



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Capacidad proapoptótica *in vitro* de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata* en células cancerígenas.

Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, previa a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

El trabajo de titulación forma parte de los proyectos de investigación: “Caracterización morfológica molecular fitoquímica y métodos de propagación en especies silvestres del género valeriana de la provincia de Tungurahua” aprobado con la resolución: 1569-CU-P-2017, dirigido por el PhD. Homero Vargas y “Estudio etnobotánico y bioensayos de plantas medicinales relacionadas con el tratamiento de cáncer de cérvix en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua, Ecuador, aprobado con resolución: 0904-CU-P-2018, dirigido por la PhD. Yenddy Carrero Castillo

Autor: Jeniffer Andrea Williams Ibarra.

Tutor: Carrero Castillo, Yenddy Nayghit, PhD.

Ambato – Ecuador

Enero - 2021

APROBACIÓN DEL TUTOR

Carrero Castillo, Yenddy Nayghit, PhD.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 17 de agosto de 2020.

Carrero Castillo, Yenddy Nayghit, PhD.

C.I.1757404577

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Jeniffer Andrea Williams Ibarra, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.

Jeniffer A. Williams

Jeniffer Andrea Williams Ibarra

C.I. 1350834493

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman

.....

Presidente del tribunal

.....

Lic. M Sc. Danae Fernández Rivero

C.I: 1757181209

.....

Ing. Mario Daniel García Solís, PhD.

C.I: 1103605471

Ambato, 31 de agosto del 2020

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este trabajo de titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi trabajo de titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de éste, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reducción no suponga ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

Jeniffer A. Williams

Jeniffer Andrea Williams Ibarra

C.I. 1350834493

AUTORA

DEDICATORIA

Pon en manos del señor todas tus obras y tus proyectos se cumplirán.

Proverbio 16:3

Dedicada a mis queridos padres Juan Williams y Antonia Ibarra por su inmenso amor, trabajo y sacrificio. Me enseñaron que con esfuerzo y responsabilidad todo es posible.

A mis hermanos Damián, Génesis y Antonella por su amor, compañía y apoyo incondicional.

A mis abuelitos y familia gracias por el cariño.

Con Amor

J.W

AGRADECIMIENTOS

Para alcanzar esta meta existieron muchas personas que marcaron una diferencia en mi vida, deseo expresar mi más profundo agradecimiento:

A Dios por guiar mi vida, por darme la oportunidad de ser profesional y brindarme fortaleza, sabiduría y amor incondicional.

A mis queridos padres Antonia Ibarra y Juan Williams por ser el pilar fundamental, por ser incondicionales, por brindarme todo su amor, Uds. han sido luz en los momentos más difíciles y me han enseñado los valores que hoy definen mi vida, todos mis logros son suyos. Gracias a Uds. soy la mujer que soy, los amo con todo mi corazón.

A mi hermano Damián por ser mi compañero y amigo incondicional en esta etapa universitaria, gracias por ser un ejemplo para mí y por cuidarme. A mis hermanas Génesis y Antonella por alegrar mi vida, por su cariño y por estar pendientes de mí. Siempre estaré agradecida por todo su amor.

A mis queridos abuelitos gracias por todo el cariño y sus bendiciones. De manera especial a mi abuelita Jacinta Vélez por estar siempre conmigo.

A toda mi familia gracias por todo su apoyo y consejos.

A la Dra. Yenddy Carrero gracias por ser una excelente tutora, por brindarme sus conocimientos, consejos, por compartir sus experiencias y enseñanzas.

Al Doctor Homero Vargas gracias por incluirme en su proyecto de investigación, por ser un docente amigo y por estar siempre pendiente brindándome su apoyo.

Debo agradecer a las personas con las que compartí esta etapa de mi vida y me apoyaron en todo. Mi querido amigo Jhonny gracias por tu amistad y por compartir muchos momentos en tanto tiempo, pero sobre todo por estar en las buenas y en las malas junto a mí. A mis amigas Ary, Lili, Eri, Ale, Lulú y Ruth gracias por todos los momentos compartidos y las experiencias maravillosas. A mi querida amiga Catalina⁺ por ser un ejemplo de vida.

A todas las personas que conocí a lo largo de mi vida universitaria que me brindaron su cariño y con los que compartí gratos momentos.

Finalmente, agradezco a todos los docentes que me enseñaron y compartieron conmigo sus conocimientos, principios y amistad.

J.W

INDICE GENERAL DE CONTENIDO

CONTENIDOS

PORTADA...	i
APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
INDICE GENERAL DE CONTENIDO.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes Investigativos	1
1.1.1 El Cáncer.....	1
1.1.2 Epidemiología del cáncer.....	1
1.1.3 Cáncer de mama	2
1.1.4 Proceso de Carcinogénesis.....	4
1.1.5 Etapas de la carcinogénesis	5
1.1.6 Respuesta Inmunitaria.....	6
1.1.7 Principales muertes celulares	7
1.1.8 Apoptosis	8
1.1.9 Mecanismos moleculares de la Apoptosis	9
1.1.10 Principales tratamientos contra el cáncer.....	11
1.1.11 Medicina tradicional y agentes quimioterapéuticos	13
1.1.12 Valeriana	17
1.2 OBJETIVOS	22
1.2.1 OBJETIVO GENERAL	22

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
1.3 HIPÓTESIS	23
1.3.1 Actividad proapoptótica <i>in vitro</i> de <i>Valeriana rígida</i> y <i>Valeriana decussata</i> en células cancerígenas.	23
1.4 Señalización de las variables de la hipótesis.....	23
1.4.1 Variables dependientes.....	23
1.4.2 Variables independientes.....	23
CAPITULO II.....	24
METODOLOGÍA.....	24
2.1 Materiales.....	24
2.2 Métodos.....	28
2.2.1 Tipo de Investigación.....	28
2.2.2 Financiamiento.....	28
2.2.3 Método de secado del material vegetal	29
2.2.4 Método analítico para determinar la cuantificación de sólidos.	29
2.2.5 Preparación del extracto acuoso para el cultivo celular	30
2.2.7 Descongelación de las células MCF-7	31
2.2.8 Pases Celulares.....	31
2.2.9 Conteo Celular	32
2.2.10 Ensayo MTT	33
2.2.12 Inmunohistoquímica.....	33
2.2.13 Real Time (Expresión génica)	34
2.2.14 Diseño experimental.....	36
CAPÍTULO III	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
3.1 Análisis y discusión de resultados	37
3.1.1. Análisis fisicoquímico	37
3.1.2. Actividad citotóxica	38
3.1.2.1 Expresión de p53 en células mcf-7 con extractos de <i>Valeriana rígida</i> y <i>Valeriana decussata</i>	43
3.1.2.2 Expresión de la proteína Bcl-2 y Bax en células MCF-7 con extractos de <i>Valeriana rígida</i> y <i>Valeriana decussata</i>	46
3.1.2.4 Expresión de la proteína Bcl-2 y Bax en células MCF-7 con extractos de <i>Valeriana rígida</i> y <i>Valeriana decussata</i>	49
3.1.3 Expresión génica	51

3.2 Verificación de hipótesis	54
CAPÍTULO IV	55
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	56
ANEXOS.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción taxonómica de <i>Valeriana decussata</i> y <i>Valeriana rígida</i>	22
Tabla 2. Materiales, equipos y reactivos utilizados para el secado, pulverización y determinación de sólidos totales.	24
Tabla 3. Descripción taxonómica de <i>Valeriana decussata</i> y <i>Valeriana rígida</i>	24
Tabla 4. Materiales, equipos y reactivos utilizados para el cultivo celular.....	25
Tabla 5. Materiales, equipos y reactivos utilizados para la cuantificación de proteínas	25
Tabla 6. Materiales, equipos y reactivos utilizados para los ensayos de citotoxicidad	26
Tabla 7. Materiales, equipos y reactivos utilizados para inmunohistoquímica	26
Tabla 8. Materiales, equipos y reactivos utilizados para la extracción de ARN	27
Tabla 9. Materiales, equipos y reactivos utilizados para la síntesis de ADN complementario	27
Tabla 10. Materiales, equipos y reactivos utilizados para la RT-PCR	28
Tabla 11. Secuencia de primers utilizados.	34
Tabla.12 Concentración de sólidos totales extraídos de los diferentes extractos.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1 La apoptosis es llevada a cabo por dos vías centrales.....	11
Fig.2 Agentes quimioterapéuticos contra diferentes tipos de cáncer aislados de fuentes vegetales.	15
Fig.3 “Estructura química del Valtrato perteneciente a los valepotriatos”	18
Fig.4 Fotografía Vargas, H. (2019) Hojas de <i>Valeriana rígida</i>	21
Fig.5 Fotografía Vargas, H. (2019) Hojas de <i>Valeriana decussata</i>	21
Fig.6 Fotografía Vargas, H. (2019) Raíz de <i>Valeriana rígida</i>	21
Fig.7 Fotografía Vargas, H. (2019) Raíz de <i>Valeriana decussata</i>	21
Fig.8 Cámara de Neubauer: lectura en barrido de los cuatro cuadrantes.....	32
Fig.9 Temperatura de reacción para la amplificación de Bcl-2, BAX y p53: <i>Software Bio-RAD Real-Time CFX96</i>	36
Fig.10 Ensayo de citotoxicidad del extracto de <i>Valeriana decussata</i> raíz (DR) sobre células MCF-7	38
Fig.11 Ensayo de citotoxicidad del extracto de <i>Valeriana decussata</i> hojas y tallos (DHT) sobre células MCF-7.....	39
Fig.12 Ensayo de citotoxicidad del extracto de <i>Valeriana rígida</i> raíz (RR) sobre células MCF-7	40
Fig.13 Ensayo de citotoxicidad del extracto de <i>Valeriana rígida</i> hojas y tallos (RHT) sobre células MCF-7	41
Fig.14 Expresión de la proteína p53 en células MCF-7 con extracto de <i>Valeriana decussata</i> raíz (DR) magnificación 630X.	43

Fig.15 Expresión de la proteína p53 en células MCF-7 con extracto de <i>Valeriana decussata</i> hojas y tallos (DHT) magnificación 630X.	44
Fig.16 Expresión de la proteína p53 en células MCF-7 con extracto de <i>Valeriana rígida</i> raíz (RR) magnificación 630X.)	44
Fig.17 Expresión de la proteína p53 en células MCF-7 con extracto de <i>Valeriana rígida</i> hojas y tallos (RHT) magnificación 630X.	45
Fig.18 Expresión de la proteína Bcl-2 en células MCF-7 magnificación 630X.....	46
Fig.19 Expresión de la proteína Bcl-2 en células MCF-7 con extracto de <i>Valeriana decussata</i> raíz (DR), hojas y tallos (DHT) magnificación 630X.....	47
Fig.20 Expresión de la proteína Bcl-2 en células MCF-7 con extracto de <i>Valeriana rígida</i> raíz (RR) y hojas y tallos (RHT) magnificación 630X.).....	48
Fig.21 Expresión de la proteína Bax en células MCF-7 con extracto de <i>Valeriana decussata</i> raíz (DR), hojas y tallos (DHT) magnificación 630X.....	49
Fig.22 Expresión de la proteína Bax en células MCF-7 con extracto de <i>Valeriana rígida</i> raíz (RR) magnificación 630X.	50
Fig.23 Expresión relativa normalizada de la proteína p53 según el método $\Delta\Delta Ct$ para el gen GAPDH en el control de los extractos de <i>Valeriana decussata</i> y <i>Valeriana rígida</i>	51
Fig.24 Expresión relativa normalizada de la proteína Bax, según el método $\Delta\Delta Ct$	52
Fig.25 Expresión relativa normalizada de la proteína Bcl-2, según el método $\Delta\Delta Ct$	52

RESUMEN

El cáncer representa un problema de salud pública a nivel mundial, con altas tasas de incidencia y mortalidad en países desarrollados y no desarrollados. Actualmente existen diferentes tratamientos terapéuticos diseñados para eliminar o detener la proliferación de células cancerígenas, sin embargo, la mayoría son invasivos y presentan efectos colaterales. En la actualidad se están desarrollando alternativas terapéuticas de origen natural con el objetivo de proponer tratamientos más eficientes y menos invasivos para combatir el cáncer. Frente a esta problemática la siguiente investigación se fundamentó en evaluar *in vitro* la capacidad proapoptótica y citotóxica de extractos de valeriana sobre la línea celular de cáncer de mama. Se realizaron ensayos de viabilidad celular (MTT), ensayos de inmunohistoquímica por microscopía de fluorescencia y PCR cuantitativa de transcripción inversa para la expresión génica de las proteínas. Los resultados obtenidos evidenciaron la disminución en la proliferación celular y la variabilidad en la expresión génica de las proteínas apoptóticas en las células de cáncer de mamá después de ser tratadas con dosis óptimas de los extractos de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata*.

Palabras clave sugeridas: Apoptosis, Alternativas terapéuticas, Extractos vegetales, Valeriana, Cáncer de mama

ABSTRACT

Cancer represents a public health problem level world, with high incidence and mortality rates in developed and undeveloped countries. Currently there are different therapeutic treatments to eliminate or prevent the proliferation of cancer cells, however, the most are invasive, and they have side effects. Today there are natural therapeutic alternatives with the aim of develop more efficient and less invasive treatments to fight cancer. Faced with this problem, the research done it is based on in vitro evaluation of the proapoptotic and cytotoxic capacity of valerian extracts on the breast cancer cell line. Cell viability assays (MTT), immunohistochemistry assays were performed by fluorescence microscopy and quantitative reverse transcription PCR for gene expression of proteins. The results obtained showed the decrease in cell proliferation and variability in the gene expression of apoptotic proteins in breast cancer cells after being treated with optimal doses of *Valeriana rigid* and *Valeriana decussata* extracts.

Keywords: Apoptosis, Therapeutic alternatives, Valerian plant, extracts, Breast cancer

LISTA DE ABREVIATURAS

A2780: Línea celular de cáncer de ovario humano

AE: 1,8-dihidroxi-3-[hidroximetil]-antraquinona

Apaf-1: Factor-1 activador de la apoptosis

BAX: Proteína X asociada a BCL-2

BCL-2: Linfoma de células B2

BSA: Albúmina de suero bovino

CLN: ácidos linolénicos conjugados

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DISC: Complejo de señalización inductora de muerte

DMEM: Dulbecco's modified eagle's medium

E2F1: Factor de transcripción del ciclo celular

ECD: Dicroísmo circular electrónico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FBS: Suero fetal bovino

PE: Ficoeritrina

FITC: Fluoresceína

GABA: ácido γ -aminobutírico

GST P: Glutación S-transferasa P

HeLa: Línea celular de cáncer cervical

IC₅₀: Inhibitory Concentration 50

IVHD-valtrato: Valepotriatos activos

MCF 10A: Células epiteliales mamarias normales

MCF-7: Línea celular de cáncer de mama

MDA-MD-435: Línea celular de carcinoma mamario

Mdm2: Regulador negativo del supresor tumoral p53

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

MTX: Metotrexato

NK: Natural Killer

NL: Lípidos neutros

p53: Proteína supresora de tumores

PARP: Poli ADP ribosa polimerasa

PBS: Buffer fosfato salino

PC-3M: Células de cáncer de próstata metastásico

PFA: Paraformaldehído

Rb: Proteína supresora de tumores

SDS: Dodecilsulfato sódico

ST: Sólidos totales

TNF: Factor de necrosis tumora

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes Investigativos

1.1.1 El Cáncer

La palabra cáncer es un término que hace referencia a una gran variedad de enfermedades que pueden afectar al ser humano, básicamente el cáncer se define como el crecimiento anormal del tejido tisular debido a la proliferación de células (anormales o mutantes) que presentan la capacidad de invadir y destruir otros tejidos **(NIH, 2016)**.

Se caracteriza por la agrupación de entidades clínicas de múltiples orígenes, existen tres subtipos principales: Los carcinomas que se originan en el tejido epitelial ya sea en la piel o epitelios de cavidades y órganos. Los sarcomas que provienen del tejido conectivo (huesos, cartílagos, músculo, tejido adiposo, nervios y vasos sanguíneos) y por último los tejidos glandulares como las glándulas mamarias y la próstata **(McCaffery, 1992)**.

1.1.2 Epidemiología del cáncer

El cáncer se considera un problema de salud pública que va en aumento, según Globocan en el 2018, se registraron 9.5 millones de personas fallecidas y 18 millones de casos nuevos. En este mismo año los tipos de cáncer que tuvieron mayor incidencia en la población para ambos sexos y todas las edades fueron: cáncer de pulmón 18.4%, colorrectal 9.2%, estómago 8,2%, hígado 8,2%, esófago 5.3% , mama 6.6 % , páncreas 4,5%, próstata 3,8% y cáncer de cuello uterino 3.2% **(Globocan, 2018)**.

Los tipos de cáncer difieren como consecuencia de la transición demográfica-epidemiológica, según la Organización Mundial de la Salud el cáncer es la segunda causa de muerte en países desarrollados y se encuentra entre las tres principales causas de muerte en países en desarrollo **(OMS, 2014)**.

El porcentaje de incidencia de cáncer en los países desarrollados es del 46% para los países en desarrollo su valor de incidencia en el total de la carga por cáncer es del 43% **(Itriago, Silva, & Cortes, 2013)**.

En las mujeres, el cáncer de mama es la causa más frecuente de muerte por cáncer, seguida del cáncer de cuello uterino y el cáncer de pulmón. En relación a los hombres, el cáncer de próstata y el cáncer de pulmón son los más frecuentes, a excepción de África donde predomina el sarcoma de Kaposi y de Japón en donde existen altas tasas de cáncer gástrico **(Itriago et al., 2013)**.

En América Latina, el cáncer es un problema de salud pública sumamente serio, en el 2012, fue la segunda causa de mortalidad más importante, después de las enfermedades cardiovasculares en todos los países de la región, excepto en México, donde el cáncer ocupó el tercer lugar **(Kielstra, 2017)**.

El Ecuador no escapa a esta realidad, se ha descrito que el riesgo de desarrollar cáncer antes de los 75 años es de aproximadamente un 20% constituyendo un importante problema de salud pública, con una incidencia en aumento **(MSP, 2017)**. La incidencia de cáncer es de 157,2 casos por 100.000 habitantes, según el informe dado a conocer por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC), perteneciente a la OMS. En nuestro país, el cáncer de próstata es el de mayor incidencia con 38,8 casos por 100.000 habitantes seguido del de mama con 31,8 casos **(GLOBOCAN, 2018)**.

1.1.3 Cáncer de mama

El cáncer de mama es considerado entre los principales tipos de neoplasias que afectan a las mujeres a nivel mundial, en Ecuador ocupa el primer lugar seguido del cáncer de cuello uterino y el cáncer de tiroides **(Cueva, 2015)**. Según el informe realizado por Globocan, en el 2018 se reportaron 28.058 casos, en promedio general existen 165 casos de cáncer por cada 100.000 mujeres **(American Cancer Society, 2019)**.

El tipo de cáncer de mama está determinado por la afectación de células específicas, siendo el más común el carcinoma, el cual, es un tumor que se origina en las células epiteliales que revisten la capa de los órganos y tejidos.

Cuando los carcinomas se encuentran específicamente en las mamas reciben el nombre de adenocarcinoma que se inicia en los lobulillos o conductos del seno (glándulas productoras de leche) (**American Cancer Society, 2019**). Según el alcance de diseminación existen dos tipos: carcinoma *in situ* (Carcinoma ductal *in situ* y Carcinoma lobulillar *in situ*) y carcinoma invasivo (infiltrante) (**BREASTCANCER, 2015**).

Debido al carácter invasivo o no invasivo, los estadios que se describen en este tipo de cáncer dificultan un diagnóstico oportuno y certero. En el estadio 0, las células se localizan en la parte interior de los conductos mamarios, no presenta carácter invasivo y no hay indicios de células anormales (**Sociedad Española de Oncología Médica, 2011**). En el estadio I, el cáncer se concreta en el tejido mamario, es invadido por las células cancerígenas (no invade otros tejidos), el tumor mide menos de 2 cm y los ganglios linfáticos no se encuentran comprometidos (**BREASTCANCER, 2015**).

En el estadio II el cáncer es de carácter invasivo, el tumor puede medir menos de 2 cm afectando los ganglios linfáticos, existen casos clínicos en los que llega a medir entre 2 y 5 cm pudiéndose diseminar o no a los ganglios linfáticos, cuando supera los 5 cm no presentan afectación de los ganglios linfáticos (**Santaballa. Ana & SEOM, 2017**).

En el estadio III, existe la posibilidad que el tumor no alcance los 5 cm pero que se extienda a los ganglios linfáticos axilares, otra posibilidad es la extensión del tumor a los tejidos más cercanos del seno (**Sociedad Española de Oncología Médica, 2011**). Finalmente, en el estadio IV, el tumor se propaga a otras localizaciones anatómicas, como el hígado, pulmones, la piel y hasta el cerebro, este estadio también es conocido como metastásico (**BREASTCANCER, 2015**).

La proliferación celular excesiva y la metástasis son las principales causas de muerte de los pacientes con cáncer de mama (**Tian et al., 2018**). Debido al aumento e incidencia de esta neoplasia surge la necesidad de realizar nuevas investigaciones que permitan optimizar la terapéutica convencional reduciendo la agresividad de los tratamientos empleados como; la quimioterapia, radioterapia, tratamiento quirúrgico y la terapia hormonal entre otros, los cuales, en su gran mayoría son invasivos, generando toxicidad en el organismo y causando efectos secundarios que repercuten en la calidad de vida de los pacientes (**OMS, 2014**).

Las organizaciones contra el cáncer de mama buscan reducir la tasa de mortalidad, mejorando la calidad de los servicios de detección precoz, para un diagnóstico y tratamiento oportuno (**Ministerio de Salud Pública, 2019**). La OMS promueve el control del cáncer en el marco de los programas nacionales de lucha contra el cáncer, integrándolo en la prevención y el control de las enfermedades no transmisibles (**OMS, 2014**).

Existen diferentes factores de riesgo que promueven el cáncer, los cuales pueden ser asociados a ciertos aspectos como el estilo de vida, cambios demográficos, edad, problemas hormonales, predisposición genética, consumo de tabaco, estado nutricional, sobrepeso-obesidad, inactividad física, la infección por ciertos patógenos, exposición a carcinógenos y una esperanza de vida más larga, entre otros (**MSP, 2017**).

El diagnóstico precoz sigue siendo una importante estrategia de detección del cáncer, pero no es la más eficaz debido a la escasa información que las pacientes poseen acerca de la prevención y detección temprana, en la mayoría de los casos la enfermedad se diagnostica en fases avanzadas y las personas que la padecen no cuentan con los recursos necesarios para su tratamiento. Cada año la incidencia del cáncer aumenta en el país ya que se detecta en estadios avanzados, lo que dificulta el tratamiento (**OMS, 2014**).

1.1.4 Proceso de Carcinogénesis

El proceso por el cual una célula se transforma en cancerígena es conocido como carcinogénesis, comprender este proceso se logró gracias al estudio genético. Mediante estas técnicas se estableció que la transformación progresiva de una célula normal a una célula maligna se origina en el material genético y son conocidas como alteraciones o mutaciones (**Sánchez, 2013**). La carcinogénesis es la capacidad que tiene un agente para producir o inducir una neoplasia maligna o cáncer (**De la Peña E., 2010**). La neoplasia es la transformación y crecimiento celular de forma incontrolada, forma tejido nuevo anormal que presenta carácter tumoral de tipo benigno o maligno (**Sistema Nacional de Salud, 2001**).

Durante el transcurso de la vida las personas estamos en contacto con agentes o sustancias carcinógenas las cuales por inhalación, ingestión o penetración cutánea pueden inducir al cáncer o incrementar su frecuencia (**Ríos, 2016**).

Estos agentes se clasifican en endógenos y exógenos, se van acumulando al pasar de los años hasta que inducen el desarrollo del cáncer por alteraciones irreparables en el ADN (Farré & Benavent, 2002).

Dentro de los carcinógenos de tipo endógenos se encuentran; errores en la replicación del ADN, la inestabilidad que sufren ciertas bases de ADN de forma intrínseca, ataque de radicales libres durante el metabolismo. Además, pueden ser resultado de procesos exógenos como; carcinógenos químicos, radiaciones ultravioletas y radiaciones ionizantes (Domínguez, 2004).

El estudio de la carcinogénesis es complejo, las células presentan sus propios mecanismos para reparar alteraciones producidas, en ocasiones existen errores en dichos mecanismos que no le permiten a la célula seguir con su ciclo normal de vida debido a la permanencia de cambios en el genoma (Domínguez, 2004). El modelo de estudio actual de la carcinogénesis se basa en tres etapas principales; la interacción de un agente carcinógeno que actúa como *iniciador* luego otros agentes llamados promotores actúan en la célula ya *iniciada* y finalmente la última etapa es la progresión que se puede dar con o sin la interacción de otros agentes (Granados & Herrera, 2010).

1.1.5 Etapas de la carcinogénesis

Iniciación: Es el proceso de alteración que tiene una célula a nivel de su genoma, abarca tres procesos fundamentales; metabolismo celular, reparación del ADN y la proliferación celular. Al alterarse alguno de estos procesos inicia la carcinogénesis. El compuesto químico que inicia el proceso se le denomina agente iniciador (carcinógeno incompleto) ya que esté solo inicia a la célula, la aparición de este tipo de células puede darse de forma espontánea ya que en la mayoría de los casos esta etapa es desencadenada por agentes completos (Desencadenan toda la etapa de la carcinogénesis) (BioCáncer, 2012). Tiene características morfológicas y biológicas irreversibles, la célula afectada no se diferencia morfológicamente de una célula normal, para inducir el daño debe llevar a cabo el ciclo celular para que la célula se divida y se pueda fijar el daño inducido, la eficiencia de la etapa de iniciación depende de los agentes endógenos o exógenos (BioCáncer, 2012).

Promoción: No es necesario la exposición al carcinógeno, en esta fase actúa un segundo agente denominado promotor. Este tipo de agente actúa modificando los productos de los genes implicados en el control de la proliferación celular, es decir colaboran con la mutación iniciada. Es un proceso reversible, existe una dosis umbral y una respuesta máxima a su acción. En esta fase la población iniciada se expande, causan cáncer cuando el promotor actúa de modo repetido tras el carcinógeno iniciador por estímulos generados sobre receptores de membrana, la proliferación celular favorece a la acumulación de nuevas mutaciones (**Cruz, 2012**).

Progresión: En esta etapa una de las células que ya está iniciada y en promoción de forma espontánea o inducida por otros sucesos o factores, adquiere otras alteraciones genéticas lo cual hace que adopte el fenotipo maligno (angiogénesis, invasión, metástasis, etc.) (**Martín & Civetta, 2007**).

1.1.6 Respuesta Inmunitaria

El sistema inmunológico es capaz de detectar la anomalía de una célula, cuando está se ha convertido en cancerígena la destruye antes de que se reproduzca o disemine. Las células cancerosas pueden ser eliminadas por el sistema inmunológico siempre y cuando esté no se encuentre alterado o deteriorado (**Peter, 2018**).

Aunque el sistema inmunitario funcione con normalidad, el cáncer puede afectar o condicionar la vigilancia de este, las células transformadas por el cáncer expresan proteínas anormales que definen un patrón antigénico, los antígenos tumorales se clasifican según el grado de restricción a las células neoplásicas o del tipo de respuesta manejada para su identificación para lo cual se han detectado diferentes antígenos tumorales que son reconocidos por linfocitos T y células B (**Barrera, Peralta, & Madrid, 2010**).

Las células cancerígenas pueden desarrollar la capacidad de transportar proteínas que indiquen a las células inmunitarias que están en circulación (linfocitos T) es decir que las células que tienen proteínas (proteínas de punto de control) son normales por lo que no son atacadas, es así como las células cancerígenas presente está capacidad de producir proteínas de punto de control y escapan del ataque (**Peter, 2018**).

Uno de los principales mecanismos de control en los organismos es la muerte celular programada, es un proceso genéticamente regulado en el cual las células deben morir para preservar el desarrollo, homeostasis e integridad de los organismos multicelulares. Es ejecutado por mecanismos moleculares conservados, se expresa de manera ubicua y están codificados en el genoma (**Martínez, Gómez, & Rodríguez, 2018**).

Este proceso es de mucha importancia ya que cada célula dispone de sus propias herramientas para autodestruirse. La muerte celular puede ser de forma coordinada o de forma cooperativa (**Eisenberg, Bialik, Simon, & Kimchi, 2009**). Las células disponen de la capacidad para recibir, procesar y generar diferentes señales que activen o inhiban algún elemento de la maquinaria letal. Las rutas de muerte celular programada son muy complejas, pueden tener relación y complementarse o simplemente divergen en varios puntos del proceso. Para que se active la muerte celular programada se necesita estímulos intracelulares como daños en el ADN y extracelulares como recepción de señales letales (**Martínez et al., 2018**).

1.1.7 Principales muertes celulares

Autofagia: Es un mecanismo que recicla partes de la célula, en él la célula dispara y se forman vesículas autofágicas, las cuales se van acumulando masivamente en el citoplasma, es un proceso de degradación intracelular que le permite a la célula mantener su equilibrio cuando ha sufrido estrés celular, hipoxia o inanición (**Fernández & Rodríguez, 2019**). Las características de este mecanismo han permitido que se catalogue como muerte celular programada de tipo II, es clave para el control de tumores y favorece a la eliminación de las células cancerígenas (**Costas & Rubio, 2017**). Existen dos tipos de autofagia: la microautofagia que degrada moléculas dañadas y genera la acumulación de toxinas y proteínas mal plegadas cuando se encuentran alteradas, lo cual involucra la muerte de las células y la macroautofagia que elimina organelos dañados, mitocondrias (mitofagia) o disfuncionales (**Costas & Rubio, 2017**).

Necrosis: Muerte celular originada por alguna lesión aguda, es un proceso irreversible no regulado, se deriva de una condición patológica no fisiológica, es producida por un daño en la célula, se considerada como un proceso agresivo en el cual la célula se hincha, los orgánulos se desintegran y se paralizan las funciones vitales de la célula (**Lizarbe, 2007**). El daño en la célula hace que la membrana pierda sus potenciales como consecuencia de la disminución de la energía celular, pérdida en la función de los canales homeostáticos, en la función de bombas iónicas y por los daños en los lípidos contenidos en la membrana (**Migueláñez, 2008**).

Apoptosis: Es una muerte celular programada, se encarga de eliminar células dañadas de forma ordenada y eficiente. Cuenta con una maquinaria compleja desencadenada por vías intrínsecas o extrínsecas mediadas por caspasas (**Pistritto, Triscioglio, Ceci, Garufi, & D’Orazi, 2016**). Es un proceso altamente conservado y genéticamente controlado, los cuerpos apoptóticos que contiene la célula muerta son fagocitados por las células circulantes (**D’Arcy, 2019**).

1.1.8 Apoptosis

El término apoptosis (*apoptosis* término griego que significa << *Caída o soltarse*>>) fue introducido por primera vez en 1972 por Kerr, Wyllie y Currie para describir una morfología distinta de muerte celular que implica una determinada eliminación genética de las células, es un mecanismo homeostático que ocurre durante el desarrollo y envejecimiento celular (**Elmore, 2007**).

Es una forma de muerte celular programada y coordinada, tiene importancia en diferentes cuadros fisiológicos y patológicos. Se caracteriza por ser controlada y regulada por la velocidad de división celular, cuando la célula ya no es necesaria o tiene alguna anomalía se activa la vía de muerte celular sin daño tisular colateral ni inflamación (**Mohan, 2012**).

Durante la apoptosis se generan varios cambios morfológicos, estos cambios afectan a las células aisladas o a pequeños agregados. Las alteraciones producidas por la apoptosis afectan a las estructuras subcelulares de forma global, existen tres aspectos morfológicos básicos en la apoptosis (**Pérez, 2013**).

La *membrana plasmática* sufre un proceso denominado constricción, disminuye el tamaño celular, la fosfatidilserina se externaliza y facilita el reconocimiento de las células apoptóticas por los fagocitos (**Pérez, 2013**). Disminuye el *volumen citoplasmático* ya que el citoplasma se condensa, no se observan cambios ni alteraciones en los orgánulos citoplasmáticos (**Ortega, Díaz, Avalos, Vergara, & Rosales, 2001**). El *núcleo* celular sufre diferentes cambios morfológicos durante la apoptosis. Inicialmente la cromatina se condensa y se localiza en la periferia es decir hace contacto con la membrana nuclear lo que hace que el tamaño del núcleo disminuya, posteriormente el núcleo es fragmentado por las endonucleasas acompañada de la fragmentación oligonucleosómica del ADN (**Perales, 2005**).

1.1.9 Mecanismos moleculares de la Apoptosis

La apoptosis se puede producir mediante dos vías: la vía extrínseca (receptor de muerte) y la vía intrínseca (mitocondrial).

La *vía extrínseca* o receptor de membrana inicia a través de la señalización de un agente externo conocido como receptores de muerte o transmembrana, se han identificado dos familias de receptores: Factor de necrosis tumoral (TNF) y el ligando Fas (Fas-L). La vía extrínseca inicia cuando el ligando de Fas-L se une al dominio extracelular o dominio de muerte Fas-R esta unión genera cambios conformacionales, cuando Fas-L se liga a Fas-R se produce la unión de tres o más moléculas de Fas-R, los dominios intracelulares de esta unión forman sitios para que se acople una proteína adaptadora la cual contiene un dominio de muerte llamado FADD y está asociada al receptor TNF (**Condori & Oviedo, 2017**). El complejo FADD-Fas-R atraen al sitio a una caspasa iniciadora inactiva denominada procaspasa 8 la cual es activada mediante un corte proteolítico que separa el predominio generando caspasa 8 activa, la formación del complejo FADD, Fas-R y procaspasa 8 es conocido como DISC (complejo de señalización inductora de muerte). Múltiples moléculas de procaspasa 8 quedan próximas y se degradan entre ellas para generar caspasas activas. La caspasa 8 activa pone en marcha una cascada de activación de caspasas mediante la degradación y activación de otras procaspasas de la misma familia como caspasa 3,6 y 7 causando la muerte celular por daño o destrucción del núcleo y otras proteínas intracelulares (**Kiraz, Adan, Kartal, & Baran, 2016**)(**Pérez & Lie, 2011**).

Vía Intrínseca o mitocondrial: Está vía apoptótica es desencadenada por señales intracelulares originadas por estrés biológico, cuando las células son privadas de factores de crecimiento o se exponen a sustancias que provocan daños en el ADN se activa una serie de sensores que activan la vía mitocondrial. En esta vía las proteínas de la familia BCL-2 denominadas “proteínas BH3” regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria (**Pfeffer & Singh, 2018**). La supervivencia o muerte celular está determinada por la permeabilidad de la membrana mitocondrial controlada por las proteínas Bcl-2. Estas proteínas regulan dicho proceso además cumplen otras funciones como; actividad de formación del poro, crean enlaces a otras proteínas, tienen en su estructura cuatro dominios BH1, BH2, BH3 estos interactúan con diferentes miembros de la familia Bcl-2 Y BH4 se encarga de mediar y controlar las funciones del ciclo celular (**Shubach, Galindo, & Sánchez, 2015**).

Estas proteínas se agrupan en tres categorías: Antiapoptóticas (BCL-2 y BCL-xL), pro-apoptóticas de tipo multidominio (BAX Y BAK) y pro-apoptóticas de tipo BH3 (BID-PUMA-BAD). Inicialmente la proteína p53 induce la apoptosis, su función principal es activar proteínas de la familia Bcl-2 como PUMA o BIM por medio de la transcripción (estas proteínas interactúan con Bax para la estimulación del citocromo c). Las proteínas BCL-2 activan a Bax y Bak. una vez activado Bax y Bak estos se oligomerizan, se insertan en la membrana de la mitocondria para formar conductos o poros a través de los cuales sale el citocromo c y diferentes proteínas mitocondriales hacia el citosol, este proceso es considerado como punto de no retorno (**Robbins, 2013**).

El citocromo c una vez en el citosol induce a la formación de un complejo reconocido como apoptosoma formado por la oligomerización de la proteína Apaf-1 (factor-1 activador de la apoptosis) y ATP este complejo desencadena la activación de la caspasa 9 la cual lleva al procesamiento de caspasas efectoras como caspasa 3,6 y 7 la activación de la cascada de caspasas, que culmina en la fragmentación del núcleo. La esencia de la vía intrínseca es un equilibrio entre las moléculas pro-apoptóticas y las moléculas protectoras que regulan la permeabilidad mitocondrial (**Goldar, Khaniani, Derakhshan, & Baradaran, 2015**).

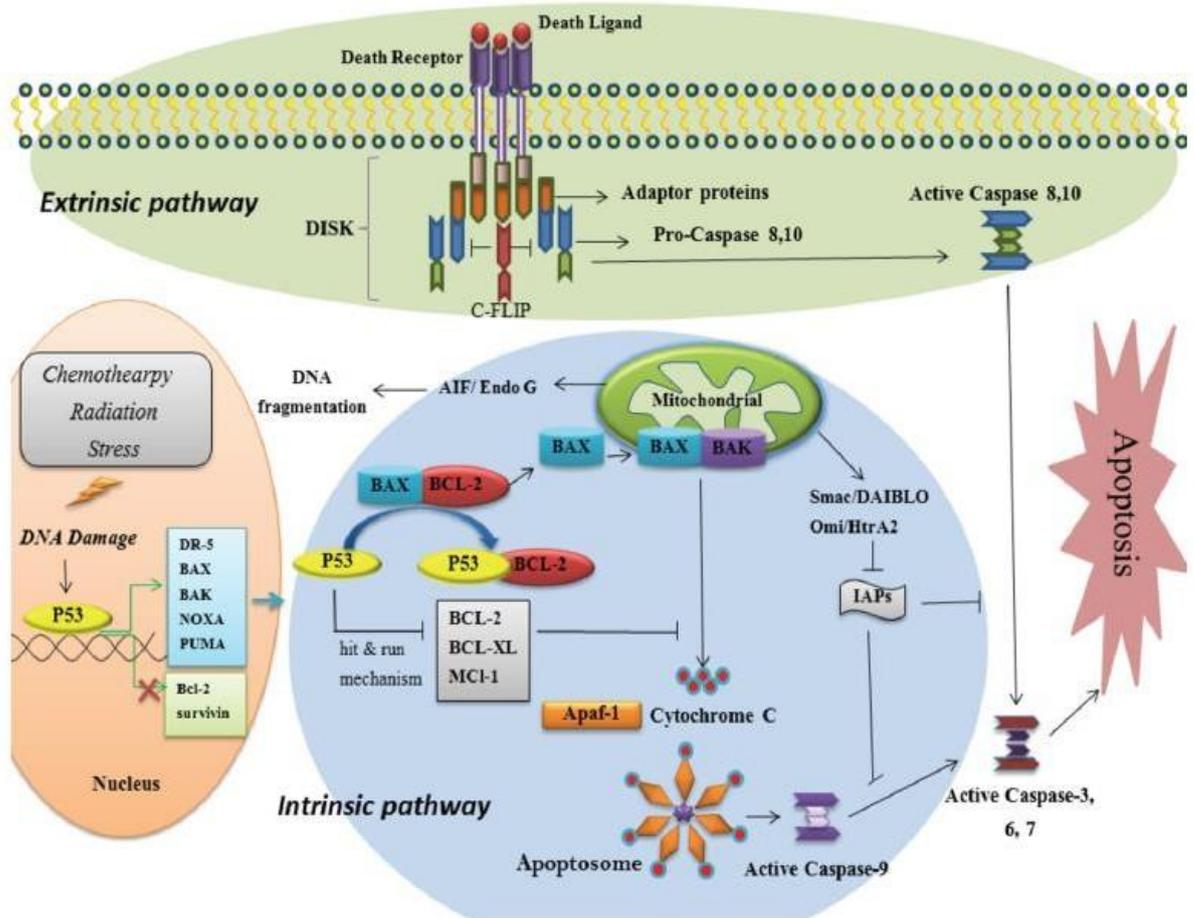


Fig.1 La apoptosis es llevada a cabo por dos vías centrales: La vía extrínseca e intrínseca. Ambas vías terminan en la misma ejecución. La vía extrínseca se activa por la unión de los ligandos extracelulares con los dominios extracelulares de la transmembrana (ligando FasL-Fas) este ligando induce a la caspasa 9 para que está catalice la maduración de la caspasa 3 (caspasa efectora) la cual induce a la cascada de caspasas y posterior demolición celular. La vía intrínseca es activada por estímulos intracelulares que activan la vía mitocondrial. La proteína p53 se activa y une a promotores de genes que codifican proteínas proapoptóticas de tipo BH3-online estas proteínas interactúan como Bax que es activada y ayuda a formar poros en la membrana externa de la mitocondria y se libera el citocromo C (Goldar, Khaniani, Derakhshan, & Baradaran, 2015).

1.1.10 Principales tratamientos contra el cáncer

Existen diferentes tipos de tratamientos contra el cáncer, la elección de este dependerá del tipo, localización y extensión de la enfermedad. Estos tratamientos fueron diseñados con el propósito de eliminar las células cancerígenas o evitar su división celular, existen personas que solo recibirán un tratamiento, pero la gran mayoría de personas que padecen la enfermedad reciben una combinación de tratamientos (Machado & Lie Concepción, 2019).

Quimioterapia: Es un tratamiento que utiliza fármacos que actúan sobre las células de crecimiento rápido (células cancerígenas) el tumor reduce su tamaño y las células dejan de dividirse rápidamente y mueren. Los fármacos actúan de manera sistémica es decir en todo el cuerpo y todos los órganos, al actuar de manera sistémica atacan a células funcionales que crecen rápidamente lo que ocasiona efectos secundarios en los pacientes (NIH, 2019).

Radioterapia: Es un tratamiento oncológico que utiliza radiaciones ionizantes, es de forma local es decir que actúa en una parte específica del organismo, destruye las células cancerosas impidiendo su crecimiento y proliferación. La radiación daña el ADN destruyendo las células cancerosas y reduciendo el tamaño de tumores, los beneficios de este tratamiento es la aplicación de dosis bajas, presenta poca toxicidad, tiene una alta eficiencia, mejor tolerancia para los pacientes y las células normales se recuperan mejor de la radiación que las células cancerígenas (Rubio, 2015).

Cirugía: Es el tratamiento más antiguo contra el cáncer, puede ser utilizada en varias etapas del cáncer como: diagnóstico, prevención, determinación y extensión de la etapa, tratamiento curativo y paliación. Es utilizado como método curativo para tumores sólidos en la zona de origen o tumor localizado (Cajaraville, Carreras, Massó, & Támes, 2001).

Inmunoterapia: Es un tipo de terapia biológica que se basa en el reconocimiento y eliminación de las células cancerígenas por parte de las células inmunitarias tales como los anticuerpos, los cuales pueden ser reproducidos en el laboratorio y administrado a los pacientes, las células que desempeñan un papel inmune en este tratamiento son: Linfocitos T, linfocito B, Células NK y fagocitos. Este tratamiento causa efectos secundarios menos agresivos que los tratamientos tradicionales (Leukemia & Lymphoma Society, 2014).

Terapia Dirigida: Utiliza medicamentos con la finalidad de bloquear la propagación y crecimiento del cáncer estos medicamentos intervienen en las moléculas específicas (dianas moleculares) que intervienen en la propagación de la patología (Machado & Lie Concepción, n.d.).

Trasplante de células madre: Se utilizan las células madre del paciente o donantes, se las extrae de la médula ósea o de la sangre y luego son congeladas. Éste tratamiento es complementario debido a que se utiliza después de una quimioterapia o radioterapia con el objetivo de que el paciente reciba dosis altas de los tratamientos mencionados y así evitar el daño de los tratamientos en la médula (**Degennaro, 2013**).

Medicina de precisión: Es un método de tratamiento que permite a los médicos tratar la enfermedad desde la genética del paciente, se basa en tres bases fundamentales: Capacidad de lectura del ADN, interpretación y análisis de los datos y translación de los resultados a la parte clínica con el fin de Con el fin de usar esta información para diagnosticar la enfermedad y tener la oportunidad de darle a un paciente los fármacos adecuados según el perfil biológico para curar la enfermedad (**Camps, 2018**).

La aparición de efectos secundarios en los procedimientos oncológicos es una de las principales limitaciones de aplicación, al someterse a estos tratamientos no solo se atacan a las células cancerosas también mueren células saludables durante el proceso y los pacientes llegan a padecer de vómito, alopecia, diarrea, fatiga, daños al sistema nervioso, náuseas, delirio, entre otros, esta desventaja impulsa a la búsqueda de nuevos tratamientos efectivos, predecibles y que no presenten efectos secundarios o que sean menos agresivos que los tratamientos actuales, mejorando así la calidad de vida de las personas que presentan la enfermedad (**Murray, Birdsall, Pizzomo, & Reilly, 2004**).

1.1.11 Medicina tradicional y agentes quimioterapéuticos

Las plantas son la base de la medicina actual, durante siglos han sido utilizadas para diferentes fines médicos entre ellos tratar el cáncer. Se han aislado diferentes moléculas a partir de ellas para la elaboración de fármacos quimioterapéuticos que han demostrado una alta eficiencia, eficacia clínica y son buenos agentes anticancerígenos.

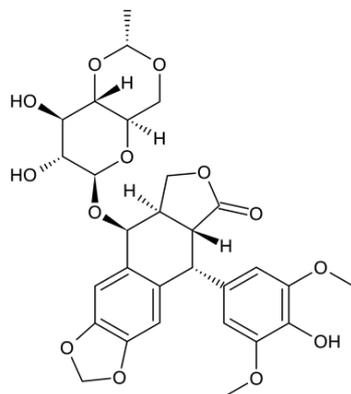
Los recursos naturales en conjunto con la medicina natural han sido fundamentales para el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer. Ante el análisis y aprobación de nuevos medicamentos para el cáncer en el período 1981-2002 el departamento de Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos manifestó que el 62% de los medicamentos son de origen natural restablecen el equilibrio del organismo al actuar de forma específica por poseer estructuras

moleculares diversas lo cual es una ventaja ante las drogas sintéticas (**Gonzales & Valerio, 2008**).

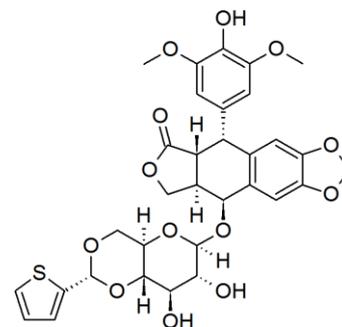
Actualmente la medicina tradicional ha contribuido al avance de nuevas terapias y nuevos medicamentos, fundamentales para la salud humana. La OMS reconoce los beneficios del uso de plantas en la medicina por medio de pruebas empíricas y científicas que avalan los beneficios que brindan (**S.N Fundación Salud y Naturaleza, 2007**). Llopart, N. menciona la importancia de las plantas en la obtención de compuestos antineoplásicos, siendo los principales agentes anticancerígenos, extraídos de plantas, los taxanos, los alcaloides vinca, las epipodofilotoxinas y los derivados de la camptotecina (**Llopart, 2016**).

Existen diferentes fármacos quimioterapéuticos que se han sintetizado a partir de los metabolitos de las plantas; como es el caso de *Podophyllum emodi* y *Podophyllum peltatum*, utilizadas en la cultura asiática para combatir el cáncer de piel, después de varias investigaciones a partir de estas plantas sintetizaron el etopósido y los tenipósido, glúcidos semisintéticos que inhiben a la enzima topoisomerasa II por lo tanto la inhibición de la replicación y transcripción del ADN éste proceso ha sido utilizado en el tratamiento de varios tipos de cáncer (**Llopart, 2016**). Otro ejemplo es el paclitaxel (Taxol®) aislado de la corteza de *Taxus brevifolia*, impide la división celular ya que los taxanos se unen a los microtúbulos durante la mitosis que son estructuras dinámicas en la división celular y los vuelven estáticos, es un medicamento reconocido para el tratamiento de cáncer de ovario, cáncer de mama , de pulmón y cáncer de colon (**Llopart, 2016**).

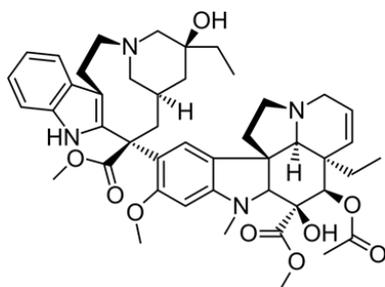
Diferentes alcaloides se han logrado obtener por medio de síntesis química, como la vinblastina y vincristina, aislada de *Catharanthus roseus* una planta utilizada en china para tratamientos de depresión y diabetes, estos alcaloides atacan a las celular cancerígenas en diferentes etapas del ciclo celular tratando así diferentes tipos de cáncer (**Vega, Velasco, & Jiménez, 2006**).



Etoposido

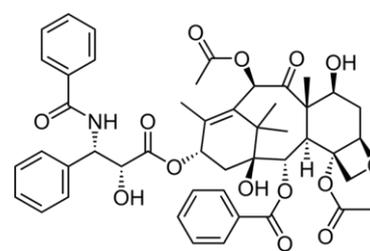


Teniposido



R1: -CH3 Vinblastina

R2: -CH0 Vincristina



Paclitaxel

Fig.2 Agentes quimioterapéuticos contra diferentes tipos de cáncer aislados de fuentes vegetales (**Etoposido, Teniposido, Vinblastina, Vincristina y Paclitaxel**) (Vega et al., 2006).

Un estudio realizado por Lin, J. y sus colaboradores, mencionan el uso del aloe vera en la terapia fotodinámica de varios tipos de cáncer como; cáncer de páncreas, cáncer de mama ya que posee AE (1,8-dihidroxi-3-[hidroximetil]-antraquinona) una sustancia que induce muerte a las células cancerígenas (J.-G. Lin et al., 2006). Otra investigación realizada por Torres, M. en el 2012 menciona que la *Annona Muricata* (Graviola), presenta características quimioterapéuticas ya que induce la necrosis celular por la inhibición de las vías de señalización que regulan el ciclo celular y el metabolismo de la célula (Torres et al., 2012).

Acosta, M. en el 2018 realizo estudios de la capacidad citotóxica y proapoptótica del látex de *Brosimum utile* (Sande) en la línea celular de cáncer cervical HeLa mediante ensayos citotóxicos y de inmunocitotoxicidad.

Se determinó que el látex de *Santanderia* actúa sobre las células HeLa por su potencial y capacidad citotóxica, mediante ensayos de inmunocitotoxicidad se evaluó que el látex reduce la expresión de BCL-2 e induce la expresión de BAX y caspasas 3/7 (Acosta, 2018).

En 2019, un estudio realizado por Canseco, M. utilizó extractos de plantas de *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechler* en los cuales se evaluó la expresión de genes inductores de apoptosis en células MCF-7 (línea celular de cáncer de mamá), donde se determinó que *Croton lechler* disminuye la expresión de BCL-2 y aumenta la expresión de BAX. La interacción de ambos genes es esencial para el funcionamiento correcto de la apoptosis; cuando se producen homodímeros de BAX la célula inicia su proceso de apoptosis de forma rápida (Canseco, 2019).

La *Hibiscus syriacus* (hibisco) presenta propiedades inhibitorias para las células cancerígenas, presenta triterpenoides que activan la señalización de la familia p53 inhibiendo así las células del cáncer de mama e inducen a la apoptosis (Hsu et al., 2015). Por otra parte *Punicagranatum* (árbol de granado) se caracteriza por presentar compuestos fitoquímicos que elevan el potencial de la planta como agente antitumoral, además contienen diferentes fitoquímicos con altos valores medicinales contra diferentes tipos de cáncer entre ellos el cáncer de mama, los extractos de esta planta atacan a genes y proteínas involucrados con el cáncer de seno (Vini & Sreeja, 2015).

En la actualidad existen cientos de investigaciones sobre varios tipos de cáncer que pueden utilizarse para buscar y descubrir nuevos principios activos derivados de plantas, que permiten detener el bloqueo, crecimiento y eliminación de las células cancerígenas (Rivas et al., 2016).

1.1.12 Valeriana

La palabra valeriana designa a cualquier planta del género *Valeriana*, L. 1753, pertenece a la familia *Caprifoliaceae*, su especie más conocida es *V. officinales* (DEEL, 2020). Es una planta originaria de Europa y partes de Asia, su extensión ha aumentado, actualmente incluye alrededor de 400 especies distribuidas en diferentes lugares del mundo. Crece en zonas húmedas con bosque, su morfología es muy variable, forman fuertes rizomas con sus raíces alargadas con pequeñas ramificaciones, pueden llegar a medir hasta un metro, sus hojas son dispuestas u opuestas, sus flores son pequeñas de color blanco-rosase caracterizan por emitir un olor fuerte y desagradable. Presenta diferentes propiedades medicinales debido a su composición química (aceites: valeranona, valeranal; monoterpenos bicíclicos y ácidos valéricos), comúnmente es usada para tratar el insomnio, estrés, enfermedades neurológicas, ansiedad, entre otras afectaciones médicas (Kutschker, 2011).

En la actualidad, se han llevado a cabo estudios con plantas de valeriana con el uso de semillas, rizomas, raíces, estolones, extractos, aceites esenciales, resinas u otros componentes los cuales son aplicados al estudio de las vías apoptóticas y a los efectos antitumorales que estas especies pueden inducir (Centro De Investigación Del Cáncer, 2017). Las valerianas más investigadas y estudiadas son; *Valeriana jatamansi* y *Valeriana officinalis*

Según un estudio realizado en el 2019 el valtrato (figura 2) de *Valeriana jatamansi* induce apoptosis e inhibe la migración de células cancerosas *in vitro* en las glándulas mamarias (Tian et al., 2018). Valtrato es un compuesto con estructura de enlace doble, es inestable, se descompone por calor, pH ácido y humedad (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2019). Pertenece al grupo de los iridoides (triésteres de alcohol) contiene ácidos alifáticos que esterifican funciones hidroxílicas, muestra una citotoxicidad relativamente baja para las células epiteliales mamarias normales (MCF 10A) (Villar & Carretero, 2011).

Valtrato induce la detención del ciclo celular en la etapa G2/M (punto de control de la progresión del ciclo celular de las células cancerígenas) y apoptosis en células MDA-MB-231 y MCF-7, con expresión reducida de p-Akt (Ser 473), ciclina B1 y caspasa 8, y aumenta la expresión de p21, p-cdc2, caspasa escindida 3, caspasa

escindida 7 y PARP (Poli ADP ribosa polimerasa) .Además, el valtrato inhibe la migración celular a través de la regulación negativa de la expresión de MMP-9 y MMP-2 que son proteínas recombinantes (Tian et al., 2018).

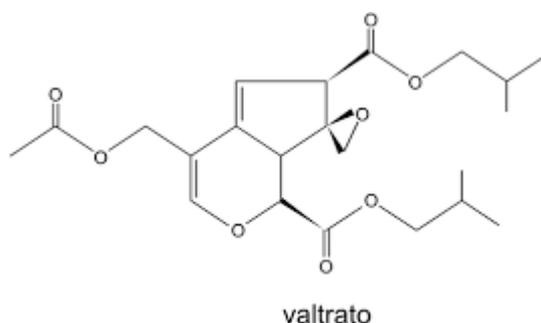


Fig.3 “Estructura química del Valtrato perteneciente a los valepotriatos”
(Llopart, 2016)

La *Valeriana jatamansi*, originaria del sur de China e India se ha utilizado tradicionalmente para el tratamiento de una variedad de enfermedades por su actividad sedante, citotóxica, antidepresiva, antimicrobiana y antioxidante (Jugran, Rawat, Bhatt, & Rawal, 2019). En los últimos años se han realizado diferentes estudios con esta planta, fundamentados en las actividades antitumorales que presenta, se ha descubierto entre sus componentes una serie de compuestos iridoides activos de tipo éster, entre los cuales se encuentra el valtrato que posee potentes citotóxicos y actividades antitumorales contra células de cáncer de ovario humano *in vitro* e *in vivo* (Xiaoguang, Chen, Sheng, Zhao, & Chen, 2013). Los valepotriatos son compuestos triésteres de alcohol, se diferencian por los ácidos que esterifican, su contenido está entre un 0,5 a 1,2 % en la raíz siendo el compuesto mayoritario el valtrato acompañado de IVHD-valtrato, acevaltrato y dihidrovaltrato. El estudio detallado *in vitro* e *in vivo* sobre los mecanismos moleculares de este compuesto han demostrado que el IVHD-valtrato a exposición moduló la expresión de numerosas moléculas involucradas en la progresión del ciclo celular y la apoptosis independientemente del estado de p53, lo que llevó a aumentar el nivel de p53, Rb, p21, p27 y disminuir Mdm2, E2F1, Ciclina B1, Cdc25C y Cdc2 (Xiaoguang et al., 2013).

También redujo la relación Bcl-2 / Bax y Bcl-2 / Bak y mejoró la división de PARP y caspasas. Los resultados preclínicos indicaron que el IVHD-valtrato es un agente terapéutico potencial para el cáncer de ovario, proporcionando una base para el desarrollo del compuesto como un nuevo agente quimioterapéutico (**Xiaoguang et al., 2013**).

En el 2017, Wang,R. y sus colaboradores atribuyeron la citotóxica de los iridoides extraídos de las raíces de *Valeriana jatamansi* contra el adenocarcinoma de pulmón y las células de carcinoma gástrico, se evaluaron cinco iridoides (se nombraron como clorovaltrato PT) y se evaluó su función en conjunto con seis análogos conocidos, las estructuras se analizaron mediante análisis espectroscópicos comparando los espectro mediante dicroísmo circular electrónico (ECD) calculados y también de forma experimental (**Xu et al., 2011**).

En otro estudio en el año 2014, en Japón, Kakehashi,A. y colaboradores demostraron un efecto inhibitorio de la valeriana en la expresión de hígado del glutatión S-transferasa P (GST P) en un bioensayo a mediano plazo en el hígado de ratas que indica la prevención de hepatocarcinógenos (agente que causa tumores en el hígado) (**Kakehashi et al., 2014**). Según los análisis es probable que los mecanismos de inhibición estén relacionados con la inducción de apoptosis y proliferación celular en las áreas de focos GST-P + activando la señalización mediada de GABA(A)R (receptor del sistema). GABA (ácido γ -aminobutírico) induce a p53, p21/ cip1, Bax, HDAC4 y CAT está inducción hace que se inhiba las modificaciones de las bases oxidativas del ADN del hígado de las ratas, los efectos de la valeriana fueron independientes de la dosis, se evidenció inhibición a dosis bajas (**Kakehashi et al., 2014**).

Los valepotriatos (3,5-dieno y 3-monoeno), una familia de ésteres iridoides con actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer humano han sido aislados de *Valeriana jatamansi* ya que presentan potentes citotóxicos y antitumorales (**S. Lin et al., 2015**). El IVHD-valtrato, uno de los valepotriatos más activos, podría suprimir significativamente el crecimiento de A2780 y tumores de xenoinjerto OVCAR3 (**S. Lin et al., 2015**). La línea celular A2780 de cáncer de ovario humano se utiliza para pruebas de citotoxicidad y estudios genéticos relacionados con el cáncer entre otros usos, dependientemente de la dosis (**Merck, 2019**).

La relación estructura-actividad de citotoxicidad contra las células de cáncer de próstata metastásico (PC-3M) fue examinado por 52 valepotriatos aislados, los mecanismos moleculares de este compuesto demostraron que la exposición a IVHD-valtrato modula la expresión de numerosas moléculas involucradas en la progresión del ciclo celular y la apoptosis, independientemente del estado de p53. Diez nuevos valepotriatos, valtratos han sido aislado de todas las plantas de *Valeriana jatamansi* (S. Lin et al., 2015).

Se han realizado estudios con las semillas pertenecientes a la familia *Valerianaceae* (*Centranthus ruber* y *Valeriana officinalis*) para descubrir aceites de semillas que contengan ácidos linolénicos conjugados (CLN) (Honma et al., 2019). Son ácidos grasos naturales que se cree que tienen propiedades anticancerígenas. En las semillas de éstas valerianas se observó un máximo de absorción de alrededor de 270 nm por medición de espectros ultravioleta. Cuando se midieron las composiciones de los ácidos grasos de estos aceites de semillas, se detectaron CLN (Honma et al., 2019). Por cromatografía en columna de sílice, los lípidos neutros (NL), glucolípidos y fosfolípidos se eluyeron de los aceites de semillas de *C. ruber* y *V. officinalis*. Luego, se midieron las composiciones de ácidos grasos de estas fracciones. Esto reveló que la mayoría de los CLN en estos aceites de semillas existían en la fracción NL. Cuando las fracciones de NL de estos aceites de semillas se hicieron reaccionar con lipasa, los CLN mostraron una buena sensibilidad a la hidrólisis de la lipasa (Honma et al., 2019). Esto sugirió que los CLN en los aceites de semillas de *C. ruber* y *V. officinalis* existían predominantemente en la posición sn-1,3 de triacilglicerol y menos en la posición sn-2. Estos resultados sugirieron que los CLN de los aceites de semillas de *C. ruber* y *V. officinalis* podrían ser fácilmente absorbidos por las células cancerosas como ácidos grasos libres y tienen un buen potencial como sustancias antitumorales (Honma et al., 2019).

La *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* pertenecen a la familia de las *Caprifoliácea*, clase magnoliopsida. Estas plantas no han sido estudiadas previamente en tratamientos contra el cáncer (Tropicos, 2018). En el presente estudio se busca aprovechar los compuestos activos y los compuestos antitumorales que puedan presentar ya que las plantas han sido una fuente invaluable de compuestos antitumorales relevantes en la terapia anticancerosa.

A pesar de esto, solo cerca del 10% de las más de 250000 especies de plantas superiores han sido investigadas para sus propiedades farmacológicas. Dentro de estas especies se encuentra la valeriana.



Fig. 5 Fotografía Vargas, H. (2019)
Hojas de *Valeriana decussata*



Fig.4 Fotografía Vargas, H. (2019)
Hojas de *Valeriana rígida*



Fig.6 Fotografía Vargas, H. (2019)
Raíz de *Valeriana decussata*



Fig.7 Fotografía Vargas, H. (2019)
Raíz de *Valeriana rígida*

Tabla 1. Descripción taxonómica de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*

Reino	Plantae
Subclase	Magnoliophyta Takht.
Superorden	Asteranae Takht.
Orden	Dipsacales Juss.
Familia	Caprifoliaceae Juss.
Género	<i>Valeriana</i> L.
Especie	<i>Valeriana Decussata</i> <i>Valeriana Rígida</i>

Fuente: (Tropicos, 2018)

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad proapoptótica *in vitro* de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata* en células cancerígenas.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la capacidad citotóxica de los extractos de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata* en células cancerígenas.
- Evaluar la expresión de las proteínas Bax, Bcl-2 y p53 *in vitro* en células cancerígenas tratadas con extractos de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata*.
- Determinar la expresión génica de Bax, BCL-2 y p53 en células cancerígenas tratadas con extractos de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata*.
- Establecer la capacidad proapoptótica de los extractos de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata*.

1.3 HIPÓTESIS

1.3.1 Actividad proapoptótica *in vitro* de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata* en células cancerígenas.

- **Hipótesis Nula:** Los extractos de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata* no presentan actividad proapoptótica en células cancerígenas.
- **Hipótesis Alternativa:** Los extractos de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata* presentan actividad proapoptótica en células cancerígenas.

1.4 Señalización de las variables de la hipótesis.

1.4.1 Variables dependientes

- Extractos de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata*

1.4.2 Variables independientes

- Actividad proapoptótica *in vitro*.
- Actividad citotóxica *in vitro*.

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales

2.1.2 Secado, pulverización y determinación de solidos totales

Tabla2. Materiales, equipos y reactivos utilizados para el secado, pulverización y determinación de solidos totales.

Materiales	Equipos	Reactivos
Matraces de 2L	Balanza analítica	Agua destilada
Probeta	Plancha de Calentamiento	
Vaso de precipitación	Bomba de filtrado al vacío	
Agitador magnético		
Papel aluminio		
Papel filtro Whatman #1		
Tubos (15ml)		
Botellas de vidrio		

Autor: Jeniffer Andrea Williams Ibarra

2.1.3 Obtención del extracto acuoso para el cultivo celular

Tabla 3. Descripción taxonómica de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*

Materiales	Equipos	Reactivos
Filtro de 0,22 µm	Balanza analítica	PBS 1 X
Papel aluminio	Vórtex	
Tubos (15ml)		

Autor: Jeniffer Andrea Williams Ibarra

PBS1X (Tampón Fosfato Salino): Se utiliza una relación 1:10 con PBS10X y agua destilada. En un volumen total de 1000ml se agrega 100 ml de PBS10X líquido con 900 ml agua destilada, se coloca en la autoclave durante 45 minutos a 120°C para que el reactivo esté estéril para su uso.

2.1.4 Obtención del extracto acuoso para el cultivo celular

Tabla 4. Materiales, equipos y reactivos utilizados para el cultivo celular

Materiales	Equipos	Reactivos
Pipetas automáticas		
Pipetas Graduadas (5-10 ml)	Cabina de flujo laminar nivel de Bioseguridad II	DMEN (Dulbecco Modified Eagle Medium).
Puntas (blancas, amarillas, azules)	Microscopio invertido de contraste.	Células MCF-7
Frascas Roux (75 ml)	Incubadora de	Suero Fetal Bovino (FBS)
Tubos cónicos (15-50ml)	atmosfera de CO ₂	Glutamina 1%
Equipo de protección personas	Baño María	1% Penicilina/
Vasos de precipitación		Estreptomicina
		Tripsina-EDTA 0,25%
		PBS1X

Autor: Jeniffer Andrea Williams Ibarra

Fuente: (Freifelder, 2019)

2.1.5 Cuantificación de Proteínas por el método Bradford

Tabla 5. Materiales, equipos y reactivos utilizados para la cuantificación de proteínas

Materiales	Equipos	Reactivos
Placa x 96 pocillos	Cabina de flujo laminar nivel	Curva patrón de
Pipetas	de Bioseguridad II	albúmina bovina
Papel parafilm	Lector de placas Victor X3	Reactivo Bradford
		Extractos de Valeriana

Autor: Jeniffer Andrea Williams Ibarra

2.1.6 Ensayos de Citotoxicidad

Tabla6. Materiales, equipos y reactivos utilizados para los ensayos de citotoxicidad

Materiales	Equipos	Reactivos
Placas de 96 pocillos	Cabina de flujo laminar nivel	PBS1X
Pipetas automáticas	de Bioseguridad II.	Medio DMEN
Pipeta Multicanal	Balanza analítica	MTT
Vaso de Precipitación	Lector de Placas Víctor X3	SDS 10%
Tubos cónicos (15 y 50ml)	Incubadora de atmósfera de	HCL 0,01 M
Papel aluminio	CO2.	
Canaletas		
Gradilla		
Tubos eppendorf de 1,5ml		

Autor: Jeniffer Andrea Williams Ibarra

2.1.7 Inmunohistoquímica

Tabla 7. Materiales, equipos y reactivos utilizados para inmunohistoquímica

Materiales	Equipos	Reactivos
Pipetas automáticas	Baño María con	PBS 1X
Placas x6 pocillos	agitación	Paraformaldehído (PFA)
Placas de cobre	THERMOLAB®-GFL	Tripón 100X
Esmalte transparente	Cámara de humedad	Anticuerpos monoclonales
Pinza metálica		específicos (Bax, Bcl-2 y p53).
		Fluoróforos (FE, FIT)
		Medio de montaje DAPI

Autor: Jeniffer Andrea Williams Ibarra

2.1.8 Real Time (Expresión génica)

Tabla 8. Materiales, equipos y reactivos utilizados para la extracción de ARN

Materiales	Equipos	Reactivos
Tubos eppendorf	Cabina de Flujo laminar vertical	PureLink® RNA
Pipetas automáticas	para PCR	Mini Kit
Puntas	Centrifuga (Zigma Zentrifugen)	Buffer de lisis
Tubos de recolección	Vortex	Buffer de lavado I
Tubos de recuperación	Nanodrop (Thermo Scientific)	Buffer de lavadoII
Tubos tipo falcón (15 ml)		RNase-Free water
		PBS 1X
		2-mercaptoetanol
		Etanol al 70%

Autor: Jeniffer Andrea Williams Ibarra

Fuente:(PureLink® RNA Mini Kit)

Buffer de lisis: Se añade 10µL de 2-mercaptoetanol por cada ml de Buffer de lisis

Tabla 9. Materiales, equipos y reactivos utilizados para la síntesis de ADN complementario.

Materiales	Equipos	Reactivos
Pipetas automáticas	Centrifuga para Eppendorf	Maxima First Strand
Bloque de hielo	Cabina de Flujo laminar	cDNA Synthesis (Thermo
Vaso de precipitación	vertical para PCR	Scientific)
Puntas	Vortex- LABNET	10X dsDNase Buffer
Tubos eppendorf		dsDNase
		Template RNA
		Water, nuclease-free
		5X Reaction Mix
		Maxima Enzyme Mix

Autor: Jeniffer Andrea Williams Ibarra

Fuente: Maxima First Strand Kit de síntesis de ADNc para RT-qPCR con dsDNase

Tabla 10. Materiales, equipos y reactivos utilizados para la RT-PCR

Materiales	Equipos	Reactivos
Pipetas automáticas	Microcentrífuga Eppendorf	GoTaq® qPCR Master
Bloque de hielo	Centrífuga Corning	Mix (2x)
Vaso de precipitación	Cabina de Flujo laminar vertical	Forward Primer
Puntas	Termal Cycler (CFX96** Real-time	Reverse Primer
Tiras de tubos eppendorf	System) Vortex- LABNET	Nuclease-Free Water Templado de ADNc

Autor: Jeniffer Andrea Williams Ibarra

Fuente: Promega GoTaq®

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Tipo de Investigación

El tipo de investigación utilizada es experimental, está orientada a determinar la capacidad proapoptótica *in vitro* de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata* en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Se realizaron pruebas citotóxicas con los extractos de valeriana, así mismo, estudios y evaluación de la expresión genética de las proteínas Bax, BCL-2 y p53 relacionadas con la ruta apoptótica. Con el objeto de investigar nuevos agentes naturales que induzcan apoptosis y permitan conocer la respuesta celular a estos compuestos.

2.2.2 Financiamiento

El trabajo de titulación es financiado por los proyectos de investigación:

- “Estudio etnobotánico y bioensayos de plantas medicinales relacionadas con el tratamiento de cáncer de cérvix en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua, Ecuador, aprobado con resolución: 0904-CU-P-2018, dirigido por la PhD. Yenddy Carrero Castillo
- “Caracterización morfológica molecular fitoquímica y métodos de propagación en especies silvestres del género valeriana de la provincia de Tungurahua”, dirigido por el PhD. Homero Vargas

2.2.3 Método de secado del material vegetal

Inicialmente se obtuvo la autorización para investigación científica y recolección de especímenes en el cerro Igualata ubicado en el cantón Quero perteneciente a la provincia de Tungurahua, fue emitida por la DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE TUNGURAHUA N°06-2018-IC-FLO-FAU-DPAT-VS; posteriormente se hizo la recolección de las diferentes especies de valeriana, se evaluaron aspectos físicos y características organolépticas de cada especie como; estado adulto de la planta, hojas, tallos y raíces con la textura y olor característico las mismas que fueron evaluadas por el PhD. Homero Vargas representante del Herbario Misael Acosta Solís de la Universidad Técnica de Ambato. El material vegetal recolectado como; Hojas, tallos y raíces de *Valeriana Rígida* y *Valeriana Decussata* fue transportado al laboratorio de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología para llevar a cabo el proceso de secado y pulverizado de cada especie de valeriana. Para realizar los procesos se empleó el protocolo estandarizado por la UOIDE, el material vegetal fue lavado con agua destilada y colocado en una estufa de 24 a 48 horas a 60°C para su desecación y deshidratación. Finalmente, el material vegetal se trituro con la ayuda un molino manual y se pesó la cantidad pulverizada en una balanza analítica, el material vegetal pulverizado se almaceno en fundas tetrapack a temperatura ambiente.

2.2.4 Método analítico para determinar la cuantificación de sólidos.

Para la determinación de un control físico-químico en los exactos de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussta* se cuantifico la cantidad de solidos presentes: para llevar a cabo el proceso se utilizaron capsulas de porcelana que fueron lavadas y secadas en una estufa a una temperatura de 105°C, posteriormente se las coloco en un desecador (para eliminar la humedad de la sustancia), transcurridas 2 horas fueron sacadas del desecador con una pinza y se pesaron con la ayuda de una balanza analítica. A continuación, se transfirió un volumen de 25 ml de los diferentes extractos acuosos en las capsulas de porcelana. Después las diferentes capsulas fueron colocadas en la estufa a 95 °C durante 1 hora hasta que las muestras se evaporaron, luego se aumentó la temperatura de la estufa a 105 °C +/- 2 durante 12 horas.

Finalmente se sacaron las capsulas de la estufa y fueron colocadas en el desecador hasta que llegaron a temperatura ambiente, se pesaron individualmente y se registró el valor de solido obtenido en cada capsula.

Los sólidos totales $ST = (g \text{ o } mg / mL \text{ o } L)$ se calcularon en base a la siguiente fórmula:

$$ST = \frac{(A - B) * 100}{Vol}$$

Donde:

A = Peso del residuo seco más crisol en mg.

B = Peso del crisol en mg.

Vol = Volumen de Muestra .

2.2.5 Preparación del extracto acuoso para el cultivo celular

Una vez obtenido el material vegetal pulverizado se hicieron dos extractos acuosos por cada especie de valeriana, se realizó un extracto de raíces y un extracto de hojas y tallos. Para realizar el extracto se utilizó un tubo tipo falcon de 15 ml, se resuspendió el material vegetal pulverizado en PBS1X estéril relación 1:20 después se homogenizo el extracto con ayuda del vórtex. Posteriormente, cada extracto fue transferido a otro tubo estéril de 15 ml a través de un filtro de 0,22 μm , con el objetivo de eliminar contaminantes o material seco y así conseguir la esterilidad. Finalmente, los tubos fueron sellados con papel parafilm y se almacenaron a -20 °C hasta su respectivo uso.

2.2.6 Cultivo Celular

En la siguiente investigación se trabajó con la línea celular MCF-7 (MCF7 ATCC® HTB-22™) derivada del cáncer de mama, se las cultivo en frascas Roux de 75ml en medio DMEN (Dulbeccos Modified Eagle Medium), el cuál fue suplementado con 10% de suero fetal Bovino (FBS). Para inhibir el crecimiento de agentes contaminantes se le añadió 1% de penicilina/estreptomicina (100 $\mu g/ml$), 1% de Glutamina.

2.2.7 Descongelación de las células MCF-7

Para descongelar las células MCF-7 previamente se preparó el baño maría y se colocó medio DMEN suplementado hasta que alcanzo una temperatura de 37°C. Después, en un tubo falcón de 15 ml se añadió 5 ml de medio DMEN suplementado, luego el criovial que contenía la suspensión celular fue colocado a baño maría a 37°C durante 1 minuto transcurrido este tiempo la suspensión celular fue añadida en el tubo de 15 ml con el medio DMEN. Se centrifugo la suspensión a 500 gravedades durante 5 minutos, después el sobrenadante fue desechado y el pellet restante fue homogenizado en 1 ml de medio DMEN está suspensión se transfirió a una frasca Roux con 10 ml d medio DMEN suplementado. Finalmente, la frasca se la incubó a 37°C, 5% de CO₂ y atmosfera húmeda durante 24 horas.

2.2.8 Pases Celulares

Los pases celulares se realizaron en base a la proliferación y población celular contenida en las frascas. Cuando las células ocupan en su gran mayoría la superficie de la frasca han alcanzado una confluencia entre el 80 y 100%. Para prevenir que las células inhiban su proliferación debido al contacto celular entre ellas se pasan a otra frasca para que sigan creciendo normalmente. Inicialmente se preparó el baño maría con Medio DMEN, PBS1X y Tripsina a una temperatura de 37°C. Después, las frascas fueron sacadas de la incubadora y se desechó el medio, se lavó la frasca con 8 ml de PBS1X y se realizó pequeños movimientos para obtener un buen lavado, luego se desecho el PBS1X y se agregó 1 ml de tripsina/EDTA al 0,25% y se incubó a 37°C alrededor de 4 a 5 minutos a 37°C, 5% de CO₂ y atmosfera húmeda, la función de la tripsina fue desenganchar las células que estaban adheridas a la frasca, se inactivo la actividad de la tripsina añadiendo 5 ml de medio DMEN suplementado. A continuación, la suspensión celular fue centrifugada a 500 gravedades por 5 minutos; el sobrenadante se desechado y el pellet fue homogenizado en 1 ml de medio DMEN suplementado. El volumen final de resuspensión celular se dividió para las diferentes frascas y se le añadió a cada frasca 12 ml de medio DMEN suplementado y se incubo a 37°C, 5% de CO₂ y atmosfera húmeda durante 48 horas.

2.2.9 Conteo Celular

Para determinar la cantidad de células en una suspensión estas deben alcanzar el 80 % de confluencia. Para realizar el conteo celular inicialmente se preparó el baño maría con medio DMEN, PBS1X y tripsina a una temperatura de 37°C. Después, las frascas fueron sacadas de la incubadora y se desechó el medio, luego se lavó la frasca con 8ml de PBS 1X y se realizó pequeños movimientos para obtener un buen lavado, después se desechó el PBS1X y se agregó 1ml de tripsina/EDTA al 0,25% y se incubó a 37°C alrededor de 4 a 5 minutos a 37°C, 5% de CO₂ y atmosfera húmeda, la función de la tripsina fue desenganchar las células que estaban adheridas a la frasca, se inactivo la actividad de la tripsina añadiendo 2 ml de medio DMEN suplementado. A continuación, la suspensión celular fue centrifugada a 500 gravedades por 5 minutos; el sobrenadante se desechó y el pellet fue homogenizado en 2 ml de medio DMEN suplementado, se centrifugo y se desechó el medio. Posteriormente, se agregó 2 ml de PBS1X y se volvió a centrifugar, después se desechó el sobrenadante y el pellet final fue resuspendido en 2 ml de medio DMEN suplementado y se agito con el vórtex. Para contar las células se utilizó el reactivo Trypan Blue cuya función fue teñir las células viables para lo cual se realizó una disolución 1:1 (se añadió en un tubo eppendorf 100 µl de la solución y 100 µl de Trypan Blue). Para el contaje en el microscopio se utilizó una cámara de Neubauer a la cual se le añadió 10 µl de la disolución final en cada cuadrante y se leyó como lo india la figura 1 en un microscopio óptico (lente de 10X). Finalmente, cuando se obtuvo el valor del conteo se multiplicó *2 y *10.000 el resultado fue el número de células presentes por cada ml (Juan, 2020).

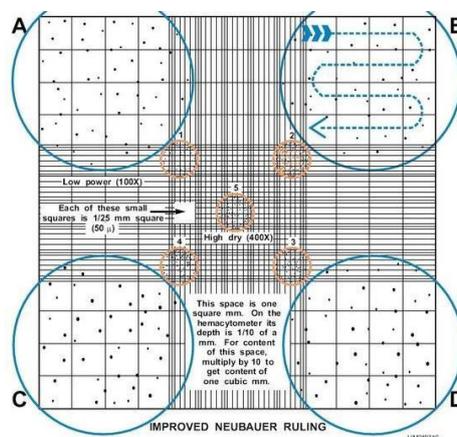


Fig. 8 Cámara de Neubauer: lectura en barrido de los cuatro cuadrantes

2.2.10 Ensayo MTT

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos, se sembraron 10000 células por pocillo. Se realizaron diluciones seriadas del extracto para determinar la viabilidad o proliferación celular por medio del análisis del IC_{50} (Capacidad del extracto para matar el 50% de células por pocillo). Luego se incubaron las placas por 48 horas a 37°C, 5% de CO₂ y atmosfera húmeda.

A continuación, se eliminó el medio de cultivo con el extracto de cada pocillo y se realizó un doble lavado con PBS1X. Posteriormente se añadió 10 µl de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (se disuelve 5mg de MTT en 1 ml de PBS1X) junto con 100 µl de medio DMEM sin rojo fenol y se incubaron las placas por 2 horas. Transcurrido ese tiempo se añadió 100 µl de SDS 10% y 100 µl de HCL 0,01 M, y se incubaron las placas durante 2 horas en las condiciones descritas anteriormente. Finalmente se leyó el formazan producido a 570 nm en el lector de placas Victor X3 (PerkinElmer, USA). La regresión no lineal estableció el porcentaje de células vivas para cada caso. La IC_{50} determinada se utilizó para determinar la actividad inhibitoria del extracto vegetal.

2.2.11 Cuantificación de Proteínas por el método Bradford

Para la cuantificación de proteínas se empleó el método Bradford que es un ensayo colorímetro, se elaboró la curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA) a 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50 y 1.75 mg/ml. En una placa de 96 pocillos se agregaron 5 µl de la muestra y del patrón por triplicado, después, se añadió 150 µl del reactivo Bradford y se dejó reposar la placa durante 5 minutos. Finalmente, se realizó la lectura de las absorbancias a 595 nm en el espectrofotómetro de microplacas. (PerkinElmer Víctor X3).

2.2.12 Inmunohistoquímica

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos, en cada pocillo se colocó un cubreobjeto estéril y se sembraron 50000 células, posteriormente se dejaron incubar durante 48 horas a 37°C. Luego, se agregaron los tratamientos respectivos, la concentración de cada tratamiento se determinó según la concentración de proteínas de estos y los valores del IC_{50} , después se incubaron las placas durante 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se desechó el medio de cada pocillo y se agregó paraformaldehído 4% (PFA) se dejó actuar durante 15 minutos, luego se retiró el PFA y se hizo un doble lavado con 500 µl PBS1X, se desechó el PBS1X se agregó 400 µl de tritón 100X y se dejó actuar durante 8 minutos, se descartó el tritón y se hizo un doble lavado con 500 µl PBS1X, en el lavado final no se desechó el PBS1X y se almacenaron las placas a -20 °C. Posteriormente se desechó el contenido de cada pocillo y se agregó por pocillo 300 µl de anticuerpos monoclonales específicos para cada una de las proteínas (Bax, BCL-2 y p53) en dilución 1:500 y se incubaron en baño maría a 37 °C en agitación constante por 1 h.

Para los tres anticuerpos primarios no conjugados (Bax, BCL-2 y p53) se hizo un lavado con PBS y se añadió 500 µl por pocillo de anticuerpo secundario anti-mouse m-IgGk BP-FITC y m-IgGk BP-PE con una concentración 1:500, se incubaron a 37°C en agitación constante por 30 min. Al terminar las incubaciones se lavaron los pocillos con PBS1X y se retiraron los cubreobjetos de cada pocillo, luego se dejaron secar a temperatura ambiente protegiéndolas de la luz durante 24 horas. Finalmente se añadió en cada placa medio de montaje DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para leer las muestras. Finalmente se colocaron los cubreobjetos en portaobjetos y se sellaron los bordes posteriormente se realizó la lectura en el microscopio invertido de fluorescencia Leica DMi8 con el software X (LAS X).

2.2.13 Real Time (Expresión génica)

Tabla 11. Secuencia de primers utilizados.

Gen	Forward Prime	Reverse Primer
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
ACTINA	CGGTTCCGATGCCCTGAGGCTCTT	CGTCACACTTCATTGATGGAATTGA
BAX	CAAGACCAGGGTGGTTGGG	ATCTTTGTGGCGGGAGTG
Bcl-2	CATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	GCCGGTTCAGGTACTCAGTCA
p53	GACGGTGACACGCTTCCCTGGATT	GGGAACAAGAAGTGGAGAATGTCA

Autor: Jeniffer Williams

Para poder comparar los datos experimentales se realizó una RT-qPCR para el marcaje de Bax, Bcl-2 y p53 de ARN proveniente de las células estudiadas.

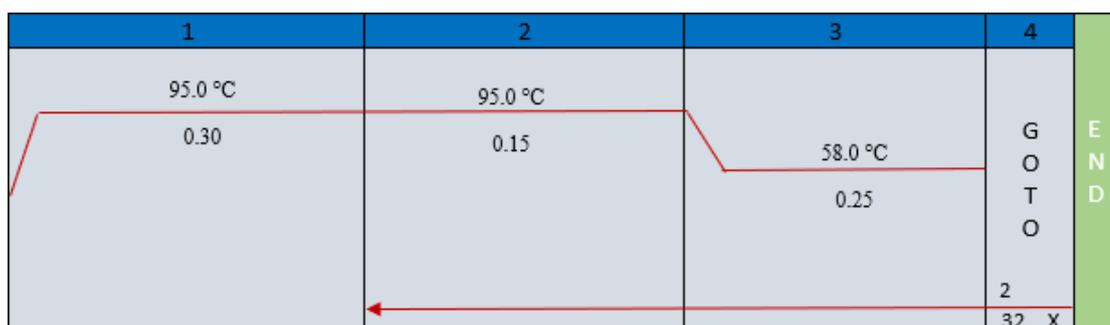
El proceso inicia con la extracción de ARN, para ello se empleó el protocolo PureLink® RNA Mini Kit. Se utilizaron los sobrenadantes celulares de cada extracto almacenados en tubos eppendorf. Inicialmente los sobrenadantes fueron centrifugados durante 5 minutos, después, se descartó el sobrenadante y se trabajó con la suspensión celular restante de cada tubo (dejando un volumen aproximado de 250 µl), a cada tubo de suspensión se le agregó 250 µl de etanol al 70% y se vortizó, inmediatamente la suspensión de cada tubo fue transferida a los tubos de recolección con columna a los cuales se les agregó 500 µl de buffer de lisis (Por cada 1ml de buffer se agrega 10µl de mercaptoetanol), luego, se centrifugaron los tubos a 12000 gravedades durante 1 minuto, se descartaron los tubos de recolección y se transfirieron las columnas a otros tubos nuevos de recolección. Posteriormente, se agregó 500 µl de buffer de lavado I a cada columna y se centrifugó durante 1 minuto a 12000 gravedades, posteriormente, los tubos de recolección fueron desechados, las columnas se las colocó en tubos de recolección nuevos y se les agregó 50 µl del buffer de lavado II (repetiendo el lavado dos veces), se centrifugó a 12000 gravedades durante 1 minuto, se descartaron los tubos de recolección y las columna fueron colocadas en tubos nuevos de recolección (eppendorf). Finalmente, a cada columna se le añadió 100 µl de agua libre de ARNasas y se centrifugó durante 1 minuto, se descartaron las columnas y se conservó el tubo con la suspensión final, se leyó la concentración obtenida de ARN en el Nanodrop (ThermoScientific), se registró el valor de concentración (ng/ul) y se almacenó el tubo a -80 °C (**Purelink®, 2010**).

A partir del ARN se hizo la síntesis del ADN complementario utilizando el protocolo Maxima First Strand cDNA Synthesis (**ThermoScientific**). Para llevar a cabo el protocolo en un tubo eppendorf se agregó 1µl de 10X dsDNase Buffer, 1µl de dsDNase, el templado de ARN y se completó con agua libre de nucleasas hasta los 10 µl. Se mezcló suavemente y se centrifugó alrededor de 1 minuto. Luego se incubó durante 2 minutos a 37°C en el ThermoMixer precalentado. Después se sacó la muestra se dejó enfriar en un bloque de hielo y se la centrifugó para posteriormente volverla a enfriar en el bloque de hielo. A continuación, en ese mismo tubo se agregó 4 µl de 5X ReactionMix, 2 µl de Maxima Enzyme Mix y 4 µl de agua libre de nucleasas se mezcló suavemente y se centrifugo, luego se incubo durante 10 minutos a 25°C.

Seguidamente, se aumentó la temperatura a 50 °C y se dejó incubar durante 15 minutos. Finalmente, para terminar la reacción se aumentó la temperatura a 85°C y se deja incubar durante 5 minutos. Una Vez obtenida la muestra (ADNc) se almacenó a -20°C (Thermo Scientific™, 2019).

Finalmente, para realizar la RT-qPCR se utilizó el protocolo GoTaq® qPCRMaster. Inicialmente en una tira de tubos eppendorf se agregó 10 µl de Mix (2X), 1 µl de Forward Primer, 1 µl de Reverse Primer, 1,6 µl del templado de ADN por cada tubo (según la reacción) y se completó hasta 20 µl con agua libre de ARNasa. Finalmente se sellaron bien las tiras de tubos y se centrifugaron en la centrifuga Corning y se los coloco en el Termal Cycller (CFX96** Real-time System). El procedimiento empleado fue realizado en la cabina de flujo laminar para evitar la degradación del fluoróforo. El equipo CFX96**Real-Time System de Bio-RAD se programó según el protocolo de Promega. Para la temperatura de activación de la polimerasa se empleó una temperatura de 95°C durante 30 segundos, para la desnaturalización del ADN a 95°C durante 15 segundos; para la amplificación 58°C durante 25 segundos en un total de 32 ciclos (Promega GoTaq®, 2014)

Fig.9 Temperatura de reacción para la amplificación de Bcl-2, BAX y p53:
Software Bio-RAD Real-Time CFX96



2.2.14 Diseño experimental

Todos los ensayos planteados en la siguiente investigación se realizaron por duplicado. Las resueltos obtenidos se tabularon y analizaron en el programa GraphPadPrism V7.0 y fueron representados como promedio la media con la desviación estándar ($\bar{x} \pm DS$) Para los diferentes análisis comparativos se utilizó ANOVA de un solo factor y post test de Bonferroni y Tukey, siendo significativos los valores de $p \leq 0.05$.

CAPÍTULO III

REULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de resultados

3.1.1. Análisis fisicoquímico

3.1.1.1 Determinación de sólidos totales (ST) a partir de extractos de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata*.

Se prepararon extractos acuosos con PBS (1:20) a partir de raíces, hojas y tallos pulverizados de las plantas de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata*. En la tabla 12 se presenta la concentración de sólidos totales de cada muestra.

Tabla.12 Concentración de sólidos totales extraídos de los diferentes extractos.

Muestra	Volumen de muestra	Concentración de sólidos totales. (%p/v)	Rendimiento (%)
R-R	25ml	12,64	25,28
R-HT	25ml	8,92	17,84
D-R	25ml	6,8	13,6
D-HT	25ml	6,64	13,28

R-R: *rígida* raíz, **R-HT:** *rígida* hojas y tallos, **D-R:** *decussata* raíz, **D-HT:** *decussata* hojas y tallos.

El rendimiento de sólidos totales (ST) extraídos varía en un rango de 13,28 a 25,28 % p/v. El extracto con mayor rendimiento es R-R (25,28%) y R-HT (17,84) en ambos extractos, el menor rendimiento se presentó en hojas y tallos D-HT 13,28% y R-HT 17,84%. Al analizar los valores generales en relación con los extractos, las concentraciones arrojadas demuestran la presencia de compuestos con una posible actividad biológica.

El porcentaje de rendimiento para ambas Valerianas fue bajo, lo cual pudo ser ocasionado por el solvente empleado (agua). El agua al ser un compuesto polar tendrá afinidad con los compuestos con alta solubilidad como; iridoides y saponinas, mientras que los compuestos apolares no tendrán afinidad para ser extraídos dentro de este grupo se encuentran los sesquiterpenos. La diferencia de rendimiento depende en gran parte de la composición fitoquímica de cada especie de valeriana.

3.1.2 Actividad citotóxica

Una vez realizado el ensayo de citotoxicidad para los extractos de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata* a partir del ensayo MTT en diluciones logarítmicas desde 1×10^0 hasta 1×10^{-8} se obtuvieron gráficos que muestran las variaciones de la densidad óptica en función de las diferentes concentraciones de los extractos.

El ensayo se realizó por duplicado, los extractos presentaron el mismo comportamiento en ambos ensayos, por lo tanto, se estableció el IC_{50} alrededor de la dilución logarítmica de 10^{-3} .

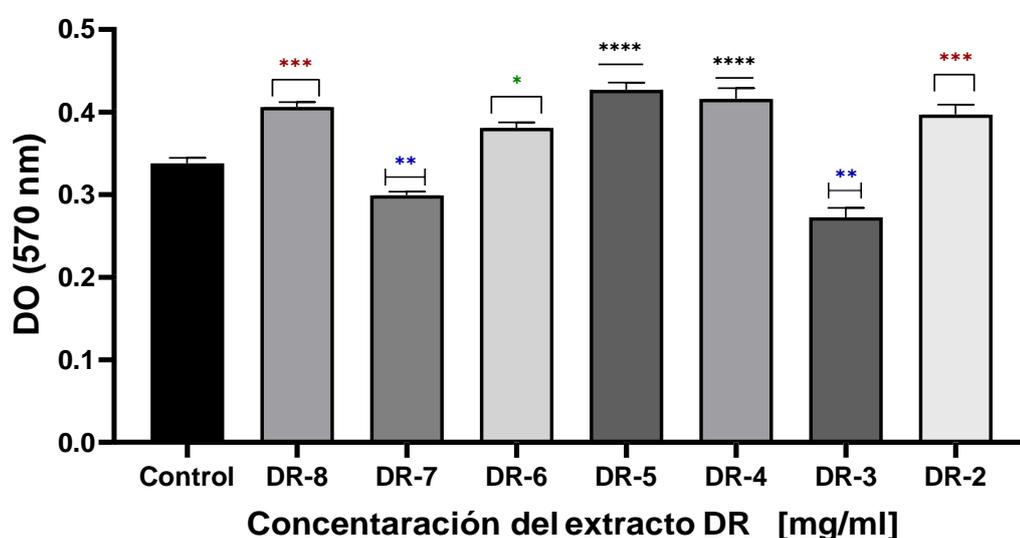


Fig.10 Ensayo de citotoxicidad del extracto de *Valeriana decussata* raíz (DR) sobre células MCF-7: Medias y desviaciones estándar ($\bar{x} \pm DS$) obtenidas a partir de la densidad óptica (~cantidad de células vivas) en función de la concentración celular de diluciones seriadas del extracto DR en la proliferación de células MCF-7; el control contiene células MCF-7 en ausencia de extracto. Se realizó una prueba ANOVA para determinar la significancia estadística (DR: F:41,17, P:< 0.0001; grados de libertad = 7 para tratamientos y 24 para residuales) seguido de la prueba de Tukey ($\alpha= 0,05$, *P=<0.05; **P=<0.01; ***P<0.001; ****P<0,0001).

En la figura 10 se observa que las células en presencia del extracto presentaron diferencia significativa al compararlas con el control, la proliferación celular no presentó una disminución significativa en todas las muestras ante el efecto del extracto.

Sin embargo, al comparar la dilución logarítmica 10^{-3} con el control se obtuvo un valor de significancia **P=<0.01 y una media de 0,2725 por debajo de la media control (0,338).

Es decir, a esta concentración se obtuvo la mayor inhibición de la proliferación celular. Además, se observó mayor proliferación celular en las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-8} (**** $P < 0,0001$) es decir, con la disminución gradual del extracto la proliferación fue aumentando, Sin embargo, en la dilución 10^{-2} del extracto de DR también de evidenció un aumento en la proliferación celular independiente de la concentración (*** $P < 0,0001$).

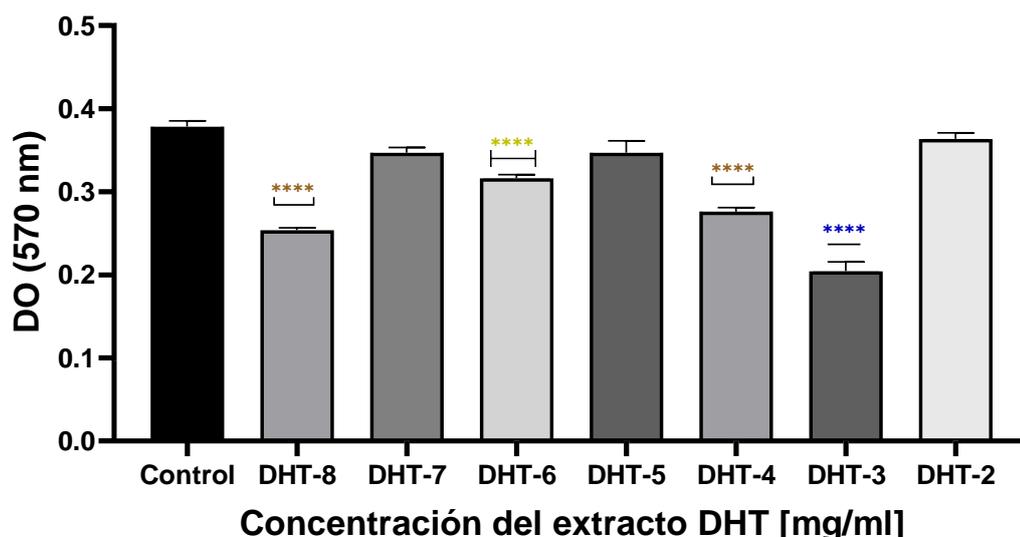


Fig.11 Ensayo de citotoxicidad del extracto de *Valeriana decussata* hojas y tallos (DHT) sobre células MCF-7:Medias y desviaciones estándar ($\bar{x} \pm DS$) obtenidas a partir de la densidad óptica (~cantidad de células vivas) en función de la concentración celular de diluciones seriadas del extracto DHT en la proliferación de células Mcf-7; el control contiene células MCF-7 en ausencia de extracto. Se realizó una prueba ANOVA para determinar la significancia estadística (DHT: $F:57,59$, $P < 0.0001$; grados de libertad = 7 para tratamientos y 24 para residuales) seguido de la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$, **** $P < 0,0001$).

En la figura 11 se obtuvo una diferencia significativa en cuanto a la disminución de la proliferación celular para las diferentes diluciones logarítmicas del extracto de DHT. Al comparar el valor de la media control 0,37825 con cada dilución, los valores más bajos estuvieron presentes en las diluciones logarítmicas 10^{-3} y 10^{-8} (0,2042 y 0,2535) lo cual, es un indicativo de que la proliferación celular disminuye de manera dependiente de la concentración del extracto. Así mismo los niveles de significancia fueron menores en estas muestras (**** $P < 0,0001$). También existieron muestras que no presentaron una diferencia significativa ($P > 0.05$) y los valores de las medias estuvieron semejantes a la media del control.

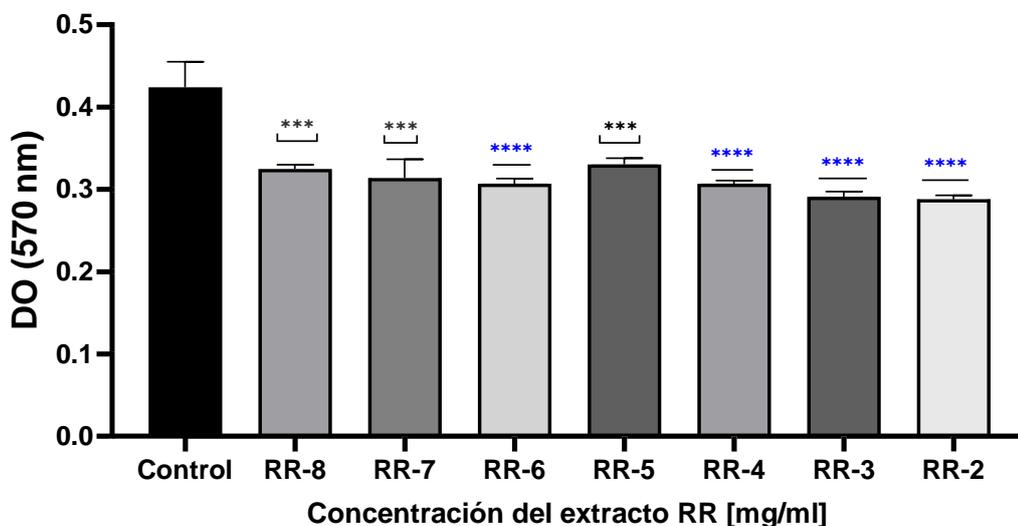


Fig.12 Ensayo de citotoxicidad del extracto de *Valeriana rígida* raíz (RR) sobre células MCF-7: Medias y desviaciones estándar ($\bar{x} \pm DS$) obtenidas a partir de la densidad óptica (~cantidad de células vivas) en función de la concentración celular de diluciones seriadas del extracto RR en la proliferación de células MCF-7; el control contiene células MCF-7 en ausencia de extracto. Se realizó una prueba ANOVA para determinar la significancia estadística (RR: F:9,022, P:< 0.0001; grados de libertad = 7 para tratamientos y 24 para residuales) seguido de la prueba de Tukey ($\alpha= 0,05$, ***P<0,001; ****P<0,0001).

En la figura 12 al comparar las células control Vs las células tratadas con extracto de RR se observa la disminución en la proliferación celular, obteniendo una alta diferencia significativa ****P<0,0001; ***P<0,001 para las diferentes diluciones logarítmicas del extracto. Los resultados mostraron que la proliferación celular más baja se evidenció en la dilución logarítmica 10^{-2} con una media de 0,288 por debajo de la media control (0,424), las demás diluciones logarítmicas también presentaron el mismo comportamiento. Además, al comparar los niveles de significancia todas las muestras presentaron la misma tendencia perteneciendo al mismo grupo con medias inferiores a la media control.

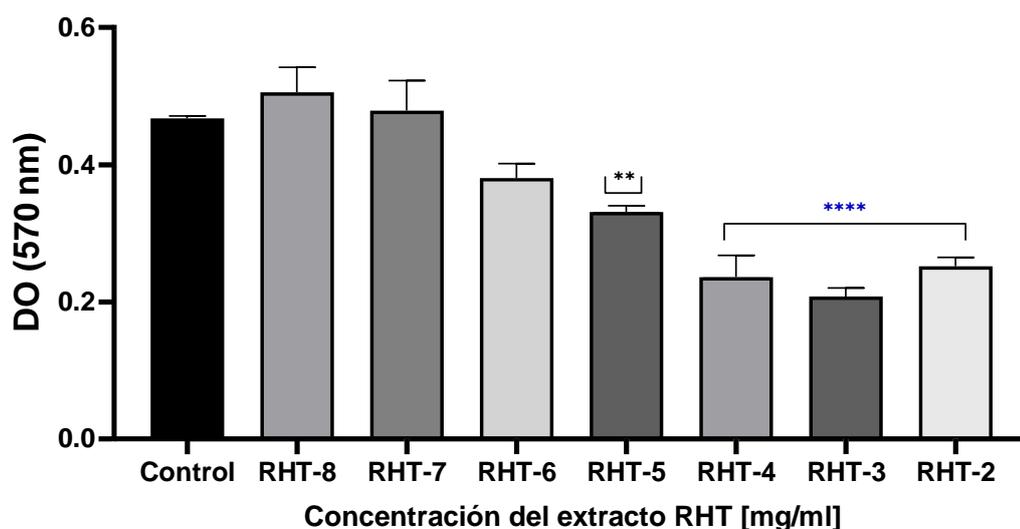


Fig.13 Ensayo de citotoxicidad del extracto de *Valeriana rigida* hojas y tallos (RHT) sobre células MCF-7: Medias y desviaciones estándar ($\bar{x} \pm DS$) obtenidas a partir de la densidad óptica (~cantidad de células vivas) en función de la concentración celular de diluciones seriadas del extracto RHT en la proliferación de células MCF-7; el control contiene células MCF-7 en ausencia de extracto. Se realizó una prueba ANOVA para determinar la significancia estadística (RHT: F:9,022, P:< 0.0001; grados de libertad = 7 para tratamientos y 24 para residuales) seguido de la prueba de Tukey ($\alpha= 0,05$, **P<0,05; ****P<0,0001).

En la figura 13 se obtuvieron valores de significancia altos ****P<0,0001 con las células tratadas en relación con el control, esto evidencio una disminución en la proliferación celular. Se observan variaciones en la proliferación independientemente de la concentración del extracto de RHT. Así mismo, la menor proliferación celular se localizó a partir de la dilución logarítmica 10^{-2} (****P<0,0001). Sin embargo, la dilución 10^{-3} fue la que presentó mayor inhibición de células MCF-7 con una media de 0,20755 por debajo de la media control 0,4675. Es importante señalar que el comportamiento fue heterogéneo en todas las muestras, las diluciones logarítmicas 10^{-8} y 10^{-7} y 10^{-6} mostraron medias superiores a la media control 0,5055, 0,4787 y 0,3802 respectivamente y no presentaron diferencia significativa (P>0.05)

Las figuras 10,11, 12 y 13 muestran las medias, desviaciones estándar y los niveles de significancia a partir de las variaciones en la densidad óptica en función de la concentración de los extractos de valeriana.

En todos los extractos de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata* se evidenció disminución en la proliferación celular. Sin embargo, el extracto DR presentó diferencia significativa (****P<0,0001) para el aumento de la proliferación celular al comparar los valores de las $\bar{x} \pm DS$ con las células control. Para los extractos restantes la concentración óptima para la inhibición de la proliferación celular fue en la dilución logarítmica 10^{-3} obteniendo valores con diferencia significativa para DR (***P<0,001), RR (****P<0,0001) y RHT (****P<0,0001). A diferencia de RR cuyo comportamiento inhibió la proliferación celular en la dilución logarítmica 10^{-2} (****P<0,0001) . Las diluciones logarítmicas diferentes a las mencionadas presentaron comportamientos muy variados, algunas tuvieron comportamiento similar a las células control incluso con mayor proliferación (P>0,05). Independientemente de la concentración estas variaciones sirven como indicador para determinar una concentración óptima que disminuya la proliferación celular y que el extracto pueda inducir actividad citotóxica en las células cancerígenas Mcf-7.

El ensayo de MTT evidenció el efecto en la proliferación celular y el bajo nivel de citotoxicidad en los diferentes extractos, mostrando el comportamiento y funcionabilidad de las células MCF-7 sometidas a tratamiento (Navarro & Ginebra, 2005). Los extractos inhiben la proliferación celular de forma dependiente a una concentración determinada en la dilución logarítmica 10^{-3} (Amiri & Namavari, 2015). Al comparar el comportamiento celular con los diferentes extractos se evidencio que para ambas valerianas se obtuvieron mejores resultados en los extractos a partir de hojas y tallos esto puede ser ocasionado por la concentración inicial del extracto o la composición de compuestos que inhiben la proliferación celular.

La proliferación evidenciada en concentraciones logarítmicas diferentes a 10^{-3} posiblemente pudo ser ocasionadas por la interacción entre las células y el extracto acuoso como lo menciona Flores & Martínez, 2019 dependiendo del tipo de planta y el extracto acuoso que se utilice la proliferación celular variara para diferentes concentraciones, es decir no se mantiene una tendencia fija. (Flores, Martínez, Ruiz, & Reyes, Leyva., 2019). Esta variación puede ser ocasionada como una respuesta de las células ante sustancias extrañas que considera como peligrosas para su interior y la activación de proteínas antiapoptóticas.

3.1.3 Inmunohistoquímica

Mediante el método Bradford se obtuvo las concentraciones de proteínas para los extractos. DR (4 mg/μl) DHT (6,3 mg/μl) RHT (3,6 mg/μl) y RR (3,2 mg/μl) para llevar a cabo el ensayo de Inmunohistoquímica.

3.1.3.1 Expresión de p53 en células mcf-7 con extractos de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata*

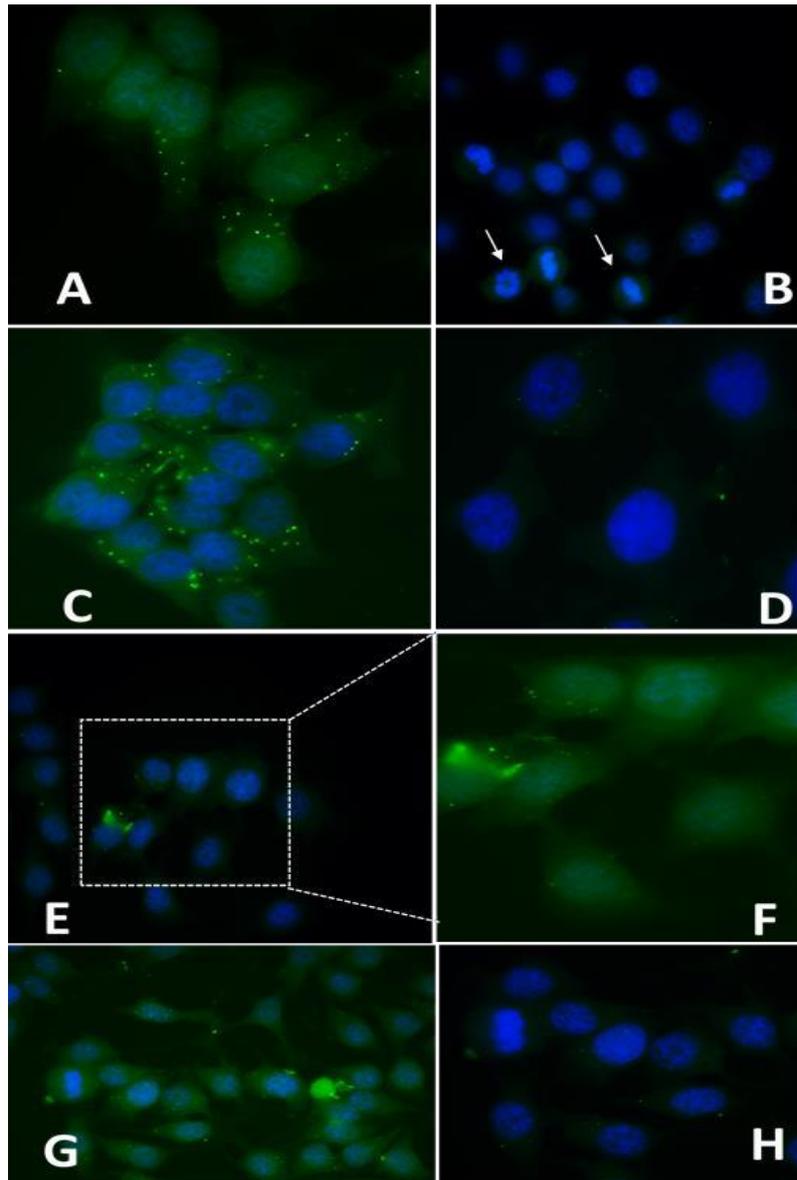


Fig.14 Expresión de la proteína p53 en células MCF-7 con extracto de *Valeriana decussata* raíz (DR) magnificación 630X. Las células con expresión de p53 fueron teñidas con el anticuerpo específico anti-mouse m-IgGkBP marcado con FITC y leído en los filtros GFP (475-509 nm) y DAPI (489-513nm). Las flechas indican núcleos de células apoptóticas. Control (A,B,C y D) extracto DR (E,F,G y H).

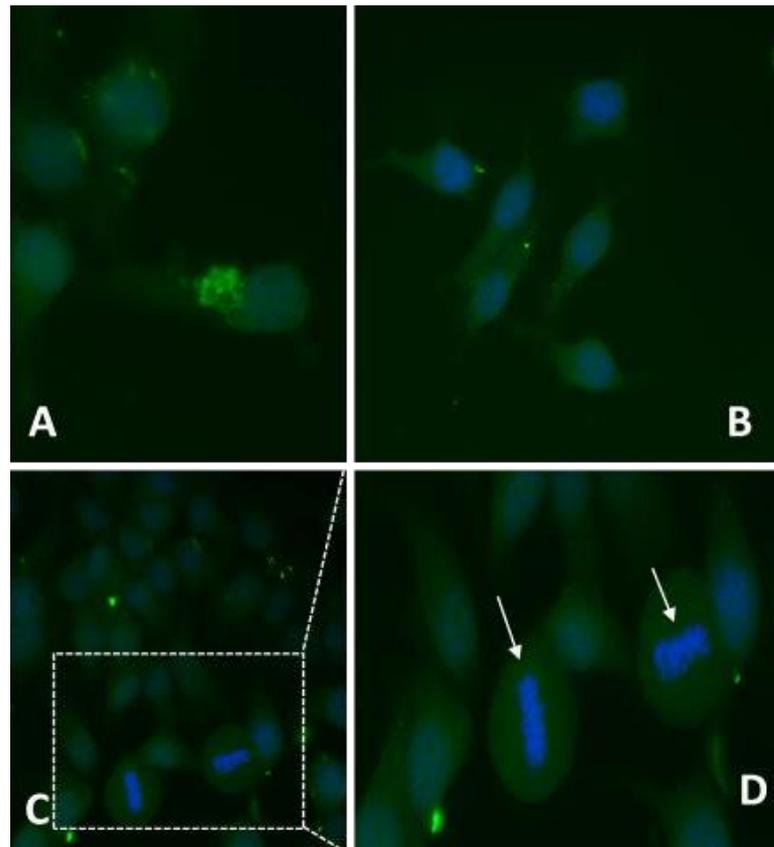


Fig.15 Expresión de la proteína p53 en células MCF-7 con extracto de *Valeriana decussata* hojas y tallos (DHT) magnificación 630X. Las células con expresión de p53 fueron teñidas con el anticuerpo específico anti-mouse m-IgGk BP marcado con FITC y leído en los filtros GFP (475-509 nm) y DAPI (489-513nm). Las flechas indican núcleos de células apoptóticas. Extracto DHT (A,B,C y D)

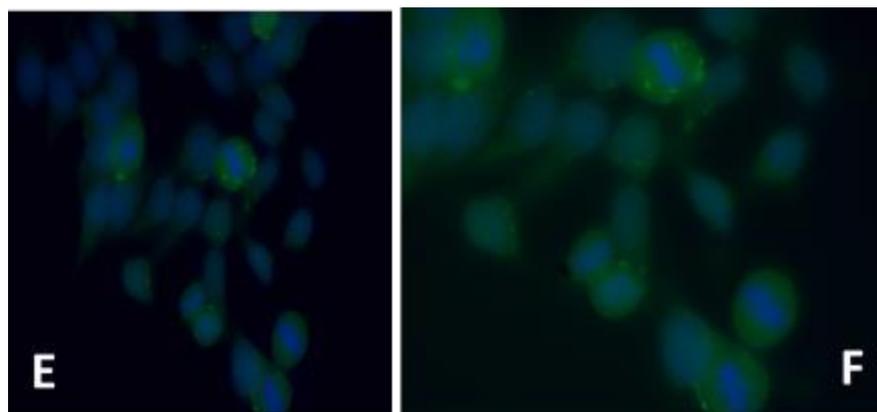


Fig.16 Expresión de la proteína p53 en células MCF-7 con extracto de *Valeriana rígida* raíz (RR) magnificación 630X. Las células con expresión de p53 fueron teñidas con el anticuerpo específico anti-mouse m-IgGk BP marcado con FITC y leído en los filtros GFP (475-509 nm) y DAPI (489-513nm). Extracto RR (E,F)

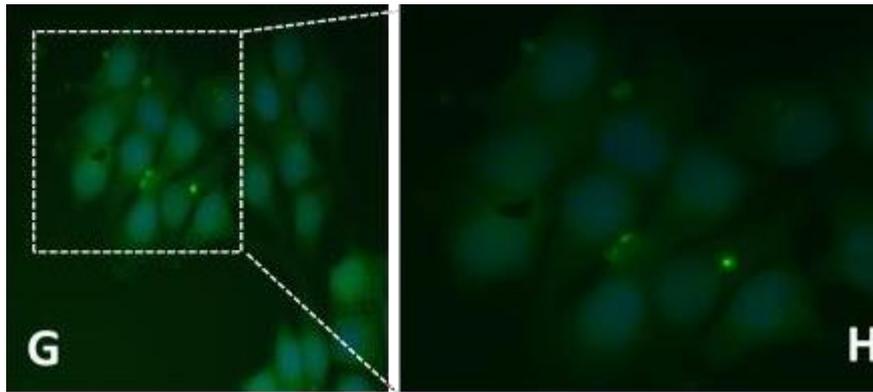


Fig.17 Expresión de la proteína p53 en células MCF-7 con extracto de *Valeriana rígida* hojas y tallos (RHT) magnificación 630X. Las células con expresión de p53 fueron teñidas con el anticuerpo específico anti-mouse m-IgGk BP marcado con FITC y leído en los filtros GFP (475-509 nm) y DAPI (489-513nm). Extracto RR (G,H)

En las figuras 14,15,16 y 17 se observa la expresión de p53 en el control celular y en las células tratadas con extractos de *Valeriana rígida* y *decussata*. Al comparar las células control vs DR y DHT se visualiza una mayor expresión de p53 en las células control, sin embargo, las células tratadas con DHT mostraron una alta expresión de la proteína y un patrón morfológico compatible con células apoptóticas. Para los extractos de RR y RHT la intensidad de expresión de p53 es menor al control, pero ambas presentaron expresión similar de esta proteína.

La proteína p53 cumple diversas funciones biológicas y es un factor indispensable en los procesos intra y extracelulares. En el presente estudio se evaluó la capacidad de inducción al suicidio celular apoptótico. Diferentes factores de estrés inducen que la proteína p53 cruce a la mitocondria y active la expresión de genes proapoptóticos e inhiba la expresión de genes antiapoptóticos (Wawryk et al., 2014). Un estudio realizado en células Mcf-7 con extracto de *Trifolium Pratens L.* demostró que inducía apoptosis mediante la regulación de la proteína p53 de manera dependiente de la dosis y el tiempo del extracto induciendo autofagia y apoptosis (Khazaei & Pazhouhi, 2019).

Es necesario profundizar el análisis de la expresión de p53, sin embargo, de todos los extractos DHT presento mayor intensidad de expresión posiblemente por la concentración inicial empleada para el ensayo de inmunohistoquímica. El nivel de expresión cuantitativo y cualitativo de p53 según diferentes estudios varía en la interacción de p53 con otro tipo de proteínas del ciclo celular y la interacción que presenten en presencia de sustancias extrañas, medicamentos o compuestos químicos (López Castiblanco & Rangel Ardila, 2020).

3.1.3.2 Expresión de la proteína Bcl-2 en células MCF-7 con extractos de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata*

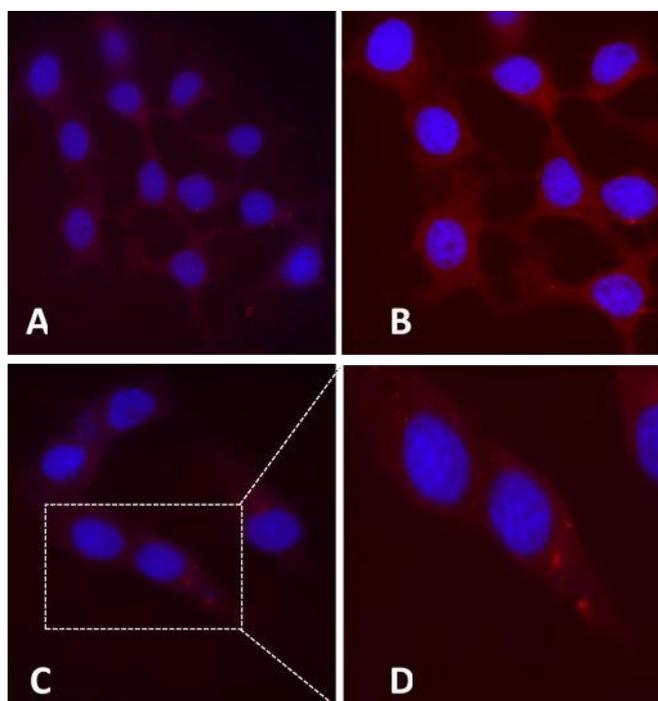


Fig.18 Expresión de la proteína Bcl-2 en células MCF-7 magnificación 630X. Las células con expresión de Bcl-2 fueron teñidas con el anticuerpo específico anti-mouse m-IgGk BP marcado con PE y leído en los filtros Texa red (595-615 nm) y DAPI (489-513nm). Control (A,B,C y D)

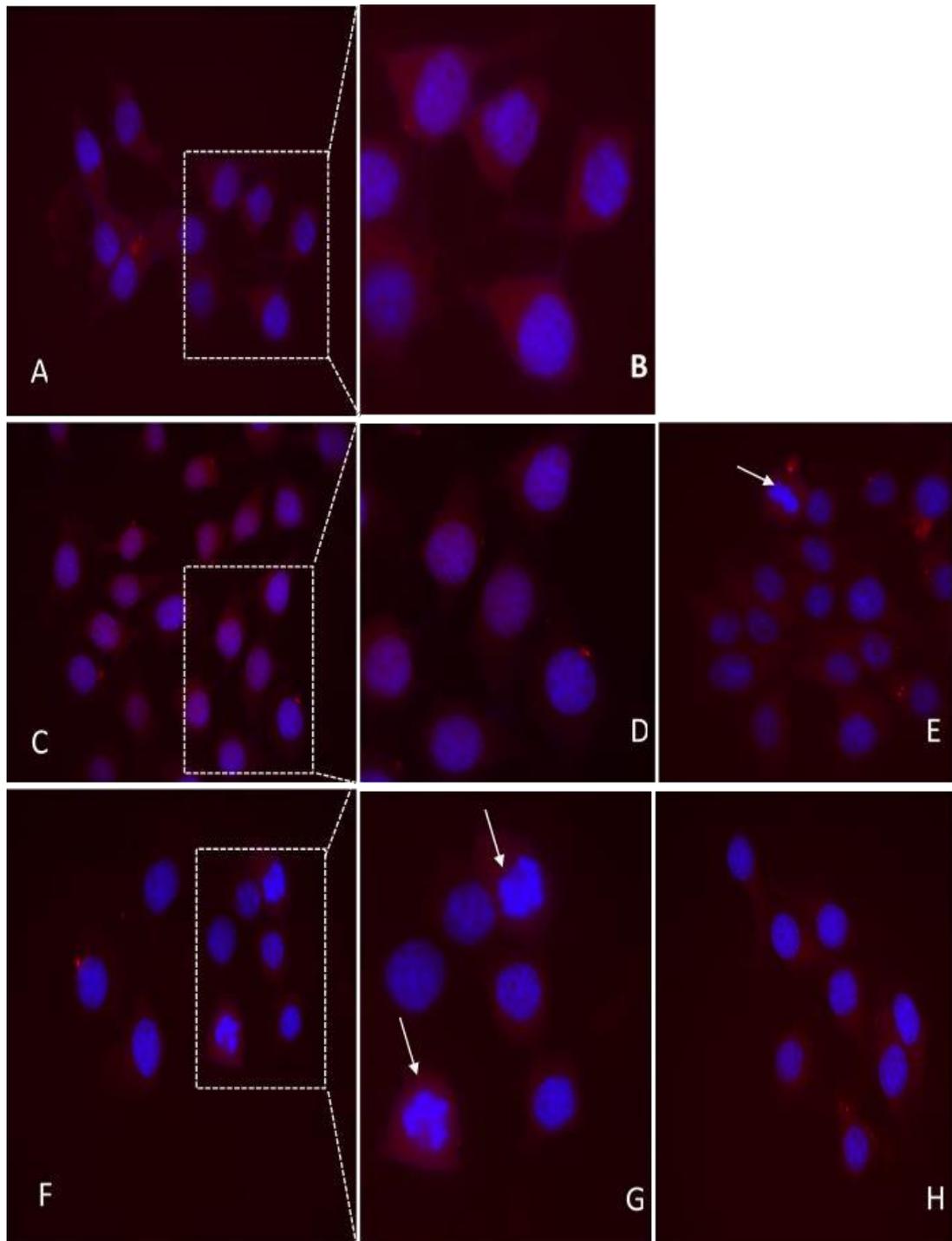


Fig.19 Expresión de la proteína Bcl-2 en células MCF-7 con extracto de *Valeriana decussata* raíz (DR), hojas y tallos (DHT) magnificación 630X. Las células con expresión de Bcl-2 fueron teñidas con el anticuerpo específico anti-mouse m-IgGk BP marcado con PE y leído en los filtros Texa red (595-615 nm) y DAPI (489-513nm). Las flechas indican núcleos de células apoptóticas. DR (A,B,C y D), DHT (E,F,G y H) .

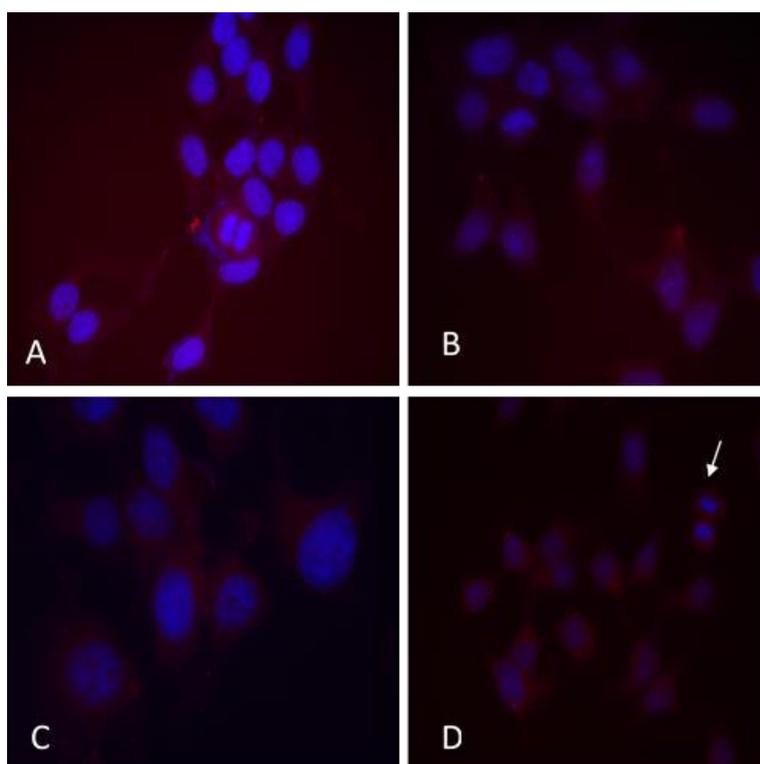


Fig.20 Expresión de la proteína Bcl-2 en células MCF-7 con extracto de *Valeriana rígida* raíz (RR) y hojas y tallos (RHT) magnificación 630X. Las células con expresión de Bcl-2 fueron teñidas con el anticuerpo específico anti-mouse m-IgGk BP marcado con PE y leído en los filtros Texa red (595-615 nm) y DAPI (489-513nm). Las flechas indican núcleos de células apoptóticas. RR (A y B) RHT (C y D).

En el análisis cualitativo general se observó que no existe un nivel alto de expresión de la proteína Bcl-2 en comparación con las células control MCF-7. Sin embargo, si se visualizó en la figura 19 (F y G) y en la figura 20 que en los tratamientos de DHT y RR respectivamente, las células presentaron características morfológicas compatibles con el proceso de apoptosis, lo cual permite inferir una posible apoptosis tardía. Es importante recalcar que para la inducción de apoptosis la proteína Bcl-2 debe estar regulada con BAX para así evitar su sobreexpresión, ya que ocasionaría un incremento en la proliferación celular confiriendo resistencia a diferentes estímulos apoptóticos.

3.1.3.4 Expresión de la proteína Bax en células MCF-7 con extractos de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata*

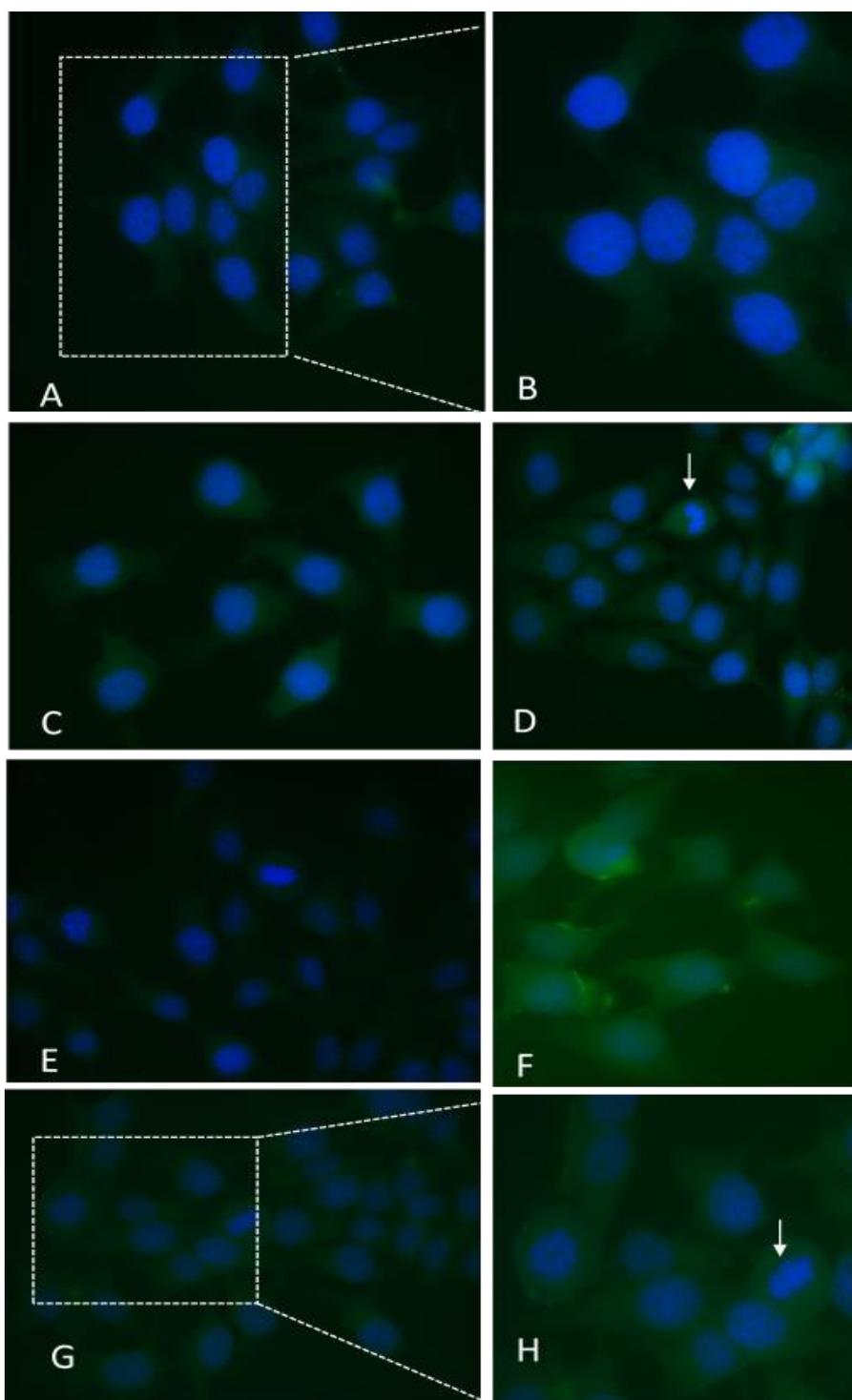


Fig.21 Expresión de la proteína Bax en células MCF-7 con extracto de *Valeriana decussata* raíz (DR), hojas y tallos (DHT) magnificación 630X. Las células con expresión de p53 fueron teñidas con el anticuerpo específico anti-mouse m-IgGk BP marcado con FITC y leído en los filtros GFP (475-509 nm) y DAPI (489-513nm). Las flechas indican núcleos de células apoptóticas. Control (A,B,C y D) extracto DR (E y F) DHT(G y H).

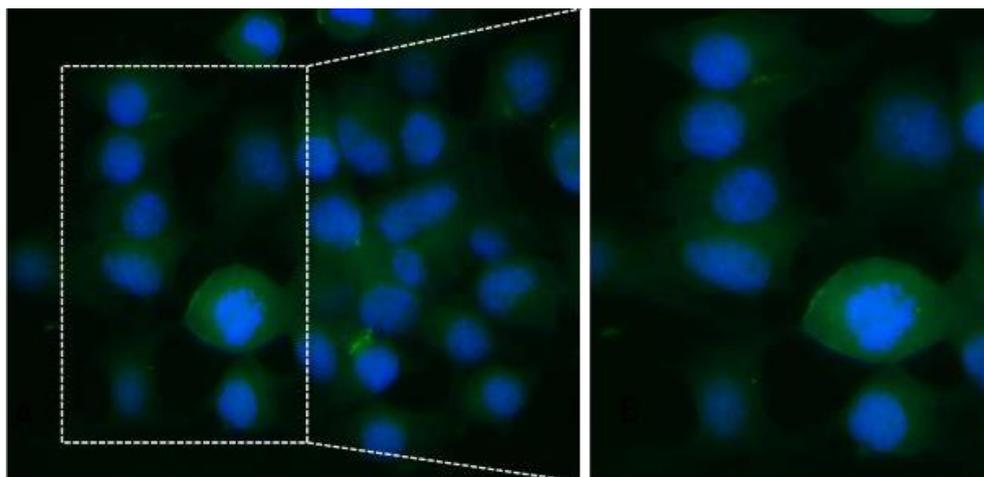


Fig.22 Expresión de la proteína Bax en células MCF-7 con extracto de *Valeriana rígida* raíz (RR) magnificación 630X. Las células con expresión de p53 fueron teñidas con el anticuerpo específico anti-mouse m-IgGk BP marcado con FITC y leído en los filtros GFP (475-509 nm) y DAPI (489-513nm).

En el análisis cualitativo de la expresión de Bax se pudo observar que las células con tratamiento mostraron un patrón de expresión similar a las células control. Sin embargo, al comparar los extractos la mayor expresión se visualizó en DHT (Figura 21-G). Es importante mencionar que tanto el control como los extractos de DR,DHT,RR y RHT las células presentaron núcleos agigantados, condensados y con variación morfológica lo que induce a una posible apoptosis tardía.

La relación de las proteínas Bcl-2 y Bax es muy importante en la activación de la apoptosis ya que está depende de la regulación de ambas. Bcl-2 es una familia de proteínas que presenta actividad pro o antiapoptótica lo que ha generado el estudio de su regulación en la apoptosis y la respuesta celular ante diferentes terapias contra el cáncer. La expresión de Bcl-2 como se ha mencionado anteriormente puede inducir o reprimir la liberación de factores indispensables para la apoptosis como; citocromo c y el AIF (Factor inductor de apoptosis) (Condori & Oviedo, 2017). La proteína proapoptótica Bax es una subfamilia homóloga de Bcl-2, para que se desencadene la apoptosis es necesario la regulación de Bax/Bcl-2. Bax tiene como función principal la permeabilidad de la mitocondria. Estudios realizados por Hussein & Chhavi, 2015 demostraron que la inducción de apoptosis de células MCF-7 era ocasionada por la regulación de Bax (Hussain, Chhavi, Saniyah, Kruti, & Shafiul, 2015)

Lo cual está relacionado con la inducción apoptótica de p53 que regula a otras proteínas proapoptóticas como Bax. Según los diferentes análisis cualitativos Bax y Bcl-2 no presentaron una diferencia aparentemente significativa, lo cual no es un indicativo de que los tratamientos con los diferentes extractos no tengan efecto en las células Mcf-7 o no induzcan a la apoptosis ya que en diferentes células se pudo observar la posible apoptosis tardía, he ahí la importancia de hacer estudios cuantitativos.

3.1.4 Expresión génica

A continuación, se presenta la expresión relativa de los genes de Bax, Bcl-2 y p53 en células Mcf-7 tratadas con los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*, calculada mediante el método de Ct en base a la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$

Como se observa en la figura 23 el gen de control endógeno GAPDH no presenta mucha variación en su expresión génica después de la aplicación de los tratamientos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*. La relación de la media con los diferentes promedios de los Cts obtenidos en la RT-qPCR para cada extracto presentaron variaciones significativas $P < 0,05$.

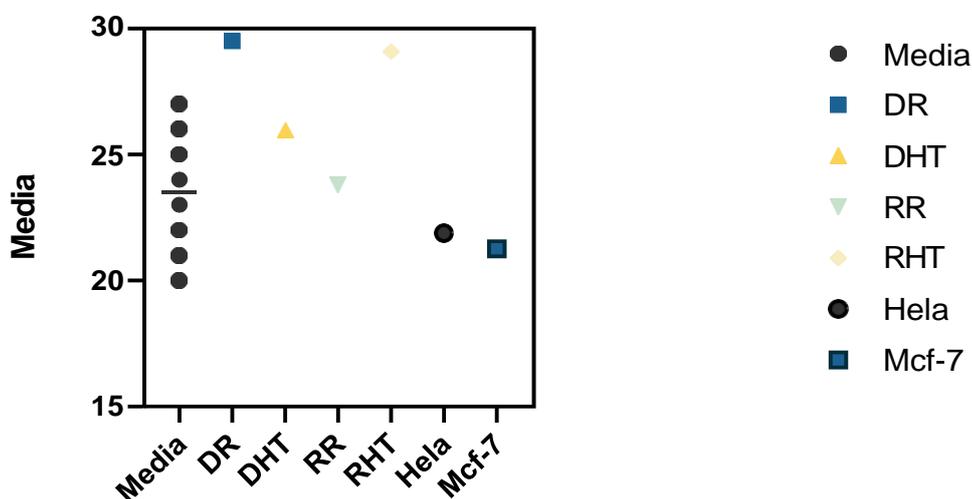


Fig.23 Análisis de los valores de Ct obtenidos para el gen GAPDH: Se analizó y validó GAPDH como gen calibrador y de referencia ya que no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control ($P < 0,05$) las medias de las diferentes muestras estuvieron en el margen de la media para GAPDH.

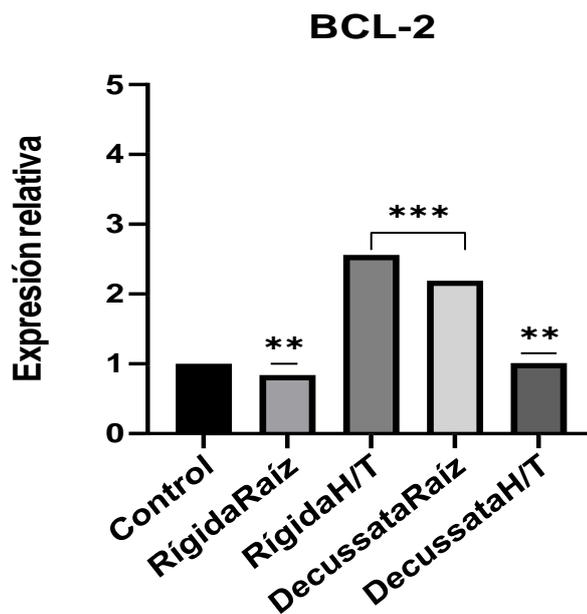


Fig.24 Expresión relativa normalizada de la proteína Bcl-2 según el método $\Delta\Delta Ct$: Se compara la expresión relativa del gen endógeno GAPDH vs la expresión génica de las células MCF-7 en presencia de los diferentes tratamientos y el control de células MCF-7 en ausencia del extracto; Se realizó una prueba ANOVA para determinar la significancia estadística ($P < 0.001$) seguido de la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$, $***P < 0,001$; $**P < 0,01$). Se observa variación en la expresión génica cuando las células son tratadas con los extractos.

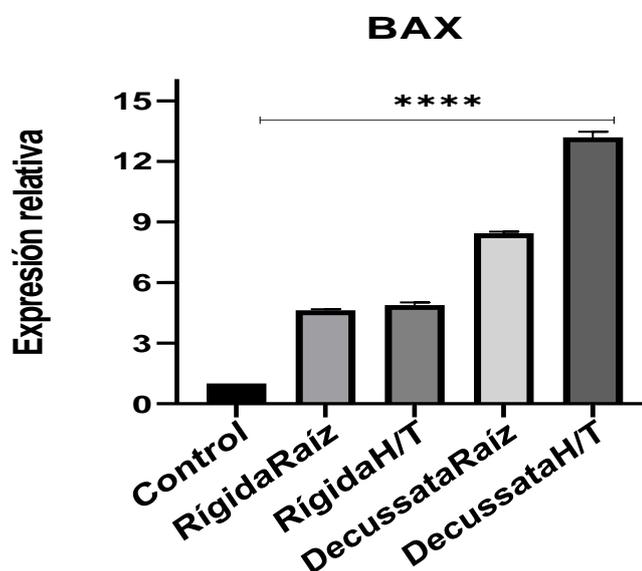


Fig.25 Expresión relativa normalizada de la proteína Bax según el método $\Delta\Delta Ct$: Se compara la expresión relativa del gen endógeno GAPDH vs la expresión génica de las células MCF-7 en presencia de los diferentes tratamientos y el control de células MCF-7 en ausencia del extracto; Se realizó una prueba ANOVA para determinar la significancia estadística ($P < 0.0001$) seguido de la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$, $****P < 0,0001$). Se observa variación en la expresión génica cuando las células son tratadas con los extractos.

Normalizar la cuantificación proporciona información de la expresión de un gen relativamente. Es decir, se puede evaluar la expresión de un gen respecto a su gen calibrador, los valores obtenidos de Ct representa las veces que se expresa más el gen diana al gen calibrador (control). Existe representación idéntica cuando se expresan valores igual a uno, del gen diana con relación al gen calibrador, valores diferentes de uno, representan un nivel de expresión menor del gen diana frente al calibrador y valores superiores a uno representa mayor expresión del gen diana sobre el calibrador **(Castanera, 2011)**.

Los resultados muestran variaciones en la expresión génica de las proteínas que inducen la apoptosis, con un aumento de Bax/Bcl-2 lo que pronosticaría la inducción apoptosis, sin embargo, la proteína p53 no se expresó en las células con extractos de valeriana esto pudo ser ocasionado por la interacción de los compuestos presentes en las especies de valeriana que indujeron a la activación de proteínas celulares que inhibieron el funcionamiento de p53 **(Chuaqui F, Cuello F, & Emmert-Buck, 1999)**. También es importante considerar que compuestos como el Valtrato presente en valerianas hacen que la muerte celular sea independiente de p53 y activan otras moléculas que inducen apoptosis. Estas variaciones de expresión pueden ser ocasionados por fitocompuestos presentes en las raíces, hojas y tallos de las Valerianas he ahí la importancia de haber realizado la siguiente investigación. Sin embargo, es necesario profundizar la composición química y los grupos funcionales presentes en las diferentes especies de Valeriana que estarían induciendo directamente en la capacidad proapoptótica de las células Mcf-7.

En la actualidad las investigaciones de extractos naturales para la terapéutica del cáncer han aumentado. Un estudio comparativo de los efectos de la apoptosis y necrosis inducidos por el extracto de raíz de *Arctium Lappa* y la doxorubicina en células MCF7 y MDA-MB-231 demostró que el extracto de raíz tuvo un efecto antiproliferativo dependiente de la dosis y el tiempo de exposición al extracto igual a la doxorubicina que es un fármaco convencional de la quimioterapia, lo cual es un gran hallazgo para la terapéutica del cáncer **(Fereshteh et al., 2017)**.

En otra investigación se evaluó el potencial anticancerígeno y antimutagénico del extracto de *Bauhinia variegata* en ratones albinos suizos, la investigación se la realizó con las hojas de la planta, como resultado se obtuvo el retraso en la fase de promoción de carcinogénesis, reducción en la carga tumoral y en la incidencia de tumores **(Agrawal & Pandey, 2009)**. Se han realizado extractos a partir de semillas de *Petroselinum sativum* que presentan actividad anticancerígena en células de cáncer de mama, los ensayos proapoptóticos a diferentes concentraciones disminuyeron la viabilidad celular y los ensayos por microscopia invertida mostraron alteraciones morfológicas en las células de manera dependiente de la concentración induciendo la muerte celular. **(Farshori et al., 2013)**

En la actualidad, no se conoce a profundidad un efecto real de la Valeriana sobre células cancerígenas, pero se han llevado investigaciones que han obtenido buenos resultados por su citotóxica *in vitro* en las células neoplásicas. Su uso terapéutico se ha limitado al sistema nervioso para el tratamiento del insomnio y la ansiedad. Sin embargo, la Valeriana tiene compuestos que potencian la interacción sinérgica de otros medicamentos depresores del SNC induciendo a la eficacia del tratamiento **(Ugalde et al., 2005)**. También existen investigaciones de la inducción de la actividad ansiolítica, la relación con el efecto del ácido valproico y la interferencia del ácido acetoxivalerénico. Garrido en el 2007 determinó por la técnica de cromatografía de gases que la *Valeriana Prionophylla* contiene ácido valerénico, acetoxivalerénico e hidroxivalerénico y los Valepotriatos. La cantidad de compuestos y ácidos tuvo diferencias en función de los extractos a partir de hojas y raíces **(Garrido, 2007)**.

En base a las siguientes investigaciones se recomienda ampliar los estudios cuantitativos para tratar de homogenizar los resultados obtenidos en la expresión génica como en la expresión a través de la inmunohistoquímica para proponer un esquema terapéutico en el que se pueda estudiar la composición de las especies de Valeriana.

3.2 Verificación de hipótesis

Al analizar la expresión génica de las proteínas Bax, Bcl-2 y p53 las cuales juegan un papel importante dentro de la apoptosis se evidenció un aumento en la expresión al comparar las células control con las células tratadas con los diferentes extractos de Valeriana, por lo tanto, los resultados obtenidos permiten aceptar la hipótesis alternativa.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se determinó que los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* poseen efecto pro-apoptótico sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7.
- Mediante el ensayo Inmunohistoquímico se evaluó que la expresión de las proteínas p53, Bax y Bcl-2 presentaron una expresión variable, sin reducción aparente de Bcl-2 cuando son sometidas a tratamientos a base de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*.
- Por medio del análisis del efecto *in vitro* de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* se estableció la concentración óptima para cada tratamiento.
- En función de los resultados obtenidos se puede inferir que las diferentes especies de *Valeriana* estudiadas contienen compuestos que inducen la apoptosis en células cancerígenas, sin embargo, se requiere una mayor cantidad de estudios cuantitativos que permitan esclarecer el mecanismo de acción, para que a futuro se diseñen compuestos bioactivos que sean empleados para optimizar la terapéutica del cáncer.

4.2 Recomendaciones

- Analizar y evaluar la capacidad citotóxica *in vitro* de los diferentes compuestos presentes en *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*, tales como, proteínas, iridoides activos, ácido valérico y valtrato.
- Evaluar otras proteínas presentes en la cascada apoptótica para determinar estímulos apoptóticos en las células.
- Realizar estudios de apoptosis tardía para evaluar el efecto de los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* en las células MCF-7.
- Elaborar análisis cuantitativos de la expresión de las proteínas bajo el efecto de los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acosta, M. (2018). *Evaluación de la capacidad citotóxica y proapoptótica del látex de Brosimum utile (Sande) sobre células HeLa como posible alternativa terapéutica para el tratamiento del cáncer de cuello uterino*. Ambato.
- Agrawal, R. C., & Pandey, S. (2009). Anticarcinogenic and Antimutagenic Potential of Bauhinia variegata in Swiss Albino Mice Asian Pacific. In *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* (Vol. 10).
- American Cancer Society. (2019). Tipos de cáncer de seno. Retrieved February 4, 2020, from <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/tipos-de-cancer-de-seno.html>
- Amiri, A., & Namavari, M. (2015). Inhibitory Effects of Cyrtopodion scabrum Extract on Growth of Human Breast and Colorectal Cancer Cells. Retrieved August 8, 2020, from http://journal.waocp.org/article_30471_d5982a77f5d573c56e0c31ef653a785f.pdf
- Barrera, R., Peralta, O., & Madrid, V. (2010). BASES MOLECULARES DE LA INMUNOLOGIA DEL CANCER. *Salud Pública de México*, 52(4), 344–353. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342010000700011>
- BioCáncer. (2012). 2.1 Iniciación. Retrieved January 8, 2020, from Revista Virtual de Formación en Oncología website: <http://www.biocancer.com/journal/806/21-iniciacion>
- BREASTCANCER. (2015). Estadios del cáncer de mama. Retrieved February 5, 2020, from <https://www.breastcancer.org/es/sintomas/diagnostico/estadios>
- Cajaraville, J., Carreras, J., Massó, M., & Támes, G. (2001). *Oncología*. 3–4. Retrieved from https://www.segg.es/download.asp?file=/tratadogeriatría/PDF/S35-0574_III.pdf
- Camps, C. (2018). *Artículo de La Medicina de Precisión como estrategia económica*,

sanitaria y social- Revista Española de Economía de la Salud.

Canseco, M. (2019). “ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES INDUCTORES DE APOPTOSIS EN LÍNEA CELULAR MCF-7 EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa* y *Croton lechleri*”. 19–35. Retrieved from https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/30428/2/TESIS_MARITZA_CANSECO_BIBLIOTECA.pdf

Castanera, R. (2011). ESTUDIO DE LA VARIACIÓN EN LOS NIVELES DE TRANSCRIPCIÓN DE GENES DE ENZIMAS DEGRADADORAS DE LIGNINA EN CULTIVOS SÓLIDOS Y SUMERGIDOS DE *Pleurotus ostreatus*. Retrieved August 16, 2020, from [https://academica-e.unavarra.es/xmlui/bitstream/handle/2454/5004/ESTUDIO DE LA VARIACIÓN EN LOS NIVELES DE TRANSCRIPCIÓN DE G.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://academica-e.unavarra.es/xmlui/bitstream/handle/2454/5004/ESTUDIO_DE_LA_VARIACION_EN_LOS_NIVELES_DE_TRANSCRIPCION_DE_G.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Centro De Investigación Del Cáncer. (2017). Nuevos tratamientos. Estrategias terapéuticas derivadas de la Biología Molecular. :: Centro de investigación del Cáncer - Comprehensive Cancer Center Research. Retrieved February 7, 2020, from <http://www.cicancer.org/es/nuevos-tratamientos-estrategias-terapeuticas-derivadas-de-la-biologia-molecular>

Chuaqui F, R., Cuello F, M., & Emmert-Buck, M. (1999). Inactivación de genes supresores de tumores en la carcinogénesis del cuello uterino. *Revista Medica de Chile*, 127(12), 1501–1512. <https://doi.org/10.4067/s0034-98871999001200014>

Condori, M., & Oviedo, M. (2017). “EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO Y APOPTÓTICO DEL EXTRACTO EN ACETATO DE ETILO DE LAS HOJAS DE *Annona muricata* (Guanábana) SOBRE CÉLULAS CANCERÍGENAS (PC-3) Y CÉLULAS EPITELIALES SANAS DE PRÓSTATA HUMANA (HPrEC), BOSTON, MA 2016.” 19–21.

Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. (2019). TRATAMIENTO FITOTERAPÉUTICO DEL INSOMNIO -- Web de Portalfarma. Retrieved February 6, 2020, from

<https://www.portalfarma.com/Profesionales/campanaspf/categorias/Paginas/articulo02.aspx>

- Costas, M., & Rubio, M. (2017). Autophagy is involved in mouse kidney development and podocyte differentiation regulated by Notch signalling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(7), 1315–1328. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13061>
- Cueva, P. (2015). El cáncer en el Ecuador - Salud Total. Retrieved February 4, 2020, from <https://www.saludsapersonas.com/vivesaludtotal/index.php/cancer/el-cancer-en-el-ecuador/423-el-cancer-en-el-ecuador>
- 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>
- De la Peña E. (2010). *MODULO 9. Mutagénesis y Carcinogénesis Química* (Repetto, Ed.). Retrieved from <http://www.remanet.net/>.
- DEEL. (2020). DEEL - Diccionario Etimológico Español en Línea. Retrieved May 24, 2020, from <http://etimologias.dechile.net/>
- Degennaro, L. J. (2013). *Actualización de información Trasplante de células madre sanguíneas y de médula ósea*. Retrieved from www.LLS.org
- Domínguez, L. (2004). *PRINCIPIOS GENERALES DE CARCINOGENESIS: CARCINOGENESIS QUÍMICA Y HORMONAL ÍNDICE*.
- Eisenberg, A., Bialik, S., Simon, H.-U., & Kimchi, A. (2009). Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death & Differentiation*, 16(7), 966–975. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.33>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Farré, M., & Benavent, R. (2002). *Cáncer. neoplasias más frecuentes*. 747–759. Retrieved from <https://www.segg.es/download.asp?file=/tratadogeriatría/PDF/S35-05>

- Farshori, N., Saad, E., Mohammad, M., Musarrat, J., Ali, A., & Ahmed, M. (2013). Anticancer Activity of Petroselinum sativum Seed Extracts on MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.10.5719>
- Fernández, D., & Rodríguez, M. (2019). Autofagia y Muerte Celular Programada. Retrieved January 15, 2020, from <https://www.unioviado.es/estresoxidativo/autofagia-y-muerte-celular-programada>
- Flores, A. M. C. ., Martínez, B. M. ., Ruiz, V., & Reyes, Leyva., J. (2019). EVALUACIÓN in vitro DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTITUMORAL DE PLANTAS MEDICINALES RECOMENDADAS EN CUETZALAN DEL PROGRESO, PUEBLA, MÉXICO. *Polibotánica*, 0(46), 113–135. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.47.9>
- Freifelder, D. (2019). *INTRODUCCIÓN AL CULTIVO CELULAR*. Retrieved from http://www.ehu.eus/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo_celular.pdf
- Garrido, J. (2007). ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN DE ÁCIDO VALERÉNICO O SUS DERIVADOS EN EXTRACTO DE HOJAS Y RAÍZ DE VALERIANA (*Valeriana prionophylla* Standl.) . Retrieved August 20, 2020, from MAESTRIA MULTIDISCIPLINARIA EN USO Y PRODUCCIÓN DE PLANTAS MEDICINALES website: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2611.pdf
- Globocan. (2018). All cancers 2018. Retrieved January 8, 2020, from International Agency for Research on Cancer website: <http://gco.iarc.fr/today>
- GLOBOCAN. (2018). Informe de OMS. Retrieved September 21, 2019, from <https://www.redaccionmedica.ec/secciones/salud-publica/ecuador-registra-28-058-nuevos-casos-de-c-ncer-seg-n-informe-de-oms-92834>
- Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., & Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian*

Pacific Journal of Cancer Prevention, 16(6), 2129–2144.

<https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.6.2129>

Gonzales, G., & Valerio, L. (2008). Medicinal Plants from Peru: A Review of Plants as Potential Agents Against Cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 6(5), 429–444. <https://doi.org/10.2174/187152006778226486>

Granados, M., & Herrera, Á. (2010). *Manual de Oncología*. Retrieved from <http://bookmedico.blogspot.com>

Hernández, J. (2012). *Oncología Clínica*. (5ª Ed.; E. del B. M. César Rodríguez, Ed.). Madrid: Nova-sidonia.

Honma, T., Shiratani, N., Banno, Y., Kataoka, T., Kimura, R., Sato, I., ... Takayanagi, T. (2019). Seeds of *centranthus ruber* and *valeriana officinalis* contain conjugated linolenic acids with reported antitumor effects. *Journal of Oleo Science*, 68(5), 481–491. <https://doi.org/10.5650/jos.ess19007>

Hsu, R.-J., Hsu, Y.-C., Chen, S.-P., Fu, C.-L., Yu, J.-C., Chang, F.-W., ... Yu, C.-P. (2015). The triterpenoids of *Hibiscus syriacus* induce apoptosis and inhibit cell migration in breast cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0592-9>

Hussain, A., Chhavi, S., Saniyah, K., Kruti, S., & Shafiul, H. (2015). Aloe vera Inhibits Proliferation of Human Breast and Cervical Cancer Cells and Acts Synergistically with Cisplatin. Retrieved August 15, 2020, from Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, Vol 16 website:
http://journal.waocp.org/article_30853_bc5be087c593d4fedeebaf41da7c9870.pdf

Itriago, L. G., Silva, N. I., & Cortes, G. F. (2013). Cancer en Chile y el mundo: Una mirada epidemiologica, presente y futuro. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 531–552. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(13\)70195-0](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(13)70195-0)

Juan, C. (2020). “*ACTIVIDAD ANTI-METASTÁSICA Y ANTI-PROLIFERATIVA DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS Ilex guayusa, Uncaria tomentosa y Croton lechleri, EN LA LÍNEA CELULAR MCF7 DE CÁNCER DE MAMA.*” Retrieved

from [https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/30821/3/JUAN CARLOS CORTEZ PINTO.pdf](https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/30821/3/JUAN%20CARLOS%20CORTEZ%20PINTO.pdf)

- Jugran, A. K., Rawat, S., Bhatt, I. D., & Rawal, R. S. (2019). Valeriana jatamansi: An herbaceous plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research*, 33(3), 482–503. <https://doi.org/10.1002/ptr.6245>
- Takehashi, A., Kato, A., Ishii, N., Wei, M., Morimura, K., Fukushima, S., & Wanibuchi, H. (2014). Valerian inhibits rat hepatocarcinogenesis by activating GABA(A) receptor-mediated signaling. *PLoS ONE*, 9(11), 2–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113610>
- Khazaei, M., & Pazhouhi, M. (2019). Antiproliferative Effect of Trifolium Pratens L. Extract in Human Breast Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, 71(1), 128–140. <https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1521443>
- Kielstra, P. (2017). Control del cáncer, acceso y desigualdad en américa latina: Una historia de luces y sombras. *The Economist Intelligence Unit*, 74. Retrieved from https://eiuperspectives.com/sites/default/files/images/Cancer_control_access_and_inequality_in_Latin_America_SPANISH.pdf
- Kiraz, Y., Adan, A., Kartal, M., & Baran, Y. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biology*, 37(7), 8471–8486. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5035-9>
- Kutschker, A. (2011). Revisión del género Valeriana (Valerianaceae) en Sudamérica austral. *Gayana - Botanica*, Vol. 68, pp. 244–296. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432011000200016>
- Leukemia & Lymphoma Society. (2014). *Información sobre la Inmunoterapia*. Retrieved from www.LLS.org/espanol
- Lin, J.-G., Chen, G.-W., Li, T.-M., Chouh, S.-T., Tan, T.-W., & Chung, J.-G. (2006). Aloe-Emodin Induces Apoptosis in T24 Human Bladder Cancer Cells Through the p53 Dependent Apoptotic Pathway. *Journal of Urology*, 175(1), 343–347. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)00005-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)00005-4)

- Lin, S., Fu, P., Chen, T., Ye, J., Su, Y. Q., Yang, X. W., ... Zhang, W. D. (2015). Minor valepatriates from *Valeriana jatamansi* and their cytotoxicity against metastatic prostate cancer cells. *Planta Medica*, *81*(1), 56–61.
<https://doi.org/10.1055/s-0034-1383369>
- Lizarbe, A. (2007). EL SUICIDIO Y LA MUERTE CELULAR.
Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp), *101*(2), 2–4.
- Llopart, N. (2016). *FACULTAD DE FARMACIA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE TRABAJO FIN DE GRADO LAS PLANTAS MEDICINALES COMO FUENTE DE COMPUESTOS ANTINEOPLÁSICOS*.
- López Castiblanco, M., & Rangel Ardila, M. (2020). *Evaluación de la expresión de Kv10.1 y p53 en las células SiHa durante la resistencia a Cisplatino*. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia>
- Machado, J. P., & Lie Concepción, A. E. (n.d.). *Apoptosis, mecanismo de acción Apoptosis, action mechanism*.
- Martín, M., & Civetta, J. (2007). Carcinogénesis. In *Macrosocial Determinants of Population Health* (Vol. 53, pp. 333–354). https://doi.org/10.1007/978-0-387-70812-6_16
- Martínez, A., Gómez, L., & Rodríguez, C. (2018). La muerte celular: un proceso indispensable para la vida | Ciencia UANL. Retrieved March 26, 2020, from <http://cienciauanl.uanl.mx/?p=7517>
- McCaffery, M. (1992). *Dolor : manual clínico para la práctica de enfermería / Margo McCaffery, Alexandra Beebe*. Retrieved from http://encore.fama.us.es/iii/encore/record/C_Rb1353320_Sdolor__Orightresult_U?lang=spi&suite=cobalt
- Merck. (2019). Línea celular A2780 humana 93112519, carcinoma de ovario | Sigma-Aldrich. Retrieved February 7, 2020, from https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_93112519?lang=en®ion=EC
- Migueláñez, M. (2008). *Muerte Celular. Apoptosis y otras formas alternativas de*

muerte celular.

- Ministerio de Salud Pública. (2019). Objetivos del Programa de Prevención y Control del Cáncer de Mama – Ministerio de Salud Pública de Tucumán. Retrieved February 5, 2020, from <http://msptucuman.gov.ar/programas-nacionales/departamento-de-enfermedades-no-transmisibles/programa-de-prevencion-y-control-del-cancer-de-mama/objetivos/>
- Mohan, H. (2012). Patología. In *Patología*. Medica Panamericana.
- MSP. (2017). *Estrategia Nacional para el Control del Cáncer*. 3(2), 814–400. Retrieved from [www](http://www.msp.gov.ar/).
- Murray, M., Birdsall, T., Pizzomo, J., & Reilly, P. (2004). *La Curación Del Cáncer: Métodos Naturales - Michael Murray, Tim Birdsall, Joseph E. Pizzorno, Paul Reilly - Google Libros*. Retrieved from https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=w2PKw5JFAvgC&oi=fnd&pg=PA9&dq=tratamientos+naturales+contra+el+cancer&ots=k_GQmqiKYZ&sig=wEc6G0-tQSKoL5E8e7mo4-L4gT8#v=onepage&q=tratamientos+naturales+contra+el+cancer&f=false
- Navarro, E., & Ginebra, M. (2005). *Desarrollo y Caracterización de Materiales Biodegradables para Regeneración Ósea*. Retrieved from <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/93360/05Mnt05de11.pdf?sequence=5&isAllowed=y>
- NIH. (2016). Instituto Nacional del Cáncer. Retrieved September 13, 2019, from [Cáncer metastático website: https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cancer-metastatico](https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cancer-metastatico)
- NIH. (2019). Quimioterapia para tratar el cáncer - Instituto Nacional del Cáncer. Retrieved January 22, 2020, from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/quimioterapia#1>
- OMS. (2014). *Cáncer: prevención y control*. Retrieved from <https://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/>
- Ortega, C., Díaz, M., Avalos, A., Vergara, M., & Rosales, A. M. (2001).

ARTÍCULOS DE REVISIÓN La apoptosis y su importancia biomédica (Vol. 137).

Perales, S. (2005). *PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO ARTERIALES EN CULTIVO*. 3–6.

Pérez, J. L. (2013). *Manual de patología general*. Elsevier España.

Pérez, J., & Lie, A. (2011). *Apoptosis, mecanismo de acción*. 1–16. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/pdfs/revciemmedhab/cmh-2012/cmh122o.pdf>

Peter, R. (2018). Defensa contra el cáncer - Cáncer - Manual MSD versión para público general. Retrieved January 13, 2020, from <https://www.msmanuals.com/es-ec/hogar/cáncer/introducción-al-cáncer/defensa-contra-el-cáncer>

Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, 8(4), 603–619. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>

Promega GoTaq®. (2014). *GoTaq qPCR Master Mix Technical Manual TM318*. 608–277. Retrieved from <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/gotaq-qpcr-master-mix-protocol.pdf>

Purelink®. (2010). PureLink™ RNA Mini Kit. *Cell*, (12183020), 1–4. Retrieved from https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_rna_mini_kit_man.pdf

Ríos, S. H. (2016). *Riesgo de exposición a Agentes Cancerígenos. 1ª. Edició*, 7–10. Retrieved from <https://www.diba.cat/documents/467843/118493136/cancerigenos.pdf/3b53a4cf-41c6-49a0-bb04-dab36d40bb85>

Rivas, C., Oranday, M., Verde, M., Morales, M., Espinosa, C., & Garza, R. (2016). Investigación en plantas de importancia médica . In *Investigación en plantas de*

importancia médica (pp. 351–410). <https://doi.org/10.3926/oms.315>

Rubio, D. C. (2015). *Radioterapia en el tratamiento del cáncer*. Retrieved from <http://radioterapiahm.com>

S.N Fundación Salud y Naturaleza. (2007). *Libro Blanco de los herbolarios y las plantas medicinales* .

Sánchez, K. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 553–562. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(13\)70659-x](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(13)70659-x)

Santaballa. Ana, & SEOM. (2017). Cancer de mama - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019. Retrieved February 5, 2020, from <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cancer-de-mama?showall=1>

Sistema Nacional de Salud. (2001). *Análisis Económico y Estadística CODIFICACION CLINICA CON LA CIE-9-MC UNIDAD TECNICA DE LA CIE-9-MC*. Retrieved from https://www.mscbs.gob.es/estadEstudios/estadisticas/normalizacion/clasifEnferm/boletines/Codificacion_clinica_n18_01.pdf

Sociedad Española de Oncología Médica. (2011). *El cáncer de mama*. Retrieved from www.roche.es

Thermo Scientific™. (2019). *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, with dsDNase*. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1671?SID=srch-srp-K1671#/K1671?SID=srch-srp-K1671>

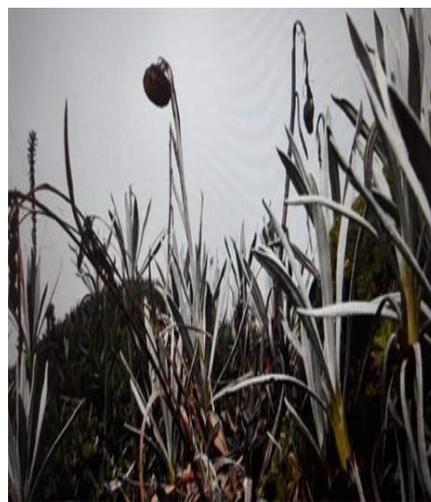
Tian, S., Wang, Z., Wu, Z., Wei, Y., Yang, B., & Lou, S. (2018). Valtrate from *Valeriana jatamansi* Jones induces apoptosis and inhibits migration of human breast cancer cells in vitro. *Natural Product Research*, 0(0), 1–4. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1548454>

Torres, M. P., Rachagani, S., Purohit, V., Pandey, P., Joshi, S., Moore, E. D., ... Batra, S. K. (2012). Graviola: A novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells in vitro and in

- vivo through altering cell metabolism. *Cancer Letters*, 323(1), 29–40.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.03.031>
- Tropicos. (2018). *Valeriana decussata* Ruiz & Pav. Retrieved September 25, 2019, from <http://www.tropicos.org/Name/33500006>
- Ugalde, M., Reza, V., González-Trujano, M. E., Avula, B., Khan, I. A., & Navarrete, A. (2005). Isobolographic analysis of the sedative interaction between six central nervous system depressant drugs and *Valeriana edulis* hydroalcoholic extract in mice*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(5), 631–639.
<https://doi.org/10.1211/0022357056000>
- Vega, E., Velasco, R., & Jiménez, M. (2006). *Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. Revisión. Volumen 31*, 1–15. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2006/bq063d.pdf>
- Villar, Á., & Carretero, E. (2011). *Valeriana officinalis*. Fitoquímica, farmacología y terapéutica. In *Neurofarmacología Contemporánea* (pp. 169–190).
<https://doi.org/10.1016/b978-84-8086-875-4.50008-2>
- Vini, R., & Sreeja, S. (2015, March 1). *Punica granatum* and its therapeutic implications on breast carcinogenesis: A review. *BioFactors*, Vol. 41, pp. 78–89. <https://doi.org/10.1002/biof.1206>
- Wawryk, E., Chylińska, P., Lis, M., Chłapek, K., Bulak, K., Jędrych, M., & Jodłowska, B. (2014). P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells. *Protoplasma*, 251(3), 525–533. <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0548-1>
- Xiaoguang, I L., Chen, T., Sheng, L., Zhao, J., & Chen, P. (2013). *Valeriana jatamansi* constituyente IVHD-valtrate como un nuevo agente terapéutico para el cáncer de ovario humano: actividades y mecanismos in vitro e in vivo. - PubMed - NCBI. <https://doi.org/10.2174/1568009611313040009>
- Xu, J., Zhao, P., Guo, Y., Xie, C., Jin, D. Q., Ma, Y., ... Zhang, T. (2011). Iridoids from the roots of *Valeriana jatamansi* and their neuroprotective effects. *Fitoterapia*, 82(7), 1133–1136. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.07.013>

ANEXOS

Anexo 1. Recolección de Valerianas



Anexo 2. Secado de Valerianas



Anexo 3. Determinación de sólidos totales y preparación del extracto acuoso de Valerianas



Anexo 4. Cuarto de cultivo celular



Anexo 5. Ensayo Bradford



Anexo 6. RT-qPCR

