar los retos y dificultades que se me presentaron. Su contribución ha sido invaluable para mi formación académica y personal.

A mis amigos y conocidos cuya fe en mi me motivaba para poder alcanzar mis metas, cuya ayuda siempre fue bienvenida y valorada para mi formación durante la carrera.

A todos los que lean esta tesis... muchas gracias.

Resumen	1
Introducción	2
Ciclo celular	2
Muerte celular	4
Cáncer	9
Cáncer de mama	12
Terapias contra el cáncer	14
Flavonoides	16
Antecedentes	18
Planteamiento del problema	20
Justificación	20
Hipótesis	21
Objetivos	21
Objetivo general	21
Objetivos particulares	21
Material y métodos	22
Cultivo celular	22
Preparación de los compuestos	22
Cuantificación del número celular	22
Actividad de LDH en sobrenadantes de cultivos celulares	23
Identificación de apoptosis	24
Análisis estadístico	24
Resultados	25
Actividad antiproliferativa de los compuestos Quercetina, Quercetagetina y Patuletina en línea celular MCF-7	25
Actividad necrótica de los compuestos Quercetina, Quercetagetina Y Patuletina en línea celular MCF-7	27
Determinación de apoptosis en células MCF-7 tratadas con los compuestos Quercetina, Quercetagetina y Patuletina	28
Discusión	34
Conclusiones	40
Bibliografía	41
Anexo	45

Resumen

El cáncer es una enfermedad genética que se origina cuando la célula pierde la capacidad de reparar el ADN o de morir por una muerte programada. El cáncer es una enfermedad genética con múltiples características como; la multiplicación celular descontrolada, la evasión de muerte programada, entre otros. Al tratarse de una enfermedad que no tiene cura, se ha convertido en una patología de interés global y nacional. En la búsqueda de nuevos tratamientos para el cáncer se ha empleado el uso de compuestos de origen natural como lo es el caso de los flavonoides. Se ha demostrado que la Quercetina, Quercetagetina y Patuletina, han presentado actividad antiproliferativa y apoptótica en diversos tipos de líneas celulares tumorales, sin embargo, la información sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7 es baja por lo que existe un campo de investigación extenso. En el presente estudio los resultados se enfocan en el análisis de la actividad antiproliferativa de los compuestos sobre esta línea celular siendo que se encontró una disminución dosis dependiente con el compuesto Quercetagetina actuando con una mayor eficacia respecto a las otras dos. Para descartar una muerte citotóxica se analizó los niveles de LDH en las células tratadas descubriendo que la actividad de esta enzima en las tratadas no representa un valor de importancia biológica por lo que se consideraría que las células tratadas no presentan muerte por necrosis. Así mismo las células presentan cambios morfológicos típicos de apoptosis, a su vez se identificó la presencia de la caspasa 3 activa típica en este tipo de muerte celular. Con perspectivas al futuro la aparición de vesículas al interior de las células sugiere un tipo de muerte distinto, por lo que se recomendaría continuar este proyecto con dicha información, también se recomienda un análisis comparativo con células sanas y un análisis cuantitativo de estos tipos de muerte celular.

Introducción

Ciclo celular

El crecimiento y proliferación de una célula está determinado por una serie de pasos que se engloban en el ciclo celular, este se divide en dos fases mayores, la interfase y la mitosis, la interfase se compone de tres sub-fases G1, S y G2 que son durante las que la célula se prepara para la división (fase M o mitosis). De acuerdo con Sun & *et al.* (2021), la fase S es un punto crítico durante el ciclo celular pues en ésta se replica el ADN, así como proteínas cromosómicas y es, por lo general, donde más actúan los quimioterapéuticos.

En la fase G1 existen “puntos de restricción” el cual separa esta fase en fases temprana y tardía donde actúan diversos factores intrínsecos (proteínas de síntesis) y factores extrínsecos como señales mitogénicas los cuales determinan si la célula se queda en ese punto de restricción o lo pasa, siendo aquí que la ausencia de estos factores “sacan” a la célula a una fase G0 o una fase quiescente (Gao & Liu, 2019). Sin embargo, estas células pueden volver a G1 en condiciones propicias para su división, generalmente mitógenos; por ejemplo, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humanos recombinantes (rhGM-CSF por sus siglas en inglés) que transfiere las células de leucemia mieloide de la fase G0 a la Fase G1. (Sun *et al.*, 2021). Así mismo, durante esta fase se van formando proteínas involucradas en la replicación de ADN, así como la formación de complejos de pre-replicación como ORC1–6, CDC6, CDT1 and MCM2–7 DNA helicasa (Suski *et al.*, 2021)

Durante el ciclo celular existen proteínas reguladoras (ciclina) las que mediante diferentes reacciones activan a las proteínas cinasas; estas últimas promueven la división celular (figura 1). Existen alrededor de 11 ciclina y cada una está relacionada con un control

específico del ciclo celular, por ejemplo, la activación de ciclinas D y E promueven la transición de células de G1 a S. Así mismo, en las ciclinas existen unos fragmentos conservados de aminoácidos los cuales unen a las ciclinas con las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs). En células de mamíferos las CDKs, junto con sus respectivos inhibidores y las proteínas de retinoblastoma (Rb) controlan los cambios en las ciclinas en diferentes fases.

Las CDKs pueden iniciar, promover y completar eventos de ciclos celulares. Siendo las ciclinas y CDK controladoras del ciclo celular (Sun *et al.*, 2021).

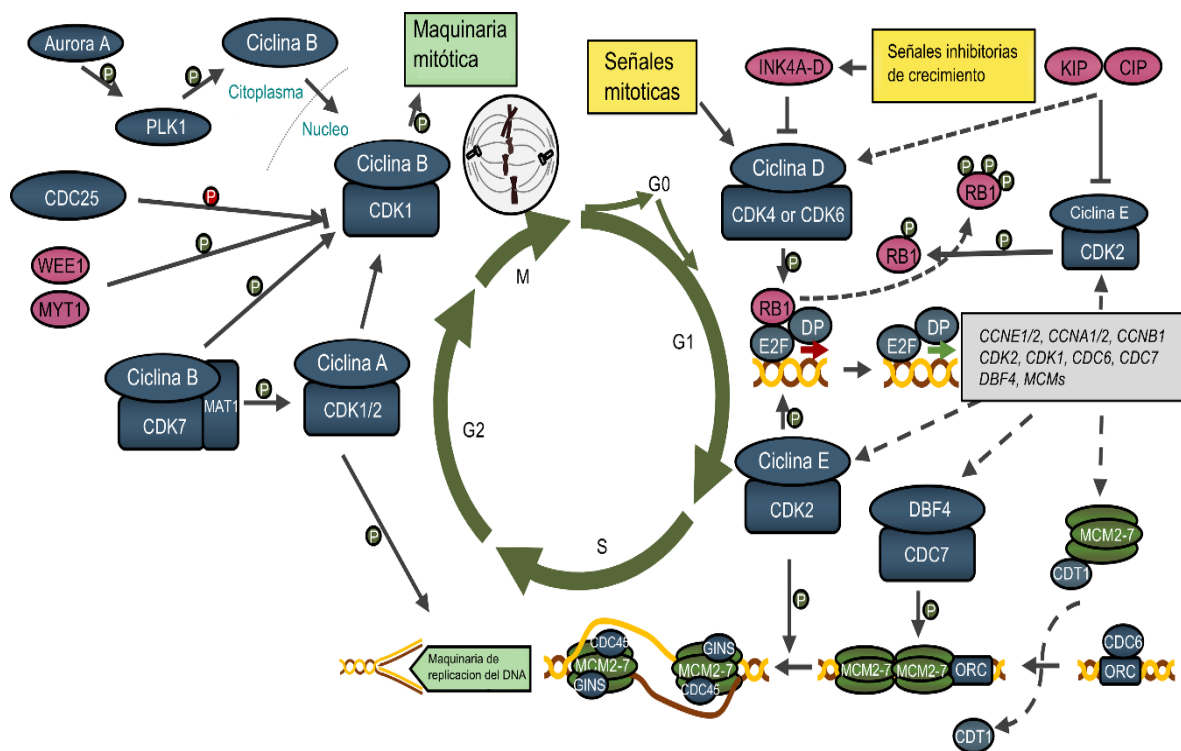


Figura 1. Resumen esquemático del ciclo celular, en el cual se pueden apreciar la función de las ciclinas para la regulación del ciclo celular. Fuente: Tomado y modificado de Suski *et al.*, 2021.

Al inicio de la fase S, la replicación es activada por una serie de diversas fosforilaciones llevadas a cabo por DBF4-CDC7 y ciclina E-CDK2, estas promueven la unión de CDC45 y GINS a MCM2-7, lo que resulta en la formación del complejo CDC45-MCM2-7-GINS (CMG) y la activación de la helicasa de ADN. Posteriormente, el papel de la ciclina E-CDK2 en la activación de los orígenes de replicación del ADN es tomado por la ciclina A-CDK2.

La ciclina A puede activar CDK1 y CDK2 que desempeña un papel importante durante la fase S, así como en G2-M. La función crucial de la ciclina A durante la transición G2/M es activar la ciclina B-CDK1, estas ciclinas B, que se acumulan en el núcleo al inicio de la mitosis, se relacionan con varios eventos como la progresión mitótica, la división celular, la reorganización del citoesqueleto, la separación de la envoltura nuclear, la condensación del cromosoma, el ensamblaje y las funciones del huso mitótico, la segregación cromosómica y la citocinesis. Por último, la regulación del ciclo celular también está fuertemente regulado por inhibidoras de ciclinas CDK's, así como la degradación de proteínas específicas de la transcripción del ciclo celular, que, dicho sea de paso, estos procesos suelen estar desregulados en cánceres humanos, resultando en una activación aberrante de varias proteínas del ciclo celular (Suski *et al.*, 2021).

Muerte celular

En el ciclo celular suele haber errores al momento de la replicación lo que daña al ADN, por lo que este ciclo cuenta con puntos de control o *checkpoints* que se aseguran de que la calidad del material genético sea adecuada. Estos *checkpoints* funcionan bloqueando el ciclo celular impidiendo que las células pasen a la siguiente fase y dando tiempo para activar diversas vías de reparación como la mediada por la proteína p53 (Sun *et al.*, 2021).

Si la reparación no está disponible ya sea por la ausencia de ciertas enzimas que participan activamente en algunas vías de reparación como lo son las endonucleasas, se activan procesos de muerte celular programados como la apoptosis.

La apoptosis es el proceso en el cual la célula detiene sus funciones de crecimiento y división y entra en un proceso de muerte programada en el cual su contenido no es dispersado al microambiente. Este proceso está guiado por caspasas (proteasas) quienes se dividen en dos grupos: las iniciadoras (-8, -9 y -10) y las ejecutoras (-3, -6 y -7). Estas últimas inician una cascada de activación de endonucleasas, destrucción de proteínas nucleares y citoesqueléticas, así como la expresión de ligandos para células fagocíticas y la formación de cuerpos apoptóticos (D'Arcy, 2019).

Este proceso se puede activar mediante dos formas, una por vía intrínseca (caspasa -9) iniciada por una serie de sensores intracelulares; y la vía extrínseca (iniciada por la caspasa -8 o -10) la cual es activada mediante la unión de ligandos denominados “ligandos de muerte”, a los receptores de las células que entrarán en apoptosis (figura 2). Las señales de la vía intrínseca convergen hacia la mitocondria, donde el balance de las subclases de proteínas miembros de la familia BCL-2 (anti- y pro-apotóticos), determinan si la apoptosis ocurre o no. Si el balance se inclina a favor de subclases anti-apoptóticas no se activan las proteínas BAX y BAK evitando que puedan ejercer su función que es permeabilizar la membrana externa de la mitocondria (Roberts, *et al.*, 2022). En caso de que las proteínas BAX y BAK no sean inhibidas, éstas tienen la habilidad de llegar hasta la membrana externa de la mitocondria, promoviendo la liberación de citocromo c al citoplasma donde se une con la proteína adaptadora APAF-1, la que a su vez posee la capacidad de reclutar a la proteasa caspasa-9, para constituir a un complejo multi-proteico denominado apoptosoma, quien, a su

vez, activa a una cascada de caspasas proteolíticas efectoras (caspasas-3, -6 y -7). Así mismo, esta permeabilización de la membrana mitocondrial libera otros factores promotores de la apoptosis como SMAC (del inglés *second mitochondria-derived activator of caspase*) SMAC tiene la capacidad de actuar sobre otras proteínas como XIAP (ubiquitina E3 ligasa asociada a una proteína inhibidora de la apoptosis), la que a su vez inhibe a la caspasa-3 (Strasser & Vaux, 2020).

En cuanto a la vía extrínseca ésta se activa mediante la unión de receptores transmembranales específicos (comúnmente llamados receptores de muerte) a sus ligandos cognados. Entre los receptores encontramos a: CD95 (o FAS) receptor-TNF- α y TRAIL-R1 y TRAIL-R2 (o receptor de muerte 4 y 5 respectivamente, en inglés DR4 y DR5); por lo general sus ligandos (FasL/CD95L, TNF- α , and TRAIL) son expresados por células del sistema inmune (Guicciardi *et al.*, 2013). En este caso la unión de estas proteínas forma un complejo en la cola interna de la proteína transmembranal llamado complejo de señalización inductor de muerte o DISC por sus siglas en inglés. Una vez conformado el complejo DISC, éste puede reclutar a las caspasas iniciadoras como la -8 o la -10, las que, una vez que adquieren su forma catalítica, son liberadas al citoplasma para ejercer su función y activar a las caspasas ejecutores como la -3, -6 y -7 (Guicciardi *et al.*, 2013).

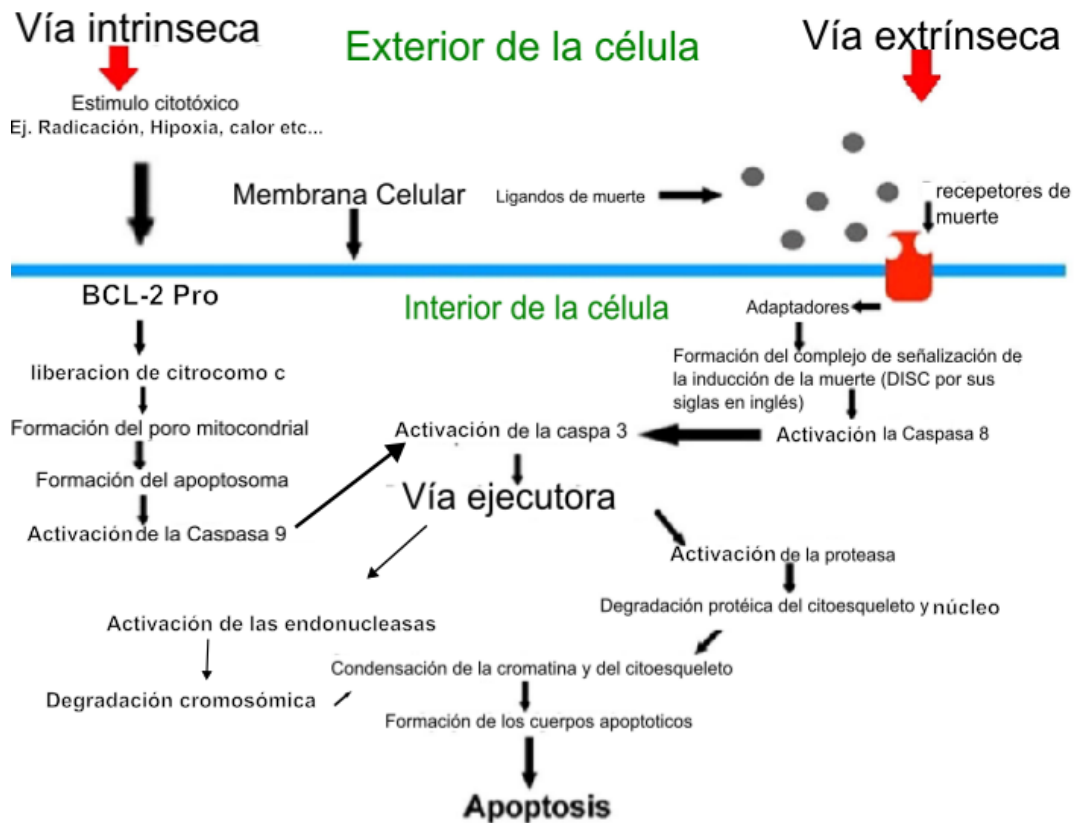


Figura 2. Resumen de las vías de muerte apoptóticas. Fuente: Tomado y modificado de D'Arcy, 2019.

La necrosis al contrario que la apoptosis, es un tipo de muerte no controlada inducida por un estímulo externo como la hipoxia o un alto contenido de especies reactivas de oxígeno. Este proceso resulta en la ruptura de la membrana celular que causa que el contenido se vierta en las áreas circundantes, así mismo esta muerte provoca que la célula se hinche y a su vez provoca que no pueda mantener una homeostasis con el ambiente (D'Arcy, 2019), también incrementa el calcio disponible en la célula, aumento de diversas proteasas y fosfolipasas, así como una pérdida integral de la membrana mitocondrial (Guicciardi *et al.*, 2013).

Morfológicamente en un cultivo celular suelen verse los restos celulares en el medio, también se logran observar fragmentos de cuerpos apoptóticos lo que algunos llaman erróneamente una apoptosis tardía. De acuerdo con D'Arcy (2019), en un microscopio la diferencia con una célula que haya muerto por necrosis y otra por apoptosis es muy clara, en la célula apoptótica destacan sus cuerpos apoptóticos los cuales encierran mucho material interior el cual, en un organismo son capturados por células fagocíticas.

De acuerdo con Strasser & Vaux (2020) la incapacidad de las células para morir o mejor dicho suicidarse se ha relacionado directamente con el cáncer en humanos y esto puede promover su resistencia a terapias. Ahora bien, y siguiendo con su idea, estas células incapaces de morir como aquellas que tienen una sobreexpresión de BCL-2 o aquellas que tienen p53 mutado no solo prevén una muerte programada, como la apoptosis, también afectan funciones supresoras de tumores activando funciones de reparación de ADN causando un arresto del ciclo celular y/o senescencia celular y si juntamos esto con una célula que recibe otra mutación que promueve aberrantemente el ciclo celular entonces se producirá un rápido crecimiento de células clonales malignas.

Cáncer

De acuerdo con De vita (2017) el cáncer se define como: "una enfermedad genética y que la acumulación de alteraciones moleculares en el genoma de las células somáticas son la base para la progresión de esta enfermedad". Así mismo y de acuerdo con la OMS (2022), el cáncer también conocido como neoplasias o tumores malignos engloba un grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo, cuya característica más notoria es que las células anormales entran en un estado de rápida multiplicación anormal.

El cáncer también puede invadir otras partes del organismo diferente al sitio en el cual se originó, este proceso se conoce como metástasis.

En adición a estas dos características del cáncer y como un esfuerzo para una mirada terapéutica, se ha recurrido a agruparlas en un marco conocido como los "Hallmarks del cáncer" propuesto por Hanahan & Weinberg (2000, 2011), en el que se conceptualizan 10 capacidades de las células tumorales: mantenimiento de las señales de proliferación, evasión de los supresores de crecimiento, evasión de la respuesta inmune, inmortalidad replicativa, inflamación crónica, activación de la metástasis, inducción de angiogénesis, inestabilidad genómica y mutación, evasión de la muerte celular, reprogramación metabólica. Incluso, se siguen proponiendo más "Hallmarks" relacionados con los avances que se han tenido en la investigación sobre esta enfermedad como; transdiferenciación/desdiferenciación, desregulación epigenética, alteración del microbioma y alteración en la señalización neuronal (Senga & Grose, 2021) así como Hanahan (2022) donde también propone 4 nuevos Hallmarks como lo son: Desbloqueo de la plasticidad fenotípica, reprogramación de la epigenética no mutacional, microbiomas polimórficos y células senescentes (figura 3).

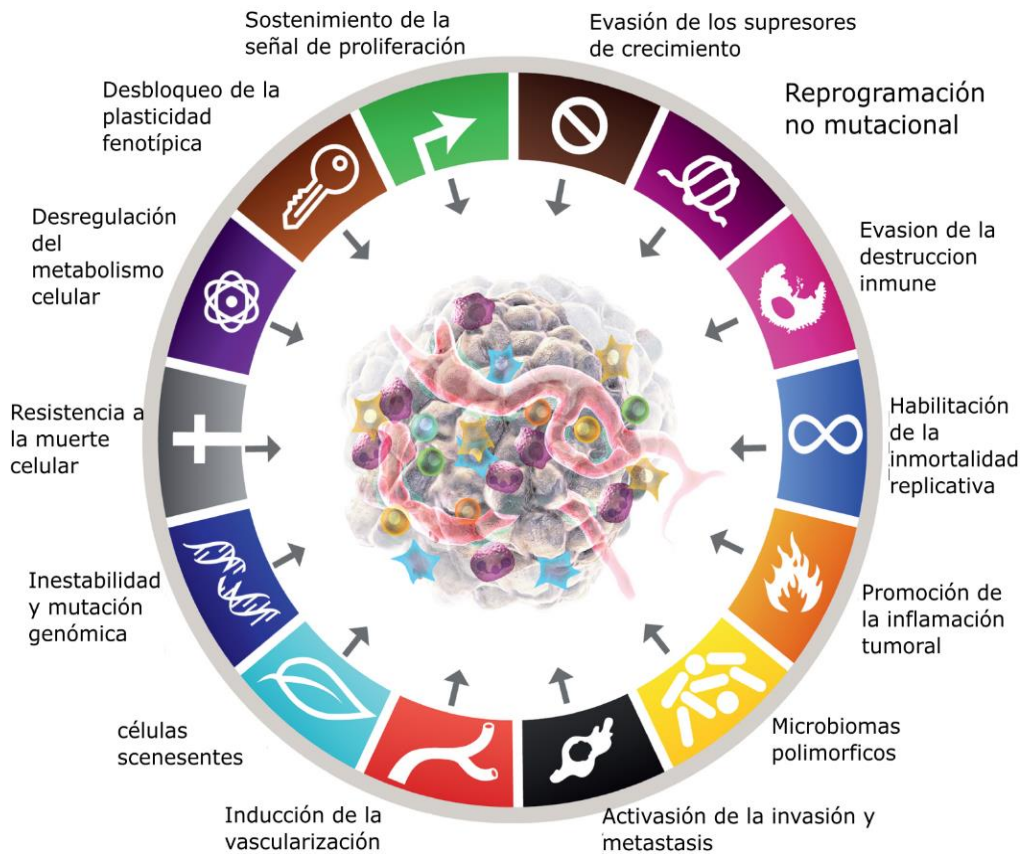


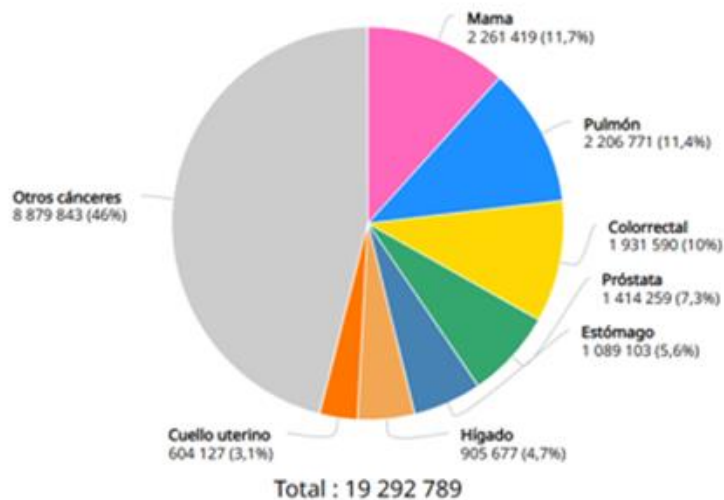
Figura 3 Esquema que representa los "Hallmarks" del cáncer contando los cuatro propuestos por Hanahan. Fuente: Tomado y modificado de Hanahan, 2022.

Al tener un marco de estudio como lo son estos Hallmarks, se vuelve más fácil direccionar y/o ordenar un trabajo de investigación, pudiéndose enfocar en determinados procesos de esta compleja enfermedad-, donde cabe mencionar que cada sello puede compartir algunas características por lo que el estudio en conjunto de estos trae un trabajo más completo. El cáncer se ha vuelto una enfermedad de interés global (figura 4), puesto que, en el año 2020, se registraron casi 10 millones de muertes de los cuales los más comunes en cuanto a letalidad fueron: de pulmón (1.8 millones), colorrectal (916,000), hepático (830,000), gástrico (769,000) y de mama (685,000), por otro lado, los cánceres de mayor

incidencia son: el de mama (2.26 millones), pulmón (2.21 millones), colorrectal (1.93 millones), de próstata (1.41 millones) y de piel (1.20 millones) (OMS, 2021).

Número estimado de nuevos casos en 2020, Mundo, ambos sexos, todas las edades

A)



Número estimado de muertes en 2020, Mundo, ambos sexos, todas las edades

B)

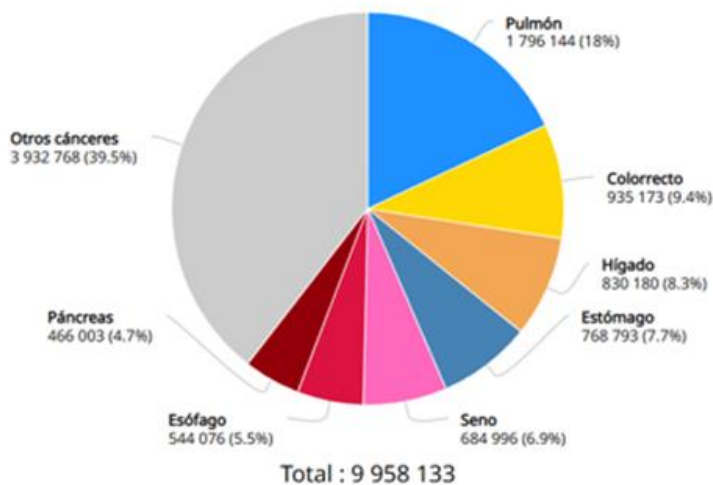


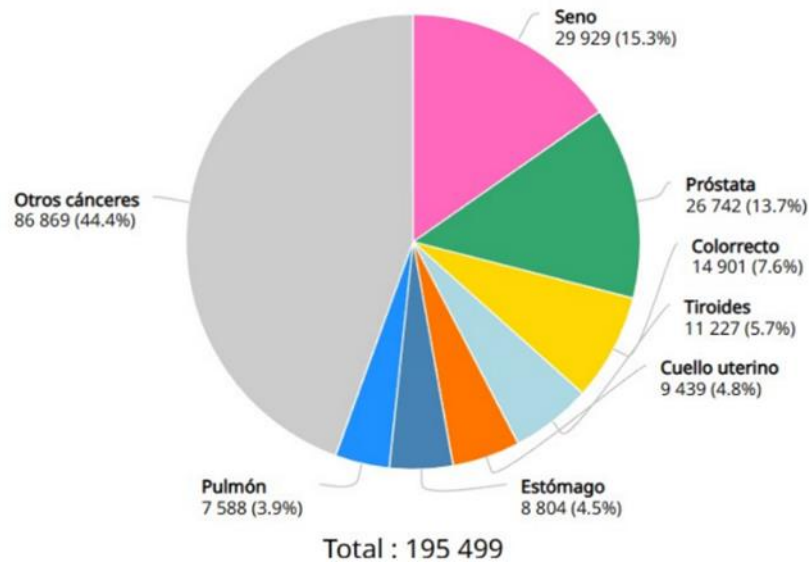
Figura 4. Graficas que representan la incidencia (A) y mortalidad (B) sobre la estadística del cáncer en el mundo. Fuente: Tomado y Modificado de Cancer Today (iarc.fr) el 13/03/202.

Cáncer de mama

El cáncer de mama al ser uno de los más comunes a nivel global y siendo la principal causa de muerte en mujeres lo hace un buen candidato para su investigación. En México como en el mundo, el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia del total de los casos (véase figura 5) sin embargo, y a diferencia de los casos globales, en México ocupa el primer lugar en casos de mortalidad. Este cáncer se origina en las células del epitelio de los conductos o lóbulos del tejido glandular de los senos, comenzando como un cáncer *in situ* de poco riesgo. Sin embargo, al ir progresando puede invadir tejidos circundantes y, consecuentemente, realizar una metástasis regional o distante, siendo esta última la causa de muerte en mujeres (OMS, 2021).

El cáncer de mama se agrupa en un diverso número de subtipos de acuerdo con un perfil molecular o un cuadro clínico patológico. Algunos ejemplos de estos subtipos histológicos o de perfil genético se clasifican dentro de: receptores positivos (Luminal A, Luminal B, tipo normal, y HER-2 positivo cuyas siglas en inglés significa receptor de factor de crecimiento epidermal humano 2 positivo) y receptores negativos (cáncer de mama triple negativo, o de tipo basal) en estos últimos se encuentran los tipo 1 y tipo 2; inmunomodulatorio mesenquimal, tipo células troncales mesenquimales y andrógeno luminal dependiendo de la expresión génica. Generalmente estos tipos están asociados con diferentes grupos de edades o etnias, por ejemplo, los “triple negativo” y HER-2 se asocian a jóvenes y mujeres premenopáusicas y también a mujeres afroamericanas y asiáticas exhibiendo un mayor potencial metastásico (Kashyap *et al.*, 2022).

Número estimado de casos nuevos en 2020, México, ambos sexos, todas las edades



Número estimado de defunciones en 2020, México, ambos sexos, todas las edades

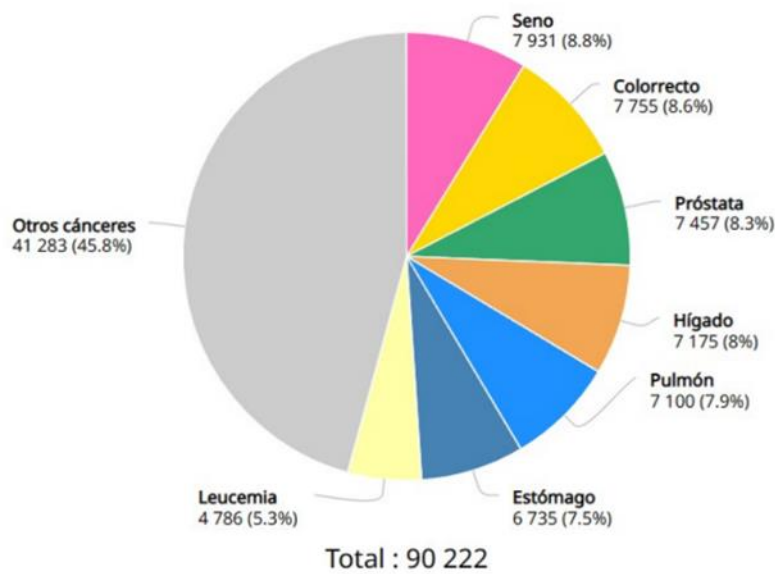


Figura 5. Graficas que representan la estadística en México siendo que la incidencia de cánceres se encuentra en la gráfica arriba y la mortalidad abajo. Fuente: Tomado y Modificado de Cancer Today (iarc.fr) el 13/03/2023.

De acuerdo con estos mismos autores (Kashyap *et al.*, 2022), los factores de riesgo incluyen una edad tardía al tener el primer hijo y tener una menopausia tardía. Lo anterior se relaciona con la falta en la diferenciación del tejido de la mama, una mayor exposición a mutágenos no estrogénicos y una genotoxicidad por los estrógenos. También mencionan que una dieta no balanceada, así como una dieta no vegetariana, poca actividad física, obesidad, el consumo moderado de alcohol, uso prolongado de anticonceptivos hormonales, fumar, historial familiar y tóxicos ambientales influyen, algunos más que otros, en gran medida la adquisición de este cáncer.

Terapias contra el cáncer

Como se busca con cualquier enfermedad, el cáncer tiene diversos tratamientos y éste depende principalmente del tipo de cáncer a tratar. De acuerdo con Carlberg & Velleuer (2021), los tratamientos se pueden categorizar en dos grupos: control local (cirugía, radioterapia, hipertermia o terapia fotodinámica) y control sistémico (quimioterapia, inmunoterapia, terapia hormonal entre otras). Siguiendo la evolución de un tumor, la cirugía es un buen método en la detección temprana, sin embargo, no exime de la posibilidad de que las células tumorales hayan invadido tejido circundante, o incluso lugares difíciles de acceder, por lo que se recurre en conjunto con otras terapias clásicas y/o específicas. También hay que recordar que algunas de estas terapias traen efectos secundarios, por ejemplo, la radioterapia puede afectar células sanas matándolas y/o promoviendo la transformación de éstas hacia nuevas células tumorales (Carlberg & Velleuer, 2021).

Por otra parte, existen terapias dirigidas cuyo blanco son moléculas específicas, por ejemplo, neoantígenos membranales o moléculas superficiales e incluso la terapia hormonal que es otro método específico contra una de las características distintivas de la célula tumoral.

De hecho, las terapias dirigidas buscan acabar con algún proceso de los conocidos “*Hallmarks* del cáncer”; en adición, si se encuentra la principal vía de estos *Hallmarks* en las células cancerosas, se podrá encontrar una terapia que actúe directamente sobre esa causa principal (Carlberg & Velleuer, 2021). Sin embargo, este tipo de terapias aún no son accesibles para la población en general y algunas de ellas se encuentran en vías tempranas de desarrollo.

Para el cáncer de mama se buscan diferentes tratamientos dependiendo de si hay o no metástasis, para aquellos que no sean metastásicos se busca erradicar el tumor de la mama y los nódulos linfáticos. En cuanto a tratamientos locales se usa la resección quirúrgica y el muestreo o extirpación de los ganglios linfáticos axilares con la opción a una radiación postoperatoria. En cuanto a un tratamiento sistémico se usan neoadyuvantes y adyuvantes ya sea preoperatorio, post operatorio (respectivamente) o ambos. Cabe aclarar que estos adyuvantes se escogen de acuerdo con el subtipo de cáncer de mama que se haya analizado previamente. Para los cánceres de mama metastásicos se ocupan adyuvantes o neoadyuvantes. Este cáncer no tiene cura (Waks & Winer, 2019).

Flavonoides

La búsqueda de nuevos compuestos con nulos o bajos efectos secundarios, ha provocado el reporte de varios fármacos de productos de origen vegetal entre los que se encuentran algunos flavonoides como la quercetina, quercetagetina y patuletina, estos también se incluyen en el subgrupo flavonoles. Los flavonoides se encuentran en diferentes concentraciones dentro de raíces, tallos, hojas, flores y frutos, son compuestos poli fenólicos con una estructura carbonaria C6-C3-C6 que contiene al menos dos anillos aromáticos conectados por una cadena de tres carbonos que forma un anillo heterocíclico que contiene un oxígeno (Maria *et al.*, 2022), esta forma le permite exhibir una gran diversidad estructural debido a sus diversos patrones de hidroxilación, metoxilación, glicosilación y acilación. Así mismo y dependiendo de la estructura, se ha visto que estos compuestos tienen actividad biológica sobre algunas líneas de células tumorales, actividad antiinflamatoria, anti mutagénica y antimicrobiana (Alvarado-Sansinenea *et al.*, 2018). De acuerdo con estos autores la quercetina, quercetagetina y patuletina (figura 6) exhiben una estructura diferente en el C6 que se ha visto que tiene actividad anticancerígena y los hace buenos candidatos contra el cáncer.

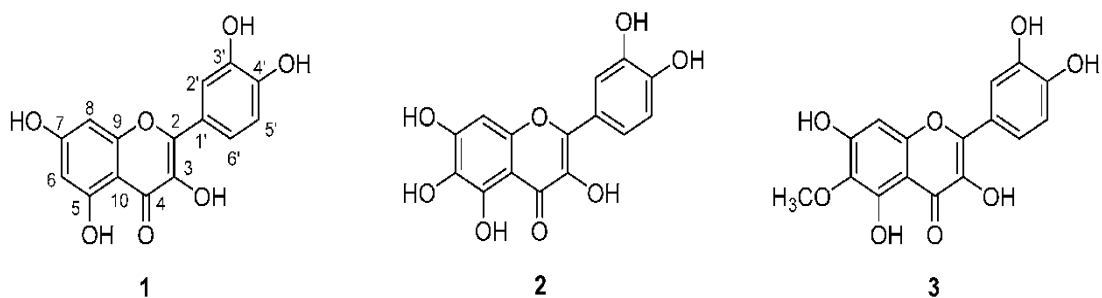


Figura 6. Estructura química de los compuestos flavonoides Quercetina (1), Quercetagetina (2) y Patuletina (3). Fuente: Tomado de Alvarado-Sansinenea, 2018.

Por lo general, los flavonoides se consumen en la dieta normal en forma de glicósidos, los cuales suelen estar con una o más moléculas de azúcar y éstas unidas a un grupo fenólico o a un grupo C-3 hidroxílico; los flavonoides suelen ser absorbidos en dos días. Posterior a la ingesta, los compuestos son metabolizados por enzimas en el intestino o en el hígado que promueven reacciones de conjugación con grupos metilo, sulfatos y ácidos glucurónicos.

Estos conjugados metabólicos son transportados al torrente sanguíneo o devueltos al sistema digestivo. Una vez absorbidos, los flavonoides pueden tener sus efectos sistémicos o locales en diferentes tipos de células y procesos biológicos. Cabe aclarar que la biodisponibilidad no es tan alta y poseen una actividad tóxica en el cuerpo en humano (Ponte *et al.*, 2021).

Antecedentes

Tang *et al.* (2020) han recopilado diversos estudios en los que han visto que la quercetina en determinadas dosis posee roles importantes en la promoción de la apoptosis, inhiben la metástasis, poseen la habilidad de controlar el ciclo celular y la angiogénesis tumoral. Lo anterior ha sido descrito en varias líneas celulares de cáncer en los que se encuentran: linfomas, cáncer de ovario, osteosarcoma, cáncer gástrico, leucemia crónica linfocítica, cáncer de próstata, osteosarcoma, melanoma, leucemia, cáncer de pulmón y de colon.

También se ha observado que quercetina afecta al ciclo celular en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-453 y MCF-7. Aunque en este artículo no se menciona la actividad apoptótica en estas últimas líneas celulares, se explica que la vía que la quercetina activa, en otras líneas de otros tipos de cáncer, para la apoptosis es la vía intrínseca (también conocida como mitocondrial) activando las caspasas -3, -8 y -9. Sin embargo, otro artículo (Ezzati *et al.*, 2020) y en específico en la línea celular MCF-7 se ha encontrado a diferentes dosis respuestas de inducción de la apoptosis, necroptosis (una forma de muerte celular necrótica pero controlada), actividad antitumoral, actividad anti proliferativa entre otros.

Algunos de estos efectos se vieron en conjunto con otros compuestos o derivados, también se describe los mecanismos por los cuales este compuesto actúa.

Referente a la quercetina y la patuletina los estudios son más escasos, en cuanto a la patuletina y en específico en el cáncer de mama, Wanwan *et al.* (2017) muestran que este compuesto inhibe la viabilidad celular en la línea celular SK-BR-3 e induce apoptosis (un 53.74% a una concentración de 26.58 g/ml). La actividad pro apoptótica de patuletina también ha sido evidenciada en diversas líneas celulares tumorales como MDA-MB-231 (mama), SK-Lu-1 (pulmón) y CaSki (cérvix) (Alvarado-Sansininea *et al.*, 2018). Estos

efectos antiproliferativos y proapoptóticos también fueron observados en los mismos tipos celulares tratados con quercetina. Adicionalmente, también se ha evidenciado que el tratamiento con quercetina, quercetina y patuletina induce una baja actividad necrótica y más aún, las células linfocíticas no se ven afectadas tras el tratamiento con estos compuestos. Este último dato muestra que algunos compuestos poseen una selectividad que favorece el encontrar una alternativa hacia nuevos tratamientos para el cáncer (Alvarado-Sansininea *et al.*, 2018).

Las evidencias del efecto de quercetina, quercetina y patuletina muestran que estos compuestos poseen actividad antiproliferativa en líneas celulares de tres tipos de cáncer, así mismo, las concentraciones requeridas para inducir un efecto antiproliferativo e incluso el apoptótico no alteran significativamente a las células no tumorales y no inducen necrosis. Sin embargo, es importante considerar que existe una importante variedad de tipos de cáncer, de los cuales uno que no ha sido tan estudiado ha sido el cáncer de mama, así mismo podemos responder cual de estos tres compuestos presenta una mejor actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica.

Planteamiento del problema

Los efectos secundarios de los compuestos que son utilizados para el tratamiento del cáncer se encuentran asociados a su actividad citotóxica, algunos de los cuales se relacionan con la necrosis. Lo anterior, genera la necesidad de encontrar alternativas que posean la capacidad de eliminar a las células tumorales por medio de una vía regulada que provoque reacciones secundarias menos agresivas durante el control de la patología. Lo anterior ha promovido el análisis de compuestos de origen natural, como los flavonoides patuletina, quercetina y quercetagetina. De acuerdo con Tang *et al.* 2020, la Quercetina es un compuesto ampliamente estudiado, sin embargo, los estudios sobre la línea celular de cáncer de mama son bajos, aunado a eso, los estudios sobre la patuletina, la quercetagetina sobre su potencial anticancerígeno en líneas celulares de cáncer de mama son escasos, por lo que existe un importante campo de investigación en estos compuestos.

Justificación

El cáncer de mama es de los que posee mayor incidencia en el mundo y uno de los más mortales según datos del 2020 (OMS) y pese a que en el tratamiento del cáncer, se aplican compuestos sintéticos y naturales que son eficientes cuando el cáncer es detectado tempranamente, en pacientes metastásicos y/o terminales son poco eficientes, generando la necesidad de buscar nuevos compuestos con actividad antiproliferativa, de baja actividad necrótica, inductores de muerte celular programada, anti metastásicos y de acción selectiva.

Hipótesis

Se han atribuido diversas actividades biológicas a los flavonoides incluyendo su capacidad antiproliferativa en células cancerosas, por lo que se esperaría que los flavonoides: Quercetina, Patuletina y Quercetagetina, presenten actividades antiproliferativa, proapoptótica y de baja actividad necrótica en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad anti proliferativa, necrótica y apoptótica de los compuestos quercetina, quercetagetina y patuletina en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

Objetivos particulares

- Determinar la actividad anti proliferativa de los compuestos quercetina, quercetagetina y patuletina en la línea celular tumoral MCF-7 con el fin de obtener la concentración requerida para disminuir la proliferación un 50% (IC₅₀).
- Evaluar el efecto necrótico de quercetina, quercetagetina y patuletina sobre la línea celular tumoral MCF-7.
- Determinar si los compuestos quercetina, quercetagetina y patuletina inducen cambios morfológicos relacionados a la apoptosis en células MCF-7.
- Identificar la presencia de apoptosis en células MCF-7 tratadas con quercetina, quercetagetina y patuletina, por medio de la inmunodetección de la caspasa-3 activa.

Material y métodos

Cultivo celular

7 000 células de la línea MCF-7 son sembradas en placas de 96 pozos, utilizando medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB). Estos cultivos se mantuvieron en una incubadora a 37° centígrados con 5.5% CO₂ y a una atmosfera húmeda.

Preparación de los compuestos

Los compuestos son proporcionados por el Dr. Jiménez Estrada del Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Química. Para el stock se tomaron 5 mg del compuesto sólido y se disolvieron en 100 µl de DMSO, posteriormente se tomaron la cantidad necesaria para realizar curvas dosis respuestas, así como las concentraciones de IC₅₀.

Cuantificación del número celular

Las células fueron cultivadas en cajas de 96 pozos con fondo plano durante 24 horas. Posteriormente se retiró el medio y se sustituyó por medio con las condiciones que a continuación se describen: Control, sólo se les cambió el medio de cultivo por medio fresco; Control del vehículo, células tratadas con la máxima cantidad de volumen del disolvente para el compuesto. Tratamientos, una curva con distintas concentraciones de los compuestos Patuletina, Quercetina y Quercetagetina. En todos los casos el volumen final de cada pozo fue de 100 µl. Transcurridas las 24 h de tratamiento, se evaluó el número celular utilizando la técnica de incorporación de cristal violeta de la siguiente forma: después de incubar a las células durante 24 horas con los diferentes estímulos, se retiró el medio de cultivo y se fijaron las células con glutaraldehído al 1.1% durante 20 min. Cumplido el tiempo se retiró el fijador y se enjuagaron con agua destilada dejando secar al aire, en seguida se adicionó el colorante

cristal violeta al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico, se incubó por 20 min más, se lavó el exceso de colorante exhaustivamente y se dejó secar al aire para después adicionar ácido acético al 10% por 20 min. Posteriormente se determinó la absorbancia de la solución de ácido acético a 590 nm por espectrofotometría en un lector de placas (*Chromate Manager*) (Modificado de Kueng *et al.*, 1989). Los datos obtenidos se analizan en hoja de cálculo de Excel calculando la IC₅₀.

Actividad de LDH en sobrenadantes de cultivos celulares

El efecto necrótico se determinó mediante la cuantificación de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH). Las células fueron tratadas con la IC₅₀ calculada para cada compuesto y tras 24 h de tratamiento, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 2,000 rpm/5 min. Posteriormente se colocaron 40 μ l del sobrenadante centrifugado con 40 μ l del reactivo LDH (que contiene al sustrato para la LDH) y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. La LDH oxida el lactato a piruvato, los protones movilizados reaccionan con la sal de tetrazolio 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio (INT) reduciéndola a formazán. El aumento en la cantidad de formazán producida en el sobrenadante del cultivo se correlaciona directamente con el aumento en el número de células lisadas. El colorante formazán es soluble en agua y puede ser detectado por espectrofotometría a 490 nm de absorbancia.

Identificación de apoptosis

Para determinar el efecto de los compuestos en la morfología de las células, éstas fueron cultivadas en placas de 96 pozos (7,000 cels/ pozo), en un volumen de 100 μ l de RPMI 1640 con 5 % de SFB. Tras 24 h de adhesión las células fueron tratadas con los compuestos a las concentraciones de IC₅₀ correspondientes durante 24 h. Las células se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 20 min a temperatura ambiente. Al término del tiempo fueron lavadas cuidadosamente 3 veces con PBS (pH 7.3), 3 min cada lavado. Las células fueron permeadas con una solución de Tritón X-100 al 0.2% en PBS durante 5 min a 4 °C, posteriormente se lavan nuevamente 3 veces con PBS, 3 min cada lavado. Posteriormente se incubó toda la noche con el anticuerpo primario anti-caspasa-3 activa desarrollado en conejo, en una dilución 1 en 400 en PBS y se mantiene en cámara húmeda. Al día siguiente se lavaron 3 veces con PBS, 3 min cada lavado, después se incubó el anticuerpo secundario acoplado a FITC en una dilución 1 en 200 en PBS durante dos horas cubierto de la luz y en cámara húmeda. Al finalizar se lavó nuevamente con PBS 3 veces por 3 minutos y finalmente, se incubó con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol-Cl₂) durante un minuto a temperatura ambiente e inmediatamente se lavó 3 veces con PBS, 3 min cada lavado. Las preparaciones se observaron a campo claro con iluminación de contraste de fases y por microscopia de epifluorescencia.

Análisis estadístico

La media y la desviación estándar se calcula utilizando Excel (Microsoft Office 365). El análisis de las diferencias estadísticas se lleva a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con una significancia de 0.05% seguido de una prueba de Tukey.

Resultados

Actividad antiproliferativa de los compuestos Quercetina, Quercetagetina y Patuletina en línea celular MCF-7

Se realizó una serie de curvas dosis respuesta para las células de la línea MCF-7 tratadas con los tres compuestos. Se obtuvo la concentración en la cual el número celular disminuía un 50% (IC50). Esta cuantificación se obtuvo mediante el ensayo de cristal violeta obteniendo el porcentaje de proliferación de acuerdo con las absorbancias registradas y cuyos resultados aparecen en la figura 7. Los resultados indican que existe una relación directa entre el incremento de la concentración de los compuestos y la disminución en el porcentaje de proliferación, permitiendo observar que los tres compuestos ejercen un efecto antiproliferativo sobre las células MCF-7.

De acuerdo con los resultados de las curvas dosis respuesta se encontró que la IC50 para quercetina es de 71.59 $\mu\text{g/ml}$; para Quercetagetina 14.53 $\mu\text{g/ml}$ y para Patuletina 94.17 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 1), siendo que para los tres compuestos la proliferación fue dependiente de la dosis, ya que la proliferación disminuía conforme se incrementaba la concentración del compuesto.

Tabla 1. Concentración requerida de los compuestos Quercetina, Quercetagetina y Patuletina para disminuir la proliferación un 50% (IC50) en la línea celular de cáncer de mama MCF-7

Compuestos	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	IC50 (mM)
Quercetina	71.59	236.97
Quercetagetina	14.53	45.66
Patuletina	94.17	283.44

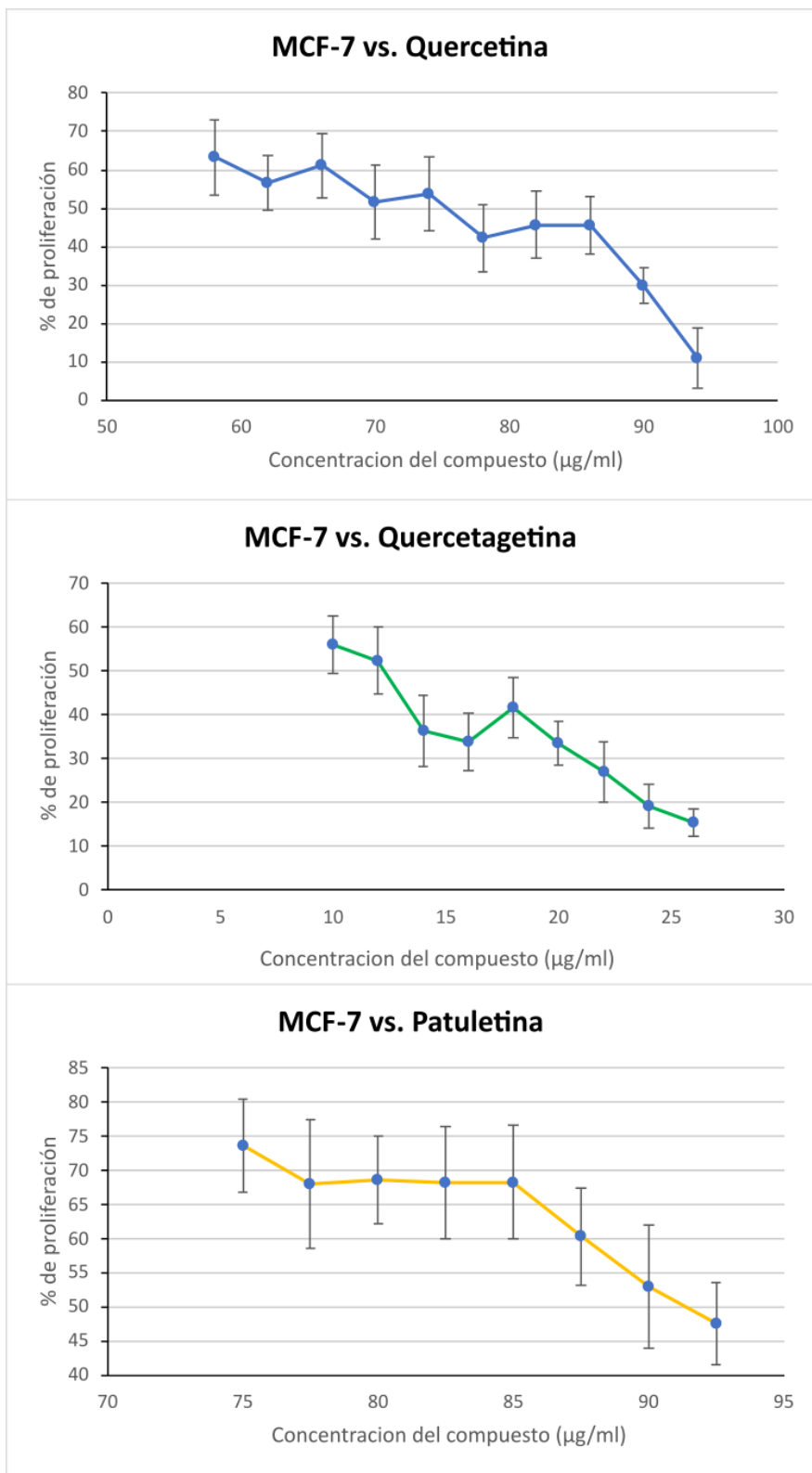


Figura 7. Efecto antiproliferativo de la Quercetina, Patuletina y Quercetagetina en cultivos celulares de la línea tumoral MCF-7. Para obtener el valor de la IC50 se realizó una regresión lineal de cada curva. Para este ensayo se realizaron tres repeticiones de cada curva.

Actividad necrótica de los compuestos Quercetina, Quercetagetina Y Patuletina en línea celular MCF-7

Con el fin de conocer la causa de la disminución de la proliferación se evaluó el efecto necrótico mediante el ensayo de LDH. Estas células fueron tratadas con la concentración de la IC50 obtenida para los tres compuestos. Se evaluaron los sobrenadantes (figura 8) conforme la técnica, midiendo las absorbancias del colorante de formazán para medir la actividad necrótica.

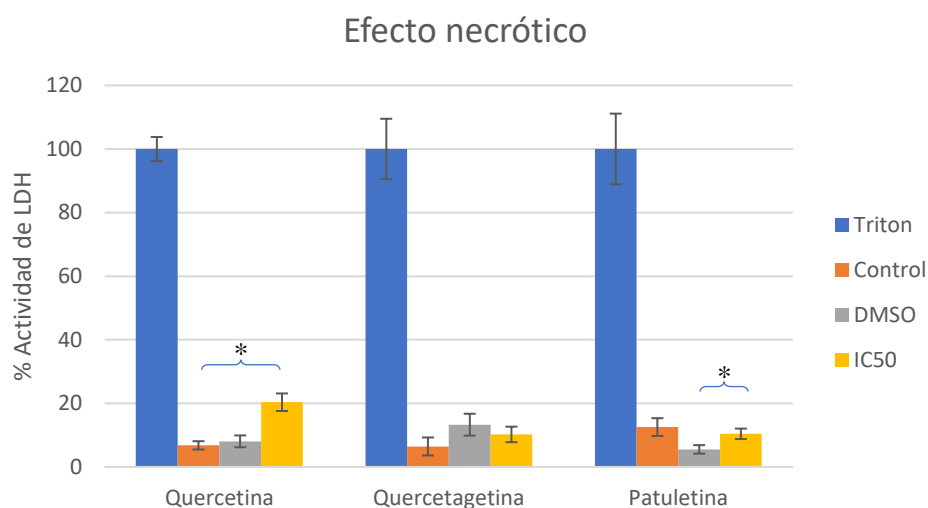


Figura 8. Actividad de la enzima LDH en sobrenadantes de los tratamientos con IC50 de los compuestos Quercetina, Quercetagetina y Patuletina en MCF-7. Para esta prueba se realizó una prueba estadística Tukey múltiple entre los grupos control y los tratados de tres ensayos independientes (Tabla A1).

De acuerdo con los resultados obtenidos (figura 8), la quercetagetina no demostró una diferencia significativa respecto a los controles, sin embargo, la quercetina si presentó una diferencia significativa respecto al control y al control positivo, en cambio la patuletina solo presento una diferencia significativa respecto al control con el vehículo.

Determinación de apoptosis en células MCF-7 tratadas con los compuestos Quercetina, Quercetagina y Patuletina

Se trataron las células con las IC50 obtenidas a partir de las curvas dosis respuesta con el fin de detectar la presencia del proceso de apoptosis, para lo que se identificaron los cambios morfológicos propios de una muerte apoptótica como la formación de cuerpos apoptóticos, condensación o fragmentación de la cromatina nuclear. Adicionalmente, se analizó la presencia de un marcador bioquímico de la apoptosis por medio de la inmunodetección de la caspasa-3 activa en los cultivos tratados con los flavonoides.

Las observaciones permitieron distinguir la morfología general de las células MCF7 y los cambios que sufren bajo el tratamiento de los flavonoides. Las células control y las tratadas con el vehículo utilizado para disolver el compuesto (DMSO) se observan con una morfología extendida y formando colonias (Figuras 10, 11 y 12). En el control positivo para apoptosis (colchicina, véase figura 9) modifican su morfología con el tratamiento, ya que se vuelven redondas y las colonias se ven disminuidas con respecto al control. Tras el tratamiento con los compuestos, se observan cambios poco notorios en la morfología de las células en comparación con el grupo control positivo siendo estas una la poca pérdida de las proyecciones plasmáticas que le otorgan a las células su forma poligonal y un poco aparente presencia de cuerpos apoptóticos. (Figuras 9,10,11, 12 y 13).

La tinción con DAPI permitió distinguir la morfología del núcleo, ya que es una molécula que se une al ADN. En las células control y las tratadas con DMSO (vehículo) se observa una distribución homogénea del ADN, por otro lado, en las células tratadas con colchicina la tinción se observa más brillante en ciertas zonas nucleares lo que hace referencia a una compactación de la cromatina y por lo tanto del núcleo. Así mismo, se puede apreciar

que algunas células evidencian fragmentación nuclear. En las células tratadas con Quercetina, Quercetagina o Patuletina (Figura 13), se identificó que tras los estímulos los núcleos de las células cambian su morfología y se muestran compactos.

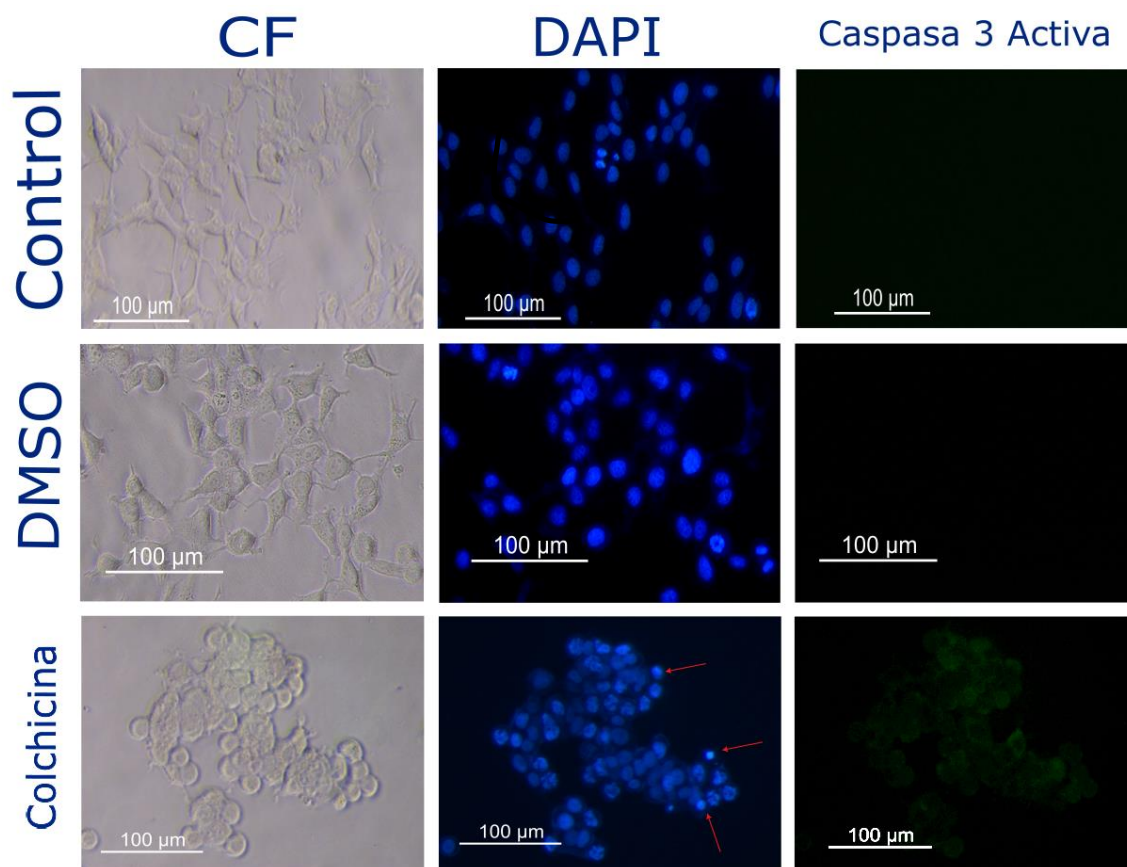


Figura 9. Identificación de apoptosis. Las imágenes del contraste de fases (CF) permite identificar la morfología general de las células. Las células del control y DMSO se observan extendidas sobre el plato de cultivo. El tratamiento correspondiente al control positivo para apoptosis (colchicina). El tratamiento con colchicina evidencia compactación de la cromatina e incluso algunos cuerpos apoptóticos (flechas en rojo). La inmunodetección para la proteína caspasa-3 activa sólo estuvo presente en el control positivo para apoptosis (colchicina). Se realizaron tres repeticiones independientes de este ensayo.

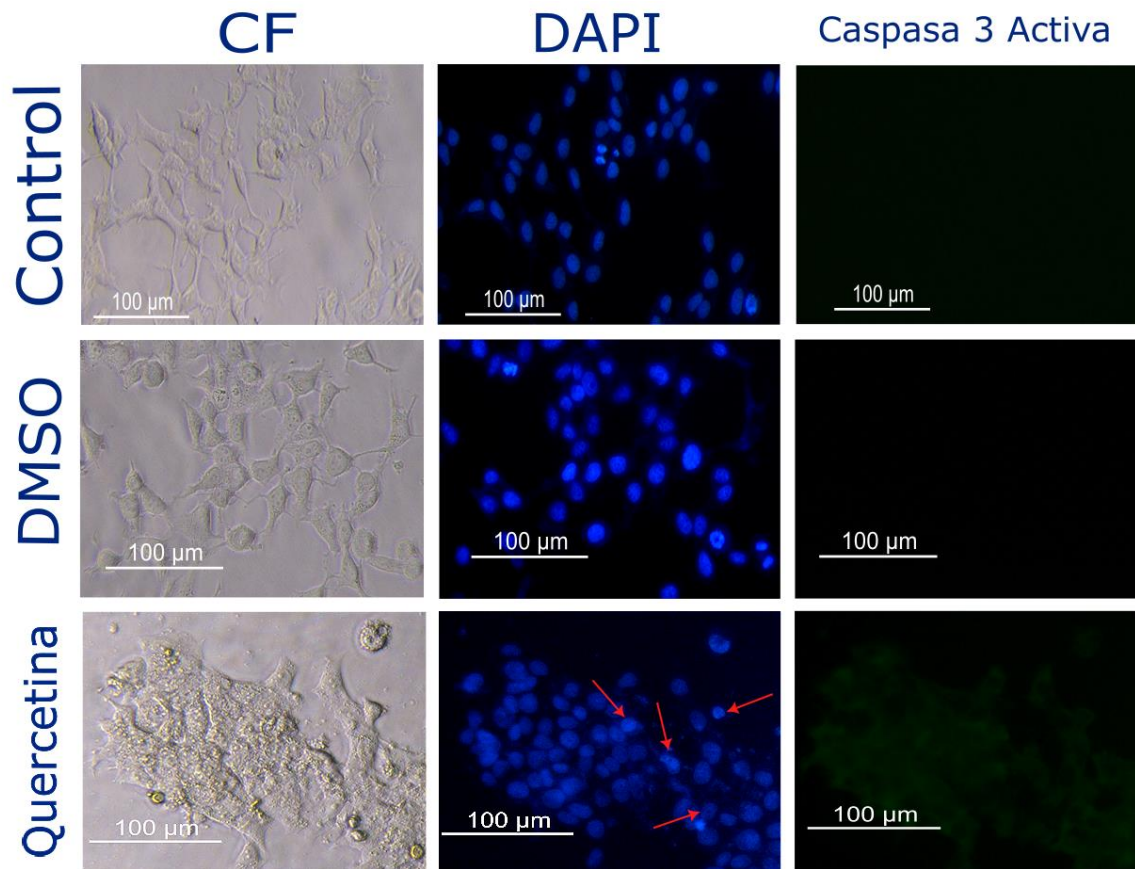


Figura 10. Detección de apoptosis en células MCF-7 tratadas con Quercetina. La iluminación con contraste de fases permite identificar la diferencia entre el control y vehículo (DMSO) con el tratamiento con la Quercetina. El tratamiento con Quercetina induce la activación de la caspasa-3 activa como muestra la presencia de fluorescencia verde en las células, así como la formación de cuerpos apoptóticos (flechas rojas en DAPI). Se realizaron tres repeticiones independientes de este ensayo.

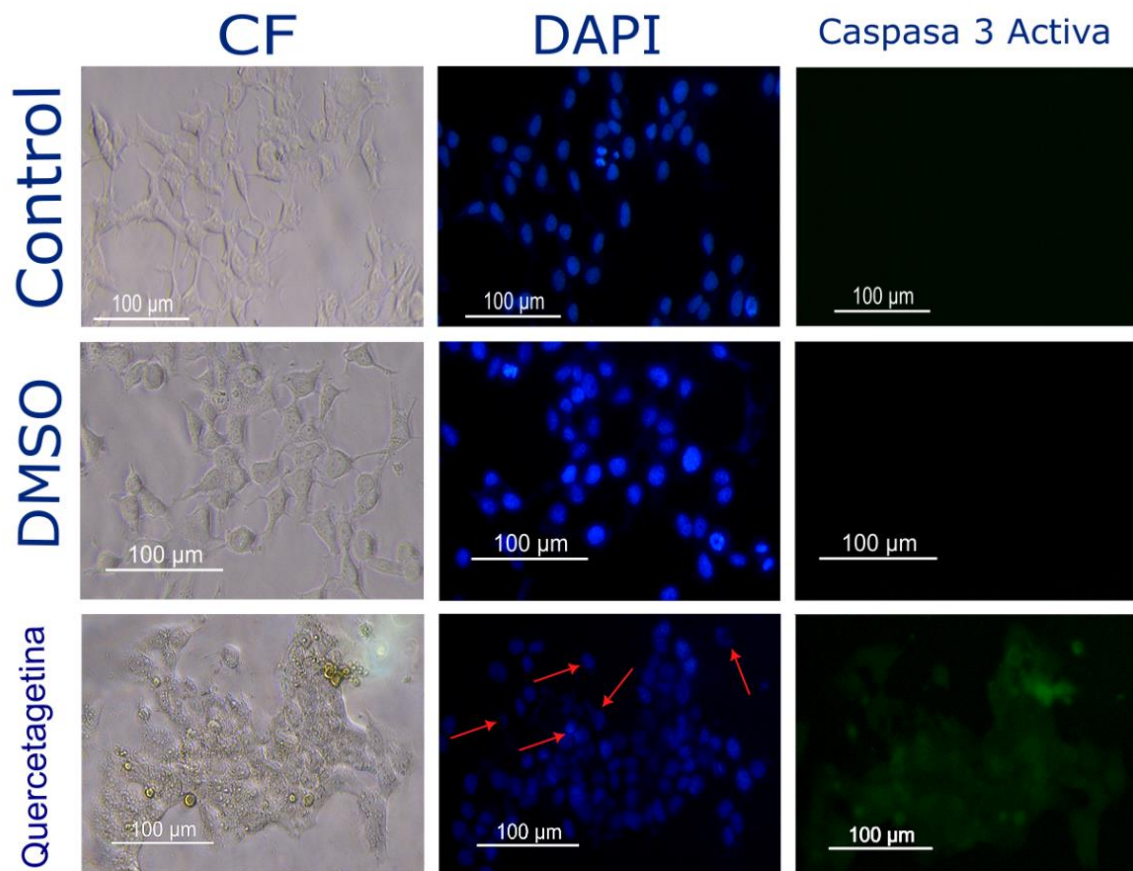


Figura 11. Identificación de apoptosis en células MCF-7 tratadas con Quercetagetina. Tras el tratamiento con el compuesto, las células sufren una compactación citoplasmática y nuclear (flechas en DAPI). La detección de la presencia de la caspasa-3 activa evidencia la presencia de apoptosis. Se realizaron tres repeticiones independientes de este ensayo.

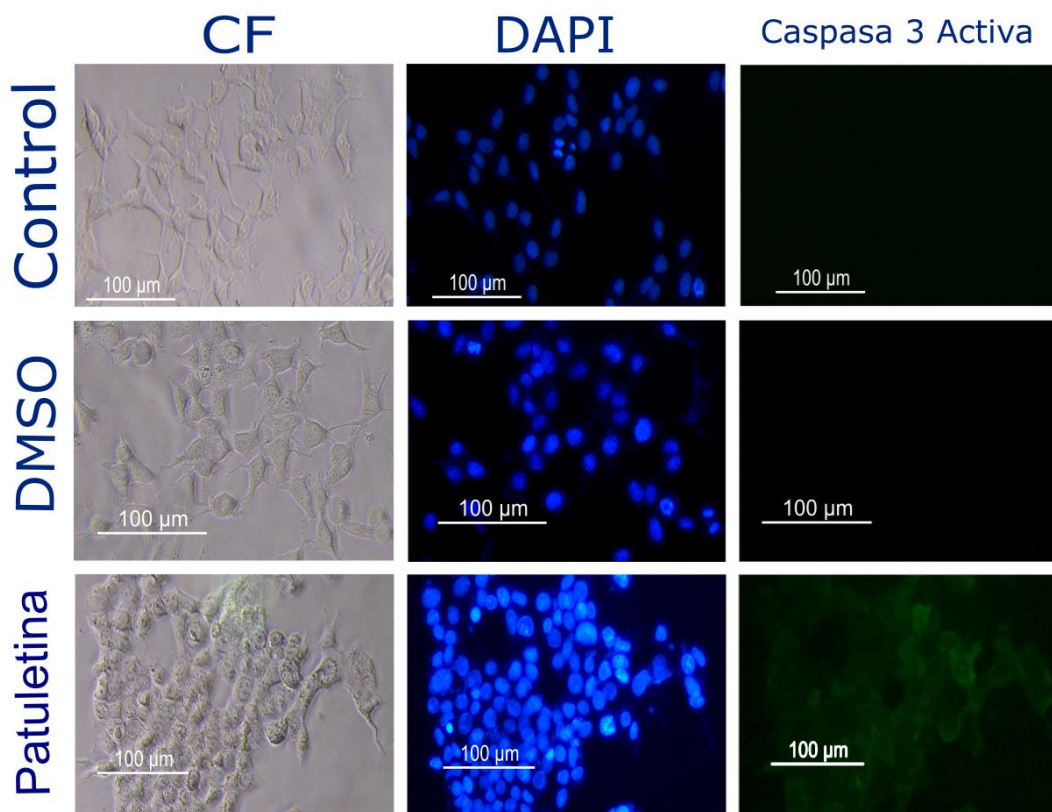


Figura 12. Presencia de apoptosis en células MCF-7 tratadas con Patuletina. Las imágenes del contraste de fases muestran la morfología general de las células, que tras el tratamiento sufren una compactación citoplasmática y nuclear (flechas en DAPI). La detección de la presencia de la caspasa-3 activa muestra una marca positiva en las células tras ser tratadas con Patuletina

Los resultados obtenidos evidencian que los compuestos Quercetina, Quercetagina y Patuletina tienen la capacidad de inducir cambios morfológicos como la compactación nuclear (figura 13), característica propia de la apoptosis. Adicionalmente, se mostró que el tratamiento con los tres compuestos induce a una activación de la caspasa-3 (figuras 9, 10, 11 y 12). Todo esto en su conjunto, demuestra que Quercetina, Quercetagina y Patuletina inducen una eliminación celular tipo apoptótica en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, sin embargo, se podría reforzar este resultado con alguna prueba cuantitativa.

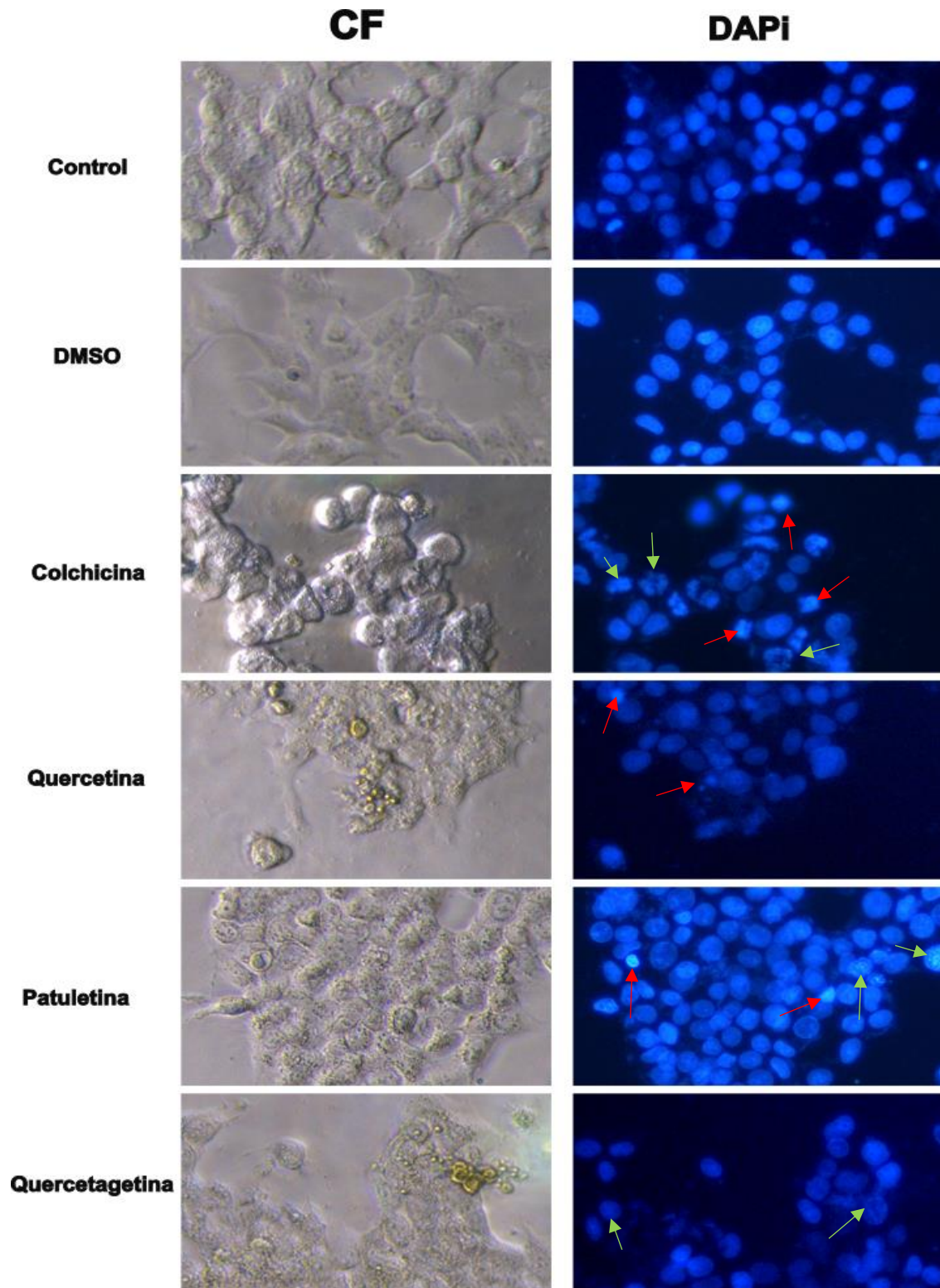


Figura 13. Acercamiento a los cambios morfológicos en los compuestos tratados. Nótese espacios amarillentos abultados en el citoplasma de las células. Las flechas rojas indican una compactación nuclear, las flechas verdes representan una fragmentación nuclear

Discusión

El cáncer es un problema de salud pública que tiene un importante impacto sobre la población a nivel mundial (OMS, 2020).

Dentro de los diferentes tipos de cáncer, uno de mayor impacto es el cáncer de mama, ya que representa el 11.7% de incidencia a nivel mundial y genera un 6.9% de muerte al mismo nivel (OMS, 2020), sin embargo, y como recordaremos, en México al contar con niveles altos de obesidad, sobrepeso, baja actividad física y sumándole la poca información que se comparte sobre este cáncer (Reynoso-Noverón *et al.*, 2017) ha hecho que en este país el cáncer de mama represente un 15.39% de los casos de cáncer, así como un 8.8% de los casos de mortalidad (OMS, 2020) provocando que este tipo de cáncer ocupe el primer lugar en incidencia y mortalidad.

En México, los tratamientos que se ocupan no difieren de los usados en otros países más desarrollados, como la cirugía, terapia endocrina, radioterapia y quimioterapéutica citotóxica (Reynoso-Noverón *et al.*, 2017). Como bien se sabe, estos tratamientos tienen efectos secundarios que afectan la calidad de vida de la persona enferma, por lo que existe un importante interés en la búsqueda de nuevas alternativas que permitan combatir el cáncer, esto implica encontrar aquellas que posean menores riesgos para los pacientes. Este campo de investigación se ha visto en aumento, por lo que se ha recurrido a las plantas medicinales, trayendo consigo un importante abanico de posibilidades. En este punto, las plantas del género *Tagetes*, una planta nativa de América y naturalizada en otros países de Europa, Asia, y África (Salehi *et al.*, 2018); de la cual se extrajeron dos de los compuestos estudiados en esta tesis que son la Patuletina y la Quercetagetina, han demostrado varias actividades biológicas de interés, como antifúngica, antimicrobiana y anticancerígena. Sin embargo, la

Quercetagetina ha sido muy poco estudiada a diferencia de la Patuletina y Quercetina. (Salehi *et al*, 2018).

En el presente estudio, las células de cáncer de mama MCF-7 tratadas con los compuestos Quercetina, Quercetagetina y Patuletina, pertenecientes al grupo de los flavonoides, mostraron una disminución en su número celular. Esta disminución mostró un comportamiento dosis dependiente, ya que la población celular se vio reducida de acuerdo con el incremento de la concentración de los compuestos. Los resultados de las concentraciones requeridas para disminuir la población un 50% mostraron que la Quercetagetina (IC₅₀= 14.53 µg/ml) presentó una mejor actividad en comparación con la Quercetina (IC₅₀= 71.59 µg/ml) y la Patuletina (IC₅₀= 94.17 µg/ml). Lo anterior muestra una mayor capacidad inhibitoria de la Quercetagetina sobre los otros dos compuestos evaluados, ya que se requieren entre 5 y 6.5 veces respectivamente menos del compuesto para obtener la misma respuesta. Estructuralmente la Quercetagetina se diferencia por tener un grupo hidroxilo más que la Quercetina y este mismo grupo difiere del grupo ácido carboxílico en la Patuletina, lo cual puede sugerir que la modificación del grupo hidroxilo en Quercetagetina le brinda ventajas que mejoran su eficiencia. Sabiendo esto, Ponte *et al.*, 2021, resume que la Quercetina tiene distintos mecanismos de acción que incluyen la disminución de factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular, la regulación a la baja de NF-κB y MAPK. Por otro lado, cabe resaltar que los mecanismos de acción del flavonoide Quercetina, perteneciente a un subgrupo conocido como flavonoles, actúa dependiendo de la línea celular, por ejemplo, en la línea celular de cáncer de cuello uterino HeLa, la Quercetina disminuye p-IκB-α, p-IKK-β y ciclina D. Por otro lado, en la

línea celular de cáncer de pulmón A549, regula a la baja TLR-4 y también disminuye la secreción de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10 (Ponte *et al.*, 2021).

También se ha evaluado el efecto de otros compuestos flavonoles, como la Myricetina sobre la línea celular MCF-7, encontrándose que este compuesto regula a PAK1, que es un regulador de la proteína AKT; esto mediante la unión directa con esta quinasa impidiendo así la activación de AKT (Felice *et al.*, 2022), sin embargo y de manera específica, no se ha investigado a fondo los mecanismos que tienen la Quercetagina y la Patuletina por lo que este trabajo plantea a futuro poder realizar ensayos que incluyan el análisis de la expresión de proteínas involucradas no sólo en la muerte celular, sino en la progresión del ciclo celular.

Uno de los objetivos al buscar alternativas a los quimioterapéuticos tóxicos, es encontrar compuestos que no provoquen reacciones adversas, puesto que los compuestos usados actualmente pueden, por su misma toxicidad (efecto necrótico), generar una respuesta inflamatoria que se ha visto pueden contribuir con el crecimiento y propagación del tumor (Proskuryakov & Gabai, 2010) e incluso la muerte de células no tumorales, por lo que se realizó un ensayo para poder descartar que los compuestos utilizados en esta investigación no tenga una alta actividad citotóxica.

Usando las concentraciones de las IC50s obtenidas a partir de una regresión lineal, se realizó el ensayo de la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática LDH presente en los sobrenadantes de los cultivos celulares tratados con los compuestos.

Recordemos que la LDH es una enzima presente únicamente en el citoplasma de la célula y al haber una ruptura en la membrana celular esta es liberada al microambiente, esta ruptura membranal es una característica de la muerte celular necrótica permitiéndonos medir

la actividad de esta en un cultivo celular (D'arcy, 2019). Los resultados obtenidos en el presente trabajo evidenciaron que la disminución celular generada por los compuestos utilizados no está completamente relacionada con la actividad necrótica, ya que la cuantificación de la presencia de la enzima LDH mostró que sólo la Quercetina presentó un porcentaje de 20.34 (± 2.76), difiriendo de las condiciones control y vehículo en 14%, mientras que en las células tratadas con Quercetagetina el porcentaje fue de un 10.22% (± 2.43) y Patuletina un 10.40% (± 1.64), porcentajes que no fueron significativamente diferentes de los valores presentados por las células no tratadas. Estos datos permiten evidenciar que la necrosis no es la vía principal por la cual los compuestos Quercetina, Quercetagetina y Patuletina están ejerciendo su actividad antiproliferativa sobre las células MCF-7. Frente a estos resultados, se procedió a analizar el efecto de los compuestos sobre la morfología de las células para poder relacionarlas con otro proceso de eliminación celular.

Los datos obtenidos mostraron que tras el tratamiento con quercetagetina, las células MCF-7 sufren cambios morfológicos correspondientes a la apoptosis. La apoptosis es una muerte celular controlada producto de señales externas o internas. En un cultivo in vitro, la principal característica de las células apoptóticas es precisamente los cuerpos apoptóticos, siendo estos fagocitados por células del sistema inmune en un organismo vivo (D'Arcy, 2019). Las observaciones a nivel de microscopía óptica durante el presente trabajo evidenciaron una ligera pérdida en las proyecciones celulares de las células tratadas con los compuestos, evidenciando contracción citoplasmática. Una característica de la apoptosis recae en la fragmentación nuclear o en la condensación nuclear de las células, para poder observar esto se realizó una tinción con DAPI a las células. El DAPI es un colorante que se une a las regiones de timina y adenina del ADN lo que lo hace un colorante muy utilizado en

la microscopía de fluorescencia (Lifeder, 2019). Los resultados mostrados en el presente trabajo con respecto a la tinción con DAPI, evidenciaron que la intensidad de fluorescencia es mayor cuando el núcleo es más compacto y, por el contrario, al no estar compacto la distribución de este color se ve homogénea en el núcleo como se puede observar en los controles negativos. Para el control positivo (colchicina) se aprecia en gran cantidad de células una condensación nuclear viéndose un azul intenso, así mismo en otras células se puede notar la fragmentación nuclear, viéndose como puntos brillantes. En las células tratadas con los compuestos se identificaron las mismas características que en el control positivo para apoptosis (colchicina). Lo anterior, aunado a la detección de la caspasa-3 activa, permitieron definir que los compuestos inducen apoptosis. La caspasa-3 tiene un papel importante en el proceso de la apoptosis, ya que independientemente de la vía de activación de la apoptosis, la ejecución del proceso es conducido por las caspasas ejecutoras como la caspasa-3 (D'Arcy, 2019).

Una observación interesante a nivel de microscopía óptica y la iluminación con contraste de fases, fue la presencia de algunos espacios en los citoplasmas de las células tratadas aparentemente formando circunferencias con un color amarillento diferente al de las células control (se pueden apreciar en los contrastes de fases en los compuestos). Estos espacios sugieren vacuolas que adicionalmente poseen un tono de color amarillento, siendo que estas características no pertenecen a los tipos de muerte aquí analizados (apoptosis y necrosis). Cabe resaltar que éstas no aparecen en las células tratadas con colchicina. Lo anterior, abre la posibilidad de un análisis más profundo del efecto de estos flavonoides sobre las células MCF-7 que pueden derivar en un tipo de muerte diferente a la muerte celular necrótica u apoptótica.

El objetivo de esta investigación fue evaluar los efectos antiproliferativo, necrótico y apoptótico de los compuestos Quercetina, Quercetagetina y Patuletina en la línea celular de cáncer MCF-7, de acuerdo con los resultados aquí mostrados podemos decir que la actividad de los compuestos posee un efecto antiproliferativo en las células MCF-7 y de los tres compuestos evaluados, el más eficiente es la Quercetagetina. La actividad necrótica es muy baja siendo que esta es muy similar a los controles por lo que se considera que no induce muerte necrótica. Finalmente, se puede sugerir que los tres compuestos poseen una actividad apoptótica.

Conclusiones

- Los compuestos Quercetina, Quercetagetina y Patuletina disminuyen el número celular de manera dosis dependiente en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.
- El flavonoide Quercetagetina disminuye de manera más eficiente el número celular de la línea MCF-7.
- Los compuestos Quercetina, Quercetagetina y Patuletina no inducen una muerte por necrosis en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.
- Los compuestos Quercetina, Quercetagetina y Patuletina inducen cambios morfológicos correspondientes a la muerte apoptótica.
- Los compuestos Quercetina, Quercetagetina y Patuletina inducen la activación de la caspasa 3.

Bibliografía

- Alvarado-Sansininea, J., Sánchez-Sánchez, L., López-Muñoz, H., Escobar, M., Flores-Guzmán, F., Tavera-Hernández, R., & Jiménez-Estrada, M. (2018). Quercetagenin and Patuletin: Antiproliferative, Necrotic and Apoptotic Activity in Tumor Cell Lines. *Molecules*, 23(10), 2579. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23102579>
- Carlberg, C., & Velleuer, E. (2021). *Cancer Biology: How Science Works* (1st ed. 2021.). Springer International Publishing.
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis, and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Ezzati, Maryam; Yousefi, Bahman; Velaei, Kobra; Safa, Amin (2020). A review on anti-cancer properties of Quercetin in breast cancer. *Life Sciences*, (), 117463–. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117463
- Felice, M. R., Maugeri, A., De Sarro, G., Navarra, M., & Barreca, D. (2022). Molecular Pathways Involved in the Anti-Cancer Activity of Flavonols: A Focus on Myricetin and Kaempferol. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4411. <https://doi.org/10.3390/ijms23084411>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., & Blagosklonny, M. V. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature

Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486–541.

<https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>

- Gao, S., & Liu, F. (2019). *Novel insights into cell cycle regulation of cell fate determination. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 20(6), 467–475. doi:10.1631/jzus. b1900197
- Guicciardi, M. E., Malhi, H., Mott, J. L., & Gores, G. J. (2013). Apoptosis and Necrosis in the Liver. *Comprehensive Physiology*, 977–1010. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120020>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, Robert A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanahan D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Reynoso-Noverón, N., Villarreal-Garza, C., Soto-Perez-de-Celis, E., Arce-Salinas, C., Matus-Santos, J., Ramírez-Ugalde, M. T., ... & Mohar, A. (2017). Clinical and Epidemiological Profile of Breast Cancer in Mexico: Results of the Seguro Popular. *Journal of Global Oncology*, 3(6), 757-764.
- Do Socorro, M., Behrens MD, Moragas-Tellis CJ, Penedo GXM, Silva AR, Goncalvez-de-Albuquerque CF. (2022). Flavonols and Flavones as Potential Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antibacterial Compounds. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 1–21. <https://doi.org/10.1155/2022/9966750>
- OMS. (2021). Cáncer de mama. Who.int; World Health Organization: WHO. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>

- OMS. (2022). *Cáncer*. Who.int; World Health Organization: WHO.
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Ponte, L. G. S., Pavan, I. C. B., Mancini, M. C. S., da Silva, L. G. S., Morelli, A. P., Severino, M. B., Bezerra, R. M. N., & Simabuco, F. M. (2021). The Hallmarks of Flavonoids in Cancer. *Molecules*, 26(7), 2029.
<https://doi.org/10.3390/molecules26072029>
- Roberts, J. Z., Crawford, N., & Longley, D. B. (2022). The role of Ubiquitination in Apoptosis and Necroptosis. *Cell death and differentiation*, 29(2), 272–284.
<https://doi.org/10.1038/s41418-021-00922-9>
- Salehi, B., Valussi, M., Morais-Braga, M., Carneiro, J., Leal, A., Coutinho, H., Vitalini, S., *et al.* (2018). Tagetes spp. Essential Oils and Other Extracts: Chemical Characterization and Biological Activity. *Molecules*, 23(11), 2847. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23112847>
- Senga, S. S., & Grose, R. P. (2021). Hallmarks of cancer-the New Testament. *Open Biology*, 11(1), 200358. <https://doi.org/10.1098/rsob.200358>
- Strasser, A., & Vaux, D. L. (2020). Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer. *Molecular Cell*, 78(6), 1045–1054.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.014>
- Sun, Y., Liu, Y., Ma, X., & Hu, H. (2021). The Influence of Cell Cycle Regulation on Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6923. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22136923>.

- "Suski, J. M., Braun, M., Strmiska, V., & Sicinski, P. (2021)." ("Sci-Hub | Targeting cell-cycle machinery in cancer. *Cancer Cell*, 39(6 ...") Targeting cell-cycle machinery in cancer. *Cancer Cell*, 39(6), 759–778. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.03.010>
- Tang, S.-M., Deng, X.-T., Zhou, J., Li, Q.-P., Ge, X.-X., & Miao, L. (2020). Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 121, 109604. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109604>
- Vincent T De Vita Jr. (2020). *Cáncer, Principios y práctica de oncología 10 edición*, Tomo 1 y 2. (2017). <https://ebooks.amolca.com/reader/cancera-1614018573?location=44>
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment. *JAMA*, 321(3), 288. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
- Zhu, W., Lv, C., Wang, J., Gao, Q., Zhu, H., & Wen, H. (2017). Patuletin induces apoptosis of human breast cancer SK-BR-3 cell line via inhibiting fatty acid synthase gene expression and activity. *Oncology letters*, 14(6), 7449–7454. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7150>

Anexo

Tabla A1- Prueba de Tukey comparando las diferencias significativas de los compuestos con los controles negativos, con relación al porcentaje de muerte celular necrótico medido por la absorbancia de la LDH.

		95.00% CI de la dif.	¿Debajo del umbral?	Valor de P ajustado
Quercetagetina	control vs. ic50	-0.05276 to 0.03209	No	0.9028
	dms0 vs. ic50	-0.03409 to 0.05076	No	0.9455
Quercetina	control vs. 74	-0.1062 to -0.05175	Yes	<0.0001
	dms0 vs. 74	-0.1000 to -0.04317	Yes	<0.0001
Patuletina	control vs. 94	-0.008435 to 0.03343	No	0.3553
	dms0 vs. 94	-0.04977 to -0.007899	Yes	0.0056