

PROYECTO FINAL DE INVESTIGACIÓN

Estudio de flavonoides sintéticos y naturales con actividad antitumoral sobre células de cáncer de mama y ensayo preliminar sobre sistemas nanoparticulados para su vehiculización.

Barbatelli, Agustin – LU 1070190

Licenciatura en Biotecnología

Tutora:

González, Lorena

IQUIFIB - Departamento de Química Biológica Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires

Co-tutor:

Martinez Tosar, Leandro Julián



UADE

UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

RESUMEN:

El cáncer de mama es un problema de salud alarmante, solo en 2020 se registraron 2.2 millones de personas afectadas por el mismo, con 685.000 fallecimientos, se estima que una de cada 12 mujeres tiende a esta patología. Existen distintas alternativas de tratamiento para los diversos tipos de cáncer de mama, entre los cuales destacan, por su mayor uso, la cirugía, radioterapia y quimioterapia. El principal inconveniente de los fármacos que se usan para el tratamiento del cáncer son los efectos secundarios en tejidos como médula ósea, folículos capilares y células epiteliales; además de su biodisponibilidad y solubilidad reducida. Debido a lo anterior, se ha impulsado el desarrollo de nuevos tratamientos con menos efectos secundarios.

Los flavonoides son una propuesta interesante para abordar el tratamiento del cáncer, ya que propician la apoptosis en células tumorales y tienen escasa citotoxicidad en células sanas. Adicionalmente, se ha considerado la implementación de nanotecnología para mejorar el suministro de dichas moléculas.

En el presente trabajo, estudiamos los efectos de un flavonoide natural, la apigenina, y uno sintético, la 2´nitroflavona (2´NF) sobre la viabilidad de líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 para evaluar su capacidad citotóxica. Se determinó un IC₅₀ de 63.71 µM para la apigenina y 19.47 µM para 2´NF en la línea MDA-MB-231, mientras que los IC₅₀ de 56.8 µM para la apigenina y 18.62 µM para 2´NF en la línea MCF-7. Por otra parte, mediante el uso de western blotting, se registraron aumentos en el clivaje de PARP y de la fosforilación de la p38 quinasa. Además, se observó, en ambas líneas celulares, una reducción de la expresión de receptores tirosin quinasa asociados con la tumorigenesis en varios tejidos, como el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y Erb B2 (HER2). Los resultados sugieren que ambos flavonoides disminuyen la viabilidad de las células cancerosas, la 2´NF demostró un efecto citotóxico superior al de la apigenina, así como también la disminución en la expresión de receptores de la familia ErbB, lo cual podría justificar considerar estos flavonoides como posibles coadyuvantes en terapias contra el cáncer de mama que involucren la inhibición de estos receptores. El ensayo preliminar utilizando TPGS y Soluplus® como vehículo nanométrico demostró una tendencia a una mayor citotoxicidad para las nanopartículas vacías por sobre las cargadas y el tratamiento con apigenina. Esto sugiere que esta nanopartícula mixta no es ideal para transportar el flavonoide.

ABSTRACT:

Breast cancer is an alarming health problem, only in 2020 there were 2.2 million people affected by it, including up to 685,000 deaths. It is estimated that one in 12 women tends to this pathology. There are different treatment alternatives for the various types of breast cancer, among which surgery, radiotherapy and chemotherapy stand out due to their greater use; the main disadvantage of anticancer drugs are the side effects on tissues such as: bone marrow, hair follicles, epithelial cells, as well as reduced bioavailability and solubility. Said so, the development of new treatments with fewer side effects has been promoted.

Flavonoids are interesting molecules that have been proposed to contribute to cancer treatment, since they promote apoptosis in tumor cells and have low cytotoxicity in healthy cells, an example of them is the natural flavonoid Apigenin, as well as the synthetic flavonoid 2'-nitroflavone (2'NF). In addition, the implementation of nanotechnology has been considered to improve the delivery of flavonoids to cells.

In this research, the cytotoxicity of the flavonoids apigenin and (2'NF) was evaluated against the breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 using a colorimetric method to measure the activity of hexosaminidase and measure cell viability, an IC_{50} of 63.71 μ M was determined for apigenin and 19.47 μ M for 2'NF in the MDA-MB-231 line, while the IC_{50} of 56.8 μ M for apigenin and 18.62 μ M for 2'NF in the MCF-7 line. Additionally western blotting was used to measure protein expression in these two conditions. An increase in PARP cleavage and p38 kinase phosphorylation were observed, in addition to the decreased expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and Erb B2 in both cancer cell lines. The results show that both flavonoids reduce cancer cells viability, where 2'NF proved a cytotoxic effect superior to apigenin in both cell lines. The evidence is sufficient to propose further studies of these flavonoids as they would be possible agents to contribute to breast cancer treatment. The preliminary test using TPGS and Soluplus® as a nanometric vehicle showed a tendency towards greater cytotoxicity for empty nanoparticles over loaded ones and treatment with apigenin. This suggests that this mixed nanoparticle is not ideal for transporting the flavonoid.

ÍNDICE

RESUMEN:	1
ABSTRACT:	2
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Cáncer de mama	5
1.1.1. Biología y clasificación del cáncer de mama	7
1.1.2. Tratamientos actuales para el cáncer de mama (CM)	9
1.1.3. Importancia de los receptores EGFR (HER1) y Erb B2 (HER2) en la proliferación celular.	13
1.1.4. Rol de la poli ADP-ribosa polimera (PARP-1)	14
1.1.5. Fosforilación de p38 y su relación con la apoptosis.....	16
1.2. Flavonoides	17
1.2.1. Estructura y clasificación.....	18
1.2.2. Potencial antitumoral de flavonoides.....	20
1.3. Sistemas de nanopartículas	21
1.3.1. Clasificación de los sistemas de nanopartículas	23
2. Hipótesis.....	25
3. Objetivos	26
3.1. Objetivo general.....	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. Metodología.....	26
4.1. Materiales y reactivos.....	26
4.2. Líneas Celulares.....	29
4.3. Micelas	29
4.4 Mantenimiento de las líneas celulares en cultivo	29
4.5 Determinación de la viabilidad celular: actividad de hexosaminidasa	30
4.6 Determinación de la citotoxicidad del vehículo a usar.	30
4.7. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC50).....	31
4.8. Cultivo y tratamiento de las líneas celulares con flavonoides (apigenina y 2'NF) para su análisis por western blot.....	32
4.9. Immunoblotting o western blotting (WB).....	32
4.10. Estudio sobre micelas de TPGS y Soluplus® como posible sistema de vehiculización nanométrico para la apigenina.	34

4.11. Análisis estadístico de los resultados.....	35
5. Resultados y Discusiones	36
5.1.1. Citotoxicidad de los vehículos para el tratamiento de las células con los flavonoides.	36
5.1.2. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC ₅₀) de los flavonoides 2'NF y apigenina en dos líneas celulares de cáncer de mama.....	39
5.1.3. Analizar los efectos de los flavonoides apigenina y 2'NF sobre la expresión de PARP-1 y la fosforilación de p38 en dos líneas celulares de cáncer de mama.	42
• Expresión del clivaje de PARP-1 en células tratadas con apigenina y 2' Nitroflavona en dos líneas celulares de cáncer de mama.	42
• Fosforilación de p38 en células tratadas con apigenina y 2'NF en dos líneas celulares de cáncer de mama.....	44
5.2. Analizar los efectos de los flavonoides apigenina y 2'NF sobre la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y Erb B2 (HER2) en dos líneas celulares de cáncer de mama.	46
• Expresión de EGFR y Erb B2 en células tratadas con apigenina y 2'NF	46
5.3 Estudiar posibles sistemas de vehiculización nanométricos para la apigenina.	49
6. CONCLUSIÓN:.....	51
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de mama

La glándula mamaria se compone de estructuras túbulo-alveolares que constituyen el parénquima mamario, dichas estructuras están inmersas en el estroma mamario. En el mismo, se encuentra gran cantidad de vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y una gran variedad de células como linfocitos, histiocitos, fibroblastos, células plasmáticas y adipocitos, siendo estos últimos el tipo celular predominante. Los lobulillos son las glándulas que producen leche. Los conductos son los tubos que transportan la leche al pezón. El tejido conectivo (formado por tejido fibroso y adiposo) rodea y sostiene todas las partes de la mama (Hassiotou et al., 2012). Una descripción gráfica de las características del tejido mamario se muestra en la figura 1.

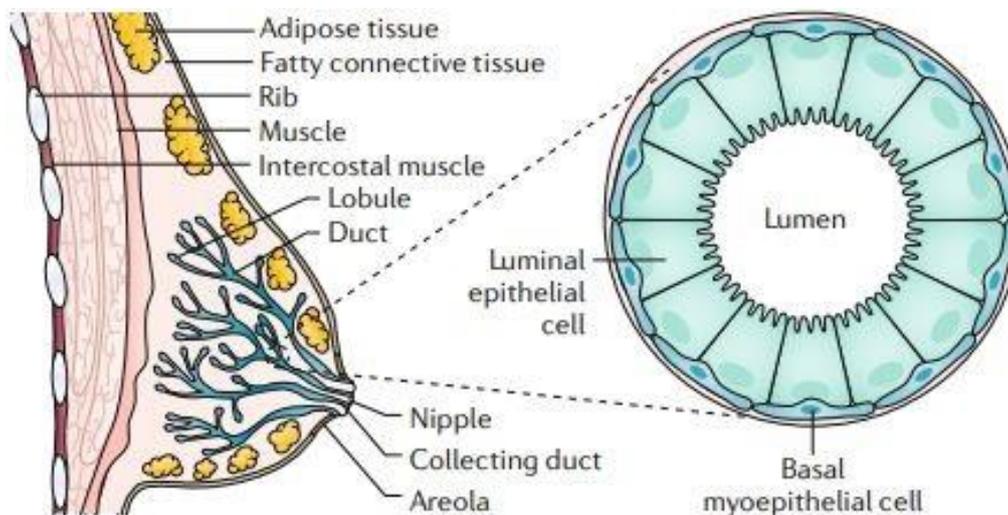


Figura 1. Estructura de las glándulas mamarias. (Harbeck, 2019)

El cáncer de mama puede comenzar en distintas partes de la mama. La mayoría de los cánceres de mama comienzan en los conductos o en los lobulillos. Puede diseminarse fuera de la mama a través de los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos. Cuando el cáncer de mama se disemina a otras partes del cuerpo, se dice que ha hecho metástasis (Harbeck, 2019).

En líneas generales y de conformidad con las cifras reportadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2021), el cáncer de mama es uno de los más comunes; solo en el año 2020, se vieron afectadas una cifra de 2,2 millones de personas. A nivel global, eso implica que 8.33% de cada 12 mujeres, es decir una de cada doce, tiene la tendencia de sufrir de esta

patología a lo largo de su vida, con los consiguientes riesgos de mortalidad. La OMS (2021) indica que se reportaron para el año 2020, un total de 685.000 mujeres a escala mundial que fallecieron producto del cáncer de mama.

Un aspecto para resaltar, de conformidad con la OMS (2021), es el aspecto socioeconómico, las evidencias indican que el mayor volumen de las muertes reportadas corresponde a los países que son categorizados como de ingresos medios y bajos. Al respecto se contrastan las cifras de supervivencia, en los países desarrollados que es de alrededor del 90%, mientras que en países como la India es de apenas un 40%. Esta diferencia se debe a la utilización de un diagnóstico temprano, nuevas y efectivas terapias, que incluyen intervenciones quirúrgicas, uso de radioterapia y farmacología; lo cual es menos común en países menos desarrollados.

El Instituto Nacional del Cáncer (NIH,2021) de Estados Unidos indica que las perspectivas mundiales para el año 2040, apuntan a un crecimiento hasta 29,5 millones de nuevos casos y las cifras de fallecimientos por esta patología alcanzarían los 16,4 millones de personas. Sin embargo, en las fuentes consultadas no se encontraron datos actualizados al 2021 para el contexto de Argentina, incluso la página oficial del Gobierno de Argentina, Ministerio de Salud, Instituto Nacional del Cáncer (2021) replica datos de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) la cual clasificó en 2018 a Argentina como un país con incidencia de cáncer media-alta, siendo el séptimo país en Latinoamérica con más casos. En Argentina se reportan más de 21.000 nuevos casos de cáncer de mama al año, lo que representa el 17% del total de la incidencia de cáncer en el país y el 33% de todos los casos de cáncer en pacientes femeninos (Observatorio Global de Cáncer de la OMS e Instituto Nacional del Cáncer de Argentina, 2018).

A pesar de la alta incidencia del cáncer de mama, la mortalidad es menor que para otros tipos de cáncer. Esta diferencia en la mortalidad está directamente relacionada con la detección temprana de la patología lo cual se asocia a las campañas de autodiagnósticos llevadas a cabo/instrumentadas por grandes organizaciones de salud.

1.1.1. Biología y clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama es una patología compleja y heterogénea, (Perou et al., 2001; Sorlie et al., 2001; Parker et al., 2009; Waks y Winer, 2019). Su etiología es diversa, lo cual determina diferentes tipos de cáncer de mama. Es importante clasificar los diferentes subtipos de cáncer de mama, ya que cada uno responde de una manera diferente al tratamiento. Diversas son las clasificaciones que se le ha dado, siendo las principales la clasificación anatómica y la clasificación molecular.

Según su origen anatómico existen dos tipos principales de cáncer de mama: el carcinoma ductal y el carcinoma lobulillar. El carcinoma ductal es el tipo de cáncer de mama anatómico más frecuente. Este se inicia en los conductos encargados del transporte de la leche desde la mama al pezón. En cuanto al cáncer de mama lobulillar tiene su origen en la zona de la mama encargada de la producción de leche denominada lobulillos (Perou et al., 2001; Sorlie et al., 2001; Parker et al., 2009; Waks y Winer, 2019). Independientemente del sitio de origen, el comportamiento, desarrollo y respuesta al tratamiento del tumor dependerá de la presencia de ciertas moléculas que se expresan en los diferentes subtipos de cáncer de mama. Estas proteínas se encuentran implicadas en el desarrollo y progresión del cáncer, por lo que a la hora del diagnóstico es de suma importancia conocer las bases moleculares de la patología.

Desde el punto de vista molecular, los genes responsables principalmente de la segregación de los subtipos moleculares del cáncer de mama son el del receptor de estrógenos (RE), del receptor de progesterona (PR), HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano) y el marcador Ki-67, implicado en proliferación celular (Gomes do Nascimento & MorminoOtoni, 2020). En función de la expresión de dichas moléculas, se clasifica los tumores mamarios en cuatro subtipos Luminal-A, Luminal-B, HER2+ y triple negativo (Liang, et al., 2015)., lo que permite tomar decisiones para el mejor abordaje terapéutico y predecir la evolución del tumor (Perou et al., 2001; Sorlie et al., 2001; Parker et al., 2009; Waks y Winer, 2019). En la tabla I se representa en forma sintética la clasificación de los diferentes subtipos de cáncer de mama establecidos por la técnica de inmunohistoquímica, así como las terapias a los que estos tipos de cáncer responden.

Subtipo molecular	Luminal A	Luminal B		HER2+	TN
		(HER2-)	(HER2+)		
Biomarcador	ER+ PR+ HER2- K67 < 14%	ER+ PR- HER2- K67 14-30%	ER+ PR-/+ HER2+ K67 14-30%	ER- PR- HER2+ K67 > 14%	ER- PR- HER2- K67 > 14%
Frecuencia de casos (%)	40 - 50	20 - 30		15 - 20	10 - 20
Grado Histológico	Bien Diferenciado (Grado I)	Moderadamente Diferenciado (Grado II)		Poco Diferenciado (Grado III)	Poco Diferenciado (Grado III)
Pronostico	Bueno	Intermedio		Malo	Malo
Respuesta a las terapias	Endocrina	Endocrina Quimioterapia	Endocrina Quimioterapia Terapias dirigidas	Terapias dirigidas Quimioterapia	Quimioterapia Inhibidores de PARP

▪ Tabla I: Clasificación de subtipos moleculares de cáncer de mama y terapias. (Horvath, 2021)

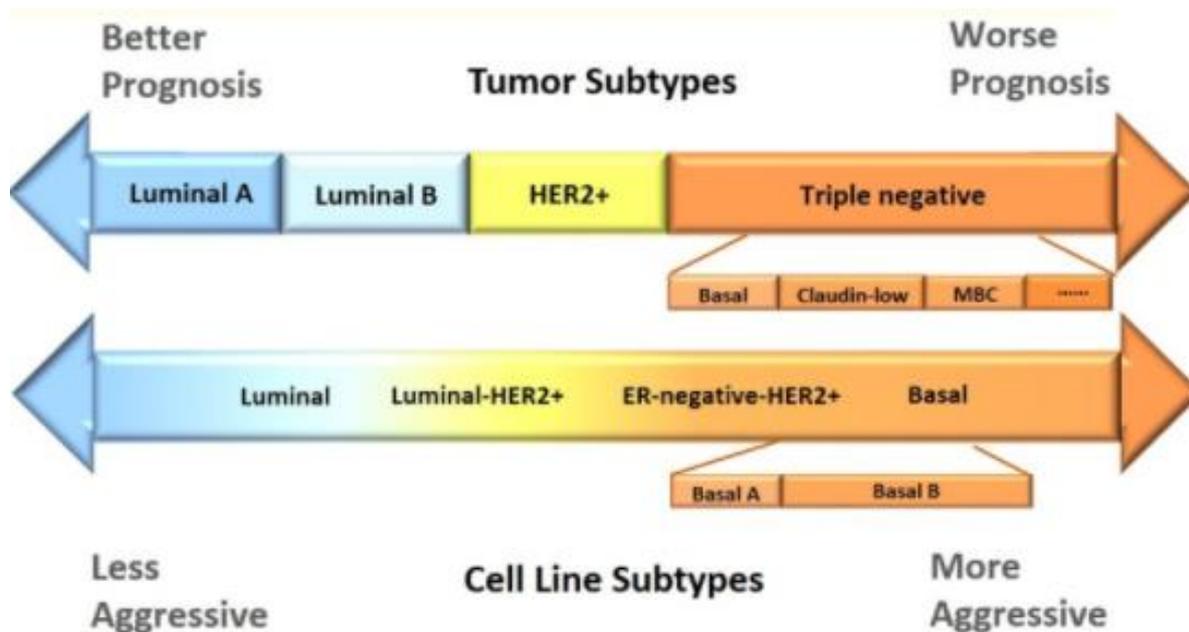


Figura 2. Clasificación de subtipos de cáncer de mama según su pronóstico. (J. Cancer, 2017)

Como se observa en la tabla I y la figura 2, cada uno de los diferentes fenotipos moleculares corresponde a un pronóstico particular debido a que cada fenotipo molecular responde de manera distinta a los tratamientos con los que se cuenta en la actualidad.

La oncología clínica actual encuentra el mayor obstáculo en la obtención de estrategias para una medicina personalizada que permitan tratar las células afectadas con una alta especificidad y eficiencia para mejorar el pronóstico de los pacientes.

En el siguiente apartado describiremos los tratamientos actuales para los distintos tipos de cáncer de mama mencionados aquí.

1.1.2. Tratamientos actuales para el cáncer de mama (CM)

La personalización del tratamiento del cáncer de mama es fundamental y depende de un gran número de factores. El óptimo tratamiento requiere de la cooperación de un equipo multidisciplinar: oncólogos médicos, cirujanos y oncólogos radioterapeutas.

Clásicamente, el tratamiento del cáncer de mama en estadios iniciales se comenzaba con cirugía y posteriormente se administraba el tratamiento sistémico y la radioterapia

(tratamiento adyuvante). En la actualidad, se puede ofrecer, previamente a la cirugía y la radioterapia, tratamiento sistémico (tratamiento neoadyuvante). Esta estrategia puede facilitar una cirugía conservadora en aquellos casos en que esta no es posible de entrada, así como proporcionar información sobre la respuesta “in vivo” del tumor para individualizar el tratamiento posterior en función de dicha respuesta.

En los estadios avanzados, el tratamiento principal será sistémico, aunque puede emplearse la cirugía o la radioterapia en situaciones concretas.

Como describimos anteriormente, realizar el diagnóstico histoquímico del cáncer de mama y clasificar el subtipo de tumor según su fenotipo molecular es de suma importancia para decidir qué tratamiento se va a practicar.

Los subtipos de cáncer de mama luminal A y luminal B son de buen pronóstico, esto es debido a que las pacientes presentan una buena respuesta a terapias hormonales dirigidas hacia el receptor de estrógenos (ER). Por otro lado, existen algunos estudios preclínicos (sin tratamientos aprobados para pacientes) dirigidos al receptor de progesterona (PR). (Pérez, 2015)

El subtipo luminal A de cáncer de mama es el subtipo molecular más común con una expresión genética que tiene receptor de hormonas positivo (ER+PR) HER2 negativo (HER2-) y una baja expresión del marcador de proliferación celular Ki-67. Desde un punto de vista clínico, las pacientes con cáncer de mama luminal A tienen un buen pronóstico terapéutico siendo la terapia endocrina adyuvante un enfoque bien establecido. Sin embargo, el impacto de la quimioterapia adyuvante es cuestionable, ya que el beneficio sobre la supervivencia parece ser pequeño. Por tanto, en caso de carecer de factores de riesgo adicionales como tamaño tumoral avanzado o ganglios linfáticos positivos, la renuncia a la quimioterapia adyuvante es estándar clínico. Por esta razón, existe una demanda considerable para aclarar la cuestión de la terapia adyuvante (referente a la utilización de compuestos que potencien la terapia) adecuada en pacientes con cáncer luminal A. En este sentido, en el 2019 (Herr, et al., 2019) se reporta un estudio basado en los datos de BRENDA (por sus siglas en inglés: Breast Cancer Care Under Evidence-Based Guidelines), en donde los autores investigan el impacto de la quimioterapia endocrina para el cáncer de mama luminal A y nodal positivo sobre la supervivencia libre de recurrencia (SLR) y la supervivencia general (SG). Por otro lado, realizaron análisis de supervivencia en pacientes con el mismo número de ganglios linfáticos positivos y su relación

con tamaño del tumor luminal A. Las evidencias empíricas obtenidas por estos investigadores, les permitió inferir que los pacientes que presentaron ganglios positivos con cáncer de mama luminal A, tienen, un beneficio limitado de la quimioterapia adyuvante. En términos de supervivencia, el tamaño del tumor y el estado de los ganglios parecen tener valor pronóstico; sin embargo, al menos en la población utilizada para este estudio, tanto el tamaño del tumor como el estado de los ganglios no fueron totalmente predictivos de un beneficio (o no) de la quimioterapia adyuvante, demostrando la importancia de un estudio general de cada paciente en el diseño terapéutico.

Como el cáncer de mama luminal B expresa ER, la vía del estrógeno también se considera un objetivo terapéutico para esta enfermedad. De acuerdo con las recomendaciones del consenso de St Gallen de 2011 (Goldhirsch, et al., 2011), donde la luminal B podría definirse en el entorno clínico como ER+/HER2-/Ki67+, el tratamiento estándar incluiría la terapia endocrina con o sin terapia citotóxica (Prat, et al., 2011). Sin embargo, un gran porcentaje de cánceres de mama ER+, que pueden considerarse representativos del subtipo luminal B, no responden de forma favorable a la terapia endocrina. Para estos casos, se han reportado estudios de ensayos clínicos recientes que consideraron blancos alternativos para el tratamiento del cáncer en estadio avanzado ER+ en pacientes postmenopáusicas, al EGFR (p. Ej., Usando el medicamento gefitinib) (Osborne, et al., 2012) y a la vía PI3K/Akt/mTOR (p. Ej., Usando Everolimus) (Baselga, et al., 2012). En este mismo sentido, los resultados del ensayo clínico BOLERO-2 mostraron que la supervivencia libre de progresión en pacientes con enfermedad ER+ refractaria a hormonas se prolonga sustancialmente con el inhibidor de mTOR, Everolimus (Baselga, et al., 2012). Si bien resultados como estos son alentadores, se hacen necesarios más estudios para evaluar la eficacia de distintos tipos de fármacos para mejorar la respuesta terapéutica de este tipo de cáncer de mama.

Aproximadamente un 20% de los casos de cáncer de mama corresponde a los subtipos HER2+ y triple negativo. Estos subtipos son los de peor pronóstico. Ello implica una baja posibilidad de recuperación para la paciente. Los tratamientos que comúnmente se dan para este tipo de tumores son quimioterapias (como cisplatino y capecitabina). Esta quimioterapia, la mayoría de las veces, produce efectos secundarios no deseados. Los efectos que pudieran aparecer en las pacientes incluyen malignidades secundarias e infertilidad. El fenotipo del subtipo de cáncer de mama HER2+ sobre expresa la proteína de membrana HER2. Esta

sobreexpresión ha sido aprovechada por investigadores para usarla como blanco terapéutico para el desarrollo de terapias dirigidas contra HER2.

El uso de terapias dirigidas a proteínas expresadas se encuentra enfocadas a disminuir (y hasta eliminar) los efectos secundarios y así mejorar el pronóstico que puede estar en detrimento debido a dichos efectos (Dai et al., 2015; Dent et al., 2007; Foulkes et al., 2010). El subtipo de cáncer de mama triple negativo no expresa los receptores ER, PR y HER, lo que imposibilita el uso de terapias receptores-dirigidas. Este tipo de cáncer se caracteriza por una alta agresividad y malignidad. Su tratamiento constituye un gran desafío. Principalmente implica cirugía, radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, también adquieren relevancia en el diseño de los protocolos antitumorales el uso de terapias dirigidas como inhibidores de PARP, de la vía PIK3/Akt/mTOR o del EGFR (Nakai et al., 2016, Al-Mahmood et al., 2018).

Como hemos descrito hasta ahora, los tratamientos más exitosos han sido aquellos que contienen como diana proteínas sobre expresadas, pero, debido a la heterogeneidad física y molecular de muchos de los tumores, se hace necesario complementar con el uso de quimioterapia. La misma, sigue siendo uno de los tratamientos actuales más eficientes contra el cáncer (Quin et al., 2017). Uno de los mecanismos de acción más comunes de los quimioterápicos es el de inhibir la replicación o inducir apoptosis celular (Quin et al., 2017; Sun et al., 2014)

Sin embargo, estos medicamentos tienen potencial para dañar el ADN incluso afectar la médula ósea, y hay evidencias de que el riesgo de leucemia es alto entre los cinco y diez años luego de la administración de agentes alquilantes. Hay otras opciones farmacológicas como las nitrosoureas, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de la mitosis celular y corticoesteroides.

Las desventajas del uso de fármacos contra cáncer son los graves efectos secundarios que presentan las pacientes, principalmente en tejidos como médula ósea, folículos capilares y células epiteliales (van Ramshorst et al., 2016; Vago et al., 2016). Otras desventajas del uso de fármacos son una biodisponibilidad reducida, una depresión rápida de sistema inmunológico y una baja solubilidad. También es importante mencionar que las pacientes pueden presentar resistencia a los fármacos y una reaparición de la enfermedad debido a vestigios de células cancerosas en la paciente. Por todo lo anterior, existe la necesidad médica de innovar y desarrollar novedosos tratamientos eficientes con menos efectos secundarios en comparación

con los tratamientos tradicionales (Banerjee et al., 2017). Ello evidencia la necesidad de continuar con las investigaciones destinadas a desarrollar y mejorar los tratamientos actuales, con el objeto de reducir la toxicidad, aumentar la eficacia de las drogas quimioterapéuticas y evitar la quimioresistencia. Detectar nuevos potenciales fármacos o combinaciones terapéuticas eficaces para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama hormono-independientes o de aquellos que presentan resistencia a la terapia hormonal podría favorecer el desarrollo de mejores estrategias terapéuticas.

En este sentido, la diversidad estructural única de productos naturales continúa brindando oportunidades para descubrir compuestos novedosos. Los metabolitos secundarios, componentes activos de productos naturales como organismos marinos, organismos microbianos y plantas terrestres, son recursos con poca explotación, particularmente interesantes para la exploración como medicamentos.

1.1.3. Importancia de los receptores EGFR (HER1) y Erb B2 (HER2) en la proliferación celular.

El EGFR constituye una familia de proteínas con actividad de receptores tirosina quinasa, y está representado por 4 miembros (HER1 o EGFR, HER2, HER3 y HER4), estos se expresan en múltiples tejidos del organismo participando en el desarrollo normal, siendo una de las razones de la rápida diseminación del cáncer. Aunque los receptores EGFR son reguladores críticos para los procesos celulares normales, se ha hecho evidente que su desregulación, como consecuencia de la amplificación de genes, la sobreexpresión de proteínas y / o mutaciones activadoras, conduce al desarrollo de cánceres, incluso se han encontrado diferentes mutaciones que se correlacionan directamente con un peor pronóstico. En consecuencia, constituye una diana en la terapia de cáncer, mediante diferentes métodos como anticuerpos monoclonales e inhibidores de la actividad tirosina quinasa (Sherbakob, 2015).

EGFR se compone de tres secciones, un dominio glicosilado extracelular, uno transmembranal que es hidrófobo y finalmente uno intracelular, además cuenta con un dominio de proteína quinasa y una cola carboxilo (Du, J., 2017). El proceso de activación de los receptores ErbB se inicia con la unión del ligando específico a la porción transmembrana del receptor, ello deriva en la activación del dominio quinasa de estos receptores y su

autofosforilación posteriormente ocurre un entrecruzamiento, mediante oligomerización y autofosforilación, mediante la fosforilación de proteínas de un sustrato complejo, posteriormente los ligandos son activados (Hsu, 2016). Algunas de las rutas celulares inducidas por la familia de receptores ErbB son las RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/ TOR, Srcquinasas y STAT (Arteaga, 2014). Una vez finalizada su tarea, las secciones membranales son enviadas a los lisosomas, la presencia de mutaciones en los genes que codifican para las RTK conlleva una sobreexpresión de estas que puede propiciar desarrollo tumoral (Hsu, 2016). Los receptores ErbB regulan las rutas de señalización para las células cancerígenas, permitiendo que por su activación constante puedan sobrevivir, proliferar, movilizarse e incluso desarrollar la metástasis (Coleman, D., 2012), por esta razón, la utilización de flavonoides como agentes que bloqueen dichos receptores resultan una terapia relevante, un buen ejemplo es el bloqueo de HER2 con apigenina, lo cual es posible gracias a que impide su unión con la P13K, adicionalmente, el flavonoide logra degradar a la HER2 al disociar su complejo, para ello utiliza la proteína chaperona GRP4, lo cual ocasiona la degradación con proteosomas y eventualmente la apoptosis celular en las células que sobre expresen HER2 (Coleman, D., 2012). Diversos flavonoides han sido propuestos para la modulación de las RTK en células cancerígenas, así mismo se ha evaluado su uso conjunto con vehículos nanométricos para su mejor transporte a los RTK y su dosificación celular.

1.1.4. Rol de la poli ADP-ribosa polimerasa (PARP-1)

PARP-1, también denominada ADP-ribosa transferasa (ADPRT) o Poli-ADP ribosa Sintetasa (PARS) participa en la reparación del daño del ADN y funciona tanto catalizando la síntesis de poli (ADP-ribosa) como uniéndose a roturas de cadenas de ADN y modificando proteínas nucleares (Mullen, 2004). El papel de PARP-1 en reparación del ADN dañado se debe a su capacidad de modificar de forma transitoria, mediante la poli-ADP-ribosilación, proteínas que intervienen en la estructura de la cromatina (especialmente histonas), llevando a cabo de este modo una alteración estructural de la cromatina 10, haciéndola de esta forma más accesible a las proteínas que participan en el complejo de reparación del ADN. Además, PARP-1 también participa en el reclutamiento y regulación de las proteínas que forman parte de este complejo como XRCC1, DNA-polimerasa β y la DNA ligasa III, involucrándola en otros procesos además de la reparación y replicación del ADN como la transcripción génica, la

muerte celular y la respuesta inflamatoria (Ame JC et al, 2004) (Leppard JB et al, 2003). Se activa principalmente en respuesta a daños en el ADN generado por diferentes agentes genotóxicos, como radiación ionizante, agentes alquilantes, radicales libres, infecciones, altos niveles de estrés u hormonas. (Figura 3)

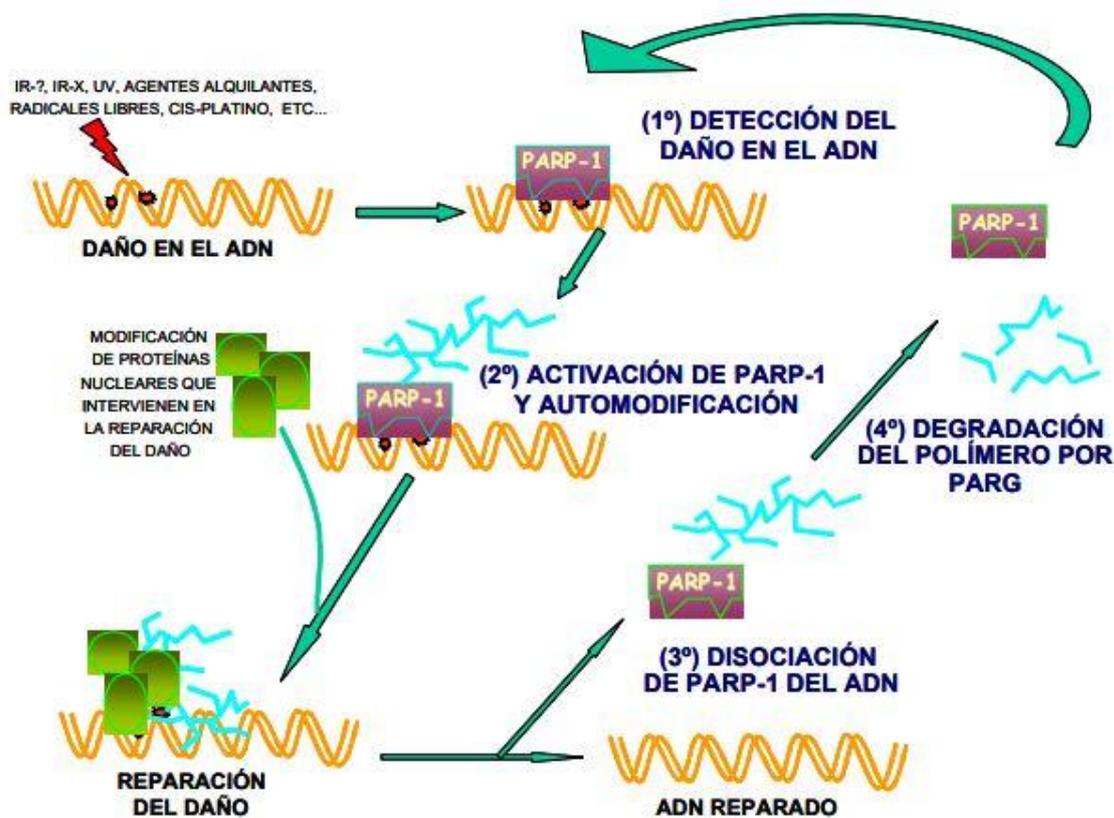


Figura 3. Etapas en la activación de PARP-1. (Martin-Olivia 2005)

PARP-1 trabaja de forma conjunta con las proteínas BRCA1 y BRCA2 para la reparación del ADN al realizar recombinaciones homologas de las bases y promoviendo la reparación de escisión de base (BER). Las células cancerígenas con mutaciones en el gen que codifica para BRCA1 y BRCA2 son susceptibles a su muerte si se inhibe la PARP-1, ocasionando que la célula no pueda resolver las lesiones en la cadena doble del ADN, el incremento de roturas eleva la inestabilidad genómica y se llega a la muerte celular eventualmente (Oliva, D., 2006). Se han estudiado inhibidores de la PARP-1 para tipos de

cáncer que se afectan por las mutaciones BRCA-1 y BRCA-2, como es el caso del cáncer de mama y ovario.

Es sabido que el clivaje de PARP-1 es un indicio de muerte celular por apoptosis (Gobeil et al. 2001). En este sentido el estudio de la expresión del clivaje de esta proteína es necesario para entender el mecanismo de muerte celular inducido por los tratamientos estudiados. Caspasa-3 es considerada una de las responsables del clivaje de PARP-1, la PARP-1 clivada tiene un peso de 89 kDa, se ha observado que el uso de ciertos flavonoides propicia el clivaje de PARP-1 (Kim, M., 2009)

1.1.5. Fosforilación de p38 y su relación con la apoptosis.

La familia de las proteínas MAPK incluye importantes proteínas para regular la proliferación celular, el crecimiento de las células y la activación de la apoptosis. Las MAPK pueden ser agrupadas en tres familias. Estas son las ERKs (quinasas reguladas por señales extracelulares), JNK (quinasas amino terminales Jun) y p38 / SAPK (proteína quinasa activadas por estrés) (Maryland., 2012).

Las proteínas quinasas son reguladas por un gran número de mecanismos que varían de una quinasa a otra. Sin embargo, todas comparten un mecanismo de activación compartido por todas las proteínas quinasas, la fosforilación (Beenstock, et al, 2014). La ruta de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (Figura 4) es fuertemente activada por tensiones ambientales, así como citocinas inflamatorias y está relacionada con las vías que detienen el ciclo celular o inducen apoptosis en células tumorales (Cuadrado, A., 2007).

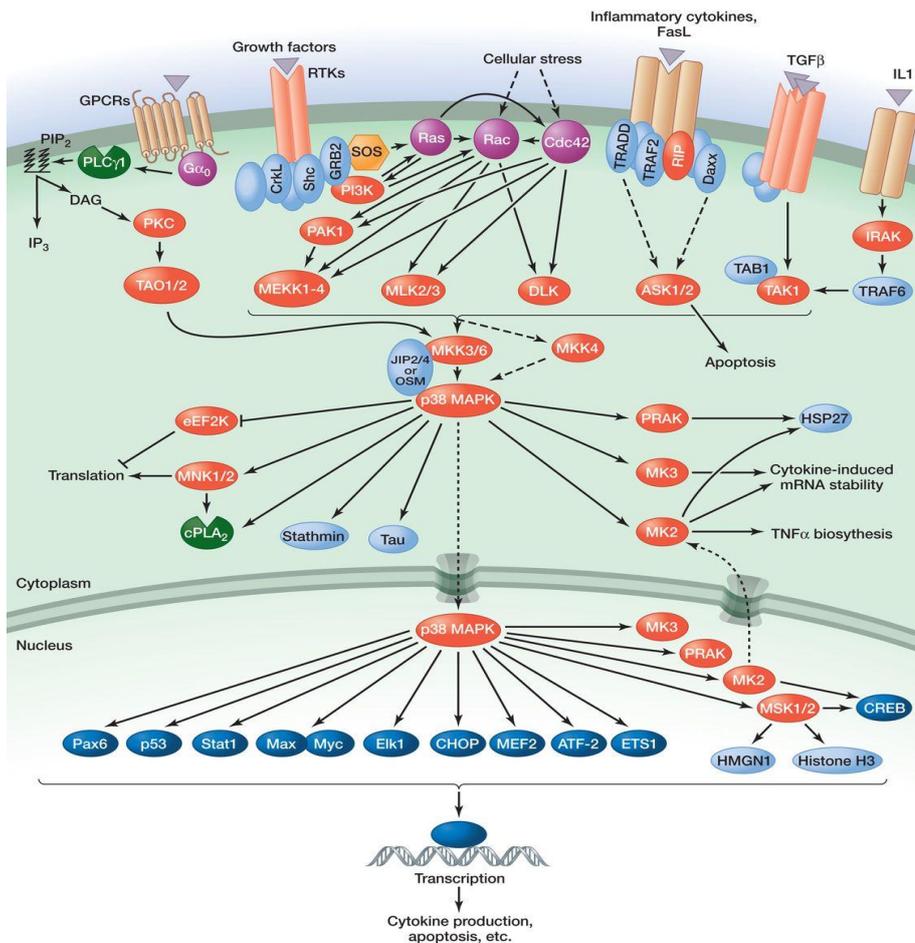


Figura 4. Vía de señalización de la MAPK p38. (Maryland., 2012).

1.2. Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de moléculas polifenólicas que constituyen metabolitos secundarios presentes en todas las plantas vasculares. Fundamentalmente se los encuentra en frutas, vegetales, nueces, semillas, tallos y flores, así como en el té y vino (Harborne, 2000; Middleton et al. 2000).

El primer reporte de aislamiento de flavonoides se realizó en 1930 a partir de naranjas y se los consideraron miembros de una nueva clase de vitaminas conocida como vitamina P. Mucho más tarde, se estableció que los nuevos compuestos aislado eran flavonoides. Hasta el momento, se han descrito e identificado más de 10,000 flavonoides, convirtiéndose en componentes esenciales de diversas aplicaciones nutraceuticas, medicinales, cosméticas y

farmacéuticas gracias a sus propiedades antioxidantes, antimutagénicas, anticancerígenas y antiinflamatorias (Kumar & Pandey, 2013).

Los flavonoides están ubicados en el núcleo de las células mesófilas, cerca de centros de generación de especies reactivas de oxígeno y son sintetizados por las plantas en respuesta a estrés biótico o abiótico, actuando como un sistema de defensa antioxidante secundario en los tejidos vegetales expuestos. También regulan los factores de crecimiento en las plantas, como la auxina (Agati, et al., 2012). Según su estructura química, los flavonoides se clasifican en seis subclases conocidas como flavonoles, flavanoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas y antocianinas. Las actividades biológicas de cada subclase dependen de su estructura química (Khajuria & Batra, 2014).

1.2.1. Estructura y clasificación

La naturaleza química de los flavonoides depende de su clase estructural y su grado de polimerización, así como también otras sustituciones y conjugaciones presentes en cada molécula. Aunque difieren en la estructura alrededor del anillo de oxígeno heterocíclico, todos ellos tienen el esqueleto de carbono característico C6-C3-C6 como se muestra en la (Figura 5). Su estructura principal se compone de dos anillos de benceno (**A** y **B**) unidos por un anillo de pireno que contiene oxígeno (**C**). Los flavonoides, desde un punto de vista estructural, se clasifican en dos familias principales: 3-hidroxi flavonoides y 3-desoxi flavonoides. El primero comprende un grupo de moléculas con un hidroxilo en la posición C-3 del anillo **C** e incluye flavonoides como flavanoles (flavan-3-ols o catequinas), antocianidinas y flavonoles mientras que el último comprende flavanonas, flavonas e isoflavonas que carecen de un grupo hidroxilo en C-3 pero presentan un grupo carbonilo en C-4. Dentro de estas dos familias, la clasificación se basa en el patrón en el que se ubican grupos hidroxilo o metilo adicionales en las diferentes posiciones de la molécula. Por ejemplo, en los isoflavonoides, el anillo **B** está unido al C-3 del anillo **C**, mientras que, en las antocianidinas y catequinas, el grupo carbonilo en C-4 está ausente.

Los flavonoides existen principalmente en las plantas como glucósidos, mientras que aquellos sin una porción de azúcar son conocidos como agliconas y ocurren con menos frecuencia en la naturaleza. Al menos ocho diferentes monosacáridos o combinaciones de los

mismos pueden unirse a los diferentes grupos hidroxilo de las agliconas. La gran cantidad de flavonoides se puede atribuir a las diferentes combinaciones de agliconas y estos azúcares. Entre estos azúcares, la glucosa y la l-ramnosa son los más comunes. Los glucósidos suelen ser O-glucósidos, con el resto de azúcar unido al grupo hidroxilo en la posición C-3 o C-7 (Khajuria, et al., 2019).

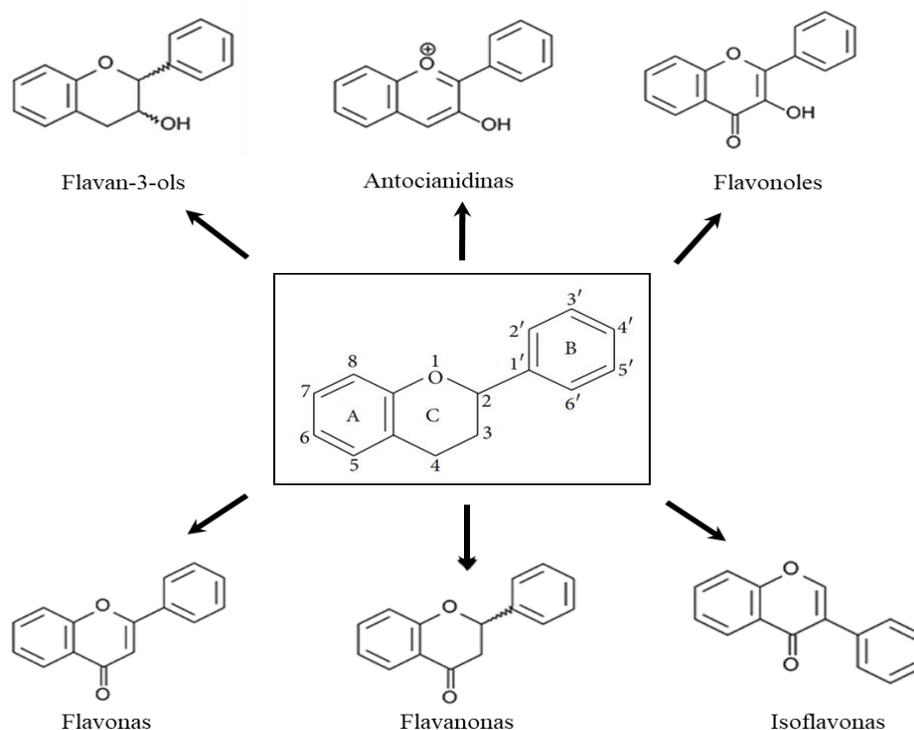


Figura 5. Estructuras básicas de las subclases de Flavonoides. Shashank Kumar y Abhay K. Pandey (2013).

Uno de los flavonoides naturales más comunes es la 4',5,7-trihidroxiavona, comúnmente conocida como apigenina. Esta se encuentra ampliamente distribuida en frutas y verduras, siendo su principal fuente la camomila (Sak et al., 2014). Tiene propiedades antiinflamatorias, antioxidantes e incluso induce apoptosis en células tumorales e inhibe metástasis (Czyz et al., 2005; Shankar et al., 2017). Existen otros flavonoides de origen sintético, como lo es la 2'-nitroavona (2'NF), diseñada y desarrollada en el Departamento de Química Biológica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Este flavonoide sintético demostró acción antitumoral en distintos tipos celulares *in vitro*

(Cárdenas et al., 2006; 2008) e *in vivo* en un modelo murino de cáncer mamario (Cárdenas et al., 2009).

1.2.2. Potencial antitumoral de flavonoides

Una alternativa al uso de los agentes antitumorales actuales, los cuales producen efectos secundarios, es el desarrollo de agentes antitumorales que no produzcan toxicidad en células sanas, algo esencial para obtener resultados terapéuticos satisfactorios para los pacientes con cáncer y mejora su calidad de vida. La evidencia emergente ha informado que muchos pacientes con cáncer usan hierbas empleadas en terapias complementarias o agentes fitoquímicos derivados de alimentos que influyen en la señalización celular (Aboaleb, et al, 2018) (Sak K and Evarus, 2015). Entre ellos, los flavonoides, son propuestos como agentes antitumorales selectivos ya que muchos estudios han informado sus notables y significativas propiedades como anticancerígeno y/o agentes quimiopreventivos, lo que sugiere una positiva correlación entre un menor riesgo de cáncer y una dieta rica en flavonoides (Sak K, 2017; Menezes, 2016; Paller, 2015; Imran M, 2019). Se ha descrito que ciertos flavonoides poseen la habilidad de inhibir el crecimiento de células tumorales e inducir una respuesta apoptótica (Ramos 2007; Banerjee et al., 2008; Crozier et al., 2009). Los flavonoides han demostrado citotoxicidad selectiva hacia distintos tipos de células tumorales con escaso efecto sobre las normales (Plochmann et al., 2007; Sak, 2014; Magne et al., 2015). Debido a toda esta información, se trabaja actualmente en el desarrollo de terapias antitumorales basadas en flavonoides.

Existen diferentes mecanismos moleculares por el que los distintos flavonoides ejercen acción antitumoral. Los flavonoides pueden interferir sobre moléculas implicadas en distintas vías de señalización intracelular (Chiu et al., 2008; Ganesan y Xu, 2017). Entre ellas, se ha reportado el efecto de ciertos flavonoides sobre mediadores y quinasas intracelulares implicadas en la regulación de proliferación y supervivencia celular como PI3K/AKT/mTOR, ERK 1/2, β -catenin, p21 etc. (Qadir et al., 2016; Islam et al., 2017; Zhang et al., 2018; Kikuchi et al., 2019). También interfieren sobre moléculas implicadas en supervivencia celular mediante la modulación de Bcl-2 y miembros de la familia, inclinando el equilibrio celular en favor de la inducción de apoptosis (Kikuchi1 et al., 2019).

Además, receptores tirosina quinasa de la familia ErbB serían blancos moleculares clave en el efecto de ciertos flavonoides (Gruca et al., 2014; Scherbakov y Andreeva, 2015). En

particular, se describió que la apigenina inhibe vías de señalización y mediadores de supervivencia celular inducidos por EGF en células de glioblastoma (Stump et al., 2017). Asimismo, en células de carcinoma nasofaríngeo, se describió la actividad anti-proliferativa sinérgica entre cetuximab (anticuerpos monoclonales que se une al EGFR bloqueando su activación por el ligando) y apigenina (Hu et al., 2018). Es fundamental conocer los mecanismos de acción antitumoral de los distintos flavonoides porque ello permitiría diseñar terapias combinadas que potencien la acción de quimioterapéuticos tradicionales.

1.3. Sistemas de nanopartículas

La nanotecnología es una disciplina que involucra a la biología, la química, la física, la ingeniería y la medicina para el diseño de sistemas nanoparticulados con muy diversas funciones y aplicaciones. Se pueden encontrar diversos criterios para definir cuándo un sistema es nanoparticulado, o cuándo una partícula es una nanopartícula. En general se entiende como nanoescala a dimensiones comprendidas entre unos pocos nanómetros y 1 μm , pero existen clasificaciones que consideran como nanopartícula a cualquier objeto con una, dos y/o tres de sus dimensiones físicas, en el rango nanométrico (Tinkle et al., 2014). Por otra parte, en bibliografía se puede encontrar una definición similar a la anterior, pero restringiendo la nanoescala a valores menores a los 100 nm (Johnston et al., 2012).

En los últimos años la nanotecnología aplicada a la administración y transporte de fármacos ha provocado un gran impacto. Por medio de ella se han desarrollado nuevas alternativas farmacológicas que han permitido mejoras en la vehiculización de las drogas, aumentando la supervivencia de los pacientes (Guerrero et al., 2015).

Las nanopartículas tienen diversas propiedades, tanto biológicas, físicas y químicas que las torna atractivas para el diseño de sistemas de vehiculización de fármacos permitiéndoles acarrear moléculas que difícilmente pueden ser administradas en el torrente sanguíneo por sí solas. Una de las ventajas más importantes es que el uso de nanopartículas incrementa la concentración del agente terapéutico en el sitio de acción. Además, las nanopartículas tienen la ventaja de disminuir la toxicidad del tratamiento, y mantienen dentro del organismo los niveles del agente terapéutico por un periodo prolongado gracias a que estas permanecen por un mayor tiempo en la circulación sanguínea (Della Rocca et al., 2012). Desde el punto de vista fisicoquímico, pueden mejorar la solubilidad y la estabilidad de muchas sustancias facilitando

la administración parenteral u oral. También reducen el peligro de degradación, maximizando así la capacidad de acción del agente terapéutico.

Como uno de los desafíos más importantes a superar en terapia oncológica es la administración de una concentración determinada de principio activo en el sitio del tumor durante un período conveniente de tiempo, la nanotecnología surge como una herramienta promisoriosa. Además de las propiedades beneficiosas inherentes a la administración de fármacos mediante sistemas nanoparticulados, su uso para la administración de anti-tumorales posee importantes ventajas que radican en la posibilidad de incrementar la concentración intratumoral del antineoplásico gracias al efecto de permeabilidad y retención aumentada (enhanced permeability and retention effect: EPR), disminuir su toxicidad y mantener los niveles terapéuticos de la droga por un periodo prolongado (DellaRocca et al., 2012).

Otra ventaja considerable de la utilización de sistemas nanoparticulados es la posibilidad de sobrellevar la resistencia a una droga dada por bombas de eflujo (Kirtane et al., 2013). La mayor parte de las drogas entran a la célula por difusión a través de la membrana por lo que son inmediatamente susceptibles a ser activamente bombeadas hacia el exterior nuevamente.

Las nanopartículas que se utilizan para transportar este tipo de sustancias son seguras para el paciente, pues están construidas utilizando materiales biocompatibles, los cuales se sintetizan y caracterizan fácilmente (Sun et al., 2014).

Desde 1995, la FDA ha aprobado el uso de ciertas nanopartículas con distintos fines para el tratamiento y/o diagnóstico de los distintos tipos de cáncer. Estas nanopartículas son administradas a los pacientes por diferentes vías: oral, local, tópica y sistémica. La principal aplicación en terapia que se le da a estas nanopartículas, ya aprobadas, es el de acarrear y dirigir un fármaco a través del cuerpo del paciente (Anselmo y Mitragotri, 2016).

El sector industrial tiene un gran interés comercial en el desarrollo y producción a gran escala de nanopartículas. Es importante señalar que la mayoría de las nanopartículas se pueden producir fácilmente a gran escala. Algunas de las técnicas para la producción de nanopartículas, de grado farmacéutico, a gran escala son: emulsificación, difusión de solventes y nano precipitación. La mayoría de las técnicas permiten una formación controlada de partículas en cuanto a forma y tamaño (Wang et al., 2016).

Dada la versatilidad y ventajas que presentan los sistemas de nanopartículas para la administración de agentes terapéuticos antitumorales, estas podrían ser utilizadas para la administración terapéutica de flavonoides.

1.3.1. Clasificación de los sistemas de nanopartículas

Según la composición del material con el que se preparen las nanopartículas, estas se pueden clasificar, fundamentalmente, en: liposomas, nanopartículas inorgánicas y nanopartículas poliméricas. Tal como indican Urrejo et al (2018) la utilización de los sistemas de nanopartículas en el área farmacológica genera grandes expectativas, las más utilizadas son las coloidales, producidas por auto ensamble, y las microcápsulas. El uso de polímeros está siendo desarrollado ampliamente para las aplicaciones biomédicas, en su presentación de nanopartículas. Los sistemas de nanopartículas más utilizados son los siguientes:

Liposomas y micelas: Vesículas formadas por lípidos que contienen largas cadenas hidrofóbicas y cabezas hidrofílicas. Esta característica genera estas dos estructuras diferentes, capaces de cargar moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas respectivamente. Se caracterizan por poder ser endocitadas por células *in vitro*. Sin embargo, estos tipos de nanopartículas tienen algunas deficiencias para ser administradas *in vivo* debido a que poseen una alta carga positiva. Esta carga induce problemas de hemotoxicidad, causada por agregados generados por la interacción entre nanopartículas y proteínas sanguíneas (Duarte et al., 2012). A pesar de los inconvenientes, este tipo de nanopartículas han sido ampliamente utilizados para la administración de sustancias hidrofílicas en sangre.

Las micelas contienen capas lipídicas que pueden cargar en su interior moléculas hidrofóbicas como aparece en la Figura 6. Aunque los liposomas y las micelas están hechas de los mismos lípidos, su disposición en el espacio permite que estas tengan aplicaciones diferentes. El liposoma muestra en su estructura una bicapa lipídica, la cual interactúa con moléculas con carga tanto en el exterior como en el interior de ella. Esta cualidad le permite “cargar” en su interior moléculas hidrofílicas. La micela no contiene en su interior las cabezas polares de los lípidos, por lo tanto, en el interior de su estructura sólo puede “cargar” estructuras sin carga hidrofóbicas como ciertos flavonoides.

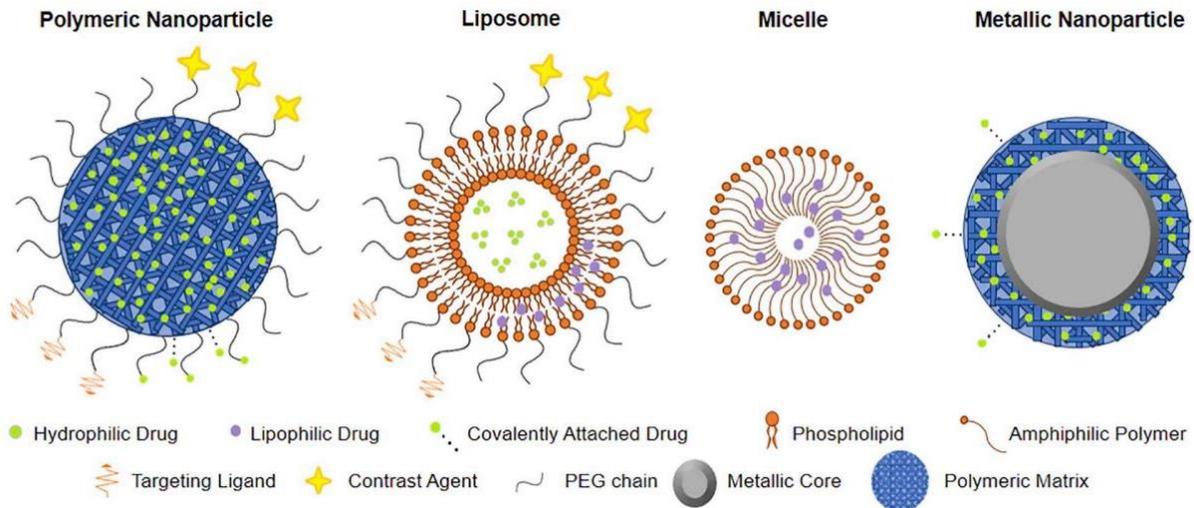


Figura 6. Representación esquemática de sistemas de entrega comunes desarrollados para fitoquímicos anticancerígenos. (Lagoa et al., 2020)

Nanopartículas poliméricas: Este tipo de nanopartículas biodegradables es de los tipos de nanopartículas más estudiadas (Figura 6). Algunas de sus características es que son estables, se pueden esterilizar fácilmente, se pueden sintetizar a gran escala con resultados reproducibles, la degradación es controlada, poseen baja toxicidad e inmunogenicidad. Los polímeros que se eligen para realizar la síntesis de nanopartículas deben ser biocompatibles y biodegradables (Sun et al., 2014), lo cual permite que su degradación sea controlada y por lo tanto la administración del fármaco también lo será. La degradación libera al agente terapéutico paulatinamente. En la mayoría de las nanopartículas poliméricas la degradación controlada produce residuos que no generan daño tóxico, mostrando excelente biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo*. Se pueden utilizar polímeros naturales o sintéticos (Wang et al., 2016; Dizaj et al., 2014; Masood, 2016). Algunos ejemplos de polímeros utilizados en la construcción de nanopartículas son la albúmina (Tirkey et al., 2017), y polisacáridos como quitosano (Carrillo et al., 2014; Bor et al., 2016; Pourmortazavi et al., 2019) o alginato (Zhou et al., 2016). Algunos ejemplos de polímeros sintéticos son la polietilamina (Peng et al., 2017), policaprolactona (Shi et al., 2014), ácido poliláctico (Gaspar et al., 2015), polietilenglicol (Frede et al., 2016) y el ácido poliláctico-co-glicólico (Gaspar et al., 2015).

Nanopartículas Inorgánicas: La ventaja del uso de nanopartículas inorgánicas es su fácil manipulación en cuanto a tamaño, forma, composición y propiedades químicas. Son fáciles de sintetizar, se pueden producir a gran escala, son fácilmente funcionalizadas y pueden ser

endocitadas por las células. Algunos ejemplos de nanopartículas inorgánicas son los nanotubos de carbono, las nanopartículas de fosfatos de calcio, nanopartículas de oro, nanopartículas de sílica, y nanopartículas magnéticas (Wang et al., 2016; Dizaj et al., 2014). A las nanopartículas magnéticas se les aplica un campo electromagnético externo que funciona para dirigir el tratamiento de forma focalizada hacia el sitio anatómico en donde se requiere la liberación del fármaco. Existen numerosos casos de éxito de estudios clínicos de nanopartículas inorgánicas, sin embargo, el uso de estas se ha limitado a patologías cercanas a la superficie del cuerpo (Vago et al., 2016; Sun et al., 2017).

2. Hipótesis

Los agentes antitumorales que hoy en día se usan para el tratamiento del cáncer son por lo general muy tóxicos, producen daños severos en las células no tumorales y resistencia ante el tratamiento prolongado. El uso de agentes antitumorales con especificidad para las células transformadas, pero inocuos o seguros para las normales, sería ideal para el tratamiento del cáncer. En este sentido, los flavonoides han demostrado citotoxicidad selectiva hacia distintos tipos de células tumorales con escaso efecto sobre las normales, lo que ha estimulado enormemente el interés en el desarrollo de terapias quimioterápicas basadas en flavonoides (Plochmann et al., 2007; Sak, 2014; Magne et al., 2015). La hipótesis de este estudio es que la flavona sintética 2'NF y la apigenina, flavona natural de estructura semejante frente a la cual se compararán los efectos de la 2'NF, producen efectos citotóxicos y regulan receptores fundamentales para la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de mama, representando así alternativas terapéuticas para ser usadas para el tratamiento del cáncer de mama, fundamentalmente en asociación con otras terapias, con el fin de potenciar su acción y/o retrasar el desarrollo de mecanismos de resistencia. Dado que el potencial uso de flavonoides en terapéutica demanda su adecuada vehiculización para que tengan una alta biodisponibilidad en el sitio de acción, se proponen posibles sistemas nanométricos para su vehiculización.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Estudiar y comparar los efectos celulares y moleculares de la 2'-nitroflavona (2'NF) y la apigenina sobre células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 y analizar la eficiencia de sistemas nanoparticulados para vehiculizar los flavonoides en estudio mediante ensayos in vitro.

3.2. Objetivos específicos

1. Analizar los efectos citotóxicos de la apigenina y 2'NF sobre las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.
2. Estudiar la regulación por las flavonas de receptores asociados a la proliferación celular y a la patogénesis del cáncer sobre las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.
3. Estudiar posibles sistemas de vehiculización nanométricos para flavonas. Analizar la citotoxicidad de las micelas propuestas como vehículo de los flavonoides.

4. Metodología

4.1. Materiales y reactivos

Los siguientes reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, Inc. (San Luis, Misuri, EE. UU.). 2-mercaptoetanol, aprotinina, azul de Coomassie R-250, Ponceau S, dodecilsulfato de sodio (SDS), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), fluoruro de sodio (NaF), glucosa, HEPES, ortovanadato de sodio (Na_3VO_4), persulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$, pirofosfato de sodio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$), albúmina de suero bovino (BSA), Tricina, Tritón X-100, Tween 20 y anticuerpo anti-actina. La acrilamida, la N, N'-metilenbisacrilamida y el y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) fueron comprados en Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, California, EE. UU.). Los anticuerpos primarios anti-EGFR y anti-ErbB2 fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, EE. UU.). Los anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa de rábano picante (IgG-HRP) anti-conejo y los siguientes anticuerpos primarios, fueron adquiridos de Cell Signalling Technology Inc. (Danvers, Massachusetts, EE. UU.): anti-p38, anti-pp38 y anti-PARP. Los marcadores de peso molecular fueron obtenidos de Bio-Rad Laboratories, Inc. (Argentina), conteniendo proteínas recombinantes de entre 10 y 250 kD.

Para este trabajo, se utilizaron dos flavonas con actividad biológica conocida: apigenina y la 2'NF. La apigenina (4',5,7-trihidroxi-flavona) (Figura 7) es un flavonoide, perteneciente al grupo de las flavonas, ampliamente distribuido en plantas incluidas la mayoría de las verduras y frutas. Se ha reportado que la apigenina posee múltiples funciones biológicas demostrando efectos protectores antiinflamatorios, antioxidantes, antibacterianos, antivirales, antitumorales y cardiovasculares (Xu, et al., 2020). La Apigenina (CAS Number 520-36-5) se obtuvo de forma comercial de Cayman Chemical.

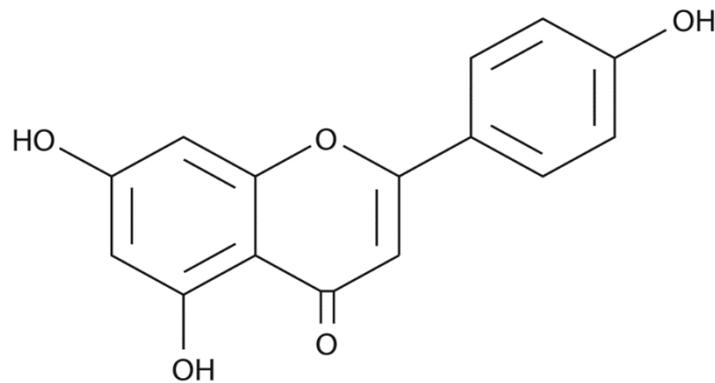


Figura 7. Estructura de la apigenina. (Hazafa et al., 2019)

La 2'nitroflavona (2'NF) fue obtenida de forma sintética en el laboratorio de la Dra. Marder (Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires Argentina) mediante procedimientos previamente reportados (Marder, et al., 1997). La determinación de pureza e identificación del producto final se realiza mediante HPLC y resonancia magnética nuclear (RMN). La estructura reportada por los autores se muestra en la Figura 8.

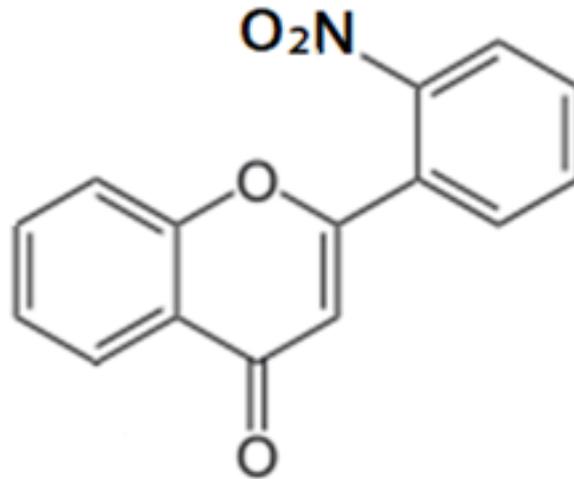


Figura 8. Estructura de la 2'nitroflavona. (Marder, et al., 1997)

4.2. Líneas Celulares

Se utilizaron dos líneas celulares de epitelio mamario: MCF-7 y MDA-MB-231.

- a- La línea celular MCF-7 (ATCC® HTB-2™, Rockville, MD, USA) fue, originalmente obtenida de una efusión pleural proveniente de una mujer caucásica de 69 años con carcinoma ductal invasivo (IDC) y constituye una línea derivada de un adenocarcinoma humano de mama que sobre expresa los receptores de estrógeno y progesterona (ER+/PR+/HER2-) representando, por lo tanto, un modelo experimental para el estudio del cáncer de mama hormono-dependiente, Luminal A. (J.Cancer, 2017)
- b- La línea celular MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™, Rockville, MD, USA) es una línea celular epitelial de cáncer de mama establecida a partir de una efusión pleural de una mujer caucásica de 51 años con adenocarcinoma mamario metastásico. Se expresa como un tumor del tipo adenocarcinoma (AC) y no expresa los receptores antes mencionados, constituyendo un modelo experimental in vitro del cáncer de mama hormono-independiente (triple-negativo=ER-/PR-/HER2-). (J.Cancer, 2017)

4.3. Micelas

Los nanosistemas micelares fueron preparadas y amablemente cedidas por miembros del Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Las mismas fueron diseñadas utilizando una formulación micelar mixta compuesta por Soluplus® y TPGS usada en un estudio donde la caracterización morfológica de las micelas vacías se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y la concentración de la droga dentro de las micelas fue medida mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Este estudio demostró el aumento de la solubilidad acuosa y mejora in vitro de la eficiencia antitumoral de una de las drogas quimioterapéuticas más importantes, paclitaxel (PTX), en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 (E. Bernabeu et al, 2015).

4.4. Mantenimiento de las líneas celulares en cultivo

Las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 fueron mantenidas en medio esencial mínimo de cultivo DMEM suplementado con bicarbonato de sodio (2,4g/L), suero fetal bovino

(SFB) previamente de complementado por calentamiento a 56°C durante 30 min (10% final), antibióticos penicilina (100U/ml) y estreptomycin (100 mg/ml) y glutamina (2 mM). Las líneas celulares fueron incubadas en botellas de cultivo de 75 cm², a 37°C y 5% de CO₂ en una atmósfera húmeda, realizando subcultivos periódicamente para mantener las células en cultivo o para su amplificación según los requerimientos.

4.5 Determinación de la viabilidad celular: actividad de hexosaminidasa

Como parámetro para estimar el número de células relativas viables se utilizó un ensayo colorimétrico que determina la actividad de la enzima hexosaminidasa en cultivos celulares. La hexosaminidasa es una enzima lisosomal cuya actividad es proporcional al número de células viables.

Específicamente, se utilizó el método colorimétrico diseñado por Landegren en 1984 (Landegren, 1984). Para este ensayo colorimétrico se emplea 4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosamina disuelta en buffer citrato 50 mM , 0,25% (v/v) Tritón X-100pH 5,0 como sustrato sintético para detectar la actividad de la enzima hexosaminidasa, con el cual se incubaba durante 2 hs. Tras dicho período de incubación, se bloquea la actividad enzimática y se agrega el reactivo revelador (50 M glicina, 5mM EDTA, pH 10,4). El producto de esta reacción da lugar a una emisión colorimétrica (amarillo) proporcional al tamaño de la población celular que puede cuantificarse en el espectrofotómetro o colorímetro de placas a 405 nm.

4.6 Determinación de la citotoxicidad del vehículo a usar.

Se realizaron dos estudios separados con distintas proporciones de dos posibles vehículos: 10% (v/v) de DMSO en etanol y 10% (v/v) de DMSO en DMEM. Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo contadas mediante cámara de Neubauer en medio DMEM suplementado. Luego de 24hs, se cambia el medio fresco conteniendo concentraciones crecientes del vehículo en estudio (1, 2, 4, 6, 8, 10%). Luego, las células se incubaron por 48 horas y se determinó el número de células viables mediante el método colorimétrico que evalúa la actividad de hexosaminidasa. Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje del crecimiento celular respecto al control (sin tratamiento). Los detalles del diseño de los ensayos realizados se muestran en la siguiente tabla:

			Vehículo (1:10)	
% Vehículo	DMEM (μL)	Vehículo (μL)	Etanol o DMEM (%)	DMSO (%)
0	500	-	0	0
1%	495	5	0.9	0,1
2%	490	10	1,8	0,2
4%	480	20	3.6	0,4
6%	470	30	5.4	0,6
8%	460	40	7.2	0,8
10%	450	50	9	1

Tabla II. Diseño experimental para el estudio de citotoxicidad de los vehículos 10% de DMSO en etanol y 10% de DMSO en DMEM.

4.7. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀)

Para la determinación de la inhibición del 50% del crecimiento (IC₅₀) para cada flavonoide estudiado en cada una de las líneas celulares se realizó el siguiente procedimiento experimental: las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo contadas mediante cámara de Neubauer en medio DMEM suplementado. Luego de 24hs, se cambia el medio fresco conteniendo concentraciones crecientes de los flavonoides (2, 5, 10, 15, 20, 40, 50, 60 y 80 μM). Las células se incubaron por 48 horas y se determinó el número de células viables mediante el método colorimétrico que evalúa la actividad de hexosaminidasa. Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje del crecimiento celular respecto al control (sin tratamiento). Las células control son células incubadas en ausencia de flavonoides, pero en presencia de un alícuota equivalente del vehículo en el que estos son disueltos (10% v/v de DMSO en etanol). Los valores de IC₅₀ se determinan a partir del análisis de las curvas dosis-respuesta obtenidas.

4.8. Cultivo y tratamiento de las líneas celulares con flavonoides (apigenina y 2'NF) para su análisis por western blot.

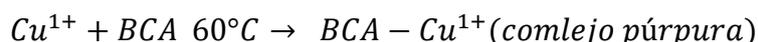
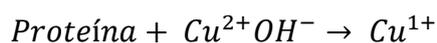
Para estudiar la expresión de distintos receptores y mediadores de la señal por western blot tras tratamiento de las células con las flavonas las células se sembraron en placas de 35 mm en una concentración de 500.000 células/placa en medio completo. Al día siguiente se cambió el medio por DMEM con concentraciones crecientes de apigenina (40 y 80 μM) o 2'NF (10 y 20 μM) y se incubaron las células durante 48 hs. Las células control son células incubadas en ausencia de flavonoides, pero en presencia de un alícuota equivalente del vehículo en el que estos son disueltos (10% v/v de DMSO en etanol). Se utilizaron dosis menores y mayores a la IC_{50} previamente determinada de cada flavona. Finalizado el período de incubación, las células se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) y las placas se conservaron a -80°C para la posterior preparación del solubilizado celular y las muestras para inmunoblotting.

4.9. Inmunoblotting o western blotting (WB)

Para analizar las muestras por inmunoblotting, se extrajeron las proteínas totales de las células conservadas a -80°C mediante solubilización en buffer pH 7,4; Tritón X-100 1% (P/V), BufferHepes 100 mM, EDTA 10 mM, pirofosfato de sodio 100 mM, fluoruro de sodio 100 mM y ortovanadato de sodio 10 mM y, PMSF 2 mM y aprotinina 0,032 unidades inhibitorias de tripsina para evitar tanto la degradación como la desfosforilación de las proteínas. Los homogenatos se centrifugaron para remover el material insoluble. La concentración de proteínas del sobrenadante fue determinada utilizando el método del ácido bicinonínico (BCA) y para luego proceder a la preparación de las muestras en buffer Laemmli (Laemmli 1970) para su análisis por WB.

Método de BCA

El ácido bicinonínico, sal sódica, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{+1} en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{+2} en medio alcalino (reacción de Biuret). La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos.



Para este ensayo se realiza una curva de calibración con estándares de seroalbúmina bovina (BSA) y posteriormente se incuban con volúmenes fijos de BCA (200 μL de BCA por cada 20 μL de muestra) incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente y leídas a 562 nm y contrastados con la curva de calibración.

Las proteínas recuperadas se analizaron mediante electroforesis en geles de poli(acrilamida) con detergente SDS (SDS-PAGE), el equipo empleado fue Mini Protean de la empresa (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, California, EE.UU.).

En todas las ocasiones se utilizaron geles discontinuos compuestos por un gel concentrador o *stacking* y un gel de resolución o *running*. Ambos geles se prepararon a partir de una solución madre de acrilamida/bis-acrilamida al 30%: 29,2% p/v acrilamida y 0,8% p/v de N,N'-metilbisacrilamida. El gel concentrador fue preparado siempre al 4% de acrilamida/bis-acrilamida con buffer Tris-HCl 1,5 M de pH 6,8. En cambio, el porcentaje del gel de resolución utilizado fue variable (7,5%, 10% y 12%) dependiendo del peso molecular de la proteína de interés, preparado siempre con buffer Tris-HCl 1,5 M de pH 8,8.

Como iniciador y catalizador de la reacción de polimerización se utilizaron 1 % p/v de persulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ y 0,09% p/v de TEMED, respectivamente. Las corridas se realizaron a temperatura ambiente, aplicando 100 voltios (V) hasta que las proteínas alcanzaran el gel de resolución, momento a partir del cual se aumentó a 135 V. La electroforesis se realizó en buffer Tris-Glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 % p/v., pH 8,3).

Las proteínas de los solubilizados celulares, una vez separadas mediante SDS-PAGE, fueron transferidas a membranas de PVDF (AmershamHybond P 0,45 PVDF, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) previamente activadas en metanol por unos segundos. La electrotransferencia en condiciones semisecas se realizó en un equipo modelo V20-SDB (Scie-Plas Ltd., Cambourne Cambridge, Reino Unido), durante una hora y media a corriente constante (0,1 \AA /membrana) y en presencia de un *buffer* de transferencia compuesto por: Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 % v/v y SDS 0,03 % p/v. El éxito de la transferencia fue corroborado mediante la tinción de la membrana de PVDF con una solución de Rojo Ponceau S 1% en agua y acético. Luego se procedió a bloquear durante 1 h a temperatura ambiente los sitios libres de proteína con BSA 3% en T-TBS (*buffer* Tris salino con Tween 20; Tris-HCl 10

mM, NaCl 150 mM y Tween 20 0,02 % p/v; pH 7,60) y de esa forma, evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana. Una vez hecho el bloqueo, se realizó la incubación con el anticuerpo específico para la proteína de interés en agitación a 4°C.

Al día siguiente, se realizaron lavados con T-TBS y se procedió a incubar dichas membranas, 1h en agitación a temperatura ambiente, con el anticuerpo primario (Concentración 1:1000 en T-TBS y BSA 1%) para luego realizar lavados con T-TBS e incubar 1h con el anticuerpo secundario conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Concentración 1:1000 en T-TBS y BSA 0.5%) que reconocería la zona Fc del anticuerpo primario específico para la proteína de interés. Finalizado el tiempo de incubación, se realizaron lavados y se realizó el revelado de la señal específica mediante quimioluminiscencia utilizando un kit comercial con el sustrato para la HRP (Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific, Inc.).

La señal se recogió en placas autorradiográficas (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) que fueron reveladas, y las imágenes obtenidas se escanearon. La intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el programa Gel-Pro analyzer (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, EE.UU.). Los valores de densidad óptica (D.O.) obtenidos fueron corregidos por control de carga y relativizados al promedio de los valores obtenidos para los controles.

4.10. Estudio sobre micelas de TPGS y Soluplus® como posible sistema de vehiculización nanométrico para la apigenina.

Para cargar las nanopartículas con apigenina se realizó el siguiente procedimiento experimental: Las nanopartículas vacías fueron preparadas usando Soluplus® y TPGS en una proporción de 2:1 en agua destilada a temperatura ambiente y equilibrando el sistema a 25°C. Luego, mediante la difusión de apigenina en etanol y el agregado por goteo a la solución del sistema micelar, bajo agitación magnética a 25 °C, las micelas cargadas resultantes fueron filtradas a través de una membrana de 0.45 µm para su uso. Para estudiar la citotoxicidad del vehículo nanométrico, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo en medio DMEM suplementado. Luego de 24hs, se cambia el medio fresco conteniendo distintas concentraciones de: apigenina (con DMSO en etanol como vehículo), micelas Soluplus®/TPGS (2:1) cargadas con apigenina y micelas Soluplus®/TPGS (2:1) vacías en una alícuota equivalente a una concentración de apigenina de 2, 5, 10, 15, 20,

30 y 40 μM . Las células se incubaron por 48 horas y se determinó el número de células viables mediante el método colorimétrico que evalúa la actividad de hexosaminidasa. Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje del crecimiento celular respecto al control (sin tratamiento). La comparación de los efectos de estos tratamientos se evaluó a partir del análisis de las curvas dosis-respuesta obtenidas.

4.11. Análisis estadístico de los resultados.

Las muestras de las células tratadas con los flavonoides y sus respectivos controles fueron analizadas en paralelo. Los resultados se presentan con la media \pm el desvío estándar de la media (SDM) del número de muestras. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía seguido de la prueba de Newman-Keuls de comparación múltiple o una Prueba T para los ensayos de IC_{50} . Se trabajó con el programa de estadística GraphPadPrism versión 8.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, EE. UU.). Los resultados significativamente distintos al basal se indican con *, con $p < 0,05$ y **, con $p < 0,01$.

5. Resultados y Discusiones

5.1. Analizar los efectos citotóxicos de la apigenina y 2' NF sobre las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.

Para analizar los efectos citotóxicos de las flavonas, se analizó la viabilidad celular de las células MCF-7 y MDA-MB-231 tras incubación con distintas dosis de apigenina o 2'NF. Estos ensayos permitieron obtener curvas dosis-respuesta para cada línea celular y cada flavona a partir de las cuales se estimó la concentración que inhibe al 50% la viabilidad celular (IC_{50}). Ello implicó, previamente, la puesta a punto de las condiciones del ensayo.

Debido a la baja solubilidad de los flavonoides, fue necesario estudiar una manera de incorporarlos al medio de cultivo. El DMSO es un solvente aprótico y altamente polar, principalmente usado para la criopreservación de células, ya que disminuye el estrés osmótico y la deshidratación celular, y como vehículo de penetración de diversos fármacos. (J. Hebeling, et al, 2015). Biológicamente es muy tóxico por lo que es importante estudiar sus efectos sobre la viabilidad celular al usarlo como vehículo. Con la intención de determinar la mayor concentración del vehículo que se puede usar sin disminuir la viabilidad celular de manera significativa, se analizó el efecto sobre viabilidad celular de distintas concentraciones de dos posibles vehículos: 10% DMSO en etanol y 10% DMSO en DMEM. Estos estudios fueron importantes para el diseño de los posteriores protocolos destinados a determinar viabilidad celular y los efectos moleculares de las flavonas sobre las líneas celulares.

5.1.1. Citotoxicidad de los vehículos para el tratamiento de las células con los flavonoides.

Se observó una tendencia a la disminución de la viabilidad celular cercana al 50% al usar concentraciones mayores al 6% de vehículo. Concentraciones menores o iguales no muestran una tendencia a reducir la viabilidad celular, obteniendo resultados similares al grupo control (Figura 9).

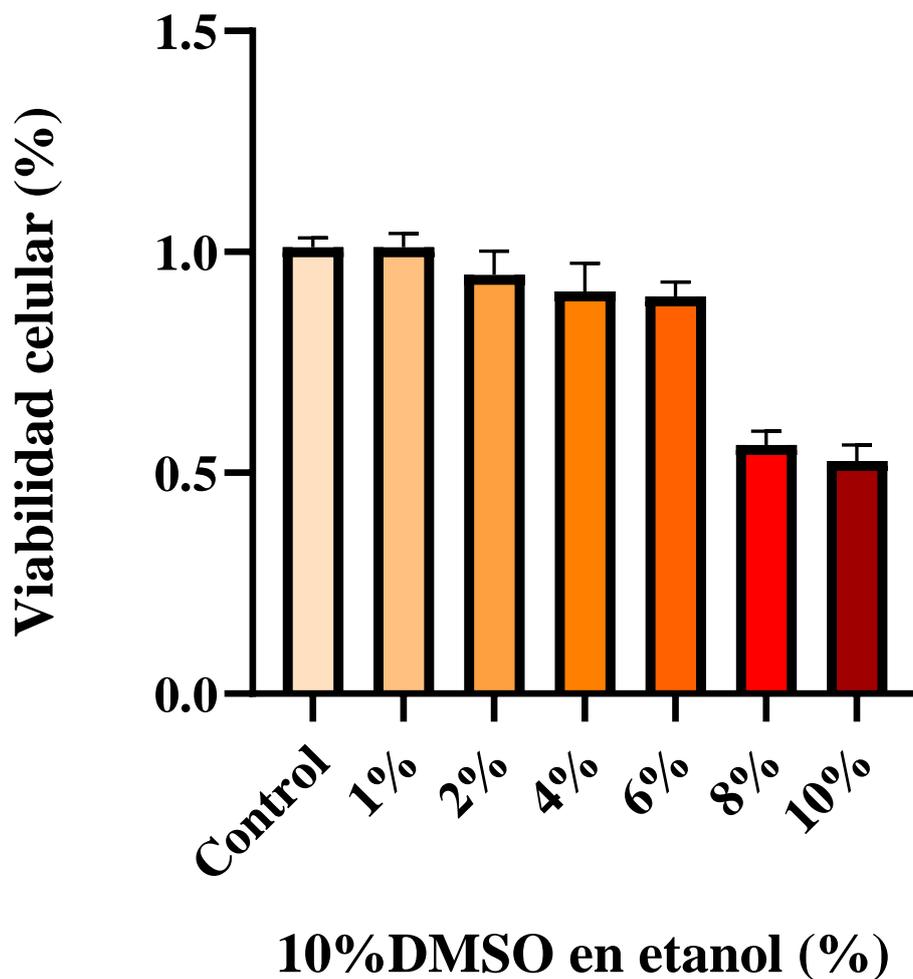


Figura 9. Viabilidad celular (expresado en porcentaje) frente a la incubación con distintas concentraciones de vehículo 10% (v/v) DMSO en Etanol. Los valores representan la media \pm DE de cinco réplicas técnicas tratando células MDA-MB-231.

Una concentración de 6% de vehículo corresponde a una concentración de DMSO de 0,6% (Tabla II) que coincide con lo reportado como concentración límite para no observar citotoxicidad. En este sentido, Jamalzadeh y colaboradores en el 2016 (Jamalzadeh, et al., 2016) realizan un estudio sobre el efecto citotóxico de varios solventes orgánicos comunes en varias líneas celulares, incluidas cáncer de mama. En este trabajo los autores reportan que altas concentraciones de DMSO pueden influir en el metabolismo celular (inhibiendo la replicación)

así como afectar la integridad de la membrana. De esta forma, nuestros resultados de disminución de viabilidad pueden asociarse a los efectos reportados anteriormente.

Por otro lado, el estudio donde se utilizó el medio de cultivo DMEM en lugar del etanol no mostró una tendencia definida respecto a los efectos del vehículo sobre la viabilidad celular para bajas concentraciones de DMSO, posiblemente, por una inadecuada solubilización del DMSO (Figura 10), no permitiendo concluir el efecto del uso de 10% (v/v) DMSO en DMEM como vehículo para los estudios siguientes.

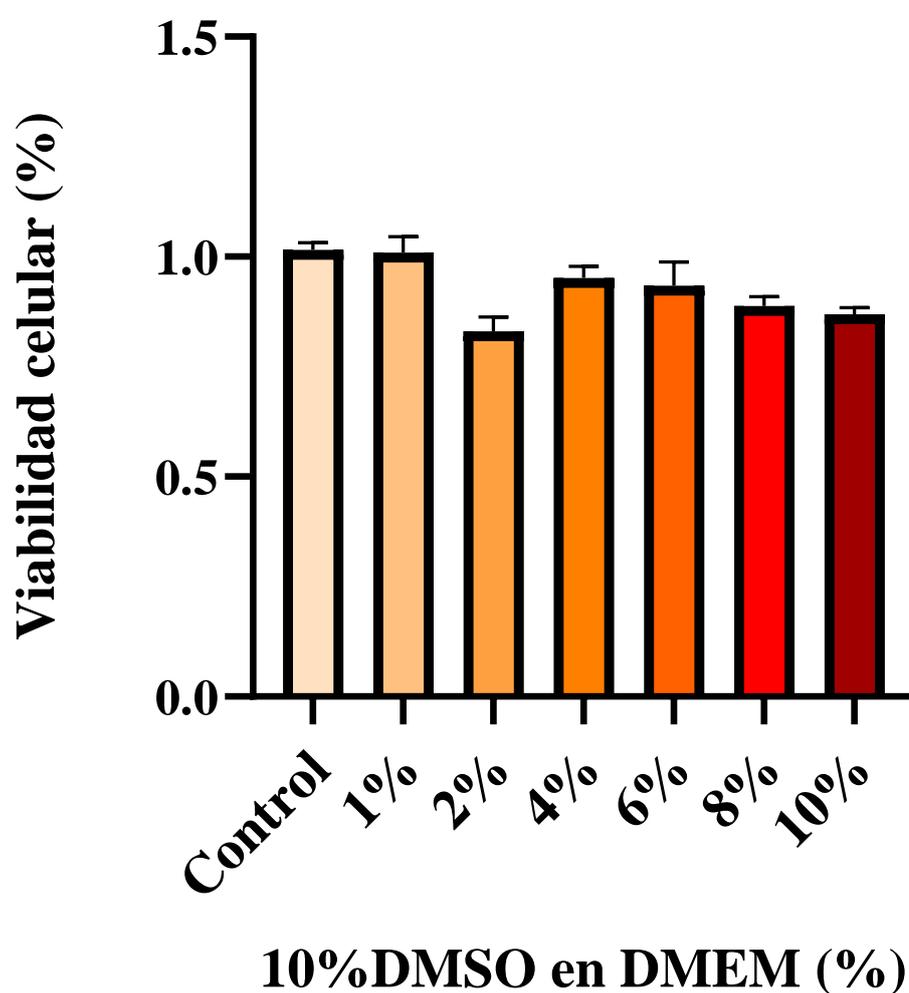


Figura 10. Viabilidad celular (expresado en porcentaje) en distintas concentraciones de vehículo 10% DMSO-DMEM. Los valores representan la media \pm DE de cinco réplicas técnicas tratando células MDA-MB-231.

Basado en estudios previos (Cárdenas et al., 2006; 2008) y los resultados que muestran estos ensayos se decide que el uso de 10% (v/v) DMSO en EtOH como vehículo a una concentración menor o igual al 6% no tiene efecto sobre la viabilidad celular, lo cual garantiza que los efectos sobre viabilidad que se verán después corresponden a las flavonas y no al vehículo.

5.1.2. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de los flavonoides 2'NF y apigenina en dos líneas celulares de cáncer de mama.

Con la intención de evaluar el efecto citotóxico de la 2'NF y la apigenina sobre las células de cáncer de mama en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231, las células se incubaron durante 48 hs con concentraciones de entre 2 y 80 μ M de los flavonoides. La viabilidad celular se determinó mediante el método de la hexosaminidasa y se normalizaron los valores con el promedio de los controles. Los valores de viabilidad remanente para cada concentración se expresaron como porcentaje de la viabilidad respecto al control (incubación con el vehículo). Los datos obtenidos permitieron diseñar las curvas dosis-respuesta para cada flavona en cada línea celular haciendo la transformación logarítmica de las concentraciones seguido de un análisis de regresión no lineal (ajuste de curva). A partir de dichas curvas (Figura 11) se pudo estimar la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀).

Para ambas líneas celulares se pudo observar una tendencia a la disminución de la viabilidad celular al exponer las células a concentraciones crecientes de ambos flavonoides (Figura 11). Al comparar la viabilidad celular para una misma flavona en las dos líneas celulares, se observó un IC₅₀ similar; sin embargo, en ambos casos se requirieron concentraciones menores de las flavonas para inhibir la viabilidad celular de las células MCF-7 (Figura 11, Tabla III). Por su parte, al considerar cada línea celular por separado y comparar el efecto de las dos flavonas, se observó una menor viabilidad celular para las células tratadas con 2'NF lo cual se evidencia en una diferencia significativa entre los valores de IC₅₀ para el tratamiento con 2'NF en ambas líneas celulares (Figura 11, Tabla III), indicando que su efecto citotóxico sobre las células fue superior al requerir una dosis menor para lograr la inhibición celular, esto nos hace considerar que su capacidad para inducir muerte celular es mayor a la de la apigenina.

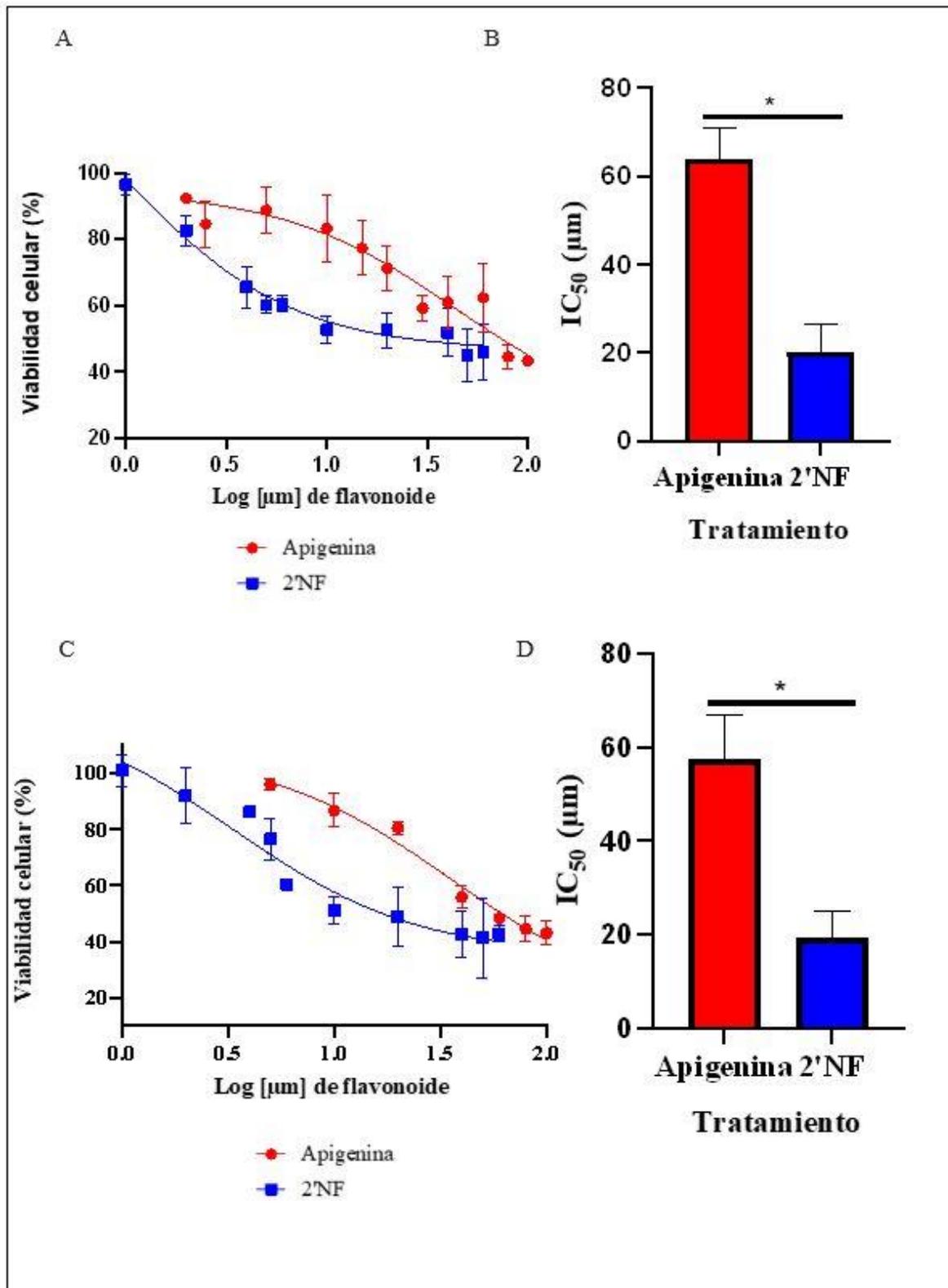


Figura 11. Ensayos IC₅₀ de línea celular MDA-MB-231(A) y MCF-7 (C) tratados con concentraciones entre 2 y 80 µM de apigenina y 2'NF. Prueba T entre los IC₅₀ de las réplicas biológicas en la línea MDA-MB-231 (B) y MCF-7 (D). Los valores representan la media ± DS de 4 experimentos independientes (*p<0.05)

Flavonoide	IC ₅₀ en MDA-MB-231(μm)	IC ₅₀ en MCF-7 (μm)
Apigenina	63.71 ± 6.84	56.86 ± 7.19
2´Nitroflavona	19.47 ± 5.33	18.62 ± 5.89

Tabla III: IC₅₀ ± DE de la línea celular MDA-MB-231 y MCF-7 tratados con apigenina y 2´Nitroflavona. Los valores representan la media ± DS de 4 experimentos independientes.

El efecto inhibitorio de la apigenina concuerda con reportes previos (Lord, C., 2008). (Madunic, J. et al., 2018). Se ha analizado su efecto contra la línea MCF-7, concluyéndose que este flavonoide bloquea el desarrollo tumoral al activar la apoptosis extrínseca, promoviendo la expresión de las proteínas p53, p21 y suprimiendo la señalización del factor nuclear-kB (NFkB) y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (siglas en inglés STAT3) (Madunic, J. et al., 2018). Asimismo, el efecto inhibitorio de la apigenina obtenido sobre la línea celular MDA-MB-231 es consistente con investigaciones anteriores en la cual se mostró que el inicio de la apoptosis, tras la incubación con apigenina, ocurría a través de la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa-3 (A. M. Scherbakov et al, 2015)

Se encontró que el valor de IC₅₀ para la 2´nitroflavona es significativamente menor al de la apigenina para ambas líneas celulares (Figura 11), indicando que su efecto citotóxico sobre las células cancerígenas fue superior al requerir una dosis menor para lograr la inhibición celular, esto nos hace considerar que su capacidad para inducir muerte celular es mayor al de la apigenina. Si bien se han hecho algunos estudios respecto al mecanismo de acción citotóxico de la 2´NF en otros tipos celulares (Cárdenas et al., 2009; 2012), están en estudio los cambios a nivel celular y molecular que se dan en células de cáncer de mama.

5.1.3. Analizar los efectos de los flavonoides apigenina y 2'NF sobre la expresión de PARP-1 y la fosforilación de p38 en dos líneas celulares de cáncer de mama.

- **Expresión del clivaje de PARP-1 en células tratadas con apigenina y 2'Nitroflavona en dos líneas celulares de cáncer de mama.**

Investigaciones empleando polifenoles derivados de frutas como la buteína han demostrado una activación dosis dependiente de las p38, así como la disminución de la proliferación de células de cáncer de mama (Heng, L., 2012). Se ha reportado la inducción de la apoptosis en células de cáncer de mama a través de la activación de JNK-1 en conjunto a la fosforilación de la p38 (Kim, M., 2009). Para detectar si la activación de p38 es inducida frente a incubación con las flavonas en estudio, se determinó su fosforilación mediante western blot (Heng, L., 2012).

Para ambas líneas celulares y ambos flavonoides se detectaron bandas de PARP-1 (116 kDA) así como también su producto de escisión C-terminal (89 kDA). Nos fue posible distinguir un comportamiento directamente proporcional entre la concentración de los flavonoides suministrada y el aumento del clivaje de PARP-1 (Figura 12), lo anterior podría deberse a la activación de la Caspasa-3 que clivó la PARP-1 y sería, por tanto, indicio del proceso apoptótico en las líneas celulares.

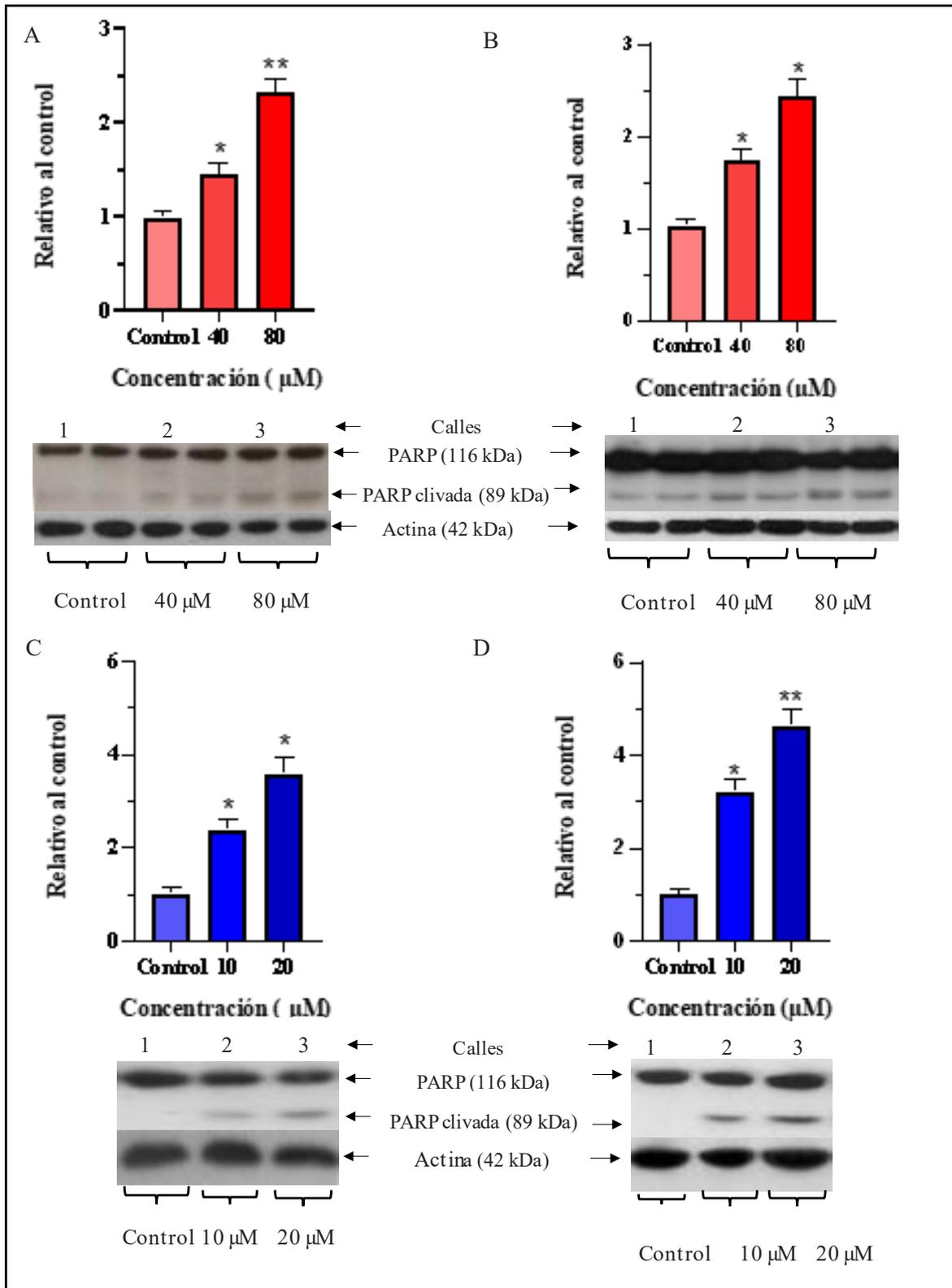


Figura 12: Ensayos de western blot del clivaje de PARP de línea celular MDA (A) y MCF-7 (B) tratados con apigenina. Sobre MDA (C) y MCF-7 (D) tratados con 2'NF. Los valores representan la media \pm DE de 5 experimentos independientes analizados por one way NOVA

seguido de un análisis de comparaciones múltiples entre cada concentración y el control. (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$). Las calles numeradas corresponden a los tratamientos observados en los gráficos.

- **Fosforilación de p38 en células tratadas con apigenina y 2'NF en dos líneas celulares de cáncer de mama.**

Se encontró un incremento en la expresión de la p38 fosforilada cuando las líneas celulares MDA y MCF-7 fueron expuestas a apigenina y 2'NF (Figura 13). Esto sugieren que ambos flavonoides podrían activar apoptosis en las líneas celulares de cáncer de mama a través de rutas mediadas por proteínas como p38. Adicionalmente, otras vías de señalización podrían participar en el proceso como ser JNK. Para ello, se deberían continuar los estudios moleculares iniciales presentados en esta tesis.

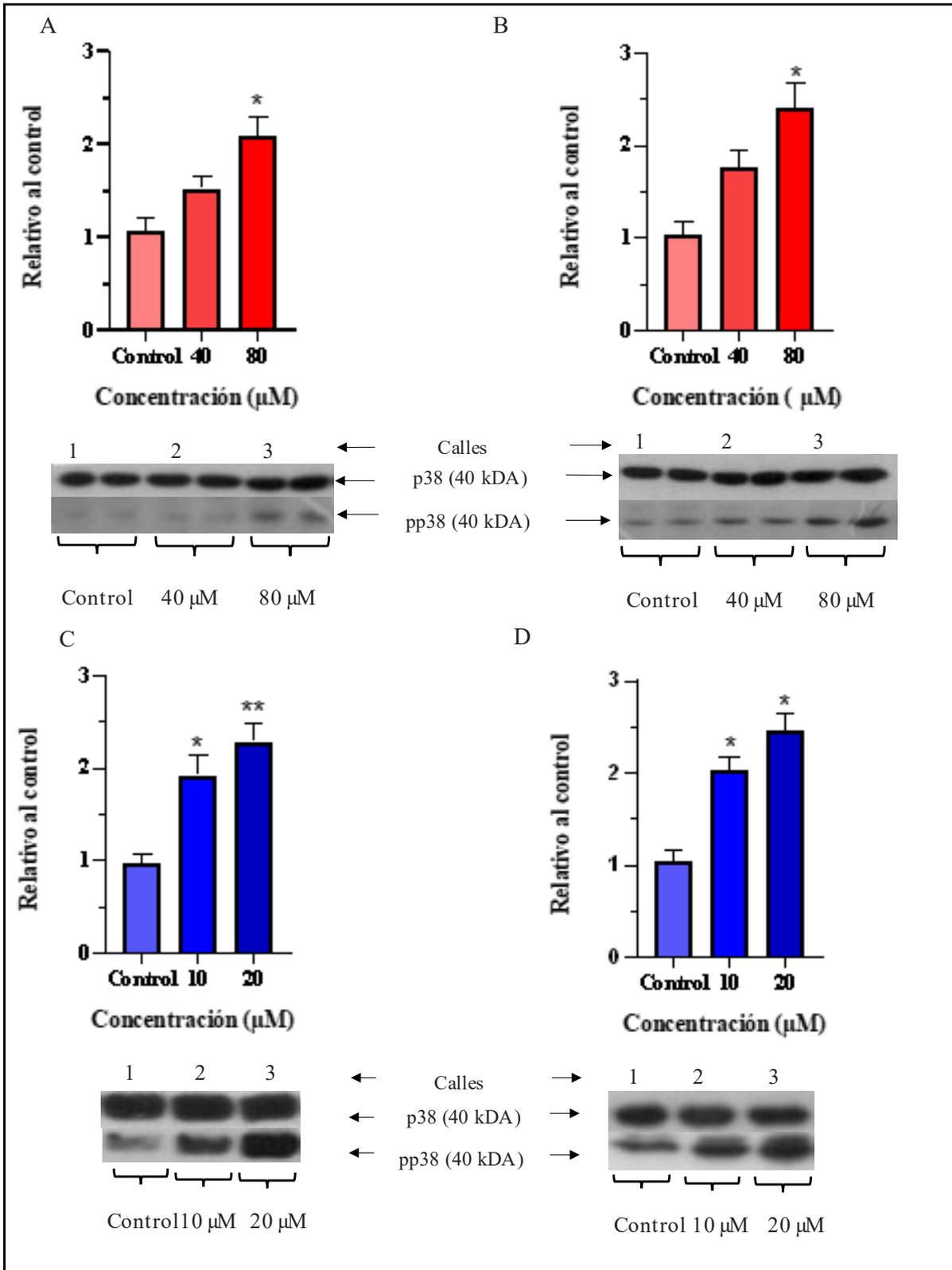


Figura 13: Ensayos de western blot sobre la relación entre la fosforilación de p38 y p38 en línea celular MDA (A) y MCF-7 (B) tratados con apigenina. Sobre MDA (C) y MCF-7 (D)

tratados con 2'NF. Los valores representan la media \pm DE de 5 experimentos independientes analizados por one way ANOVA seguido de un análisis de comparaciones múltiples entre cada concentración y el control. (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$). Las calles numeradas corresponden a los tratamientos observados en los gráficos.

5.2. Analizar los efectos de los flavonoides apigenina y 2'NF sobre la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y Erb B2 (HER2) en dos líneas celulares de cáncer de mama.

- **Expresión de EGFR y Erb B2 en células tratadas con apigenina y 2'NF**

Uno de los mecanismos mediante el cual los flavonoides interactúan con las células ocurre a través de los receptores tirosina quinasas transmembranales (RTK), específicamente los implicados en la señalización de factores de crecimiento, algunos de ellos son: EGFR, Erb B2 (HER2), VEGFR3, PDGFR, entre otros (Sherbakob, 2015).

La aplicación de los flavonoides apigenina y 2'NF ocasionó una disminución de los receptores EGFR, aunque en este caso solo se encontraron resultados estadísticamente significativos para las líneas celulares tratadas con 2'NF (Figura 14). Particularmente se observó una disminución estadísticamente significativa de la expresión de Erb B2 en ambas líneas celulares con ambos flavonoides, contrastándolo con los valores expresados en el grupo control (Figura 15). Lo anterior podría indicar que una de las vías por la cual la apigenina y la 2'NF inhiben el desarrollo de las líneas celulares sería a través de la modulación de estos RTK.

La disminución en la expresión de los RTK EGFR y Erb B2 implica que tanto la apigenina como el 2'NF poseen una predisposición para modular negativamente este tipo de receptores, lo cual es especialmente importante, tomando en cuenta que algunos cánceres de mama se caracterizan por mutaciones genéticas que llevan a la sobre expresión de los receptores EGFR y Erb B2. Tomando en cuenta lo expresado anteriormente, la apigenina y el 2'NF podrían ser buenas opciones de posibles fármacos coadyuvantes para usar en conjunto con otros tratamientos basados en el bloqueo de los receptores EGFR o Erb B2.

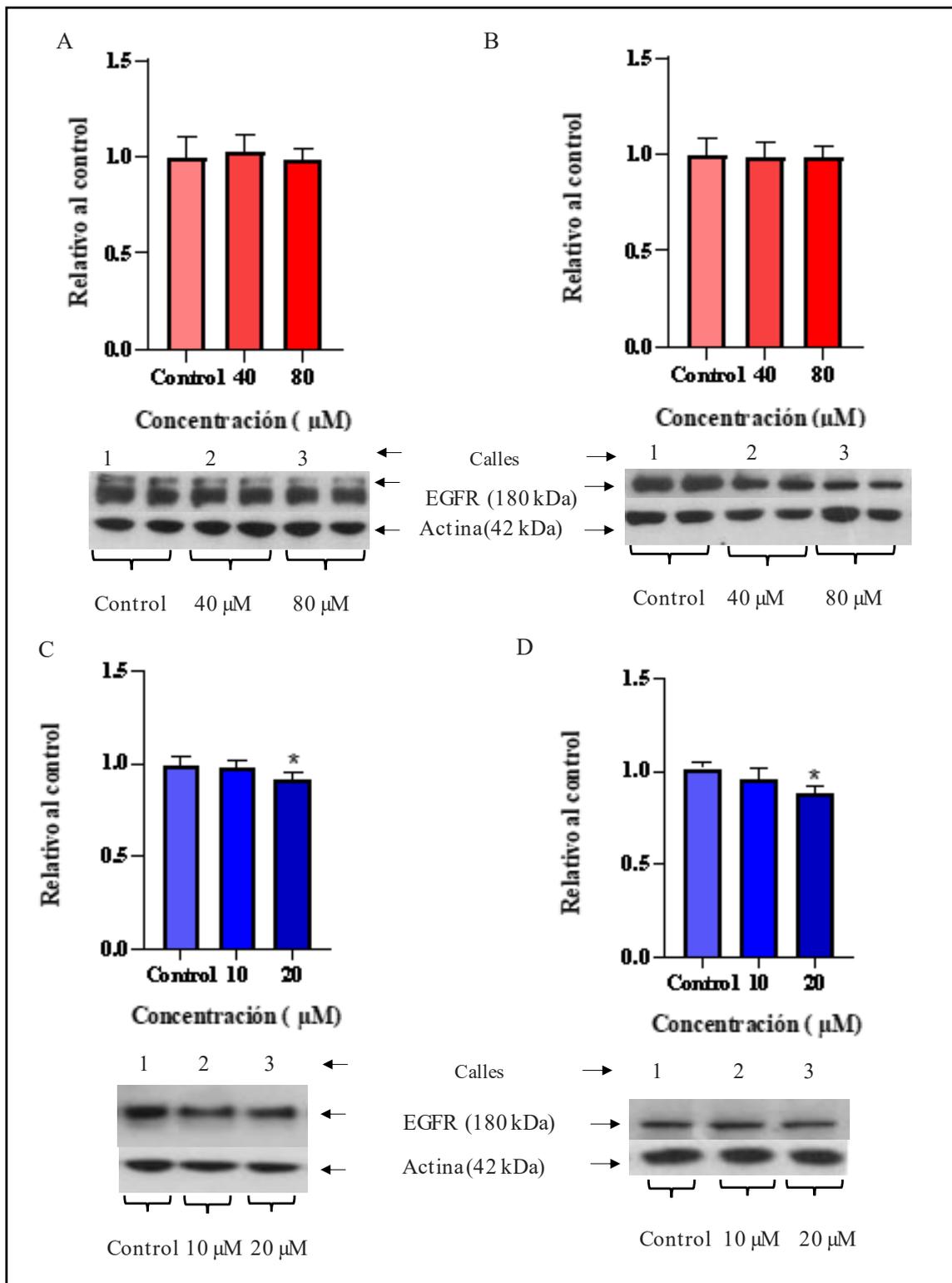


Figura 14: Ensayos de western blot de la expresión de EGFR en línea celular MDA (A) y MCF-7 (B) tratados con apigenina. En MDA (C) y MCF-7 (D) tratados con 2^oNF. Los valores representan la media ± DE de 5 experimentos independientes para MDA y 4 experimentos independientes para MCF analizados por one way ANOVA seguido de un

análisis de comparaciones múltiples entre cada concentración y el control. (* $p < 0.05$). Las calles numeradas corresponden a los tratamientos observados en los gráficos.

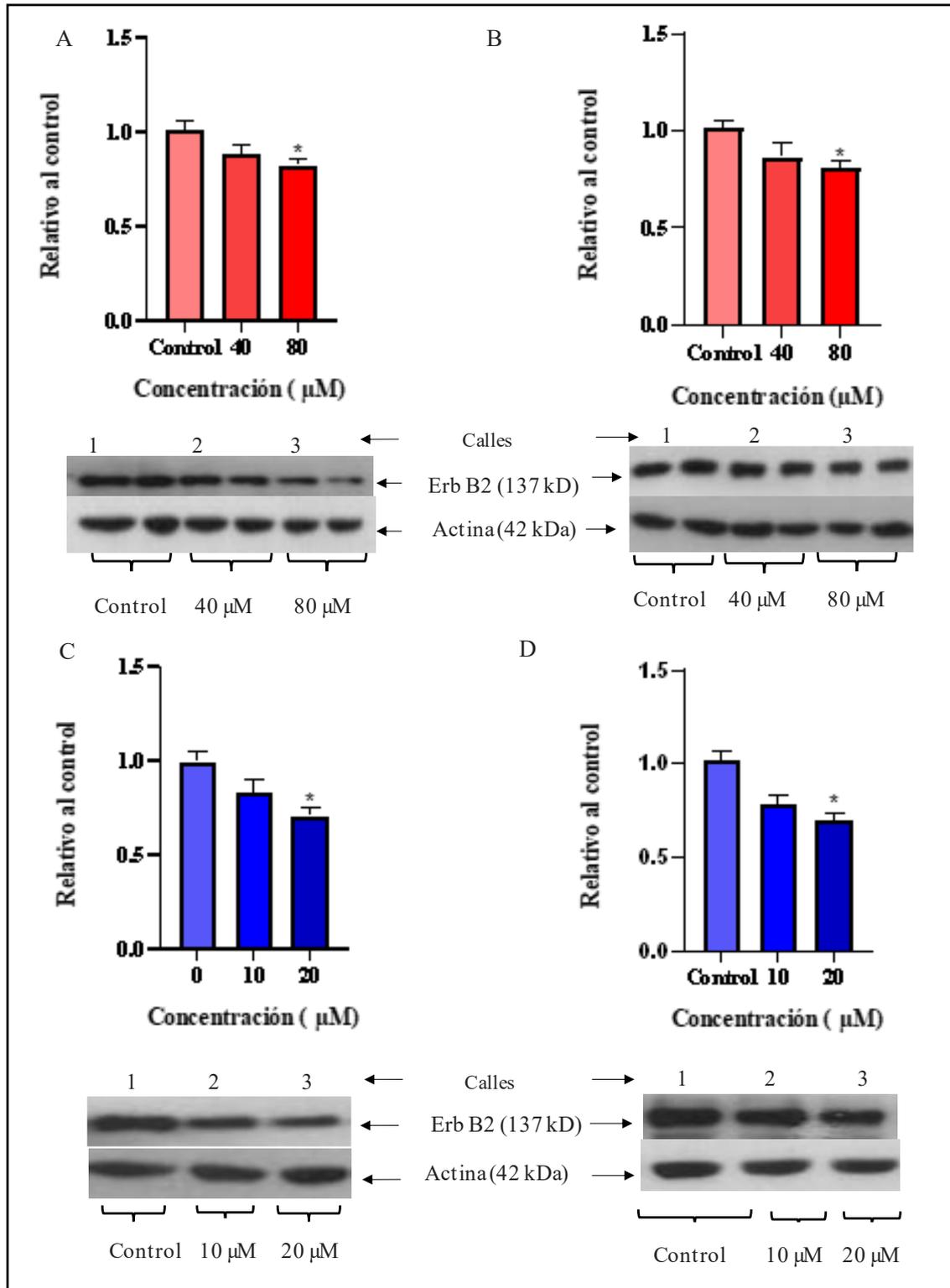


Figura 15: Ensayos de western blot de la expresión de Erb B2 en línea celular MDA (A) y MCF-7 (B) tratados con apigenina. En línea celular MDA (C) y MCF-7 (D) tratados con 2'NF. Los valores representan la media \pm DE de 5 experimentos independientes para MDA y

4 experimentos independientes para MCF analizados por one way ANOVA seguido de un análisis de comparaciones múltiples entre cada concentración y el control. (* $p < 0.05$). Las calles numeradas corresponden a los tratamientos observados en los gráficos.

5.3 Estudiar posibles sistemas de vehiculización nanométricos para la apigenina.

La emergencia de sistemas portadores nanoscópicos que permitan solubilizar y dirigir drogas han mejorado el prospecto del resultado de tratamientos. Entre ellos, las micelas poliméricas (MP) es uno de los sistemas más prometedores, mejorando la solubilidad y la estabilidad de fármacos hidrofóbicos gracias a que su estructura hidrófila en su exterior y sus segmentos hidrofóbicos en la región del núcleo interior permiten la vehiculización de drogas en su interior. Esto a su vez reduce la captación inespecífica por el sistema reticuloendotelial (RES) y favorece el *targetting* mediante el efecto de retención y permeabilidad (EPR).

La línea celular MDA-MB-231 fue usada para este ensayo preliminar donde se evaluó la eficiencia del sistema micelar Soluplus[®]-TPGS (2:1) cargado con apigenina en comparación con el tratamiento de apigenina, usado anteriormente, y otro tratamiento usando las micelas vacías Soluplus[®]-TPGS (2:1) en un alícuota equivalente al tratamiento con las micelas cargadas. Las células fueron tratadas durante 48hs y, tras medir la acción de la hexosaminidasa, se encontró una tendencia a una menor viabilidad celular para las células tratadas con el sistema micelar cargado con apigenina por sobre las que fueron tratadas con apigenina, en etanol con DMSO como vehículo. Sin embargo, se pudo observar que la tendencia de la supervivencia para las células tratadas con el sistema micelas vacías era casi tres veces menor que el de células tratadas con el sistema micelas cargado con apigenina (Figura 16 y Tabla IV). Esto se podría deber a que la apigenina este alterando las propiedades del sistema micelar.

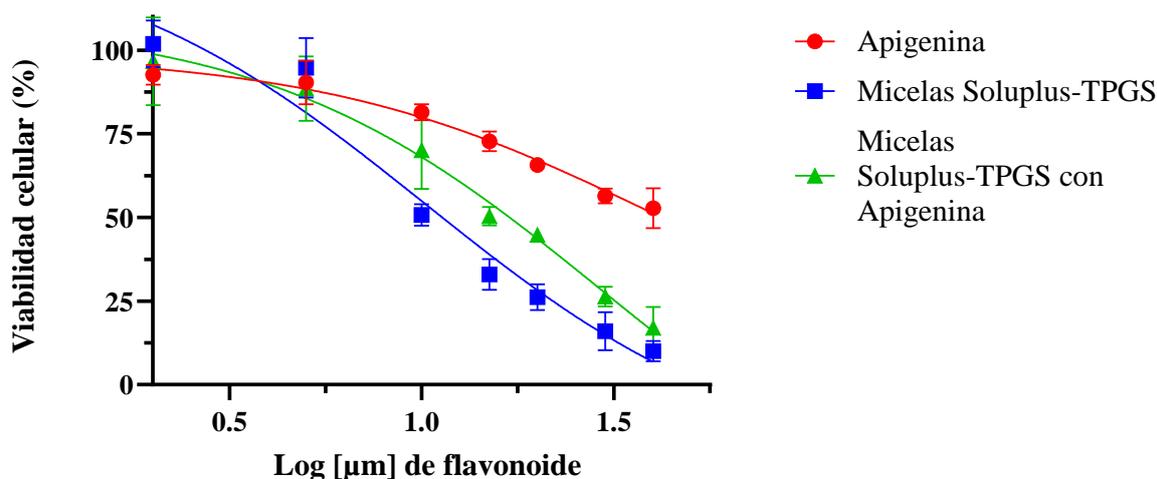


Figura 16: Ensayos IC_{50} de línea celular MDA-MB-231; tratados con concentraciones entre 2 y 40 μM de Apigenina vehiculizado con 6% de solución 10% DMSO en Etanol, micelas Soluplus[®]-TPGS (2:1) vacías y micelas Soluplus[®]-TPGS (2:1) con Apigenina. Los resultados observados corresponden al análisis de 4 réplicas técnicas.

Tratamiento	IC_{50} en MDA-MB-231(μm)
Apigenina	39.69 ± 1.28
Micelas Soluplus [®] -TPGS vacías	10.21 ± 3.93
Micelas Soluplus [®] -TPGS con Apigenina	29.22 ± 2.74

Tabla IV: $IC_{50} \pm DE$ de la línea celular MDA-MB-231 tratada con Apigenina vehiculizado con 6% de solución 10% DMSO en Etanol, micelas Soluplus[®]-TPGS (2:1) con Apigenina y micelas Soluplus[®]-TPGS (2:1) vacías. Los resultados observados corresponden al análisis de 4 réplicas técnicas.

6. CONCLUSIÓN:

El cáncer de mama es un problema de salud que a la fecha cobra hasta 685.000 vidas anualmente, si bien se cuenta con los métodos tradicionales de tratamiento: Radioterapia, quimioterapia y cirugía, estos conllevan efectos secundarios graves para los pacientes, no solo siendo agresivos, sino que pueden dejar daños permanentes en tejidos como la médula ósea.

Ante la necesidad de nuevas terapias más amigables con el paciente y efectivas contra el cáncer los flavonoides se postulan como una opción prometedora para estudiar. Estos compuestos, extraídos principalmente de plantas y frutos, pueden interactuar con células sanas, produciendo baja citotoxicidad, mientras que su comportamiento con células cancerígenas puede inhibir su desarrollo, así como activar vías apoptóticas en dichas células. Adicionalmente se ha explorado la implementación de nanotecnología para mejorar la entrega de los fármacos a las células a través de sistemas que incorporen micelas con nanopartículas.

Para esta investigación se evaluaron dos flavonoides, uno natural y uno sintético, la apigenina y la 2^o NF respectivamente. Se buscó determinar su eficiencia contra las líneas de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.

Los flavonoides demostraron una tendencia a inhibir el crecimiento de las células cancerosas, de hecho, se determinaron un IC₅₀ de 56.8 μM para la apigenina y 19.47 μM para 2^o NF en la línea MDA-MB-231, mientras que los IC₅₀ de 63.71 μM para la apigenina y 18.62 μM para 2^o NF en la línea MDA-MB-231. Cabe destacar que la 2^o NF demostró una capacidad citotóxica superior a la de la apigenina.

Por otra parte, se observó un incremento de clivaje de la proteína PARP-1 en las líneas celulares una vez interactuaron con los flavonoides. El clivaje de la PARP-1 sugiere la activación de caspasas y por ello la utilización de vías apoptóticas en las células, esto sugiere que dichos compuestos promueven la muerte celular de las células cancerígenas. Sin embargo, métodos alternativos serán necesarios para confirmar que la citotoxicidad inducida por las flavonas ocurre por apoptosis.

Así mismo se registró un aumento de concentración de la fosforilación de la p38, dicho acto concuerda con otras investigaciones de otros flavonoides, lo cual da indicios de la capacidad de estos compuestos para activar apoptosis por medio de la vía de p38 MAPK.

Adicionalmente, se consideró la interacción entre la apigenina y la 2^o NF contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y Erb B2 en dos líneas celulares de cáncer de mama. Se determinó un comportamiento inversamente proporcional, es decir; que, en respuesta al aumento de la concentración de los flavonoides, ocurrió la disminución de expresión de los receptores. Lo anterior es especialmente alentador, debido a que varios cánceres de mama se caracterizan por mutaciones genéticas que llevan a la sobre expresión de los receptores EGFR y Erb B2, y dicha particularidad permite que las células cancerígenas sobrevivan y proliferen, por lo tanto, modularlos negativamente permitiría frenar el crecimiento y desarrollo del cáncer.

Por último, el ensayo preliminar para evaluar la eficiencia de las nanopartículas demostró una tendencia a una mayor citotoxicidad para las nanopartículas vacías por sobre las cargadas y el tratamiento con apigenina. Esto sugiere que esta nanopartícula mixta no es ideal para transportar el flavonoide.

Los resultados de esta investigación alertan del posible uso de las sustancias apigenina y 2^o NF como posibles fármacos coadyuvantes para terapias que traten el cáncer de mama, aprovechando sus cualidades anti proliferativas, activadoras de apoptosis en células cancerosas y bloqueadoras de receptores indispensables para las células mutadas. Se recomienda mayor investigación en modelos in vivo para determinar posibles efectos alternos y su eficacia contra el cáncer.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. M. Scherbakov, O. E. Andreeva Blokhin. (2015) Apigenin Inhibits Growth of Breast Cancer Cells: The Role of ER α and HER2/neu. N. N. Russian Cancer Research Center, Kashirskoye Shosse, 24, Moscow, 115478, Russia.
- Abu Hazafa, Khalil-Ur- Rehman, Nazish Jahan & Zara Jabeen (2019): The Role of Polyphenol (Flavonoids) Compounds in the Treatment of Cancer Cells, Nutrition and Cancer
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S. &Tattini, M., 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plan tScience*, Volumen 196, pp. 67-76.
- Amé, J., Spenlehauer, C., Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. *BioEssays*.26 pp 882-893 <https://doi.org/10.1002/bies.20085>
- American Cancer Society. (2021). Cómo funcionan los medicamentos de quimioterapia. Recuperado de <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/quimioterapia/como-funcionan-los-medicamentos-de-quimioterapia.html>
- Anselmo, A.C., &Mitragotri, S. (2016) Nanoparticles in the clinic.*BioengTransl Med*. 1(1):10–29.
- Arteaga, Engleman. ERBB receptors: From oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 25(3) pp 282–303. doi:10.1016/j.ccr.2014.02.025.
- Bai, h. y otros, 2014. Apigenin Induced MCF-7 Cell Apoptosis-Associated Reactive Oxygen Species. *Scanning*, Volumen 36, pp. 622-631.
- Banerjee, S.M., MacRobert, A.J., Mosse, C.A., Periera, B., Bown, S.G., &Keshtgar, M.R.S. (2017) Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer. *Breast*. 31:105–13. DOI:10.1016/j.breast.2016.09.016
- Baselga, J. y otros, 2012. Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor–Positive Advanced Breast Cancer. *The New England journal of medicine*, 366(6), pp. 520-529.

- Cárdenas, M. G., Blank, V. C., Marder, M. & Roguin, L. P., 2008. 2'-Nitroflavone induces cell cycle arrest and apoptosis in HeLa human cervical carcinoma cells. *Cancer Letters*, Volumen 268, pp. 146-157.
- Cárdenas, M., Marder, M., Blank, V. C. & Roguin, P. L., 2006. Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Volumen 14, pp. 2966-2971.
- Carrillo, C., Suñé, J.M., Pérez-Lozano, P., García-Montoya, E., Sarrate, R., & Fàbregas, A. (2014) Chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery systems: Determination of loading efficiency. *Biomed Pharmacother.* 68(6):775–83.
- Coleman, D. T., Cardelli, J. (2012) Polyphenols as Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors and Anti-cancer Agents. *Nutraceuticals and Cancer*, 39–60. doi:10.1007/978-94-007-2630-7_3
- Creighton, C. J., 2012. The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics: Targets and Therapy*, Volumen 6, pp. 289-297.
- Cuadrado, A., Lafarga, V., Cheung, P., Doblado, I., Llanos, S., Cohen, P., Nebreda, A. (2007). A new p38 MAP kinase-regulated transcriptional coactivator that stimulates p53-dependent apoptosis. *THE EMBO JOURNAL*. 26 (8) pp 2115-2126.
- Choi, E. J. & Kim, G.-H., 2009. 5-Fluorouracil combined with apigenin enhances anticancer activity through induction of apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Oncology Reports*, Volumen 22, pp. 1533-1537.
- Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., & Zhan, J. (2015) Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res.* 5(10):2929–43.
- David Martin-Oliva (2005) Modulación por la poli (ADP-Ribosa) polimerasa-1 de la expresión genética durante la carcinogénesis epidérmica
- Dizaj, S.M., Jafari, S., & Khosroushahi, A.Y. (2019) A sight on the current nanoparticle-based gene delivery vectors. *Nanoscale Res Lett.* 9(1):1–9.
- Du, J., Yu, Y., Zhan, J., Zhang, H. (2017). Translational Research in Breast Cancer, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer Nature Singapore. 35 (1) pp 181-192. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6020-5_6

- Duarte, S., Carle, G., Faneca, H., Lima, M.C.P., & Pierrefite-Carle, V. (2012) Suicide gene therapy in cancer: Where do we stand now? *Cancer Lett.* 324(2):160–70.
- Eleonora Horvath (2021) Subtipos moleculares del cáncer mamario - lo que el radiólogo dedicado a imágenes mamarias debe saber.
- Ezequiel Bernabeu, Lorena Gonzalez, Maximiliano Cagel, Esteban P. Gergic (2015) Novel Soluplus[®] – TPGS mixed micells for encapsulation of paclitaxel with enhanced in vitro cytotoxicity on breast and ovarian cancer cell lines.
- Fotoini Hassioutou y Donna Geddes (2012) Anatomía de la glándula mamaria humana: estado actual del conocimiento
- Frede, A., Neuhaus, B., Klopfleisch, R., Walker, C., Buer, J., & Müller, W. (2016) Colonic gene silencing using siRNA-loaded calcium phosphate/PLGA nanoparticles ameliorates intestinal inflammation in vivo. *J Control Release.* 222:86–96.
- Gaspar, V.M., Baril, P., Costa, E.C., De Melo-Diogo, D., Foucher, F., & Queiroz, J.A. (2015) Bioreducible poly(2-ethyl-2-oxazoline)-PLA-PEI-SS triblock copolymer micelles for co-delivery of DNA minicircles and Doxorubicin. *J Control Release.* 213:175–91. DOI:10.1016/j.jconrel.2015.07.011
- Gobeil S, Boucher CC, Nadeau D, Poirier GG (2001) Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death Differ* 8:588–594. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400851>
- Goldhirsch, A. y otros, 2011. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology*, 22(8), pp. 1736-1747.
- Gomes do Nascimento, R. & Mormino Otoni, K., 2020. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know?. *Mastology*, 30(e20200024), pp. 1-8.
- Guerrero, H; Caicedo, J y Guerrero, E. (2015). La Nanotecnología farmacéutica es una realidad. *Dominio de las Ciencias*, ISSN-e 2477-8818, Vol. 3, N°.2, 2, 2017, págs. 526-538
- Herr, D. y otros, 2019. Does chemotherapy improve survival in patients with nodal positive luminal A breast cancer? A retrospective Multicenter Study. *Plos One*, 14(7), pp. 1-15.

- Hippokratis , K. &Schal, A. V., 1999. Apoptosis Versus Necrosis: Which Should Be the Aim of Cancer Therapy?.*Experimental Biology and Medicine*, 221(2), pp. 87-88.
- Hsu.Hung. (2016).The role of HER2, EGFR, and other receptor tyrosine kinases in breast cáncer.*Cancer Metastasis*. 35(4) pp 575–588. doi:10.1007/s10555-016-9649-6.
- Hynes, N., MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cáncer.Current Opinion in Cell Biology.Science Direct. 21 pp 177-184 doi:10.1016/j.ceb.2008.12.010
- Jamalzadeh, L. et al, 2016.Cytotoxic Effects of Some Common Organic Solvents on MCF-7, RAW-264.7 and Human Umbilical Vein Endothelial Cells.*Avicenna Journal of Medical Biochemistry*, 4(1), pp. 1-6.
- Khajuria, R. & Batra, P., 2014. Flavonoids and their therapeutic potential as an cancer agents: biosynthesis, metabolism and regulation. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 3(6), pp. 2188-2216.
- Khajuria, R., Singh, S. &Bahl, A., 2019.General Introduction and Sources of Flavonoids. En: H. Singh Tuli, ed. *Current Aspects of Flavonoids: Their Role in Cancer Treatment*. Singapore: Springer, pp. 1-7.
- Kumar, S. & Pandey, A. K., 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, pp. 1-16.
- Lagoa Ricardo, João Silvaa , Joaquim Rui Rodriguesa , Anupam Bishayeeb, 2020. Advances in phytochemical delivery systems for improved anticancer activity.
- Landegren, U., 1984. Measurement of Cell Numbers by Means of the Endogenous Enzyme Hexosaminidase.Applications to Detection of Lymphokines and Cell Surface Antigens.*Journal of Immunological Methods*, Volumen 67, pp. 379-388.
- Leppard JB, Dong Z, Mackey ZB, et al. Physical and functional inter-action between DNA ligase III alpha and poly(ADP-Ribose) poly-merase 1 in DNA singlestrand break repair. *Mol Cell Biol*2003;23:5919-27
- Liang, H. y otros, 2015.Heterogeneity of Breast Cancer Associations with Common Genetic Variants in FGFR2 according to the Intrinsic Subtypes in Southern Han Chinese Women.*BioMed Research International*, pp. 1-9.

- Madunic, J. Vrhovac, M. Gajski, G. Popic, J. Garaj-Vrhovac, V. (2018). Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties. *Cancer Letters*.413, pp 11.22. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.10.041>
- Majumder, N., Das, N. G. & Das, S. K., 2020.Polymeric micelles for anticancer drug delivery.*Therapeutic Delivery*, 11(10), pp. 613-635.
- Marder, M. y otros, 1997.Synthesis of Halogenated/nitrated Flavone Derivatives and Evaluation of their Affinity for the Central Benzodiazepine Receptor.*Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters*, 7(15), pp. 2003-2008.
- Masood, F. (2016) Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy.*Mater SciEng C*. 60:569–78. DOI:10.1016/j.msec.2015.11.067
- Ministerio de Salud, Instituto Nacional del Cáncer. (2021). Estadísticas – Incidencia. Recuperado de <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia>.
- Mullen, P., 2004. PARP Cleavage as a Means of Assessing Apoptosis. En: S. Langdon, ed. *Cancer Cell Culture. Methods in Molecular Medicine*.s.l.:Humana Press, pp. 171-181.
- Nadia Harbeck, Frederique Penault-Llorca, Javier Cortes Michael Gnant, Nehmat Houssami (2019) – Breast Cancer
- Oliva, D. M., Muñoz, J., Aguilar, R., Ruiz, M., Oliver, F. (2006). Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa-1: una proteína nuclear implicada en procesos inflamatorios, muerte celular y cáncer. *Médicas UIS*.pp 95 - 103
- Organización Mundial de la Salud. (2021). Cáncer de mama. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- Osborne, C. K. y otros, 2012. Gefitinib or placebo in combination with tamoxifen in patients with hormone receptor-positive metastatic breast cancer: a randomized phase II study. *ClinicalCancerResearch*, 15(5), pp. 1147-1159.
- Peng, S.F., Hsu, H.K., Lin, C.C., Cheng, Y.M., & Hsu, K.H. (2017) Novel PEI/Poly- γ -glutamic acid nanoparticles for high efficient siRNA and plasmid DNA co-delivery.*Molecules*. 22(1):1–16.

- Pérez, G. (2015). Prevalencia de subtipos por inmunohistoquímica del cáncer de mama en pacientes del Hospital General Regional 72, Instituto Mexicano del Seguro Social. *Cirugía y Cirujanos (English Edition)*, Volume 83, Issue 3, May–June 2015, Pages 193-198
- Pourmortazavi, S.M., Sahebi, H., Zandavar, H., & Mirsadeghi, S. (2019) Fabrication of Fe₃O₄ nanoparticles coated by extracted shrimp peels chitosan as sustainable adsorbents for removal of chromium contaminates from wastewater: The design of experiment. *Compos Part B Eng.* 107130. DOI:10.1016/j.compositesb.2019.107130
- Prat, A., Ellis, M. J. & Perou, C. M., 2011. Practical implications of gene-expression-based assays for breast oncologists. *Nature reviews. Clinical oncology*, 9(1), pp. 48-57.
- Quin, S.Y., Zhang, A.Q., Cheng, S.X., Rong, L., & Zhang, X.Z. (2017) Drug self-delivery systems for cancer therapy. *Biomaterials.* 112:234–47. DOI:10.1016/j.biomaterials.2016.10.016
- Shashank Kumar and Abhay K. Pandey (2013) - Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview
- Sherbakov, A. M., Andreeva, O. E., 2015. Apigenin Inhibits Growth of Breast Cancer Cells: The Role of ER α and HER2/neu. *Acta Naturae. Research Articles*, 7(26), pp. 133-139
- Shi, S., Shi, K., Tan, L.W., Qu, Y., Shen, G.B., & Chu, B.Y. (2014) The use of cationic MPEG-PCL-g-PEI micelles for co-delivery of Msurvivin T34A gene and doxorubicin. *Biomaterials.* 35(15):4536–47. DOI:10.1016/j.biomaterials.2014.02.010
- Sun, J., Shi, Z., Jia, S., & Zhang, P. (2017) The force analysis for superparamagnetic nanoparticles-based gene delivery in an oscillating magnetic field. *J MagnMagn Mater.* 85–9. DOI:10.1016/j.jmmm.2016.11.018
- Sun, N., Liu, Z., Huang, W., Tian, A., & Hu, S. (2014) The research of nanoparticles as gene vector for tumor gene therapy. *Crit Rev OncolHematol* 89(3):352–7. DOI:10.1016/j.critrevonc.2013.10.006
- Tirkey, B., Bhushan, B., Uday, K.S., & Gopinath, P. (2017) Prodrug encapsulated albumin nanoparticles as an alternative approach to manifest anti-proliferative effects of suicide gene therapy. *Mater SciEng C.* 73:507–15. DOI:10.1016/j.msec.2016.12.108

- Urrejola, M; Soto, L; Zumarán, C; Peñaloza, J; Álvarez, B; Fuentevilla, I y Haidar, Z. (2018) Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly). *Int. J. Morphol.* vol.36 no.4 Temuco dic. 2018.
- Vago, R., Collico, V., Zuppone, S., Prosperi, D., & Colombo, M. (2016) Nanoparticle-mediated delivery of suicide genes in cancer therapy. *Pharmacol Res* 111:619–41. DOI:10.1016/j.phrs.2016.07.007
- van Ramshorst, M.S., van Werkhoven, E., Honkoop, A.H., Dezentjé, V.O., Oving, I.M., & Mandjes, I.A. (2016) Toxicity of dual HER2-blockade with pertuzumab added to anthracycline versus non-anthracycline containing chemotherapy as neoadjuvant treatment in HER2-positive breast cancer: The TRAIN-2 study. *Breast*. 29:153–9.
- Wang, K., Kievit, F.M., Zhang, M. (2016) Nanoparticles for cancer gene therapy: Recent advances, challenges, and strategies. *Pharmacol Res.* 114:56–66. DOI:10.1016/j.phrs.2016.10.016
- Xu, L. y otros, 2020. The Anticancer Potential of Apigenin Via Immunoregulation. *Current Pharmaceutical Design*, 26(1).
- Zhou, J., Deng, W., Wang, Y., Cao, X., Chen, J., & Wang, Q. (2016) Cationic carbon quantum dots derived from alginate for gene delivery: One-step synthesis and cellular uptake. *Acta Biomater.* 42:209–19. DOI:10.1016/j.actbio.2016.06.021
- Zhou, Q., Wang, S., Zhang, H., Lu, Y., Wang, X., Motoo, Y., Su, S. (2009). The combination of baicalin and baicalein enhances apoptosis via the ERK/p38 MAPK pathway in human breast cancer cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. 30, pp 1648–1658; doi: 10.1038/aps.2009.166