



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Evaluación de genes asociados a actividad antitumoral, por
acción de extractos y diterpenos de *Salvia amarissima* en un
modelo de carcinoma mamario en ratones**

Tesis que presenta

Jennifer Alexis Rojas Morales

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda

San Luis Potosí, S.L.P., junio de 2020



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Evaluación de genes asociados a actividad antitumoral, por acción de extractos y diterpenos de *Salvia amarissima* en un modelo de carcinoma mamario en ratones**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Jennifer Alexis Rojas Morales** y aprobada el **19 de junio de 2020** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Co-Director de la tesis

Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda

Co-Director de la tesis

Dra. María Jazmín Abraham Juárez

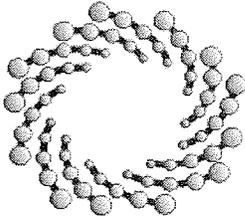
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., y en el Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales del Consorcio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas, bajo la codirección del Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís y el Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda. El trabajo fue financiado por proyecto de Ciencia Básica (CB-A1-S-7705) y FORDECYT (FORDECYT-CIIDZA:296354).

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (931774) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 204 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 8 días del mes de julio del año 2020, se reunió a las 10:18 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Presidente	IPICYT
Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda	Secretario	IPICYT
Dra. María Jazmín Abraham Juárez	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Jennifer Alexis Rojas Morales

sobre la Tesis intitulada:

Evaluación de genes asociados a actividad antitumoral, por acción de extractos y diterpenos de Salvia amarissima en un modelo de carcinoma mamario en ratones.

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:59 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 8 días del mes de julio de 2020.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



A Dios, por ser mi fortaleza en momentos de debilidad.

A mi abuela, por su amor incondicional y su conocimiento brindado.

A mis padres, por su apoyo, a quienes debo todo lo que soy, por enseñarme el camino para lograr mis propósitos.

A mi hermana, por estar siempre a mi lado y demostrarme su amor.

Agradecimientos

Expreso mi agradecimiento a quienes hicieron posible el desarrollo de este trabajo.

Al **CONACyT** por la beca otorgada durante la realización de la maestría

Al **Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C.**

Al **Dr. Ángel Alpuche**, por la codirección de esta tesis, por brindarme su confianza y por compartir conmigo sus conocimientos.

Al **Dr. Elihú Bautista**, por la codirección de esta tesis, por la confianza y apoyo en la realización de este proyecto, su mentoría y amistad.

A la **Dra. Jazmín Abraham**, por formar parte de mi Comité Tutoral, su mentoría y por abrirme las puertas de su laboratorio para la realizar algunos experimentos.

Al **Dr. Guillermo Palacios**, por brindarme su apoyo, amistad y mentoría durante la realización de experimentos en el Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales.

A los doctores, amigos y compañeros del **Consortio de Investigación, Innovación y Desarrollo para la Zonas Áridas**, por su ayuda, su amistad y consejos durante mi estancia de maestría.

A mis compañeros del **Laboratorio de Biología Molecular de Plantas**, por su apoyo y consejos.

A mis **compañeros de generación**, por hacer amena la estancia de la maestría.

A **Teresa, “la reina”**, por brindarme su verdadera amistad, sus consejos, mentoría y convertirse parte de mi familia durante estos 2 años.

A **Mariano**, por sus palabras de aliento cuando no todo va bien, por celebrar mis logros como suyos y sobre todo por su amor incondicional.

A la **Dra. Jackeline Arvizu**, por alentarme a seguir con mis estudios de posgrado y por su apoyo a la distancia.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	xi
Lista de figuras	xii
Anexos	xiii
Abreviaturas	xiv
Resumen	xvi
Abstract	xvii
I. Introducción	1
1. Generalidades del cáncer	1
2. Cáncer de mama	1
2.1. Diagnóstico	2
2.2. Tratamiento	3
3. Muerte celular por apoptosis	3
3.1. Vía extrínseca de la apoptosis	4
3.2. Vía intrínseca de la apoptosis	5

4. La resistencia a múltiples fármacos	7
5. Productos naturales en la modulación de la MDR y la apoptosis de células cancerosas	9
5.1. Teotihuacanina	11
6. Modelo murino de cáncer de mama con células tumorales 4T1	11
6.1. Células 4T1	12
II. Objetivos	13
III. Materiales y Métodos	14
1. Obtención de diterpenos	14
2. Obtención de muestras de tumores primarios de cáncer de mama	14
3. Diseño de oligonucleótidos	15
4. Extracción y purificación de RNA	15
5. Síntesis de cDNA	16
6. Validación de oligonucleótidos por RT-PCR	16
7. Análisis de expresión génica	17
8. Preparación de lisados de células tumorales y análisis por western Blot	17
9. Análisis estadístico	18
IV. Resultados y Discusión	19
1. Los tratamientos con extractos de <i>S. amarissima</i> reducen el tamaño del tumor	19
2. Los diterpenos de <i>S. amarissima</i> no inducen apoptosis en en cáncer de mama	21
3. Los extractos de diterpenos y los diterpenos puros reprimen los genes de resistencia a múltiples fármacos	23

4. EL ensayo de radioinmunoprecipitación [RIPA] mantiene las proteínas estables por más tiempo	25
V. Conclusión	26
VI. Referencias	27
Anexos	34

Lista de tablas

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos diseñados para este trabajo	34
Tabla 2. Temperaturas de amplificación óptimas	36

Lista de figuras

Figura 1. Señalización de las vías de la apoptosis	6
Figura 2. Transportador de casete de unión a ATP (ABC)	8
Figura 3. Efecto de los tratamientos con extractos de diterpenos y diterpenos puros de <i>S. amarissima</i> en el crecimiento del tumor primario de ratón	20
Figura 4. Análisis de expresión relativa de los genes involucrados en la vía de la apoptosis en tumores de mama de ratones tratados con extractos de <i>Salvia amarissima</i>	22
Figura 5. Análisis de expresión relativa de los genes involucrados en la multiresistencia a fármacos en tumores de mama de ratones tratados con extractos de <i>Salvia amarissima</i>	24
Figura 6. Detección de la proteína β actina de ratón, evaluada mediante un ensayo de Western blot en tejido de tumor primario de mama de ratón	25
Figura 7. Gel de calidad de RNA total de tumores primarios de mama a partir de ratones hembras BALB/c para síntesis de cDNA	37
Figura 8. Análisis cualitativo de la expresión de los genes involucrados en la vía de la apoptosis y la resistencia a fármacos, mediante RT-PCR punto final, en tumores de mamas de ratonas BALB/c tratadas con diferentes compuestos extraídos de <i>Salvia amarissima</i>	38

Anexos

I. Tablas	34
II. Geles de calidad	37
III. Protocolos	39
IV. Soluciones	46

Abreviaturas

°C	Grados Celsius
ATP	Adenosín trifosfato
BCRP	Proteína resistente al cáncer de mama
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CDS	Región codificante
DD	Dominio de muerte
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAasa	Enzima que hidroliza el ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético disódico
<i>et al.</i>	Colaboradores
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
g	Gramos
h	Horas
IHC	Inmunihistoquímica
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
M	Molar
µg	Microgramos
µL	Microlitros
MDR	Multiresistencia a fármacos
mL	Mililitros
min	Minutos
mg	Miligramos
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)-propanelsulfónico
MPS	Marcador de peso molecular
mV	Mili volts

nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de iones de hidronio
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa.
SDS	Dodecilsulfato sódico
T_m	Temperatura de fusión del DNA
TNF	Factor de necrosis tumoral
V	Volts
w/p	Relación peso/volumen

Resumen

Evaluación de genes asociados a actividad antitumoral, por acción de extractos y diterpenos de *Salvia amarissima* en un modelo de carcinoma mamario en ratones

El cáncer de mama es el principal tipo de cáncer que afecta a las mujeres a nivel mundial. Existen diferentes estrategias que ayudan a eliminar células cancerosas como la quimioterapia, que actúa en la detención del ciclo celular o induce apoptosis, sin embargo, este tipo de estrategias, desarrollan multiresistencia a fármacos (MDR). La MDR es la principal causa de fracaso del tratamiento en la quimioterapia. Un mecanismo primario de la MDR es la sobreproducción de la glicoproteína P (P-GP/MDR1) y la proteína resistente a cáncer de mama (BCRP), que reducen la acumulación intracelular de medicamentos contra el cáncer. Lo anterior, ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas para tratar la enfermedad como el uso de productos naturales. Ejemplo de ello son los terpenoides, compuestos orgánicos producidos por plantas y animales, que tienen una amplia gama de actividades farmacológicas, una de ellas es la antitumoral. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes tratamientos de extractos de *Salvia amarissima* (*Sin. S. circinata*) conteniendo diterpenoides o diterpenos puros, sobre la expresión de los genes de las vías de la apoptosis (*Fas*, *Bcl2*, *Bax*, *Cas3*) y aquellos involucrados en la multiresistencia a fármacos (*Mdr1* y *Bcrp*), en tejido de tumor primario de mama de ratón. Los resultados obtenidos mostraron que ninguno de los 3 tratamientos administrados a los ratones con cáncer de mama, inducen la expresión de los genes involucrados en la vía de apoptosis. Sin embargo, los compuestos de *S. amarissima*, mostraron reducir la expresión de los genes involucrados en la multiresistencia a fármacos (*Mdr1* y *Bcrp*), lo que sugiere que estos compuestos son capaces de revertir la multiresistencia a fármacos en células cancerosas resistentes a la quimioterapia, o permitir que se acumule el diterpeno dentro de la célula.

PALABRAS CLAVE. Cáncer de mama, MDR1, BCRP, apoptosis.

Abstract

Evaluation of genes associated with antitumoral activity by *Salvia amarissima* extracts and diterpenes activity in a model of mammary carcinoma in mice

Breast cancer is the main type diagnosed cancer in women worldwide. There are many strategies to kill cells cancer, such as chemotherapy. Chemotherapy stops cycle cell and induces apoptosis. However, this strategy develops multidrug resistance (MDR) in cells cancer. MDR is the main reason for chemotherapy failure. One important mechanism out which cancer cell acquire drug resistance is the overexpressing P-glycoprotein (*Pgp*/MDR-1) and breast cancer resistant protein (BCRP), through which intracellular cancer drug content is reduced. This has led to the search for new alternatives to treat breast cancer, such as the use of natural products. For example, terpenoids, which are organic compounds produced by a wide variety of plants and animals, and they are known to have a wide range of pharmacological properties, among them antitumoral activity. The goal of this work was to assess the *S. amarissima* (Syn. *S. circinata*) treatment effects on the expression of the apoptosis genes (Fas, Bcl2, Bax, Cas3) and those involved in multidrug resistance (*Mdr1* and *Bcrp*). Results showed that *S. amarissima* treatments do not induce apoptosis genes expression. However, *S. amarissima* compounds downregulate MDR genes expression. Therefore, *S. amarissima* compounds are promising for MDR therapy.

KEY WORDS. Breast cancer, MDR1, BCRP, apoptosis.

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades del cáncer

El cáncer es una enfermedad genética causada por un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células debido a la acumulación progresiva de mutaciones aleatorias en genes que controlan el crecimiento y la diferenciación celular (Olopade et al., 2001; Organización Mundial de la Salud, 2018).

El desarrollo del cáncer en un individuo requiere de tres etapas: iniciación, promoción y progresión. La iniciación ocurre cuando hay una alteración en el genoma de una célula como mutaciones, deleciones e inserciones. Los agentes que actúan en esta primera etapa pueden ser físicos, químicos o virales. La promoción representa la etapa de crecimiento tisular con la formación del tumor. Participan los factores de crecimiento y los receptores a los factores de crecimiento, así como también la angiogénesis. La progresión implica la capacidad de invadir tejidos vecinos o a distancia, por parte de la célula tumoral maligna. Esa capacidad está codificada también en los genes de la misma célula, con modificaciones estructurales y funcionales (Domínguez, 2004; Martín *et al.*, 2011).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estimó en 2015 que el cáncer es una de las principales causas de muerte en la población a nivel mundial (8.8 millones de muertes). Los tipos de cáncer que causan un mayor número anual de muertes son los de pulmón, hígado, estómago, colon y mama (Organización Mundial de la Salud, 2018).

2. Cáncer de mama

El cáncer de mama es el más común en las mujeres de entre 35 y 55 años en todo el mundo, pues representa el 16% de todos los cánceres femeninos (Organización Mundial de la Salud, 2018). En México, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó a finales del 2017, 40 mil casos nuevos de cáncer de mama, lo que convierte al cáncer de mama en la principal neoplasia maligna para

la población femenina en el país, dejando de manifiesto la importancia de mejorar métodos de diagnóstico y tratamientos para la enfermedad.

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea y se divide clínicamente en tres subtipos básicos: luminales, determinados por la expresión de receptores hormonales (estrógeno y progesterona), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), y cáncer de mama triple negativo, que no expresa ninguno de estos receptores (Martin, *et al.* 2014). Esta clasificación ha facilitado el diagnóstico y tratamiento para la enfermedad, pues permite la selección de medicamentos específicos para el subtipo de tumor.

2.1 Diagnóstico

En el diagnóstico de cáncer de mama se emplean algunas técnicas de imagen como la mamografía (considerada como el estándar de oro), ultrasonidos de mama y resonancia magnética, las cuales pueden ser efectivas para la detección y monitoreo de paciente con cáncer de mama, sin embargo, dichas técnicas sufren de algunas limitaciones como su costo, la falta de sensibilidad y especificidad (Wellings *et al.*, 2016).

El avance tecnológico ha impulsado el reconocimiento del cáncer de mama como una enfermedad heterogénea, lo que permitió comprender el comportamiento biológico del cáncer de mama y establecer biomarcadores moleculares que superan las limitaciones relacionadas a las técnicas de imagen y facilitan la identificación del subtipo de cáncer de mama. La introducción de biomarcadores ayuda a desarrollar un tratamiento adecuado al paciente (Harbeck *et al.*, 2010; Arrechea *et al.*, 2011; Harbeck *et al.*, 2017).

Actualmente, el cáncer de mama se diagnostica por técnicas de inmunohistoquímica (IHC) o hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) y análisis de expresión génica (Bao, 2012) en conjunto con técnicas de imagen.

2.2 Tratamiento

Actualmente, las estrategias de tratamiento a pacientes con cáncer de mama incluyen cirugía, radioterapia y terapias sistémicas (Harbeck y Gnant, 2017). Las terapias sistémicas implican el uso de medicamentos administrados al torrente sanguíneo para destruir a las células cancerosas; dentro de este tipo de terapias se encuentra la quimioterapia, terapia génica, inmunoterapia y la terapia dirigida (Instituto Nacional de Cáncer, 2019).

La eliminación de células tumorales por la mayoría de las estrategias anticancerígenas utilizadas actualmente en la clínica, principalmente la quimioterapia, la radiación, la terapia génica y la inmunoterapia, se ha relacionado con la activación de las vías de transducción de señales de apoptosis en las células cancerosas (o muerte celular programada), como la vía intrínseca y/o extrínseca (Fuda *et al.*, 2006). Una de las causas principales del fracaso de la quimioterapia es la generación de resistencia a múltiples fármacos (MDR), impidiendo la apoptosis (Fulda *et al.*, 2006; Coley, 2008). Por lo anterior, el desarrollo de nuevas moléculas que induzcan a las células cancerosas a apoptosis y/o puedan inhibir el desarrollo de la MDR son de gran importancia.

Por otro lado, comprender los eventos moleculares que regulan la apoptosis en respuesta a los tratamientos contra el cáncer, y cómo las células cancerosas resistentes, pueden ser sensibilizadas, brinda oportunidades para desarrollar mejores terapias moleculares para combatir el cáncer.

3. Muerte celular por apoptosis

La apoptosis es un proceso celular genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos (Fulda *et al.*, 2006; Pistrutto, *et al.*, 2016). Este mecanismo, está evolutivamente conservado y es un regulador clave del control del crecimiento fisiológico y la regulación de la homeostasis de los tejidos. (Fulda *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2019).

Las células apoptóticas sufren algunos cambios morfológicos y bioquímicos que consisten en modificaciones de la estructura de la membrana celular (aparición de cuerpos apoptóticos), encogimiento del núcleo, condensación de la cromatina y fragmentación del DNA (Koolman *et al.*, 2004; Fulda *et al.*, 2006; Galluzzi *et al.*, 2018). Es importante señalar que las células apoptóticas son eliminadas por fagocitosis, por lo que no se producen reacciones pro-inflamatorias (Koolman *et al.*, 2004).

Los mecanismos de la apoptosis son complejos e involucran una cascada de señalización dependiente de energía. Existen dos vías apoptóticas principales: la vía extrínseca o del receptor de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial (Elmore, 2007).

3.1. Vía extrínseca de la apoptosis

La vía de señalización extrínseca inicia por perturbaciones del microambiente extracelular. Este mecanismo implica interacciones mediadas por receptores de muerte (Galluzzi *et al.*, 2018).

Los receptores de muerte son proteínas transmembranales de la superfamilia de genes del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). Los receptores de esta familia tienen un dominio citoplasmático conocido como "dominio de muerte" (DD, por sus siglas en inglés), el cual transmite la señal de muerte desde la superficie celular a las vías de señalización intracelular (Fulda *et al.*, 2006; Elmore, 2007). Los receptores de muerte mejor caracterizados incluyen al receptor de muerte de superficie celular Fas (FAS; también conocido como CD95 o APO-1), receptor 1 de TNF (TNFR1), receptor 1 de ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL-R1) y TRAIL-R2 (Elmore, 2007; Galluzzi *et al.*, 2018). Los ligandos correspondientes de la superfamilia de TNF comprenden ligandos de receptores de muerte tales como el ligando Fas (CD95L/FasL), TNF α , linfotoxina- α (los dos últimos se unen a TNFR1) y TRAIL (Fulda *et al.*, 2006; Elmore, 2007; Galluzzi *et al.*, 2018).

La inducción de la apoptosis por esta vía se inicia tras la unión de los ligandos a sus receptores de muerte correspondientes, lo que conduce a una oligomerización y cambio conformacional del receptor para dejar expuesto su DD y de esta manera reclutar proteínas adaptadoras hacia la membrana celular (Pistritto *et al.*, 2016). Las proteínas adaptadoras, como el dominio de muerte asociado a Fas (FADD), secuestran pro-caspasas iniciadoras (8 o 10), que da como resultado la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC), aumentando la concentración local de pro-caspasas y promoviendo la autoactivación de las mismas (Fulda *et al.*, 2006; Pistritto *et al.*, 2016; Galluzzi *et al.*, 2018). La activación de las caspasas iniciadoras da como resultado la escisión y activación de las caspasas efectoras (3, 6, 7), lo que induce la muerte celular [Figura 1] (Pistritto *et al.*, 2016).

3.2. Vía intrínseca de la apoptosis

La vía intrínseca de la apoptosis, también conocida como la vía mitocondrial, está regulada por proteínas de la familia Bcl-2, que incluye proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas (Wu *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2019). La activación de esta vía puede darse por diferentes estímulos, los cuales producen señales intracelulares que llevan a la muerte celular (Singh *et al.*, 2019). Algunas de estas señales son la ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas y citocinas. Otros estímulos pueden ser radiación, toxinas, hipoxia, infecciones virales y radicales libres (Wu *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2019).

La presencia de los estímulos anteriormente mencionados, provoca la activación de los miembros pro-apoptóticos BH3 de la familia Bcl-2 (Bax, Bak), lo que neutraliza a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1 (Pistritto *et al.*, 2016; Galluzzi *et al.*, 2018). Lo anterior, conduce el aumento en la permeabilidad de la membrana externa de la membrana mitocondrial (MOMP), de esta manera, las proteínas que normalmente se encuentran en el espacio intermembrana de la mitocondria, principalmente citocromo *c*, son liberadas al citosol (Pistritto *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2018).

El citocromo *c* juega un papel importante en la activación de la muerte celular dependiente de las mitocondrias. Al unirse con la proteína Apaf-1 (factor de activación de la proteasa de apoptosis-1) en el citosol, recluta a la pro-caspasa 9 en su dominio de reclutamiento de caspasa (CARD), lo que conlleva a la formación de un complejo proteico conocido como apoptosoma (Pistrutto *et al.*, 2016; Galluzzi *et al.*, 2018). La formación del apoptosoma permite la autoproteólisis y activación de la pro-caspasa 9 (Wu *et al.*, 2018). El proceso a su vez activa las caspasas efectoras 3, 6 y 7 lo que conduce a la muerte celular apoptótica [Figura 1].

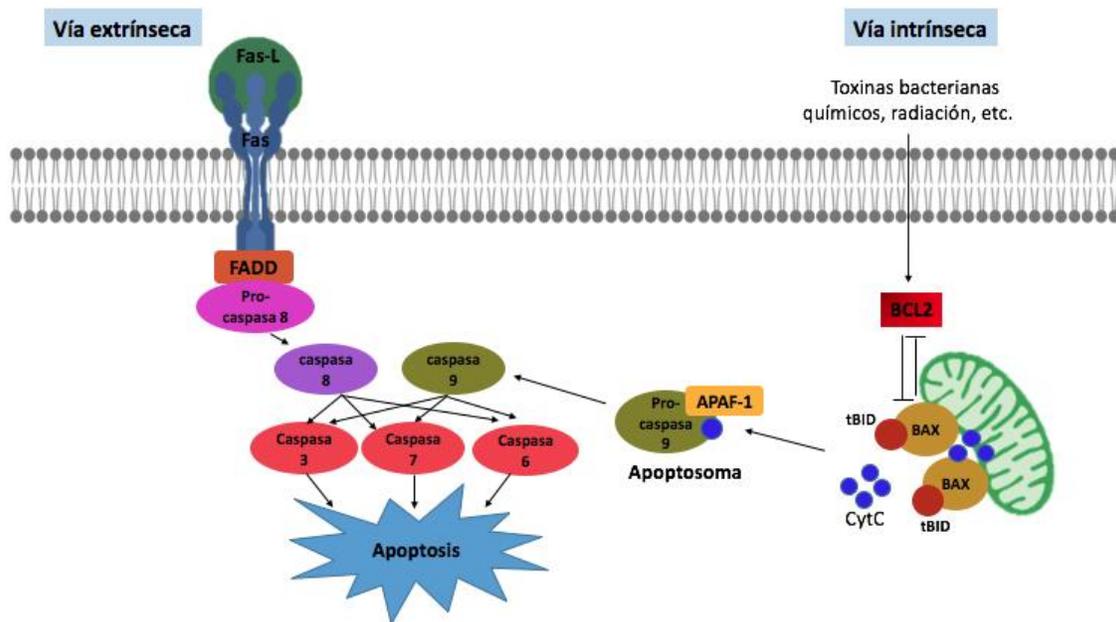


Figura 1. Señalización de las vías de la apoptosis.

La inducción de las vías de apoptosis puede ser a través de dos diferentes sitios de entrada. En la membrana plasmática mediante la activación de los receptores de muerte (vía extrínseca). En la mitocondria (vía intrínseca), por la liberación de moléculas como el citocromo *c* que ayuda a la formación del apoptosoma y llevar a cabo la apoptosis (Elmore, 2007).

4. La resistencia a múltiples fármacos

La resistencia de las células tumorales a fármacos distintos tanto estructural como funcionalmente, se conoce como resistencia a múltiples fármacos (MDR) (Limtrakul *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2018). La aparición de resistencia a los medicamentos ha hecho que muchos de los agentes quimioterapéuticos disponibles actualmente sean ineficaces, por lo tanto, la MDR es el principal obstáculo para el éxito de la quimioterapia en muchos tipos de cáncer (Limtrakul *et al.*, 2007; Coley, H., 2008).

Se han descrito diversos mecanismos involucrados en la regulación de la MDR. El principal mecanismo está asociado con la familia de transportadores de cassette de unión a ATP (ABC) (Yang *et al.*, 2018). Los transportadores ABC son una superfamilia de proteínas transmembranales dependientes de ATP, que se encargan de transportar sustratos desde el espacio intracelular al extracelular (Yang *et al.*, 2018; Liao *et al.*, 2019). En humanos, se han logrado identificar 49 proteínas diferentes de esta superfamilia, en las cuales se encuentran la glicoproteína P (P-gp, ABCB1 o MDR1) y la proteína resistente a cáncer de mama (BCRP/ABCG2), que han sido ampliamente caracterizadas en el contexto de multiresistencia (Limtrakul *et al.*, 2007; Coley 2008; Liao *et al.*, 2019). Principalmente se encuentran en epitelios y mucosas como: la barrera hematoencefálica, epitelio intestinal, epitelio renal, hígado y placenta (Kumar *et al.*, 2019; Liao *et al.*, 2019). Estas proteínas constan de dos partes homólogas y forman un dímero. Cada homólogo contiene un dominio de hélices α transmembranales (TMD) y un dominio de unión a nucleótidos citosólicos (NBD). El TMD combina y transporta sustratos, mientras que el NBD tiene un sitio de unión a ATP y posee actividad de ATPasa para proporcionar energía a partir de la hidrólisis de ATP [Figura 2] (Szakács *et al.*, 2014; Khunweeraphong *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2019; Liao *et al.*, 2019).

La sobreexpresión de las proteínas MDR1 y BCRP provoca el flujo de salida de diversos compuestos usados para el tratamiento contra el cáncer, lo que da como resultado la disminución de la concentración de éstos dentro de la célula, lo que finalmente se traduce como MDR (Khunweeraphong *et al.*, 2017). Si bien, aún no se conoce por completo la vía de señalización que desencadena la sobreexpresión

de los transportadores ABC, algunos estudios han relacionado a diferentes miRNAs, que intervienen en la vía PI3K/Akt, como responsables en la regulación de la expresión de MDR1 (Martin *et al.*, 2013; Zou *et al.*, 2014). Además de los niveles alterados de miRNAs, la célula cancerosa resistente, tanto *in vitro* como en pacientes, han mostrado disminución en la represión de MDR1, debido a la hipermetilación del promotor y la acetilación de la lisina 9 de la histona H3 (Martin *et al.*, 2013). Lo anterior, deja ver que el mecanismo molecular que da lugar a la MDR es complejo y expone la importancia de seguir investigando en esta área.

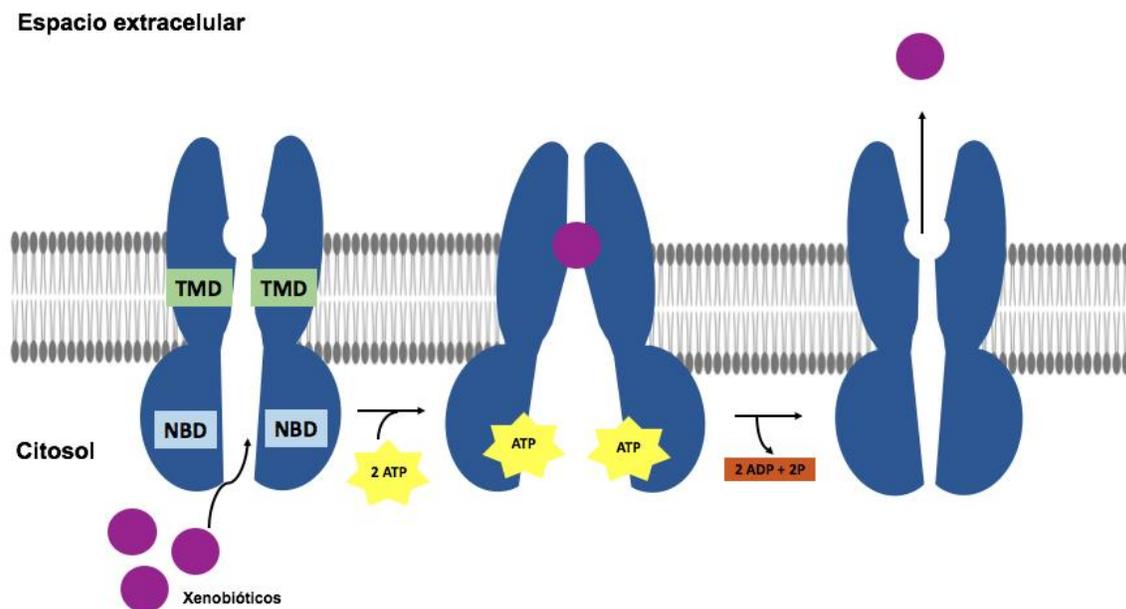


Figura 2. Transportador de cassette de unión a ATP (ABC).

Representación gráfica del mecanismo de transporte de los xenobióticos del interior de la célula hacia el espacio extracelular, mediado por un transportador ABC. En la imagen se muestra el cambio conformacional que sufre la proteína de transmembrana cuando moléculas de ATP se unen a los dominios NBD y éstas son hidrolizadas. Tras la hidrólisis de ATP el xenobiótico es liberado al exterior de la célula (Khunweeraphong *et al.*, 2017; Liao *et al.*, 2019).

5. Productos naturales en la modulación de la MDR y la apoptosis de células cancerosas

Los productos naturales, en los últimos años han sido blanco de estudio para la obtención de nuevas moléculas que sirvan en el desarrollo de tratamientos contra el cáncer de mama. Varios fitoquímicos en la medicina moderna han resaltado su importancia por demostrar su efecto antitumoral y la capacidad de revertir el fenómeno de MDR, así como minimizar los efectos secundarios en los pacientes que reciben tratamientos convencionales (Gu *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2017; Ateba *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2019). Algunos ejemplos de ello son: la camptotecina (CPT), aislada por primera vez en los sesenta del tallo del árbol chino *Camptotheca acuminata*, que demostró tener una fuerte actividad antitumoral al inhibir la actividad de la topoisomerasa I, obligando a la célula cancerosa a entrar en un estado de muerte programada (apoptosis), algunos de los derivados de la CPT como topotecan e irinotecan, actualmente se usan para el tratamiento de cáncer de ovario y colon, respectivamente (Srivastava *et al.*, 2005). Por otro lado, los compuestos aislados de *Catharanthus (vinca) roseus* como, vinblastina y vincristina, han sido ampliamente caracterizados para su uso en el tratamiento de cáncer, incluyendo cáncer de mama. Estos compuestos pueden inhibir la mitosis en la metafase a través de su interacción con la tubulina (Gupta *et al.*, 2003). Otros agentes derivados de plantas con uso clínico son la homoharringtonina, aislada del árbol chino, *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupacea* (*Cephalotax-aceae*) y elliptinium, un derivado de elipticina, aislado de especies de varios géneros de la familia Apocynaceae, incluida *Bleekeria vitensis*. Una mezcla racémica de harringtonina y homoharringtonina (HHT) se ha utilizado con éxito en China para el tratamiento de la leucemia mielógena aguda y la leucemia mielógena crónica. Elliptinium se comercializa en Francia para el tratamiento del cáncer de mama (Cragg *et al.*, 2005). Dentro de los reguladores de la MDR, en el 2014 se describieron a crototanshinona y dihidrotanshinona, aisladas de la hierba china *Salvia miltorrhiza*, por ser potentes candidatos para el desarrollo de agentes de reversión de MDR en cáncer de colon. Se ha demostrado que estos compuestos pueden disminuir la relación de flujo del xenobiótico de manera dependiente de la dosis, así como aumentar la

concentración de sustrato en las células cancerosas y regular negativamente la expresión de P-gp (Hu *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2019).

Las plantas del género *Salvia* L. de la familia Lamiaceae, desde la medicina antigua se han caracterizado por contener diferentes compuestos usados para tratar enfermedades como: menorragia, enfermedades cardíacas y hepáticas. Recientemente, los metabolitos secundarios de este género han tomado gran importancia por su actividad antimicrobiana, antioxidante y citotóxica (Jassbi *et al.*, 2016). Los fitoquímicos biológicamente activos aislados de las plantas de *Salvia*, están representados principalmente por terpenoides. Los terpenoides son productos naturales con estructuras químicas complejas constituidas por unidades de isoprenos (C₅H₈)_n. Usualmente, son agrupados de acuerdo al número de monómeros vinculados a su estructura y se clasifican en: monoterpenoides (C10), sesquiterpenoides (C15), diterpenoides (C20), sesterterpenoides (C25), triterpenoides (C30), tetraterpenoides (C40) y politerpenoides (Jassbi *et al.*, 2016; Ateba *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2019). En el género de *Salvia*, se han identificado una variedad de diterpenoides con esqueleto de carbón de tipo clerodano que tienen actividades farmacológicas importantes, dentro de las cuales resalta la actividad citotóxica (Jassbi *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016). Los diterpenoides de tipo clerodano más abundantes en la familia Lamiaceae son los de tipo neo-clerodano, llamados así por tener la misma estereoquímica absoluta que la clerodina, un compuesto originalmente aislado de *Clerodendrum infortunatum* L. (Lamiaceae) (Li *et al.*, 2016). Algunos diterpenoides de tipo neo-clerodano que han demostrado actividad citotóxica son: salvileucalina B y salvileucalina A, aislados de las partes aéreas de *S. leucantha*. Salvileucalin B ha demostrado citotoxicidad contra las células de cáncer de pulmón A549 y de cáncer de colon HT-29 (IC₅₀: 5.23 y 1.88 µg/mL, respectivamente) (Jassbi *et al.*, 2016). Tehuanina F, un neo-clerodano aislado de las partes aéreas de *Salvia herbacea*, mostró citotoxicidad contra las líneas celulares U251 (IC₅₀ 41.86 ± 1.4 µM) y SKLU-1 (IC₅₀ 38.92 ± 4,1 µM) que corresponden a células de glioblastoma humano y adenocarcinoma pulmonar, respectivamente (Bautista *et al.*, 2012). Otro neo-clerodano es la teotihuacanina

obtenida de *Salvia amarissima*, un posible modulador de la MDR (Bautista *et al.*, 2015).

5.1 Teotihuacanina

La teotihuacanina es un diterpenoide tipo amarisano, originado a partir del *neo-clerodano*, aislado de *Salvia amarissima* (*Sin. circinata*), una planta herbácea endémica y ampliamente distribuida en todo México. El estudio de este diterpenoide en los últimos años ha tomado importancia pues ha demostrado tener actividad citotóxica *in vitro* en células HCT-15 y HCT-116 (relacionadas con cáncer de colón) y HeLa (cáncer de cérvix) (Bautista *et al.*, 2015). Por otro lado, un extracto de acetona de *S. amarissima*, rico en teotihuacanina y amarissinina B, mostró tener actividad citotóxica contra células MCF-7 y MDA-MB-231 (células de cáncer de mama), al mismo tiempo que aumentó la susceptibilidad a la vinblastina en células MCF-7 resistentes a vinblastina (Bautista *et al.*, 2015; 2017), lo que convierte a la teotihuacanina en un potente modulador de la resistencia a fármacos anticancerígenos.

La realización de estudios que ayuden a elucidar los mecanismos de acción de esta molécula, así como sus blancos moleculares, pueden convertir a la teotihuacanina en una buena candidata para el desarrollo de nuevas estrategias en el tratamiento de cáncer de mama que ayuden a combatir tanto la proliferación de la célula cancerígena, como la resistencia a fármacos.

6. Modelo murino de cáncer de mama con células tumorales 4T1

Se han desarrollado numerosos modelos murinos para investigar elementos clave en la biología del desarrollo y progresión del cáncer de mama. Ningún modelo es ideal, pero los más útiles son aquellos que reflejan la historia natural y la

histopatología de la enfermedad humana, y permiten investigaciones básicas sobre los mecanismos celulares y moleculares subyacentes (Heppner *et al.*, 2000).

El modelo murino de cáncer de mama 4T1, es un modelo singénico en ratones BALB/c hembras, nulíparas, de 6 a 8 semanas de edad. Este modelo utiliza a la línea celular 4T1 para la formación del tumor primario en las mamas del ratón (Pulaski *et al.*, 2000). Las células tumorales de la línea 4T1 pueden ser inoculadas vía ectópica (subcutánea, debajo del cojinete mamario) y la ortotópica (dentro del tejido mamario). El desarrollo del tumor primario puede observarse en la segunda semana después de la inoculación de las células 4T1 y mide entre 3 a 4 mm de diámetro. Estos tumores son muy similares al cáncer de mama humano en estadio IV (Pulaski *et al.*, 2000).

El cáncer de mama humano en estadio IV se caracteriza por varios factores de diagnóstico: (1) la presencia de edema y ulceraciones de la piel en y alrededor de la carga del tumor primario, (2) la extensión del tumor primario al revestimiento de la cavidad torácica, (3) la presencia de células metastásicas en los ganglios linfáticos drenantes, y (4) la presencia de metástasis en órganos distantes (Harris *et al.*, 1997; Pulaski *et al.*, 2000). Los tumores primarios del modelo 4T1 que miden de 3 a 4 mm de diámetro exhiben todas estas características (Pulaski *et al.*, 2000; Fantozzi *et al.*, 2006).

6.1 Células 4T1

La línea celular 4T1 es una subpoblación tumoral resistente a 6-tioguanina. Esta línea celular es derivada de la población parental 410.4 que fue aislada de un único tumor mamario que surgió espontáneamente en un ratón Balb/cfC3H portadora del virus del tumor mamario murino (MMTV) (Heppner *et al.*, 2000).

Las células 4T1 se caracterizan por producir espontáneamente tumores altamente metastásicos que pueden producir metástasis en el pulmón, el hígado, los ganglios linfáticos y el cerebro, cuando son inyectadas en ratones BALB/c (Pulaski *et al.*, 2000).

II. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de 3 tratamientos que consistieron en el extracto total de acetona de *Salvia amarissima*, una fracción de acetato de etilo rica en diterpenos y diterpenoides puros, en la expresión de genes de la vía de la apoptosis y los involucrados en la multiresistencia a fármacos en tejido de tumor primario de mama de ratón.

Objetivos Específicos

1. Evaluar *in vivo* los compuestos de *Salvia amarissima* en ratones hembras BALB/c con cáncer de mama.
2. Evaluar el efecto de los compuestos sobre la expresión de los genes de las vías de la apoptosis (*Fas*, *Bcl2-b*, *Bax*, *Caspasa 3*) por RT-qPCR.
3. Evaluar el efecto de los compuestos sobre la expresión de los genes involucrados en la multiresistencia a fármacos (*Mdr1-b*, *Bcrp*) por RT-qPCR.
4. Evaluar el buffer de extracción de proteínas de células tumorales para un futuro ensayo de Western blot de las proteínas de interés.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de diterpenos

Los extractos acetona y AcOEt ricos en diterpenoides y el diterpenoide puro, teotihuacana, fueron aislados a partir de las partes aéreas de *S. amarissima* (SATPA) después de ser secadas al sol y molidas (Bautista *et al.*, 2015). Las muestras ricas en diterpenos de *S. amarissima* fueron proporcionadas por el Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda, del Laboratorio de Química de Productos Naturales del Consorcio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas, CIIDZA/IPICYT.

2. Obtención de muestras de tumores primarios de cáncer de mama

Los tumores primarios de cáncer de mama se indujeron en las mamas de ratones hembras BALB/c (Bioterio Instituto Mexicano de Seguridad Social, UMAE) nulíparas de 6-7 semanas de edad con la línea celular 4T1. Después de la aparición del tumor (3 mm) en los ratones, se les administró una dosis única, vía oral con los siguientes tratamientos: grupo A [fracción de extracto de acetato de etilo (SATPA-AcOEt)], grupo B [fracción de extracto de acetona (SATPA acetona)] y grupo C [diterpeno puro (teotihuacanina)]. Como grupo control se utilizaron ratones con cáncer de mama que no se le administró ningún tratamiento (grupo N). Al tercer día después del tratamiento los ratones fueron sacrificados, como lo describe Pulaski *et al.*, (2000). En ese momento, los tumores y órganos internos, como bazo y ganglios, se extirparon de los animales. Se registró el peso y volumen de los tumores para determinar el efecto antitumoral. Seguido de eso, se congelaron con nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C. Finalmente, los tumores fueron proporcionados a nuestro grupo de trabajo por el Dr. Fernando Calzada Bermejo del Hospital de Especialidades, UMAE, Instituto Mexicano de Seguridad Social.

3. Diseño de oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos se llevó a cabo mediante el uso del software Primer3Plus. Para el diseño de cada par de oligonucleótidos se tomó la región codificante (CDS) de cada uno de los genes a evaluar de la especie de ratón *Mus musculus*. Se tomaron en consideración isoformas para los genes *Mdr1* y *Bcl2*, involucrados en la resistencia a fármacos y regulación de la apoptosis, respectivamente. El software nos permitió calcular el tamaño de producto a amplificar, temperatura de fusión (T_m) y contenido de guaninas y citosinas (GC). Las propiedades fisicoquímicas de los oligonucleótidos diseñados se evaluaron en el programa OligoEvaluator™ de Sigma-Aldrich®, donde se consideró que no se formarían estructuras secundarias, un bajo porcentaje en la formación de dímeros y una T_m entre 55 °C y 65 °C. La especificidad de los oligonucleótidos diseñados y los previamente reportados (GAPDH), se evaluaron mediante análisis BLAST usando el genoma de referencia de *Mus musculus* (No. acceso GCF_000001635.26). Los oligonucleótidos diseñados fueron sintetizados químicamente en Merck, Sigma-Aldrich® (México). La Tabla 1 (anexo I) muestra las secuencias y parámetros fisicoquímicos de los pares de oligonucleótidos diseñados para los genes involucrados en la vía de la apoptosis (*Fas*, *Bcl2*, *Bax*, *Cas3*) y resistencia a fármacos (*Mdr1*, *Bcrp*).

La estandarización de las condiciones de amplificación se hizo por la técnica de PCR en punto final.

4. Extracción y purificación de RNA

La extracción de RNA total se realizó mediante el uso de TRizol® Reagent (Ambion® by Life Technologies) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La extracción de RNA se hizo a partir de un pool de 3 tumores primarios de mama obtenidos de ratones hembras BALB/c, por cada grupo evaluado [grupo N (sin tratamiento), grupo A fracción de extracto de acetato de etilo (SATPA-AcOEt), grupo B fracción de extracto de acetona (SATPA acetona) y grupo C diterpeno puro

(teotihuacanina)]. El RNA extraído se trató con DNAsa I (Invitrogen™), para remover DNA contaminante. La concentración y rendimiento de las muestras se determinaron con un espectrofotómetro visible UV NanoDrop® 1000 (Thermo Scientific). La integridad del RNA se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% (Figura 7, Anexo II) teñidos con bromuro de etidio (200 ng/mL). El rendimiento obtenido con el método de TRizol® para cada uno de los grupos evaluados por cada 90 mg de tejido, osciló entre los 2,700 y 4,000 ng/μL de RNA.

5. Síntesis de cDNA.

El cDNA se obtuvo a partir de 700 ng de RNA libre de DNA. Para la síntesis del cDNA se empleó la enzima ProtoScript® II (First Strand cDNA Synthesis Kit, New England BioLabs®) de acuerdo a las especificaciones del fabricante, en un volumen de reacción de 20 μL. El cDNA sintetizado se almacenó a -20 °C hasta su uso.

6. Validación de oligonucleótidos por RT-PCR

Tras la obtención del cDNA, se llevó a cabo la reacción de PCR en un termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Los productos de PCR fueron evaluados de manera cualitativa en geles de agarosa al 1.5%. El buffer de corrida utilizado fue TBE al 0.5X. Para los genes *Mdr1* y *Bcl2* se evaluaron las 2 isoformas reportadas. Como control de carga, se utilizó el gen expresado constitutivamente GAPDH. Las temperaturas de amplificación óptimas para PCR punto final se muestran en la Tabla 2 (anexos). Los productos de PCR evaluados cualitativamente se muestran en la Figura 8 (Anexo II).

7. Análisis de expresión génica

La cuantificación relativa de la expresión de los genes, se realizó con el método Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) en el equipo 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo con Fast SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific). El GAPDH se usó como control de carga. En la Tabla 2 del anexo I, se muestran los genes evaluados y las condiciones de amplificación de cada uno de los genes, optimizadas para el tiempo real, así como las concentraciones utilizadas.

8. Preparación de lisados de células tumorales y análisis por Western Blot

Con el fin de evaluar el mejor método para extracción de proteínas de tumor de mama de ratón, se realizó la extracción por 2 métodos y se detectó la proteína β -actina por Western blot, ya que se contaba con ese anticuerpo y porque es una proteína presente de forma constitutiva en tejidos de ratón. El análisis de transferencia Western Blot nos ayudó a determinar la cantidad y calidad de la proteína β -actina. Los tumores primarios sin ningún tratamiento, fueron triturados en nitrógeno líquido y se pesaron 90 mg de tejido para cada método probado. En el primer caso, el tejido se lisó con buffer de ensayo de radioinmunoprecipitación [RIPA] (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, SDS 0.1% y NP-40 1%) suplementado con un cóctel inhibidor de proteasas (Rojas et al., 2019), previamente enfriado en hielo y se centrifugó a 15,000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se utilizó para realizar los ensayos de Western Blot. En el segundo caso, los tejidos fueron lisados con buffer de carga enriquecido con SDS al 10% [Tris-HCl 0.25 M (pH 6.8), Ditiotretitol 0.5 M, glicerol 50%, SDS 10%, azul de bromofenol 0.25%], se incubaron 5 min a 95°C y centrifugaron a 15,000 g por 1 min a temperatura ambiente, como lo describe Abraham (2019). Después de la lisis celular, para el primer caso, se tomaron alícuotas del sobrenadante y mezclaron con buffer de carga 5X y se llevó a una concentración final de 1X en un volumen de 15

μL. Las muestras se incubaron 5 min a 95°C y centrifugaron a 15,000 g por 1 min a temperatura ambiente para enseguida ser cargadas en el gel. En el segundo caso, después de su lisis y centrifugación, se cargaron directamente en el gel. Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% y luego se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa y bloquearon con solución de bloqueo [5% de leche descremada (p/v) en TBS 1x] por 1 h. La membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal IgG₁ de ratón anti-β actina (C4) conjugado con HRP (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:1,000 durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, la proteína se detectó mediante autorradiografía con película de rayos X (Abraham, 2019). Como control de carga se usaron 10 μL de proteína total de planta a 3 μg/μL.

9. Análisis estadístico

La diferencia estadísticamente significativa del peso del tumor y el tamaño del tumor, así como los niveles de expresión de los genes evaluados entre los diferentes grupos de tratamiento se determinó mediante ANOVA de una vía con una comparación multivariable de Dunnet (Prism 8). Una $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Los tratamientos con extractos de *S. amarissima* reducen el tamaño del tumor

Para evaluar si el extracto total de acetona, la fracción de acetato de etilo y los diterpenoides puros de *S. amarissima* tenían algún efecto en el crecimiento del tumor de los ratones con cáncer de mama, se administraron vía oral los diferentes tratamientos. Los ratones que recibieron tratamiento redujeron el crecimiento del tumor significativamente al final del tratamiento, en comparación a los que no recibieron tratamiento, lo cual se vio reflejado en el peso registrado. De forma ilustrativa este efecto se muestra a una dosis por cuestiones de propiedad intelectual (Figura 3). En los últimos años, los terpenoides se han caracterizado por mostrar actividades farmacológicas notables, que incluyen actividades antitumorales, antivirales, anti-hiperglucémicas, antiinflamatorias y antiparasitarias (Jiang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013), especialmente los diterpenoides han demostrado tener una fuerte actividad antitumoral, tal es el caso del taxol (Alqahtani *et al.*, 2019), un derivado diterpenoide actualmente usado en la quimioterapia como paclitaxel® o taxotere®. Así mismo, se informó que un tratamiento de 3 semanas con 15 mg/Kg de criptotanshinona, diterpeno de abietano aislado de *Salvia miltiorrhiza* Bunge, cada dos días en un modelo de xenoinjerto ZR-75-1, reduce el volumen y el tamaño del tumor en ~ 80% y 70%, respectivamente en comparación con el control mediante la inhibición de la expresión de genes diana ER, pS2 y Cat D, relacionados al desarrollo de cáncer de mama (Ateba *et al.*, 2018). Por otro lado, la oridonina, otro diterpeno de origen natural, en un modelo de metástasis espontánea (inyecciones ortotópicas de células de cáncer de mama 4T1 en ratones BALB/c), redujo significativamente la formación de ganglios metastásicos y el área del tumor en un 29 y 53.8%, respectivamente, en comparación con el control (Ateba *et al.*, 2018), datos muy parecidos a los obtenidos con los tratamientos de *Salvia amarissima*, considerando que es el mismo modelo murino usado.

Lo anterior, sugiere que los diterpenoides aislados de *S. amarissima* son promisorios para el tratamiento de cáncer de mama.

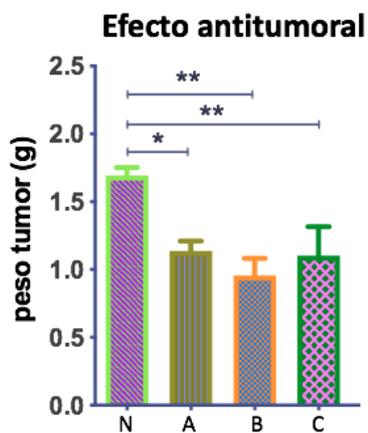


Figura 3. Efecto de los tratamientos con extractos de diterpenos y diterpenos puros de *S. amarissima* en el crecimiento del tumor primario de ratón.

En la imagen se muestran los pesos obtenidos de los tumores primarios de ratón con cáncer de mama después de ser sometidos a extractos de diterpenos y diterpenos puros de *S. amarissima* (N: control, A: extracto de acetona 30 mg/Kg, B: fracción de acetato de etilo 15 mg/Kg, C: teotihuacanina 5 mg/Kg). Los tratamientos lograron reducir el peso de los tumores en comparación con los que no recibieron tratamiento.

Se realizó un análisis de ANOVA de una vía con una comparación múltiple de Dunnett. Se tomaron como valores significativos todos aquellos que tuvieran un $p < 0.05$.

2. Los extractos de *S. amarissima* y teotihuacanina no afectan la expresión de genes de la ruta de apoptosis en cáncer de mama

Para evaluar los efectos de los diferentes compuestos extraídos de *Salvia amarissima* [Sin. *S. cricinata*] (fracción de acetato de etilo, extracto de acetona, y teotihuacanina), administrados a los ratones con cáncer de mama y evaluados al tercer día, sobre los niveles de expresión de los genes de la vía de la extrínseca (*Fas*) e intrínseca (*Bcl2*, *Bax*) de la apoptosis, así como caspasas efectoras (*Casp3*) se realizaron análisis de cuantificación relativa respecto a tumores sin tratamiento, por la técnica de RT-qPCR.

Los perfiles de expresión obtenidos de los genes involucrados en las vías de la apoptosis mostraron que a la dosis ensayada de los tratamientos con extractos de diterpenos y la teotihuacanina aislados de *S. amarissima* no afectan la expresión de los genes de la ruta de la apoptosis en las células tumorales de cáncer de mama a los 3 días, sin embargo, no sabemos qué sucede en tiempos anteriores a la toma de muestra. La cuantificación relativa de los genes se muestra en la Figura 4, en donde no se observó ningún cambio estadísticamente significativo en la expresión de los genes de los ratones que recibieron tratamiento, respecto al nivel de expresión de los genes de los ratones que no recibieron tratamiento. Con estos resultados podemos sugerir varias alternativas: 1) Por un lado, aunque se ha reportado que algunos compuestos de plantas con efecto antitumoral, incrementan la expresión de genes de la vía de apoptosis (proapoptóticos) (Sakamoto *et al.*, 2010; Guzmán *et al.*, 2016; Ateba *et al.*, 2018), existen estudios en los que se ha visto que la respuesta citotóxica de compuestos de origen natural a las células tumorales, está mediada por vías de muerte no apoptóticas como necrosis, catástrofe mitótica y autofagia, en las que las proteasas, que no son caspasas, como las calpaínas o las catepsinas y las enzimas lisosomales o PARP-1 pudieran estar involucradas (Fulda *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Banerjee, *et al.*, 2016). Por lo tanto, las vías de muerte celular no apoptóticas se deben tener en cuenta como respuesta a la terapia citotóxica. 2) Los compuestos de *S. amarissima*

no actúan a nivel transcripcional, sino traduccional, como pasa con los genes reportados por Liao *et al.* (2019), donde al adicionar tetrandrina, un alcaloide de origen natural, a diferentes líneas celulares de cáncer resistentes a fármacos, observaban una disminución en la cantidad de la proteína, sin embargo, no existía ningún cambio en el nivel de transcrito. 3) Finalmente, es posible que en el momento en el cual se analizaron los tumores, el nivel de expresión ya había disminuido para los genes de la vía de apoptosis, por lo que se tendría que analizar tiempos anteriores.

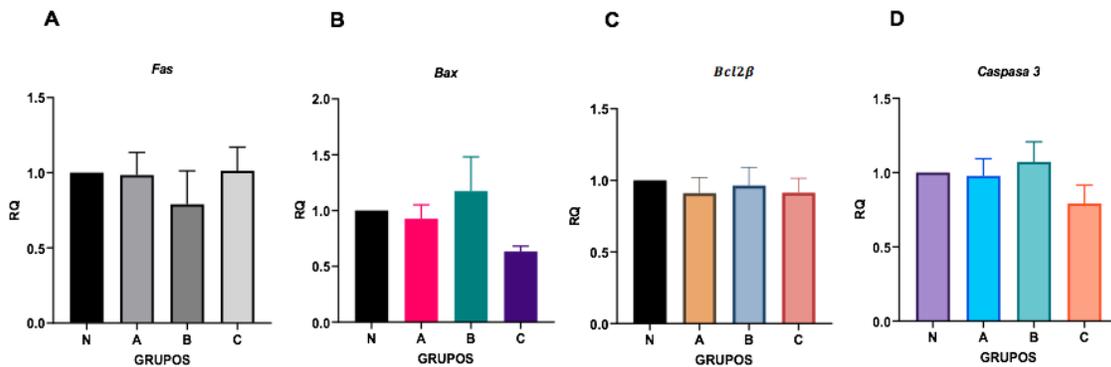


Figura 4. Análisis de expresión relativa de los genes involucrados en la vía de la apoptosis en tumores de mama de ratones tratados con extractos de *Salvia amarissima*.

Se evaluó la expresión del mRNA de genes involucrados en la vía [A] extrínseca (*Fas*) e [B-C] intrínseca (*Bax*, *Bcl2β*) de la apoptosis, así como una de las [D] caspasas efectoras (*Caspasa 3*), en tumores primarios de mama obtenidos de ratón, después de recibir diferentes tratamientos de *Salvia amarissima* (N: control, A: extracto de acetona, B: fracción de acetato de etilo, C: teotihuacanina). La expresión de mRNA se analizó por la técnica de RT-qPCR. Se usó GAPDH como control de carga. Cada una de las barras muestra la media de la cuantificación hecha por triplicados para cada uno de los grupos evaluados. Se realizó un análisis de ANOVA de una vía con una comparación múltiple de Dunnett. Se tomaron como valores significativos todos aquellos que tuvieran un $p < 0.05$.

3. Los extractos de *S. amarissima* y teotihuacanina reprimen los genes de resistencia a múltiples fármacos en cáncer de mama

La evaluación de los niveles de expresión de los genes involucrados en la multiresistencia a fármacos (*Mdr1* y *Bcrp*), mediada por los diferentes compuestos extraídos de *Salvia amarissima* [*S. amarissima*] (fracción de acetato de etilo, extracto de acetona, y teotihuacanina), se llevó a cabo por la técnica de RT-qPCR.

Los compuestos de *S. amarissima* mostraron inhibir significativamente la expresión los genes involucrados en la multiresistencia a fármacos (Figura 5). En el caso de *Mdr1 β* , se observó que la fracción de acetato de etilo, tuvo una mayor inhibición del gen, respecto al extracto de acetona y la teotihuacanina (Figura 5A), esto podría ser explicado por la presencia de otros compuestos de tipo terpenoide con lo que se genere sinergia como lo reporta Shuhendler *et al.* (2014), donde la administración simultánea de doxorubicina y mitomicina C tiene un efecto sinérgico, inhibiendo la MDR en ratones inmunodeprimidos y en la células de cáncer de mama murino MDR EMT6/AR1. Sin embargo, para *Bcrp*, a pesar de que los compuestos de *S. amarissima* inhiben su expresión, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. A pesar de que *Mdr1 β* y *Bcrp* codifican para proteínas de la misma superfamilia, son genes independientes que pueden tener mecanismos de inducción diferentes por lo que el nivel de transcrito entre genes puede variar aún cuando se encuentren bajo las mismas condiciones en el microambiente celular, como lo observaron Zou *et al.*, en el 2014, donde el nivel de transcrito de ABCB1 (*Mdr1 β*) y ABCG2 (*Bcrp*), difieren ligeramente al ser sometidas al mismo tratamiento.

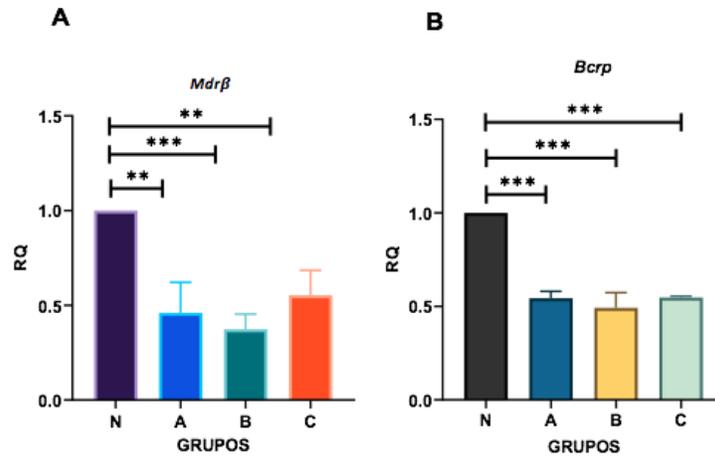


Figura 5. Análisis de expresión relativa de los genes involucrados en la multiresistencia a fármacos en tumores de mama de ratones tratados con extractos de *Salvia amarissima*.

[A] Análisis de la expresión de la isoforma *Mdr1β* de tres tratamientos (A, B y C) respecto a tumores sin tratar (N), **[B]** Análisis de la expresión del gen *Bcrp* de tres tratamientos (A, B y C) respecto a tumores sin tratar (N). Se evaluó la expresión del mRNA de genes involucrados en la multiresistencia a fármacos en tumores primarios de mama de ratón, después de recibir diferentes tratamientos de *Salvia amarissima* (N: control sin tratamiento, A: extracto de acetona, B: fracción de acetato de etilo, C: teotihuacanina). La expresión de mRNA se analizó por la técnica de RT-qPCR. Se usó GAPDH como control interno. Cada una de las barras muestran la media de la cuantificación hecha por triplicados para cada uno de los grupos evaluados. Se realizó un análisis de ANOVA de una vía con una comparación múltiple de Dunnett. Se tomaron como valores significativos todos aquellos que tuvieran un $p < 0.05$.

4. Selección del método de extracción de proteínas de tumor de mama de ratón para posteriores ensayos de Western blot.

Se evaluaron dos métodos de extracción de proteína total de tumor de mama de ratón, para detectar la proteína β -actina mediante el ensayo de Western blot y posteriormente evaluar proteínas relacionadas en la vía de la apoptosis y multiresistencia a fármacos. Estos datos nos servirán para poder entablar una relación entre el nivel de transcrito y el nivel de proteína. Los resultados del Western blot se muestran en la Figura 6, en donde se observa que la extracción de proteína con ambos buffers fue muy buena. El carril con el control de carga (C+) contiene 30 μ g de proteína total de planta, por lo que se puede estimar que los carriles con las muestras de tumor primario de mama de ratón tienen aproximadamente 10 veces la cantidad del control (300 μ g), lo cual es un alto rendimiento de proteína. El tiempo de exposición para el revelado del Western blot fue de 2 segundos. Sin embargo, hace falta determinar la concentración de proteína en los extractos, utilizando un método cuantitativo como el de Bradford. El buffer de extracción RIPA, al contener inhibidores de proteasas, puede mantener las proteínas estables por más tiempo (Roche, 2020), por tal motivo, el buffer RIPA se seleccionó para futuros experimentos.

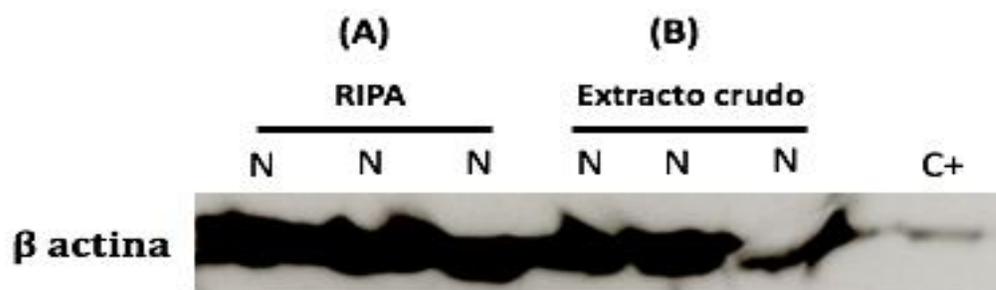


Figura 6. Detección de la proteína β actina de ratón, evaluada mediante un ensayo de Western blot en tejido de tumor primario de mama de ratón.

El tejido de tumor primario de mama de ratón BABL/c obtenido de ratón del grupo N (sin ningún tratamiento) se lisó en buffer de ensayo de radioinmunoprecipitación en frío (RIPA) [A] y en buffer de carga rico en SDS [B], para evaluar la calidad de la proteína con los diferentes métodos de extracción. Cada extracto se cargó por triplicado. Se usó extracto de plantas como control positivo. Se usó el anticuerpo monoclonal IgG₁ de ratón anti- β actina (C4) conjugado con HRP (1:1000).

V. CONCLUSIONES

1. Los tratamientos con extractos de diterpenos y el diterpeno puro aislados de *Salvia amarissima* reducen el tamaño del tumor, en comparación con los que no recibieron ningún tratamiento.
2. Es posible amplificar por RT-PCR y RT-qPCR, los genes de la ruta de apoptosis y de multiresistencia, en tumores de mama de ratón mediante las condiciones experimentales establecidas.
3. El extracto y la fracción de *Salvia amarissima* así como teotihuacanina no inducen o reprimen la expresión de los genes involucrados en la vía de la apoptosis.
4. La expresión de los genes involucrados en la multiresistencia a fármacos se ve disminuida por la fracción de acetato de etilo y el extracto de acetona de *Salvia amarissima* y la teotihuacanina.
5. La fracción de acetato de etilo de *Salvia amarissima* tiene un mayor efecto en la inhibición del gen *Mdr1 β* .
6. Es posible detectar la proteína β -actina por Western Blot en tumores de mama de ratón sin tratamientos.
7. El buffer de extracción RIPA produjo un rendimiento adecuado de proteína total de tumores primarios de mama de ratón.

VI. REFERENCIAS

Abraham, J. *et al.* (2019) 'Western Blot in maize', *Bio-101*. doi: 10.217/BioProtoc.3257.

Alqahtani, F. *et al.* (2019) 'Paclitaxel', in *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*; 205–238. doi: 10.1016/bs.podrm.2018.11.001.

Arrechea Irigoyen. *et al.* (2011) 'Subtipos moleculares del cáncer de mama: Implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas'. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*; 34(2): 219–233. doi: 10.4321/S1137-66272011000200008.

Ateba, S., Mvondo, M., Ngeu, S., Tchoumtchoua, J., Awounfack, Ch., Njamen, D., Krenn, L. (2018). 'Natural terpenoids Against female breast cancer: A 5-year recent research'. *Current Medicinal Chemistry*; 25(27): 3162-3213.

Bao B., Prasad, A. (2012) En: *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance: Progress and Prospects*. "Targeting CSC in a most aggressive subtype of breast cancer TNBC". 2da edn, doi: 10.1007/978-1-4614-5647-6.

Baselga, J. (2011) 'Targeting the Phosphoinositide-3 (PI3) Kinase Pathway in Breast Cancer', *The Oncologist*, 3, pp. 19–24. doi: 10.1634/theoncologist.2012-0234.

Bautista, E., Maldonado, E., Ortega, A. (2012). 'neo-Clerodane Diterpenes from *Salvia herbacea*'. *Journal of Natural Products*; 75(5): 951–958. doi:10.1021/np3001464

Bautista, E. *et al.* (2015) 'Teotihuacanin, a diterpene with an unusual spiro-10/6 system from *Salvia amarissima* with potent modulatory activity of multidrug resistance in cancer cells', *Organic Letters*, 17(13), pp. 3280–3282. doi: 10.1021/acs.orglett.5b01320.

Bautista, E. *et al.* (2017) 'Corrigendum to "Structural elucidation and evaluation of multidrug-resistance modulatory capability of Amarissinins A-C, diterpenes derived from *Salvia amarissima*" [Fitoterapia 114 (2016) 1–6] (S0367326X16301861)(10.1016/j.fitote.2016.08.007)', *Fitoterapia*, 116, p. 146. doi: 10.1016/j.fitote.2016.11.001.

Banerjee, M. *et al.* (2016) 'Cytotoxicity and cell cycle arrest induced by andrographolide lead to programmed cell death of MDA-MB-231 breast cancer cell line'. *Journal of Biomedical Science*; 23(1). doi: 10.1186/s12929-016-0257-0.

Coley, H. (2008). 'Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer'. *Elsevier*; 34: 378-390. doi:10.1016/j.ctrv.2008.01.007.

Cragg, G., Newman, D. (2005). 'Plants as a source of anti-cancer agents'. *Journal of Ethnopharmacology*; 100 (1-2): 72-79.

Domínguez Boada L. (2004). 'Principios generales de carcinogénesis: carcinogénesis química y hormonal'. *Biocancer*. 1. Recuperado de: <http://www.biocancer.com/journal/235/principios-generales-de-carcinogenesis-carcinogenesis-quimica-y-hormonal>.

Elmore S. (2007). 'Apoptosis: a review of programmed cell death'. *Toxicologic pathology*; 35(4): 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.

Fantozzi, A., & Christofori, G. (2006). 'Mouse models of breast cancer metastasis'. *Breast Cancer Research*; 1-11.

Fulda, S., Debatin, K. (2006). 'Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy'. *Oncogene*; 25: 4798–4811. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209608>.

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. *et al.* (2018). 'Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018'. *Cell Death Differentiation*; 25: 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.

Gao, S. *et al.* (2017). 'Cepharanthine induces autophagy, apoptosis and cell cycle arrest in breast cancer cells'. *Cellular Physiology and Biochemistry*; 41(4); 1633–1648. doi: 10.1159/000471234.

Gu, J. W. *et al.* (2013). 'EGCG, a major green tea catechin suppresses breast tumor angiogenesis and growth via inhibiting the activation of HIF-1 α and NF κ B, and VEGF expression'. *Vascular Cell*; 5(1): 1–10. doi: 10.1186/2045-824X-5-9.

Gupta, S., Bhattacharyya, B. (2003). 'Antimicrotubular drugs binding to vinca domain of tubulin'. *Molecular and Cellular Biochemistry*; 253 (1-2):41-47.

Guzmán-Rodríguez, J., López-Gómez, R., Salgado-Garciglia R., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J. (2016). 'The defensin from avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 82: 620–627.

Harbeck, N. *et al.* (2010). 'Personalized treatment of early-stage breast cancer: Present concepts and future directions'. *Cancer Treatment Reviews*. Elsevier Ltd; 36(8): 584–594. doi: 10.1016/j.ctrv.2010.04.007.

Harbeck, N., Gnant, M. (2017). 'Breast cancer'. *Key Topics in General Surgery*. Elsevier Ltd; 389(10074): 307–311. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31891-8.

Harris, J., Morrow, M., and Norton, L. (1997). 'Cancer of the breast. In *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, 5th edition. (V.T. DeVita Jr., S. Hellman, and S.A. Rosenberg, eds.), 1541- 1616. Lippincott-Raven, Philadelphia.

Heppner, G. H., Miller, F. R., & Shekhar, P. M. (2000). 'Nontransgenic models of breast cancer'. *Breast cancer research: BCR*; 2(5): 331–334. <https://doi.org/10.1186/bcr77>

Hu, T., To, K., Wang, L., Zhang, L., Lu, L., Shen, J., Cho, C. (2014). 'Reversal of P-glycoprotein (P-gp) mediated multidrug resistance in colon cancer cells by cryptotanshinone and dihydrotanshinone of *Salvia miltiorrhiza*'. *Phytomedicine*; 21(11): 1264–1272.

Instituto Nacional del Cáncer. (2019) 'Terapias dirigidas contra el cáncer'. Recuperado de : <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/terapia-dirigida/hoja-informativa-terapias-dirigidas>.

INEGI. (2017). 'Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos Nacionales'. Inegi [Internet]:1–14. Available from: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf.

Jassbi, A., Zare, S., Firuzi, O., Xiao, J. (2016). 'Bioactive phytochemicals from shoots and roots of *Salvia* species'. *Phytochemistry*; 15(5):829-867.

Jiang, Liang, L., Guo, W. (2012). 'Natural products possessing protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory activity found in the last decades'. *Acta Pharmacologica Sinica*; 33(10):1217-1245.

Koolman, J., Röhm, K. (2004). 'Bioquímica: Texto y Atlas: La Apoptosis'. Editorial Médica Panamericana; 3 ed: 396.

Khunweeraphong, N., Stockner, T., Kuchler, K. (2017). 'The structure of the human ABC transporter ABCG2 reveals a novel mechanism for drug extrusion'. *Scientific reports*; 7(1): 13767. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11794-w>.

Kumar, A., Jaitak, V. (2019). 'Natural products as multidrug resistance modulators in cancer'. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 176:268-291.

Limtrakul, P., Chearwae, W., Shukla, S., Phisalpong, Ch., Ambudkar, S. (2007). 'Modulation of function of three ABC drug transporters, P-glycoprotein (ABCB1), mitoxantrone resistance protein (ABCG2) and multidrug resistance protein 1 (ABCC1) by tetrahydrocurcumin, a major metabolite of curcumin'. *Molecular and Cellular Biochemistry*; 296:85-95.

Liao, D., Zhang, W., Gupta, P., Lei, Z. N., Wang, J., Cai, C. Y., Vera, A., Zhang, L., Chen, Z., Yang, D. (2019). 'Tetrandrine interaction with ABCB1 reverses multidrug resistance in cancer cells through competition with anti-cancer drugs followed by downregulation of ABCB1 expression'. *Molecules*; 24(23):4383.

Martín de Civetta, M & Civetta, J. (2011). 'Carcinogénesis'. *Salud Publica Mex*; 53:405-414.

Martin, H., Smith, L., Tomlinson, D. (2014). 'Multidrug-resistant breast cancer: Current perspectives'. *Breast Cancer*; 6:1-13. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S37638>.

Olopade, O. I., Pichert, G. (2001). 'Cancer genetics in oncology practice'. *Ann Onc*; 12: 895–908.

Organización Mundial de la Salud. (2018). 'Cáncer'. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., y 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>

Pulaski, B., Ostrand-Rosenberg, S. (2000). 'Mouse 4T1 Breast Tumor Model'. *Current Protocols in Immunology*; 39 (1): 1-16.

Roche (2020). 'Protein Stabilization Reagents from Roche'. Recuperado de: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/roche/roche-protein-stabilization-reagents.html>

Rojas, P. *et al.* (2019). 'Fasting reduces oxidative stress, mitochondrial dysfunction and fibrosis induced by renal ischemia-reperfusion injury'. *Free Radical Biology and Medicine*; 135: 60-65. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.018.

Sakamoto, T., Horiguchi, H., Oguma, E., Kayama, F. (2010). 'Effects of diverse dietary phytoestrogens on cell growth, cell cycle and apoptosis in estrogen-receptor-positive breast cancer cells'. *Journal of Nutritional Biochemistry*; 21:856-864.

Singh, R., Letai, A., Sarosiek, K. (2019). 'Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*; 20: 175–193. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>.

Shuhendler, A., Prasad, P., Zhang, R., Amini M., Sun M., Liu P., Bristow R., Rauth A., Wu X. (2014). 'Synergistic nanoparticulate drug combination overcomes multidrug resistance, increases efficacy, and reduces cardiotoxicity in a nonimmunocompromised breast tumor model'. *Molecular Pharmaceutics*; 11 (8): 2659-2674.

Srivastava, V., Negi, A., Kumar, J., Gupta, M., Khanuja, S. (2005). 'Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads'. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*; 13(21): 5892-5908.

Szakács, G., H., Gottesman, M., Boumendjel, A., Kachadourian, R., Day, B. Baubichon-Cortay, Di Pietro, A. (2014). 'Targeting the achilles heel of multidrug-resistant cancer by exploiting the fitness cost of resistance'. *Chemical Reviews*; 114(11):5753-5774. <https://doi.org/10.1021/cr4006236>.

Wang, S. *et al.* (2013) 'Oridonin induces apoptosis, inhibits migration and invasion on highly-metastatic human breast cancer cells', *American Journal of Chinese Medicine*, 41(1), pp. 177–196. doi: 10.1142/S0192415X13500134.

Wellings, E. *et al.* (2016). 'Breast cancer screening for high-risk patients of different ages and risk-Which modality is most effective?'. *Cureus*; 8(12): 945.

Wu, H., Medeiros, L., Young, K. (2018). 'Apoptosis signaling and BCL-2 pathways provide opportunities for novel targeted therapeutic strategies in hematologic malignances'. *Blood Reviews*; 32(1):8-28. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.08.004>.

Yang, M., Li, H., Li, Y., Ruan, Y., & Quan, C. (2018). 'Identification of genes and pathways associated with MDR in MCF-7/MDR breast cancer cells by RNA-seq analysis'. *Molecular medicine reports*; 17(5):6211–6226. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8704>.

Zhang, T. *et al.* (2013). 'DNA damage induced by oridonin involves cell cycle arrest at G2/M phase in human MCF-7 cells'. *Wspolczesna Onkologia*; 17(1): 38–44. doi: 10.5114/wo.2013.33772.

Zou Z., Zhang, J., Zhang, H., Liu, H., Li, Z., Cheng, D., Chen, J., Liu, L., *et al.* (2014). '3-Methyladenine can depress drug efflux transporters via blocking the PI3K-AKT-mTOR pathway thus sensitizing MDR cancer to chemotherapy'. *Journal of Drug Targeting*; 22(9):839-848.

ANEXO I

(Tablas)

Tabla 1. Características de los oligonucleótidos diseñados para este trabajo.

Gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Amplicón	T _m (°C)	%GC	Estructuras secundarias	Formación de dímeros
<i>Fas</i>	FASf	GCTGTGGATCTGGGCTGT	174 pb	64.2	60	Ninguna	No
	FASr	CATGGTTGACAGCAAAATG G		63.9	45	Muy pocas	No
<i>Bax</i>	BAXf	TGCAGAGGATGATTGCTGA C	173 pb	64	50	Pocas	No
	BAXr	GATCAGCTCGGGCACTTTA G		63.8	55	Ninguna	No
<i>Bcl2α</i>	BCL2af	GATCAGCTCGGGCACTTTA G	187 pb	63.8	55	Ninguna	No
	BCL2ar	GGTATGCACCCAGAGTGAT G		63.1	55	Pocas	No
<i>Bcl2β</i>	BCL2bf	GTGGTGGAGGAACTCTTCA G	153 pb	61.3	55	Pocas	No
	BCL2br	CCGGTTCAGGTA CT CAGTC A		62.8	55	Ninguna	No
<i>Caspasa 3</i>	CASP3f	CTGGAATGTCATCTCGCTCT	165 pb	62	50	Ninguna	No
	CASP3r	AGCTGCTCCTTTTGCTATGA		61.7	45	Pocas	No
<i>Bcrp</i>	BCRPf	CTCGCAGAAGGAGATGTGT T	151 pb	62.1	50	Pocas	No
	BCRPr	TGGGTCCCAGAATAGCATT A		61.8	45	Pocas	No
<i>Mdr1α</i>	MDR-1af	GTACATGCTGGTGGGAACT C	188 pb	62.1	55	Ninguna	No
	MDR-1ar	CGTACGTGGTCATTTCTTCC		62	50	Ninguna	No

<i>Mdr1β</i>	MDR-1bf	CCAGTATTCTGCCAAGCATT	240 pb	61.6	45	Pocas	No
	MDR-1br	CAAACCAGCCTATCTCCTG A		61.8	50	Pocas	No

*La "f" en el nombre de cada oligonucleótido hace referencia al oligonucleótido diseñado forward y la letra "r" al oligonucleótido reverse.

Tabla 2. Temperaturas de amplificación óptimas.

PCR punto final			RT-qPCR		
Gen	Amplicón	Ta (°C)	Gen	Ta (°C)	[cDNA] ng/μL
<i>Fas</i>	174 pb	60	<i>Fas</i>	60	3
<i>Bax</i>	173 pb	57	<i>Bax</i>	60	3
<i>Bcl2α</i>	187 pb	57	<i>Bcl2α</i>	60	3
<i>Bcl2β</i>	153 pb	60	<i>Bcl2β</i>	60	3
<i>Caspasa 3</i>	165 pb	60	<i>Caspasa 3</i>	60	3
<i>Bcrp</i>	151 pb	60	<i>Bcrp</i>	60	3
<i>Mdr1α</i>	188 pb	57	<i>Mdr1α</i>	60	3
<i>Mdr1β</i>	240 pb	57	<i>Mdr1β</i>	60	3

ANEXO II

(Geles de calidad)

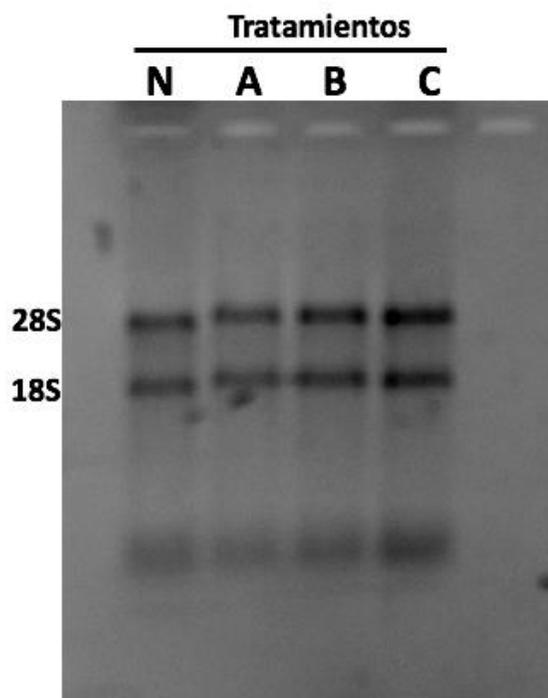


Figura 7. Gel de calidad de RNA total de tumores primarios de mama a partir de ratones hembras BALB/c para síntesis de cDNA.

Se muestra un resultado representativo del análisis electroforético de RNA extraídos a partir de 90 mg de tumor primario de mama con el método de Trizol®, después de ser tratado con DNAsa I. En la imagen se observan las bandas correspondientes a los RNA ribosomales (rRNA) 28S y 18S. Las letras en la parte superior de la imagen indican los diferentes tratamientos usados en el experimento (N: control, A: fracción de acetato de etilo, B: extracto de acetona, C: teotihuacanina).

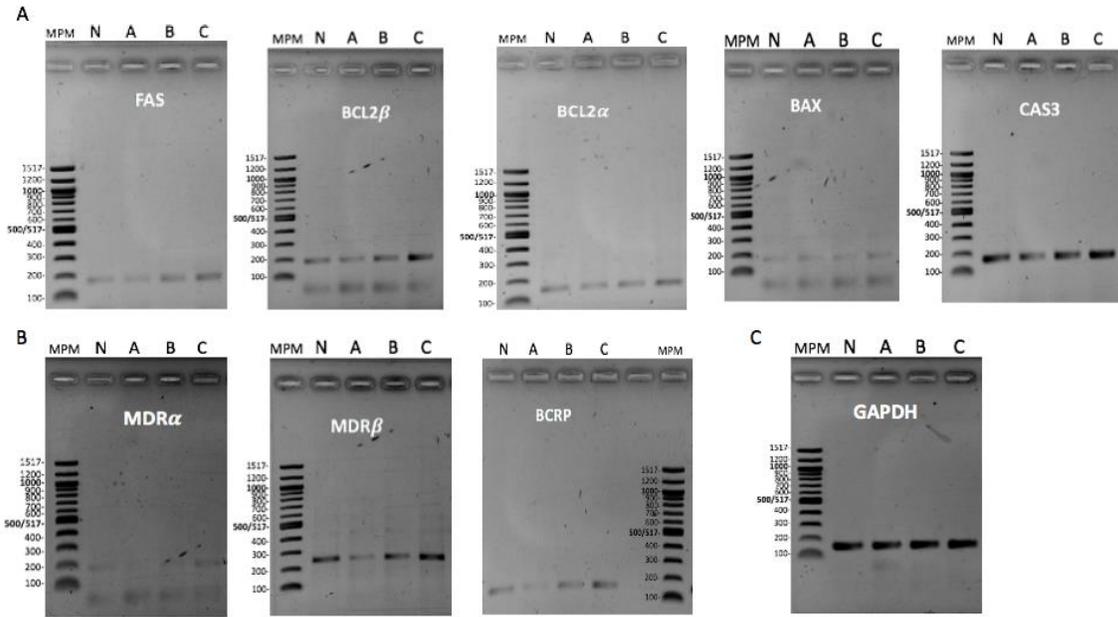


Figura 8. Análisis cualitativo de la expresión de los genes involucrados en la vía de la apoptosis y la resistencia a fármacos, mediante RT-PCR punto final, en tumores de mamas de ratonas BALB/c tratadas con diferentes compuestos extraídos de *Salvia amarissima*.

Para optimizar las condiciones de los oligonucleótidos diseñados, se evaluó el nivel de transcrito por RT-PCR de genes involucrados en la vía de la apoptosis y en la multiresistencia a fármacos. Los productos de PCR fueron evaluados cualitativamente por geles de agarosa al 1.5%. **[A]** Se observan los productos de PCR de los genes de la vía intrínseca (*Bax*, *Bcl2*) y la vía extrínseca (*Fas*) de la apoptosis, así como la caspasa efectora (*Caspasa 3*). El gen *Bcl2* tiene 2 isoformas (alfa y beta), en ratones por lo que ambas fueron evaluadas. **[B]** Muestra los genes involucrados en la multiresistencia a fármacos. El gen *Mdr1* tiene 2 isoformas (alfa y beta) en ratón y ambas fueron evaluadas. **[C]** Se usó GAPDH como control de carga. Las letras en la parte superior de la imagen indican los diferentes tratamientos usados en el experimento (N: control, A: fracción de acetato de etilo, B: extracto de acetona, C: teotihuacanina).

ANEXO III

(Protocolos)

Extracción de RNA con TRizol® Reagent (Ambion® by Life Technologies)

La extracción de RNA se lleva a cabo a partir de 100 mg de tejido tumoral obtenido de ratón (conservado a -80°C)

1. Triturar el tumor primario en frío (nitrógeno líquido) hasta obtener un macerado fino (no dejar hidratar el tejido, agregar nitrógeno las veces que sea necesario).
2. Agregar 1 mL de TRizol® por cada 100 mg de tejido. Homogeneizar hasta lograr la lisis total de las células. Incubar a temperatura ambiente por 5 min.
3. Añadir 200 µL de cloroformo frío por cada mL de TRizol utilizado. Agitar por inversión e incubar 5 min en hielo.
4. Centrifugar a 12,000 rpm a 4°C durante 15 min. Debe existir la separación de la fase acuosa y orgánica. **NOTA.** Si la fase acuosa no se observa transparente, recuperar la fase acuosa en un nuevo microtubo de 1.5 mL estéril y repetir el paso 3.
5. Transferir la fase acuosa a un microtubo de 1.5 mL estéril y añadir 500 µL de isopropanol frío por cada mL de TRizol utilizado. Mezclar por inversión e incubar 15 min en hielo.
6. Centrifugar a 12,000 rpm a 4°C durante 15 min.
7. Eliminar el sobrenadante y lavar el sedimento adicionando 1 mL de etanol al 75% (con agua DEPC) por cada mL de TRizol usado. Mezclar por inversión. Centrifugar a 7,000 rpm por 5 min.
8. Desechar sobrenadante y dejar secar la pastilla sin dejar que se deshidrate.
9. Resuspender la pastilla en agua DEPC estéril (30-50 µL).
10. Almacenar a -80°C hasta su uso.

Tratamiento con DNasa I (Invitrogen™ kit)

Reactivos	Concentraciones
DNasa I	100 U
Buffer de reacción DNasa I	10 x
EDTA (pH 8.0)	25 M

1. En microtubos de 1.5 mL, añadir 1 µg de RNA, 1 µL de buffer para DNasa, 1 µL de DNasa y completar a un volumen de 10 µL con agua DEPC estéril.
2. Incubar microtubos por 10 min a temperatura ambiente.
3. Inactivar la DNasa I con 1 µL de EDTA e incubar por 10 min a 65°C.
4. Cuantificar y hacer gel de calidad
5. Almacenar a -80°C hasta su uso.

Gel de calidad al 1.2%

1. Disolver 0.48 g de agarosa en 27.43 mL de agua DEPC. Fundir agarosa.
2. Mezclar formaldehído (8 mL) y 4.57 mL de MOPS 10X en la agarosa fundida (cuando se encuentre en una temperatura tolerable a la piel).
3. Verter agarosa en el soporte la cámara y poner el peine.

NOTA: El voltaje de corrida es de 70 mV. El buffer de corrida es MOPS 1X.

Preparación de muestras de RNA para gel de calidad

1. Adicionar 2-3 µL (600 ng/µL) de RNA en un microtubo de 0.6 mL estéril.
2. Agregar 3 µL de buffer de carga para RNA (RNA Gel Loading Dye 2X by ThermoFisher Scientific).
3. Incubar a 65°C por 2 min y cargar gel.

Síntesis de cDNA con ProtoScript II First Strand Synthesis Kit (New England Biolabs)

1. Mezclar RNA con oligonucleótidos d(T)₂₃VN en microtubos estériles y ajustar volumen a 8 µL con agua libre de nucleasas.

Componente	Volumen
RNA total	1-6 µL (hasta 1 µg)
d(T) ₂₃ VN (50 µM)	2 µL
Agua libre de nucleasas	para un volumen total de 8 µL

2. Desnaturalizar RNA/d(T)₂₃VN a 65°C por 5 min. Dar un pulso y ponerlo inmediatamente en hielo.
3. Añadir los siguientes componentes:

Componente	Volumen
Mezcla de reacción ProtoScript II (2X)	10 µL
Mezcla de enzimas ProtoScript II (10X)	2 µL

4. Incubar los 20 µL de reacción de síntesis de cDNA a 42°C por 1 h.
5. Inactivar la enzima a 80°C por 5 min.
6. Almacenar a -20°C.

Western Blot

a. Preparación de la muestra

1. Añadir 200 μ L de solución de lisis por cada 100 mg de tejido y homogeneizar para liberar las proteínas:

Solución de lisis	Componentes
RIPA	Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, SDS 0.1% y NP-40 1%, cóctel de proteasas.
Buffer de carga 5X	Tris-HCl 0.25 M (pH 6.8), dithiothreitol 0.5 M, glicerol al 50%, SDS al 10%, azul de bromofenol 0.25%.

2. Centrifugar por 10 min a 12,000 rpm, recuperar sobrenadante y mantener en hielo en el caso de usar RIPA. Cuando se usa buffer de carga 5X, seguir el paso 9.

b. Electroforesis en gel

3. Preparar un gel de poliacrilamida al 12% para SDS-PAGE, mezclando los reactivos de la siguiente manera:

Concentrador (12%)	Separador (4%)
1.6 mL de agua milliQ	1.4 mL de agua milliQ
2.0 mL de acrilamida/bis al 30%	0.27 mL de acrilamida/bis al 30%
1.3 mL de Tris HCl 1.5 M (pH 8.8)	0.25 mL de Tris HCl 0.5 M (pH 6.8)

50 μ L de SDS al 10%	20 μ L de SDS al 10%
50 μ L de APS 10%	20 μ L de APS 10%
6 μ L TEMED	5 μ L TEMED

NOTA: Adicione TEMED hasta que esté listo para verter el gel porque después de agregarlo inicia la polimerización. Agregue TEMED a la mezcla en una campana extractora, es muy tóxico.

4. Probar el sellado agregando 1 mL de etanol anhidro en el sándwich de vidrio y rotule el nivel con un rotulador. Si después de 5 minutos no hay fugas visibles, está listo para usar.
5. Añadir TEMED al gel separador, mezclar completamente y verter rápidamente 4.5 mL en el sándwich de vidrio.
6. Agregar 1 mL de etanol anhidro al gel (esto es para establecer una superficie lisa y reducir la entrada de oxígeno) e incube 15 min a temperatura ambiente para la polimerización.
7. Verter el etanol a una toalla de papel. Agregar TEMED al gel de concentrador, mezclar completamente y añadir 1.5 mL sobre el gel separador. Inserte rápidamente el peine en el gel concentrador líquido. Tratar de evitar burbujas en los pozos.
8. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente para la polimerización. Guarde el gel dentro del sándwich de vidrio cubierto con una envoltura de plástico a 4°C durante la noche para una polimerización completa.
9. Mezcle muestras con 5X de buffer de carga a una concentración final 1X (agregue 2.5 μ L de buffer de carga a 10 μ L de muestra). Incubar a 95°C durante 5 min. Centrifugar las muestras durante 1 min a temperatura ambiente a 12,000 rpm.
10. Sacar el sándwich de vidrio con el gel del refrigerador y dejar temperar. Cargar las muestras al gel.
11. Correr el gel con un voltaje constante a 80 V hasta que el frente del colorante esté al final del gel concentrador, luego aumentar el voltaje a 120 V hasta que el frente del colorante llegue al fondo del gel.

c. Transferencia gel-membrana

12. Después de la corrida retirar el gel de las placas de vidrio y deseche el gel separador. Equilibrar el gel separador en 100 mL de buffer de transferencia durante 15 min, en una caja de plástico cuadrada con tapa.
 13. Cortar una membrana de PVDF del mismo tamaño que el gel y sumergir en 10 mL de metanol al 100% durante 1 min.
 14. Transferir la membrana a la caja que contiene el gel con buffer de transferencia. Equilibrar durante 5 min.
 15. Añadir dos juegos de 3 cuadrados de papel de filtro delgado en el buffer que contiene el gel y la membrana, de forma que quede un sándwich (papel filtro-membrana-gel-papel filtro).
 16. Transferir durante 7 minutos a 15 V en el secador semi seco (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, BIO-RAD), para 1 mini gel. Cuando termine, abra el papel secante, retire los papeles de filtro y el gel. Tomar la membrana con pinzas y colocar sobre dos capas de papel (papel toallas desechables) para secarlo durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente.
 17. Remojar la membrana seca en metanol al 100% durante 1 min y luego en 1X TBST durante 5 min con agitación suave.
 18. Bloquear la membrana con 15 mL de solución de bloqueo, agitar a 50 rpm a temperatura ambiente durante 1 h.
 19. Lavar la membrana en TBST 1X, tres veces durante 5 minutos cada una. Todos los lavados e incubaciones se realizan a 50 rpm.
 20. Incubar la membrana con el anticuerpo primario a 1: 1,000 en TBST 1X, agitando durante 2h a temperatura ambiente es un tiempo de incubación suficientemente largo.
 21. Lavar la membrana en TBST 1X tres veces durante 5 minutos cada una.
 22. Incubar la membrana con el anticuerpo secundario a una dilución de 1: 3,000 a 1: 10,000 en TBST 1X, agitando a temperatura ambiente durante 2 h.
- NOTA.** Únicamente en caso de que el anticuerpo primario no esté conjugado al secundario.

23. Lavar la membrana en TBST 1X tres veces durante 10 min en cada lavado.

d. Inmunodetección

24. Para detectar la proteína, trate la membrana con sustrato para detección con peroxidasa, si el anticuerpo secundario se conjuga con HRP (peroxidasa de rábano picante). Colocar 800 μ L del sustrato en una lámina de plástico (un trozo de envoltura de plástico) y remoje completamente la membrana en ambos lados.

25. Incubar 5 min en la oscuridad. Drenar el exceso de sustrato tomando la membrana con pinzas y de manera vertical 10 s, sobre toallitas desechables. Colocar la membrana entre dos capas de plásticos transparentes para evitar que se seque.

26. Colocar la membrana envuelta con la proteína hacia arriba en un cassette de película de rayos X. En un cuarto oscuro, exponer a una película de rayos X durante 30 segundos. Dependiendo de la intensidad de la señal, ajuste el tiempo de exposición.

ANEXO IV

(Soluciones)

Acetato de sodio 1M

Disolver 16.406 g de acetato de sodio en 150 mL de agua DEPC/miliQ y aforar a 200 mL.

Agarosa 1.5%

Pesar 1.5 g de agarosa (Bio-RAD®, USA) y agregar 100 mL de buffer TBE 0.5X, mezclar la agarosa con el buffer y fusionar los componentes en un microondas por 1 min aproximadamente. Dejar enfriar, verter en charola y colocar peine.

Agua DEPC 0.1%

Adicionar 100 μ L de DEPC (dietil pirocarbonato) por cada 100 mL de agua miliQ. Incubar aproximadamente 12 horas a 28 °C en agitación constante, protegidos de la luz. Esterilizar mediante autoclave (121 °C 15 lbs) durante 30 min.

Buffer de carga 5X con azul de bromofenol

Para 5 mL:

Tris-HCl 0.25 M (pH 6.8), dithiothreitol 0.5 M, glicerol al 50%, SDS al 10%, azul de bromofenol 0.25%. **NOTA.** Realizar alícuotas de 0.5 mL y conservar a -20°C.

Bromuro de etidio (200 ng/mL)

Disolver 0.2 g de Bromuro de Etidio (Sigma-Aldrich®, USA) en 10 mL de agua desionizada. Mantener en recipientes ámbar o protegidos de la luz.

Coctel de proteasas 25X (Sigma-Aldrich)

Disolver una tableta de inhibidor de proteasa cOplete™ en 2 mL de agua destilada. La solución concentrada puede almacenarse a una temperatura de 2 a 8 °C durante 1 a 2 semanas, o hasta 12 semanas a una temperatura de -15 a -25 °C.

EDTA 0.5M

Para 100 mL de solución, disolver 18.6 g de EDTA en 80 mL de H₂O desionizada con ayuda de un agitador magnético, ajustar el pH a 8 con perlas de NaOH. Aforar hasta 100 mL.

MOPS 10X

Disolver 20.9 g MOPS en 350 mL de agua DEPC y ajustar pH a 7.0 con NaOH 2 N. Añadir 25 mL de acetato de sodio 1 M (preparado con agua DEPC) y 10 mL de EDTA 0.5 M (pH 8.0). Ajustar volumen a 500 mL con agua DEPC. Esterilizar la solución con filtro millipore de 0.45 mm a temperatura ambiente protegido de la luz. Almacenar a temperatura ambiente.

Marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (New England Biolabs)

Añadir 80 µL TE o agua inyectable en 20 µL de buffer de carga e incorporar las dos fases. Adicionar 20 µL de 100 pb DNA ladder. Homogeneizar y almacenar a -20°C.

NaCl 5 M

Adicionar 146.1 g de NaCl a 450 mL de agua destilada. Agitar hasta que esté completamente disuelta la sal. Finalmente aforar a 500 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución de bloqueo

Para 20 mL

Añadir 5% de leche descremada (p/v) en buffer TBST 1X. Preparar solución nueva para cada experimento.

TBE 10X

Disolver 108 g de Tris y 55 g de ácido bórico en 800 mL de agua destilada. Añadir 40 mL de EDTA 0.5 M (pH 8.0) y aforar a 1000 mL. Esterilizar por filtrado y almacenar a temperatura ambiente.

TBST 1X

Tris base 50 mM, NaCl 155 mM (pH 7.6) y Tween 20 al 0.05%.

RIPA

Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, SDS 0.1%, NP-40 1%, coctel de proteasas 2.5X.