



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

**Efecto citotóxico y
antimigratorio de extractos de
Modiola caroliniana
evaluado en las líneas celulares
tumORAles de mama MCF-7 y
MDA-MB-231.**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias
Médicas, mención en Biología Celular y Molecular**

CAROLINA ELISA BAEZ BUSTAMANTE

Director de Tesis: Dr. Joan Villena García

Julio / 2023



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

**“Efecto citotóxico y
antimigratorio de extractos de
Modiola caroliniana
evaluado en las líneas celulares
tumORAles de mama MCF-7 y
MDA-MB-231.”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias
Médicas, mención en Biología Celular y Molecular**

CAROLINA ELISA BAEZ BUSTAMANTE

**Director de Tesis: Dr. Joan Villena García.
FECHA: Julio / 2023**



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

“Efecto citotóxico y antimigratorio de extractos de *Modiola caroliniana* evaluado en las líneas celulares tumorales de mama MCF-7 y MDA-MB-231.”

Carolina Elisa Baez Bustamante

Este trabajo se realizó bajo la supervisión de Dr. Joan Villena García en el laboratorio de Laboratorio Bioensayos (Biología Celular del Cáncer) Facultad de Medicina Universidad de Valparaíso y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. Carlos Jara
Presidente Comisión

Dr. Iván Montenegro
Profesor Informante

Dr. Lautaro Taborga
Profesor Informante

Dr. Joan Villena García
Director de Tesis

**Viña del Mar, Chile
2023**

Agradecimientos.

El desarrollo de esta investigación ha significado mucho para mí. Ha implicado grandes sacrificios, cantidades de tiempo, frustraciones y energía. Pero ha tenido una gran significancia para mi proceso de autovalidación, autoconocimiento y aprendizaje.

Estas tan solo son unas breves palabras para lo que realmente creo de este maravillosa etapa y creo que lo mínimo es detenerse y dar el espacio de agradecer y reconocer el rol de las y los científicos en el mundo, por ello es por lo que agradezco a todos quienes estuvieron apoyando o entregando de alguna forma un granito de motivación, idea, ayuda, información o enseñanza para poder culminar con este proceso, el cual sin duda alguna si tuviese que retornar a elegir lo volvería a cursar.

Hoy le agradezco a mi familia por estar presentes a su manera, a mis profesores por entregar cada información, resolver cada duda, por guiarme y formarme como científica, por sobre todo al Dr. Joan Villena y al Dr. Carlos Jara por toda su paciencia y amabilidad para entregar el conocimiento y por lo grato que hacen del laboratorio cuando están juntos ahí. A mis compañeras de laboratorio Viviana y Rut que han significado un gran apoyo y estímulo a seguir avanzando en este camino, gracias por la ayuda desinteresada <3. A mi hijita Lua, porque a pesar de ser tan chiquitita ha tratado de entender a su mamá y también a mis amiguitas que estuvieron para sostenerme en los momentos de caos.

Gracias.

La jaula se vuelve plumas.

Abreviaturas

- **A.G:** ácido gálico
- **A:** acetato de etilo
- **AAPH:** 2-amidinopropano
- **ABAP:** 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
- **ABTS⁺:** radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)
- **ATP:** adenosín tri fosfato
- **BHT:** butilhidroxitolueno
- **C+:** control positivo
- **CAM:** componentes de adhesión celular
- **CAT:** catalasa
- **CCF:** cromatografía en capa fina
- **CM:** cáncer de mama
- **CS:** control solvente
- **CTE:** cadena transportadora de electrones
- **D:** diclorometano
- **DCF:** diclorofluoresceína
- **DCFH2-DA:** 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
- **DE:** desviación estándar
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido
- **e-:** electrones
- **E:** etanol
- **EE:** Equivalentes emodina
- **EMT:** transición epitelio mesenquimal
- **EO:** estrés oxidativo
- **FAB:** fragmentación agente de bloqueo
- **Fe II:** ion de hierro II
- **Fe III:** ion de hierro III
- **Fe:** hierro
- **FRAP:** Ensayo del poder antioxidante reductor del hierro.
- **GAE mg*L⁻¹:** ácido gálico miligramos de equivalentes de ácido gálico por litro
- **GM:** glándula mamaria

- **GSR:** glutatión reductasa
- **H:** *n*-hexano
- **H⁺:** hidrógeno
- **H₂O₂:** peróxido de hidrógeno
- **HO•:** radical hidroxilo
- **IC₅₀:** concentración inhibitoria media
- **IL:** interleucinas
- **M. caroliniana:** *Modiola caroliniana*
- **MEC:** matriz extracelular
- **MET:** transición epitelio mesenquimal
- **MMP:** metaloproteinasas de matriz.
- **MnSOD:** superóxido dismutasa de manganeso
- **O₂:** oxígeno
- **O₂•-:** radical superóxido
- **OMS:** organización mundial de la salud
- **QE mg*L⁻¹:** miligramos de equivalentes de quercetina por litro
- **QT:** quercetina
- **Redox:** reducción-oxidación
- **RL:** radical libre
- **RMN:** resonancia magnética nuclear
- **RNS:** especies reactivas del nitrógeno
- **ROS:** especies reactivas de oxígeno
- **RTNF:** factor de necrosis tumoral
- **SFB.:** suero fetal bobino
- **SI:** sistema Inmune
- **SRB:** Sulforrodamina B
- **TAM:** macrófagos asociados a tumores
- **TEM:** transición mesenquimal epitelial
- **TNFα:** fator de necrosis tumoral
- **TP53:** proteína supresora de tumores
- **TRAP:** capacidad antioxidante total
- **TRX: TROLOX®:** ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

Índice

Agradecimientos.....	5
Abreviaturas.....	6
Índice.....	8
Índice de figuras.....	11
Índice de tablas.....	11
Resumen.....	12
Introducción.....	13
La mama.....	13
Patologías de la mama.....	14
Cáncer.....	15
Resistencia a la muerte celular.....	16
Metástasis.....	17
ROS y cáncer.....	17
Epidemiología del cáncer de mama en Chile y el mundo.....	19
Factores de riesgo para desarrollar cáncer de mama.....	21
Técnicas de detección de cáncer de mama.....	21
Tratamientos convencionales y costos asociados.....	22
Propuesta fitoterapia.....	22
Los principales tipos de fitoconstituyentes presentes en plantas son.....	23
<i>Modiola caroliniana</i>	25
Hipótesis.....	28
Objetivos.....	28
Objetivo general.....	28
Objetivos específicos.....	28
Metodología.....	29
Tipo de investigación.....	29
Diseño de investigación.....	29
	8

Colección de <i>Modiola caroliniana</i>	29
Obtención de extractos	30
Evaluación de los fitoconstituyentes.	31
Contenido de fenoles totales	31
Contenido de flavonoides totales	31
Contenido de antraquinonas totales	32
Prueba de capacidad antioxidante total:	32
TRAP	32
FRAP	33
DPPH•	33
Líneas celulares	34
Evaluación de viabilidad celular	34
Evaluación ROS por citometría de flujo	35
Migración mediante ensayo de la cámara.....	36
Estadística.....	38
Resultados.....	39
Obtención extracción secuenciales.....	39
Fitoconstituyentes.....	40
Concentración de fitoconstituyentes de <i>M. caroliniana</i>	40
Estimación de fenoles totales:	40
Estimación de flavonoides totales.....	41
Estimación de antraquinonas totales.	42
Capacidad antioxidante total para <i>M. caroliniana</i>	43
Capacidad antioxidante total TRAP	43
La capacidad antioxidante total FRAP.....	44
IC ₅₀ del radical DPPH•	45
Viabilidad celular	46
Porcentaje de viabilidad de la línea MCF-7.	46
Porcentaje de viabilidad de la línea MDA-MB-23.	47
Porcentaje de viabilidad de la línea MCF-10A.....	48

Comparaciones de IC ₅₀	49
Generación de ROS	50
Porcentaje de ROS para MCF-7.....	50
Porcentaje de ROS para MDA-MB-231	52
Porcentaje de ROS para MCF-10A.....	53
Migración celular (ensayo de la cámara de Boyden o transwell)	54
Discusión.....	58
Conclusiones.....	69
Bibliografía.....	70

Índice de figuras

Figura N°1 Anatomía de la mama femenina-----	14
Figura N° Principales metabolitos secundarios de <i>M. caroliniana</i> -----	26
Figura N°3 Otros metabolitos en <i>M. caroliniana</i> -----	26
Figura N°4 Imágenes de <i>Modiola caroliniana</i> -----	27
Figura N°5 Diseño de investigación-----	29
Figura N°6 Viales ámbar con los extractos realizados -----	30
Figura N°7 Esquema de la sonda fluorescente-----	35
Figura N°8 Cámara de migración-----	37
Figura N°9 Estimación de fenoles totales-----	40
Figura N°10 Capacidad Estimación de flavonoides totales-----	41
Figura N°11 Estimación de antraquinonas-----	42
Figura N°12 Actividad Capacidad secuestradora de radicales libres TRAP-----	43
Figura N°13 Capacidad antioxidante total FRAP-----	44
Figura N°14 IC ₅₀ del radical DPPH•-----	46
Figura N°15 porcentaje de viabilidad de la línea MCF-7-----	47
Figura N°16 Porcentaje de viabilidad de la línea MDA-MB-231-----	48
Figura N°17 Porcentaje de viabilidad de la línea MCF-10A-----	49
Figura N°18A Histograma de la generación de ROS en MCF-7-----	51
Figura N°18B Porcentaje de células positivas para ROS MCF-7-----	52
Figura N°19 Porcentaje de células positivas para ROS MDA-MB-231-----	53
Figura N°20 Porcentaje de células positivas para ROS MCF-10A-----	54
Figura N°21 Fotografías migración celular-----	55-56

Índice de tablas

Tabla 1 Rendimiento de los extractos-----	39
Tabla 2 Tabla IC ₅₀ -----	49
Tabla 3 Porcentaje de migración-----	57

Resumen

El cáncer es una enfermedad no trasmisible que puede afectar a las mamas y las terapias que hoy en día se ofrecen suelen ser invasivas y costosas. Por ello el interés de encontrar nuevos y/o mejorados tratamientos para controlar esta enfermedad. El cáncer se da por una serie de factores y el impacto del microambiente tumoral es primordial para su progreso. Por ej. La relación células cancerosas y ROS o células cancerosas y compuestos antioxidantes. Además de ello se han descrito otras características propias del cáncer como lo es la muerte celular y la migración en procesos metastásicos. En esta búsqueda se presenta la fitoterapia como oportunidad y *M. caroliniana* es una planta utilizada popularmente con fines medicinales, a la cual se le ha atribuido distintas propiedades. Por lo tanto, nuestro objetivo ha sido evaluar los extractos de *M. caroliniana* con respecto a los fitoconstituyentes, capacidad antioxidante, viabilidad celular, niveles de ROS y efectos sobre la migración en líneas tumorales de mama. En cuanto a lo metodológico, a partir de extractos de polaridad ascendente se analizó el contenido fitoquímico y la capacidad antioxidante a través de espectrofotometría, la viabilidad celular mediante ensayos de citotoxicidad con Sulforrodamina B, se midió la detección de ROS en las líneas tumorales MCF-7 y MDA-MB-231 y en la línea no tumoral MCF-10A, y mediante el ensayo de membrana se midió migración en la línea MDA-MB-231. Los resultados arrojaron que los extractos de *M. caroliniana*, poseen fenoles, flavonoides y antraquinonas, siendo los extractos diclorometano y acetato de etilo, los que presentan la mayor concentración de ellos. Además, los extractos de *M. caroliniana* poseen baja capacidad antioxidante y reducen la viabilidad celular sin selectividad entre líneas tumorales y no tumorales. También, los extractos de *M. caroliniana* elevan la generación de ROS y reducen la migración celular en la línea MDA-MB-231. Los resultados obtenidos son competentes en términos de propiedades anticancerígenas, evidenciando la capacidad para reducir la viabilidad en líneas celulares tumorales y no tumorales, lo que sugiere que los efectos anticancerígenos podrían no estar restringidos a células específicas. Por otra parte, el aumento de ROS podría ligarse con la apoptosis y la baja en la migración causada por los extractos podría tener un buen impacto en cuanto a la inhibición porcentual del desarrollo metastásico desde el tumor primario hacia otros órganos. Por estos hallazgos *M. Caroliniana* resulta ser potencialmente prometedora en el desarrollo de terapias coadyuvantes o alternativas contra el cáncer.

Palabras: extractos, citotoxicidad, cáncer de mama, migración, ROS, *Modiola caroliniana*.

Introducción

La mama

La mama, también llamado seno, son órganos que se presentan de a dos a cada lado de la línea media y forman relieves ovoides o cónicos, donde en su vértice se diferencia la areola mamaria y el pezón. Son de tamaños variables según cada persona. En el caso de los varones son rudimentaria y no desarrollan tejido glandular a diferencia de la mujer que sí lo hace (1). A partir de tejido ectodérmico, durante el desarrollo embrionario se origina la mama y en las mujeres comienza a desarrollarse en la pubertad, bajo la influencia de estrógenos y progesterona, las cuales están reguladas por hormonas hipofisiarias, en respuesta a la GnRH hipotalámica (2). La mama posee características distintivas que le diferencian de otros órganos, en primer lugar, su función es nutritiva hacia el lactante y se correlaciona con la supervivencia de este. En segundo lugar, el sistema lobulillar pasa por cambios estructurales durante todo el largo de la vida, durante la menarquia, embarazo y menopausia (3). Anatómicamente, consta de una zona glandular apocrina y un tejido subcutáneo que se ubica en la zona pectoral del tórax, entre la segunda y sexta costilla. Posee una glándula mamaria (GM) bajo la piel, de aspecto semiesférico con dos prolongaciones, una axilar en esa dirección y una inferior dirigida al abdomen. La GM se compone de conductos y lobulillos, de dos distintos tipos de células epiteliales, (las luminales y las mioepiteliales) y de dos tipos de estroma (intralobulillar e interlobulillar). Además, la mama posee un ligamento suspensorio que se une a la superficie anterior de la GM, estableciendo zonas donde se acumula tejido adiposo de forma variable. Cada uno de los elementos nombrados anteriormente pueden dar origen a lesiones tanto benignas como malignas. (4). En la imagen N°1 se detallan las estructuras anatómicas de la mama.

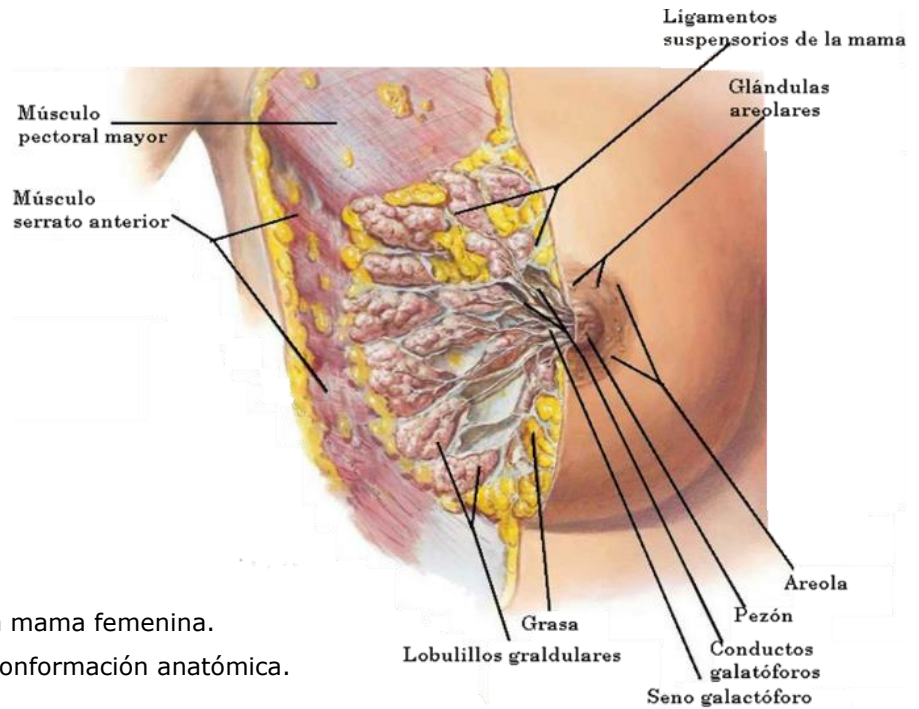


Figura N°1 Anatomía de la mama femenina.
Se muestra la mama y su conformación anatómica.

Patologías de la mama

Al igual que cualquier otro órgano, este no está libre de enfermedades, las que se pueden clasificar en dos grandes grupos, en primera instancia tenemos las patologías benignas y luego las patologías malignas.

Las patologías benignas representan un grupo de trastornos de amplia gama, que pueden definirse como anomalías descubiertas por pruebas de imágenes o por lesiones palpables encontradas por autoexamen, o por reconocimiento de secreción vía pezón. Estas condiciones no malignas, por lo general, no aumentan el riesgo de malignidad a través del tiempo en los pacientes.

Algunos autores indican que una buena clasificación de las enfermedades no malignas es la siguiente (5).

- Enfermedades no proliferativas: aumento de riesgo no sustancial.
- Trastornos proliferativos: aumento de riesgo leve-moderado.
- Hiperplasia atípica: aumento sustancial.

La edad comprendida entre 15 y 30 años es sobre todo el grupo de mayor incidencia con respecto a las patologías benignas que afectan al órgano mamario, y dentro de ellos quienes tienen entre 21 y 30 años son el grupo a quienes más repercuten. La lesión más común es el fibroadenoma y seguido de ello la fibroadenosis.

La patología benigna se ha clasificado en 6 grandes grupos: Anomalías del desarrollo, trastornos funcionales, procesos inflamatorios, procesos pseudotumorales, lesiones proliferativas y tumores benignos. En cuanto a las patologías malignas, encontramos al cáncer de mama y parecen ser más voluminosas y de una menor consistencia que los tumores benignos, poseen mayores cambios quísticos y también se caracterizan por un aumento en la tasa mitótica, además suelen presentar células neoplásicas multinucleadas. Esta enfermedad representa un alto índice de mortalidad en la población mundial (6).

Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades no transmisibles de células que proliferan crónica y descontroladamente, que pueden dar origen a neoplasias, las neoplasias son nuevas formaciones anormales de tejidos de características tumorales benignas o malignas en alguna parte del cuerpo. Estas diversas neoplasias confluyen en algunas características que, mediante el análisis, nos permiten constituir un marco lógico para una mayor comprensión de estas. Las últimas revisiones en cuanto al contexto del cáncer indican que los tumores son mucho más que una masa en proliferación y se propone que son tejidos complejos compuestos por variados tipos de células disímiles, que participan interactuando heterotípicamente entre sí. Y el origen de estos procesos cancerosos se asocian al concepto "tumorigénesis", el cual se define como: el origen producción y desarrollo de cáncer, debido a cambios fenotípicos y genotípicos que alteran el desarrollo normal entre la muerte y la proliferación celular. Para comprender los procesos de tumorigénesis se debe abarcar no tan solo los rasgos de las células cancerosas, sino que además debe incluirse la influencia del microambiente tumoral en el crecimiento canceroso (7).

A través de diversos estudios, se ha llegado a consenso con respecto al cáncer caracterizando a la célula cancerígena, entre estas características encontramos al mantenimiento de la señalización proliferativa, la evasión de supresores del crecimiento, la habilitación de la inmortalidad replicativa, la inducción de angiogénesis, la inestabilidad genómica, la reprogramación del metabolismo energético celular, la inflamación promotora de tumores, la evasión de la destrucción inmunitaria,

la resistencia a la muerte celular y la activación de invasión y metástasis (8). Por otro lado se ha descrito que existe una relación entre ROS y cáncer (9). Característica que será abordada en esta investigación en conjunto con la resistencia a la muerte celular y la activación e invasión de la metástasis.

Resistencia a la muerte celular.

La apoptosis es un tipo de muerte celular regulada en la que las células reciben estímulos extrínsecos o intrínsecos, para inducir su propia muerte (10). Existen dos rutas apoptóticas, dependiendo del punto de inicio de esta. La vía extrínseca y la vía intrínseca. Esta última es el proceso que comienza en las mitocondrias, las cuales son organelos membranosos que se encargan de la generación de energía celular y de la regulación de la apoptosis, por lo tanto, la disfunción mitocondrial es un punto crucial en el proceso, ya que cuando la célula detecta señales de estrés las mitocondrias liberan señales proapoptóticas como el citocromo c al citoplasma. Esta liberación de proteínas desencadena una cascada de señalización que incluyen la activación de la familia de las caspasas que llevan a la fragmentación del ADN y la desintegración del citoesqueleto. A partir de daños o modificaciones en el ADN no permite a la célula continuar su ciclo y de este modo da lugar a la muerte celular. Por otro lado, es posible que se produzca un estímulo desde el exterior de la célula, lo que desencadena la vía extrínseca de la apoptosis y la cual comienza cuando los ligandos de muerte (citoquinas proapoptóticas y proinflamatorias) se unen a receptores con dominio de muerte, como los del factor de necrosis tumoral (RTNF), que se encuentran en la membrana celular (11). La maquinaria apoptótica se compone de reguladores aguas arriba y aguas abajo, los cuales derivan en la activación de unas proteasas llamadas caspasas efectoras [8,9], que permiten que se genere el proceso apoptótico (12).

En el caso de las células cancerosas, estas son capaces de superar la barrera regulatoria que genera la apoptosis, produciéndose como consecuencia de ello la patogénesis del cáncer. Las células tumorales han desarrollado diferentes estrategias para eludir el mecanismo apoptótico, ya sea inhibiendo algunas funciones de supresores de tumores, como la proteína TP53, proteína que censa el daño al ADN, conocida como el guardián del genoma, que activa la apoptosis aumentando la expresión de proteínas apoptóticas. Las células cancerosas eluden este mecanismo aumentando la expresión de algunos reguladores antiapoptóticos, o llevando al alza señales de supervivencia, al regular a la baja los factores proapoptóticos. Otra forma que también se ha descrito para inhibir la actividad apoptótica, es interrumpir o bloquear el mecanismo normal de la vía extrínseca, la cual se activa generalmente por ligandos que se unen a receptores de muerte que están presentes en

la superficie celular, activando cascadas intracelulares, que activan finalmente a caspasas efectoras, las cuales producen la degradación celular (8).

Metástasis

Esta característica de las células cancerígenas corresponde a la capacidad de disociarse, diseminarse y colonizar sitios secundarios discontinuos, vale decir hacer metástasis, esta invasión ocurre a partir del tumor primario a través de su membrana basal y representa una interesante diferencia que distingue a un tumor de un cáncer (7, 14). Se han descrito algunos obstáculos que deben atravesar las células cancerosas para generar la colonización metastásica. Para ello deben independizarse del tumor primario, desprendiéndose de este e infiltrándose en tejidos distantes, deben evadir defensas del sistema inmunitario, adaptarse al nuevo nicho y sobrevivir como célula iniciadora del tumor secundario latente (15). El proceso antes descrito se le conoce como transición epitelio mesenquimal (EMT) y para que ocurra es necesario que las uniones de adhesión celular se desensamblen, se generen remodelaciones de citoesqueleto y se pierda la polaridad celular. En cuanto al ambiente extracelular, es necesario que ocurra la degradación de la membrana basal primaria, la construcción de nuevos complejos de adhesión y el desarrollo de una nueva matriz extracelular para la generación tumorigénica secundaria (16). Una de las principales causas de muertes por cáncer se debe a la metástasis, comprometiendo órganos vitales, y llevando a la muerte alrededor del 90% de los pacientes que presentan este diagnóstico (17).

ROS y cáncer

Los organismos aerobios necesitan el oxígeno (O_2) para la producción de energía (ATP). No obstante, este puede llegar a ser tóxico ya que también produce especies reactivas de oxígeno (ROS) (18). Estas son moléculas pequeñas altamente reactivas y algunas de ellas, poseen en su última capa de valencia, electrones (e^-) desapareados. A la cuentan con esta característica se les denomina radicales libres (RL). La ROS son subproductos del metabolismo normal del O_2 , aunque también los hay subproductos del nitrógeno (N). Entre las ROS encontramos al oxígeno singletes (O_2) el radical hidroxilo ($\bullet OH$), el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) y moléculas no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) entre otras (19). En el contexto celular normal, se metaboliza la mayor parte del O_2 sin la formación de intermediarios tóxicos, sólo se genera aproximadamente

un 5% de ROS (40) A bajas concentraciones los ROS tienen funciones de señalización celular regulando actividad mitógena y proliferación, imitando y amplificando la reacción de los factores de crecimiento, también están relacionadas con el metabolismo y muerte celular apoptótica, entre otras funciones descritas (20). Cuando hay mayor demanda de O₂ (procesos inflamatorios, etapas de crecimiento, desarrollo activo), se producen más ROS y al ocurrir un exceso en la producción de ellos, se produce estrés oxidativo (EO). El estrés oxidativo es un desequilibrio que ocurre entre la producción de ROS y los sistemas antioxidantes del organismos encargados de neutralizar los efectos de los ROS. Este se da ya que la producción de estos metabolitos reactivos en contraste a la capacidad regulatoria de estos que posee la célula como mecanismo de defensa antioxidante para eliminarlos permite un delta a favor de los ROS y este aumento puede conducir daño en biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos presentes en la célula (29 - 31). Ante el aumento de ROS, la célula ha desarrollado mecanismos antioxidantes de respuesta rápidas y eficientes para impedir o remover la posible agresión a las biomoléculas blanco. Este sistema de regulación permite que la célula llegue a la homeostasis redox y en consecuencia a la sobrevivencia celular, aunque también puede haber una disminución/afectación en los mecanismos de detoxificación y con ello promover el EO (23).

Las ROS residen en varios organelos de una membrana como los peroxisomas, endosomas, fagosomas y también en citosol, además se encuentra en organelos de doble membrana como las mitocondrias en estas los ROS poseen una mayor actividad Este organelo de doble membrana que realiza metabolismo aeróbico fisiológico, se ha descrito como el responsable del envejecimiento celular y de la mayor fuente endógena de producción de ROS, como subproducto natural de la cadena transportadora de electrones y de la síntesis de ATP, a partir de reacciones de oxígeno molecular en el sistema de fosforilación oxidativa (24–26). En este sistema, los e⁻ procedentes del NADH⁺H⁺, pasan secuencialmente a través del complejo I, la ubiquinona, el complejo III y el citocromo c llegando al complejo IV, quien lo cederá al oxígeno molecular formando H₂O. Alternativamente los e⁻ del FADH₂, producto final de la succinato deshidrogenasa o complejo II, así como de otras enzimas como la glicerol- 3-P deshidrogenasa, la ETF-ubiquinona oxidorreductasa (primera enzima de la β-oxidación de los ácidos grasos) o la dihidroorotato deshidrogenasa (una enzima relacionada con la biosíntesis de pirimidinas), pasan a la ubiquinona y son canalizados por el complejo III, citocromo c y complejo IV para que lleguen finalmente hasta la reducción del oxígeno molecular. Es en este transporte que acabamos de describir, donde el oxígeno es reducido antes de llegar al complejo IV y dan origen a las ROS (27).

La presencia de ROS se asocia al proceso de envejecimiento y a una diversidad de estados patológicos entre ellos la carcinogénesis (28). Estos procesos surgen entre otras posibilidades, a partir de una amplia variedad de mutaciones genéticas que pueden estar causadas por la influencia de diferentes agentes tanto extrínsecos como intrínsecos (29). En este punto, las ROS toma un rol representativo en cuanto a entidad carcinogénica, ya que contribuye en las diferentes etapas de la evolución tumoral actuando como un inductor en la inestabilidad genómica, también en las vías de señalización relacionadas a la supervivencia, a la proliferación, a la resistencia, a la antiapoptosis, a la angiogénesis y la metástasis, ya sea en células preneoplásicas como en células neoplásicas (30). Los oncogenes activan procesos de transformación tumoral que conllevan aumento en las ROS y en el EO, proceso que finalmente decanta en la oxidación de macromoléculas, como ácidos grasos, proteínas y ácidos nucleicos presentes en células animales. Estas biomoléculas tienen electrones en orbitales superficiales que pueden ser capturados mediante procesos oxidativos o ser compartidos en reacciones nucleofílicas para formar compuestos o aductos (31).

Epidemiología del cáncer de mama en Chile y el mundo

Tanto para Europa occidental como para USA, el cáncer posee una alta prevalencia en diagnósticos y fallecimientos por esta causa. En EE.UU, el cáncer es la segunda causa principal de muerte y en 2020, cuatro millones de personas fueron diagnosticadas con cáncer de las que fallecieron 1.4 millones a causa de esta enfermedad (42, 43).

En cuanto al cáncer de mama (CM), enfermedad sistémica, polimorfa y multifactorial, que se caracteriza por el rápido desarrollo de la proliferación desordenada y descontrolada de células con genes mutados de distintas zonas de la mama, específicamente en las zonas epiteliales que revisten los conductos y/o lobulillos de la glándula mamaria (55, 56). El CM es un problema global de salud y cada año se diagnostican millones de casos en todo el mundo. Solo en 2020, se registraron alrededor de 2.2 millones de nuevos diagnósticos y se estima que 684.996 mujeres murieron en el mundo a causa de esta enfermedad. Para el mismo año en Latinoamérica causó la mayor cantidad de muertes de la zona (43, - 46). Y el CM prevalece en mujeres de entre 40 y 50 años, aunque puede afectar a cualquier rango etario. Solo en Estados Unidos afecta a alrededor de una de cada 14 mujeres entre 35 y 54 años de edad, y se proyecta que este número aumente inclusive haciéndose presente en varones (42, 54).

Para Chile en el 2017, el cáncer fue calificado como la 2º causa de muerte en el país, 1 de cada 4 muertes ocurre por enfermedades de origen carcinogénico, inclusive en algunas regiones del país esta patología lleva la delantera causando el mayor número de decesos(40). Así como sucede en otros países, Chile no está exento de un cambio significativo en la estructura etaria, conductual y de hábitos de vida no saludables de la población, los cuales han tenido efecto acrecentando la morbimortalidad por enfermedades no transmisibles, las más importantes en este caso son las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, ya que corresponden a la primera y segunda causa de muerte en el país (41). El 2022 el ministerio de salud de Chile indicó que hubo 28.492 muertes inscritas, por causas neoplásicas. Este mismo informe indicó que el año 2015, hubo un aumento progresivo a partir del año 1997 (42). Hasta el año 2018, siete son las regiones del país que llevan la delantera en términos de mortalidad vinculada a neoplasias. Estas regiones son: Arica y Parinacota, Tarapacá, Antofagasta, Maule, Biobío, Los Lagos, Aysén(43).

Al establecer las relaciones de muertes por cáncer y sexo en el año 2015, se indica que las principales causas de muerte en varones son cáncer de estómago, cáncer de próstata y cáncer de pulmón. En el caso de las mujeres, la delantera la toma el cáncer de mama con 1.511 muertes (16,6 por cada 100.000 habitantes), seguido del cáncer del pulmón con 1.262 muertes (13,8 por cada 100.000 habitantes) (41). El cáncer de mama al igual que el resto de los carcinomas, posee algunas células con capacidad migratoria e invasiva, capaces de generar tumores secundarios en distintos órganos a partir de la mama. El CM generalmente al momento del diagnóstico inicial presentan escasa evidencia de diseminación, y los tratamientos utilizados para detener el cáncer en las primeras etapas, permiten que haya propagación entre un 20% y un 30% desde el tumor primario hacia otros órganos, llevando de este modo a complicaciones en los pacientes e incluso a la muerte debido a la diseminación de esta enfermedad. En cuanto al cáncer de mama, constituye un problema para la salud a nivel mundial, ya que cada año se diagnostican millones de casos, tan solo en el 2020 esta cifra aumentó alrededor de 2.200.000 diagnósticos. El mayor porcentaje de muertes por este particular cáncer corresponde a países del continente africano y también en la Polinesia. En África el fallecimiento de las mujeres ocurrió con mayor incidencia antes de los 50 años. En Latinoamérica y el Caribe, la incidencia del cáncer de mama reporta al menos 210.000 casos nuevos durante el 2020 resultando ser la localización que posee mayor ahínco en cuanto a la frecuencia y mortalidad por esta causa (33). Y en ese mismo año se estima que 684.996 mujeres murieron en el mundo a causa de esta enfermedad (44 45). En cuya instancia, a los pacientes se les propone como primera opción de tratamiento la cirugía para extirpar el tumor primario. Al llevarse a cabo la cirugía, abre la posibilidad de que en la zona pueden quedar residuos de células cancerosas con capacidad migratoria y estas se vuelvan focos metastásicos (46).

Factores de riesgo para desarrollar cáncer de mama.

Los factores de riesgo para desarrollar CM han sido analizados. Y en primera instancia encontramos a la obesidad postmenopáusica, como el factor más importante, seguido de ello el no dar de lactar o haberlo realizado por menos de 6 meses, una menarquia menos a 12 años también está dentro de esta lista y en último factor encontramos que tener un primer parto después de los 30 años o nuliparidad es influyente en el desarrollo de este tipo de carcinoma (47). Se ha observado una estrecha relación significativa entre el cáncer de mama y los factores de riesgo antes nombrados. Los factores de riesgo del cáncer de mama incrementan la posibilidad de la aparición de este. Se han clasificado los factores de riesgo del cáncer de mama en dos grandes grupos, los primeros son los no modificables que representan los factores genéticos y hormonales, y también tenemos el grupo de los modificables, este último hace referencia a la relación con el ambiente y estilo de vida (48). Entre los no modificables están: La menarquia y factores genéticos (edad, raza, antecedentes familiares de cáncer de mama y las enfermedades benignas propias del paciente) (49). El segundo grupo se relaciona con estilo de vida, el impacto del medio ambiente en el organismo, alimentación, consumo de tabaco y alcohol, actividad física realizada por la persona, sobrepeso y obesidad. Los factores genéticos antes nombrados tienen una mayor contribución al desarrollo de cáncer de mama (50). En cuanto a los factores genéticos el principal es la edad (a medida que aumenta esta, aumenta el riesgo de padecerlo); también existe la influencia de otros factores como la predisposición genética (si están presentes los genes BRCA1 y BRCA2), la obesidad, el consumo de tabaco, la ingesta de alcohol, la aplicación de terapia hormonal de reemplazo, no tener hijos o que el primer hijo sea mayor a 35 años de la madre, no dar leche materna y una vida sedentaria (51).

Técnicas de detección de cáncer de mama.

El cáncer de mama puede ser detectable por el surgimiento de síntomas, pero en muchas ocasiones no se presentan evidencias de estos, por ello es por lo que destaca la importancia de la realización de pruebas de detección programadas. Las pruebas de detección temprana son capaces de reconocer un cáncer de seno cuando es pequeño y no se ha extendido, ello implicaría mejores pronósticos y también mejoras en los resultados tras los tratamientos propuestos al paciente (52). Las recomendaciones para las mujeres según la edad son las siguientes:

Las recomendaciones para las mujeres según la edad son las siguientes:

- De 40 a 44 años → realización de una mamografía
- De 45 a 54 años → realización de una mamografía cada año.
- De 55 años en adelante → realización de una mamografía cada 1 o 2 años.

La mamografía consiste en una exploración diagnóstica de la mama y la glándula mamaria, mediante la utilización de un equipo de rayos X modificado, el mamógrafo. Este aparato se compone de un tubo de rayos X adaptados para adquirir la mejor resolución posible en la visualización de las estructuras fibroepiteliales de la GM. Su capacidad de identificación de lesiones de mínimas dimensiones ha favorecido su utilización en exámenes de rutina para detectar tumores antes de que se manifiesten clínicamente o puedan ser palpables (53).

Tratamientos convencionales y costos asociados

Existen un conjunto de métodos actuales para tratar el cáncer incluido el de mama, entre estos encontramos tratamientos que poseen en distintos costos asociados tras su aplicación en el paciente, algunos de ellos conllevan una baja efectividad y otros una alta secuela post tratamiento (emocionales, sociales, económicos), dependiendo del tipo de cáncer y etapa en la que esté, es la propuesta de tratamiento que ofrecerán los médicos. Por su parte el Instituto Nacional del Cáncer informa acerca de algunos tratamientos que nombraremos a continuación. La cirugía, inmunoterapia, quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida, terapia fotodinámica, terapia de hipertermia, terapia con células madre y terapia hormonal, cada una de las cuales posee una forma de accionar distinta pero que en común poseen algunas desventajas y/o efectos secundarios (54).

Propuesta fitoterapia

Los organismos vegetales han evolucionado desarrollando distintos compuestos fitoquímicos que forman parte de su naturaleza y estructura, donde algunos de ellos tienen actividad de defensa, estructural y/o energética, mientras que otros cumplen distintas funciones, son los denominados fitoquímicos (55). En estos reside un alto porcentaje de los principios activos de las plantas, que son en realidad metabolitos primarios y secundarios, estos últimos de estructura relativamente

compleja, que se diferencian de los primarios, porque estos están universalmente distribuidos y participan en la actividad celular de todo ser viviente (56). Por su parte si bien la investigación sobre productos naturales continúa generando nuevos hallazgos moleculares con potenciales bioactividades para tratamiento in vitro y clínico sobre distintas enfermedades, hasta el momento se han establecido algunas clasificaciones de moléculas ya descritas (75).

Los principales tipos de fitoconstituyentes presentes en plantas son

Terpenoides y esteroides: Este término se refiere a un grupo de sustancias que tienen orígenes biosintéticos en común y siguen la regla del isopropeno, desarrollada por Wallace en el año 1866. Depende el número de carbonos que tenga la molécula, se realiza la clasificación. Entre estos encontramos, aceites esenciales, iridoides, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, esteroides.

Compuestos fenólicos: Son un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con un o más sustituyentes hidroxilos y que se presentan generalmente como glicósidos. Son de característica polar y tiene tendencia a ser solubles en agua. Entre estos encontramos a los flavonoides, cumarinas, cromenos y bendofuranos, xantonas, quinonas, lignanos.

Alcaloides: Estos son el grupo más grande de metabolitos secundarios descritos hasta el momento. Se encuentran en diferentes partes de la planta y se pueden encontrar en estado libre como glucósidos o formando sales con ácidos orgánicos. Se incluyen las sustancias que contienen 1 o más átomos de nitrógeno como parte de su sistema cíclico. Debido a la gran complejidad de estructuras que presentan los alcaloides se clasifican según su origen o clasifican según la acción fisiológica que presentan. (66)

Los organismos vegetales al relacionarse con su entorno muchas veces oxidante, han desarrollado sistemas de defensa para esto, mediante la formación de moléculas antioxidantes, lo que ha logrado amortiguar los efectos de radicales libres (RL), especies reactivas y oxidantes tanto exógenos como endógenos (57). Estas moléculas antioxidantes se pueden clasificar de la siguiente forma según el mecanismo de acción que realizan (58, 59):

- Primarios → previene la formación de RL.

Estos impiden la formación de RL utilizando la descomposición de H_2O_2 o la quelación de metales, que participan en cadenas redox. Representantes de estos antioxidantes son la enzima catalasa, la enzima glutatión peroxidasa, la enzima superóxido dismutasa, y algunas proteínas quelantes como la transferrina o la ceruloplasmina.

- Secundarios → inactivan los radicales libres ya formados.

Estos también conocidos como los eliminadores o secuestrantes de RL (scavenger), inhiben el inicio de la cadena y rompen su propagación. Ejemplos de estos encontramos a las vitaminas A, C, E y coenzima Q_{10} , a flavonoides y polifenoles.

- Terciarios → remedian el daño oxidativo principalmente el ocasionado al ADN.

Son conocidos como de reparación o también llamados síntesis de novo, reparan los daños en el ADN y participan en la reconstrucción de la membrana, ejemplos de estos son proteasas y transferasas.

Como se menciona antes, en esta investigación los bioconstituyentes celulares suelen ser un blanco fácil para distintos oxidantes por que sufren efectos adversos debido al desequilibrio que generan, desestabilizando a las moléculas estructurales presentes en las células (60, 61). En base a lo anterior, diversas enfermedades se han asociado al EO y los RL, por esta razón es que se han propuesto, terapias ricas en antioxidantes, que van desde la ingesta de los compuestos, hasta la extracción y purificación de sustancias antioxidantes con el objetivo de detener el deterioro funcional producido por moléculas oxidantes en nuestras células. Estos distintos compuestos han sido utilizados con fines medicinales, alimenticios, domésticos y cosméticos entre otros, en la población humana alrededor de todo el mundo (62-64). Terapéuticamente se pueden evaluar los componentes vegetales para contribuir a mejoras en los tratamientos de las enfermedades, entre ellas el cáncer. Por ello es por lo que podemos establecer una relación entre la salud humana y la fitoquímica. Dentro de este contexto se propone que los extractos de la planta *M. caroliniana* podrían contribuir como coadyuvante o tratamiento alternativo para el CM.

Modiola caroliniana

M. caroliniana, es una especie vegetal que pertenece al Reino Plantae, y al Subreino Tracheobionta, corresponde a la superdivisión Spermatophyta y a la división Magnoliophyta, su clase es Magnoliophyta y la Subclase es Dilleniidae perteneciente al orden de las Malváceas (65). Su nombre común en Chile es pëla- pëla (pila pila), que significa muy fresco, es una "maleza" rastrera, que se distribuye por casi todo Chile, la cual florece con un tono bermejo, (ver figura 4) (66) y se han descrito la presencia de mucilagos en la planta (67). Culturalmente la etnia mapuche la ha utilizado para fines antiinflamatorios, analgésico, depurativo, y emoliente, en aplicación externa en heridas y/o granos, utilizando formatos como cataplasmas o infusiones con la finalidad de curar afecciones en órganos como el estómago, los bronquios o la piel. También, se le ha dado uso diurético y cardiovascular, y algunos estudios han demostrado la capacidad hipotensora de los extracto de la planta, e inclusive en algunas zonas del continente americano se le conoce como "sanalotodo" 79, 80).

Un estudio realizado en septiembre de 1977 indica que *M. caroliniana* es una especie invasora en Chile y se encuentra a partir del año 1818 en 21 provincias del país, desde la IV hasta la X región incluida Juan Fernández, con un rango alto de presencia (71, 72). Y en cuanto a su origen, parece ser incierto y lo adjudican a Sudamérica, donde actualmente se ha encontrado con una alta presencia en Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay e incluso en América del norte en U.S.A. (73). En Europa se encuentra esta especie en lugares de temperaturas templadas, en algunas zonas específicas de España y Portugal (74). Es de hábitat húmedos y suelos fértiles, es una planta rastrera, en Chile es común encontrarla a orillas de caminos y en medio de siembras (75).

Actualmente en una farmacia en Chile se vende una solución de *Modiola* en formato gotario, al cual se indica como tratamiento complementario para la depresión, falta de ánimo y la desmotivación (76). Sin embargo, algunos estudios han demostrado la baja efectividad de *M. caroliniana* en estados depresivos/ansiosos (75). Un estudio realizado para detectar componentes mayoritarios concluyó que un extracto metanólico de *M. caroliniana* posee azúcares reductores, mucilagos, saponinas, flavonoides y a los menos un compuesto esteroideo unido a un anillo pentagonal no saturado similar a los compuestos cardiotónicos presentes en cardenólidos; y mediante análisis HPLC MS-MS confirmaron la presencia de flavonoides, glucurónido de quercetina, metoxi-quercetina ramnosa, derivados del ácido clorogénico y derivados de apigenina ver figura N°2. Además en el mismo estudio, se evaluó la capacidad antioxidante indicando que posee una baja capacidad antioxidante (77).

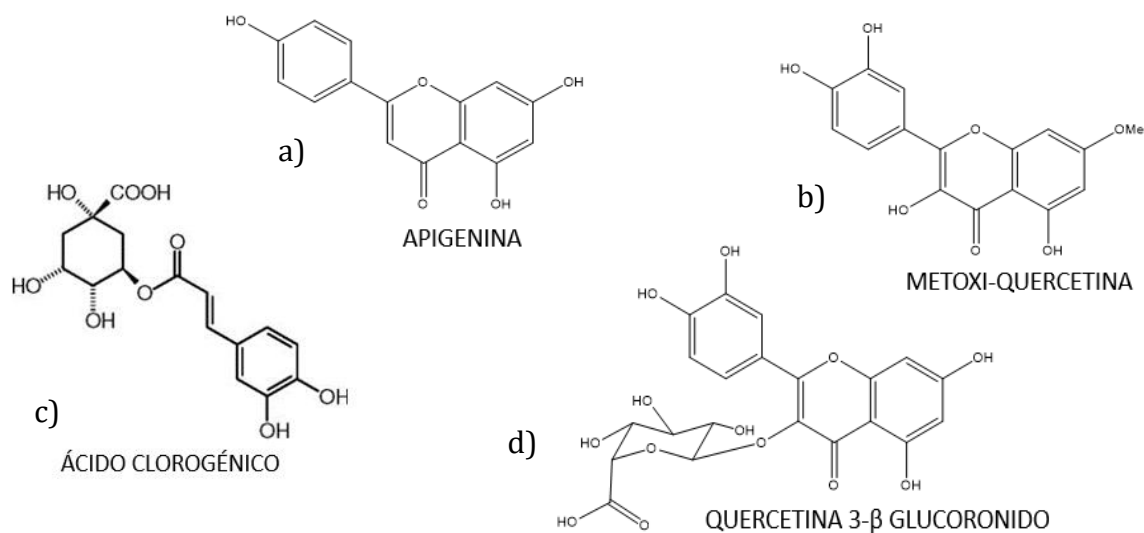


Figura N°2 Principales metabolitos secundarios descritos en la fracción metanólica del extracto de *M. caroliniana*. a) Apigenina, b) Metoxiquercetina, c) Ácido clorogénico y d) Quercetina 3-β glucorónido.

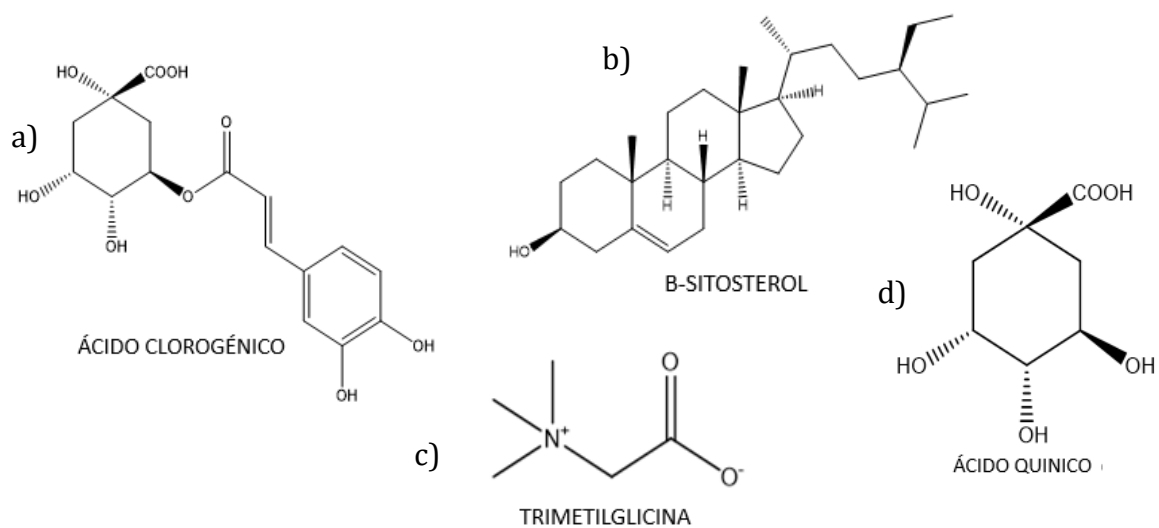


Figura N°3 Otros compuestos presentes en la fracción metanólica de *M. caroliniana*. a) Ácido Clorogénico, b) B-Sitoesterol, c) Trimetilglicina y d) Ácido quínico.

Otro estudio indica que *M. caroliniana* ha sido evaluada en líneas tumorales HEPG2, HEP3B 2.1-7 y sana PANC-1, a bajas concentraciones (100, 10, 1, 0.1 y 0.01 µg/mL), obteniéndose como resultado que posee efectos estimulantes de la proliferación y una nula actividad citotóxica en las líneas celulares de páncreas e hígado, tanto en células no tumorales como en células tumorales (78).

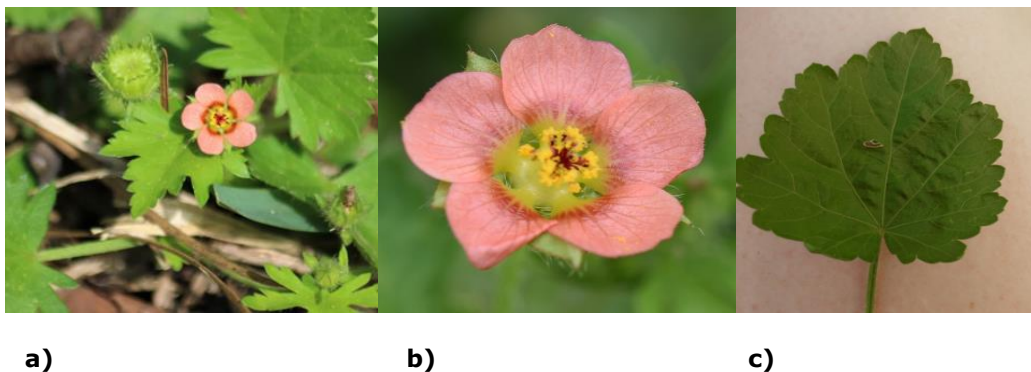


Figura N°4 imágenes de *Modiola caroliniana*. a) Imagen de la planta completa, b) Flor característica de *M. caroliniana*, c) Hoja de *M. caroliniana*.

Por los antecedentes expuestos es que surge el siguiente cuestionamiento: ¿Los extractos de *Modiola caroliniana* podrían tener efectos en procesos celulares asociados a carcinogénesis?

Hipótesis

Los fitoconstituyentes en los extractos de *Modiola caroliniana* presentan actividad antioxidante, disminuyen la viabilidad celular, aumentan los niveles de ROS y disminuyen la migración celular en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la concentración de fitoconstituyentes y la capacidad antioxidante de los extractos de *Modiola caroliniana* y sus efectos sobre la viabilidad celular, los niveles de ROS y la migración celular en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB 231 y una línea celular inmortalizada no tumoral de mama MCF-10A.

Objetivos específicos

- Analizar la concentración de fitoconstituyentes presentes en los extractos con polaridad creciente de *M. caroliniana*.
- Analizar la capacidad antioxidante de los extractos con polaridad creciente de *M. caroliniana*.
- Estudiar el efecto de los extractos de *M. caroliniana* sobre la citotoxicidad en las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB 231) y la línea celular no tumoral (MCF-10A).
- Determinar el efecto de los extractos de *M. caroliniana* sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno ROS en las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB 231) y la línea celular no tumoral (MCF-10A).
- Evaluar el efecto de los extractos de *M. caroliniana* sobre la migración celular en las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB 231) y la línea celular no tumoral (MCF-10A).

Metodología.

Tipo de investigación

La presente investigación es del tipo experimental in vitro, cuantitativo, transversal y prospectivo.

Diseño de investigación

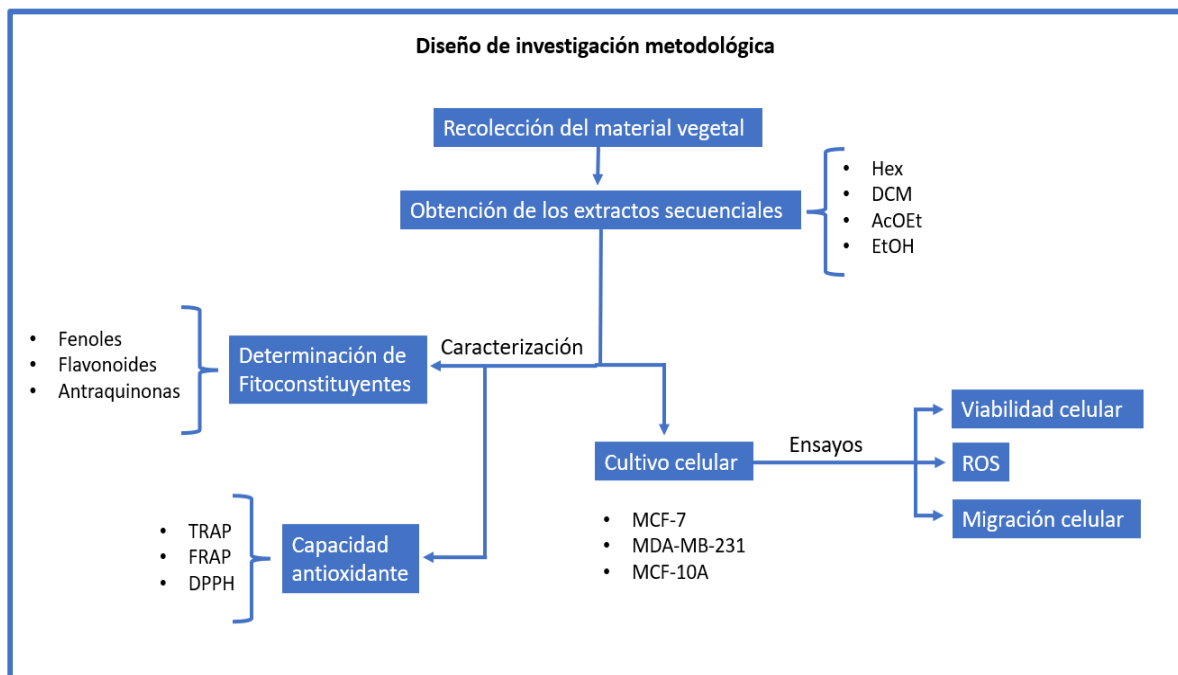


Figura N°5: Diseño experimental general de la investigación

Colección de *Modiola caroliniana*

M. caroliniana se coleccionó en la región del Maule específicamente en la localidad de Vara Gruesa, (Latitud -35.830491393678024 y Longitud -71.52530907144342). La identificación de las especies fue asistida por Pamela Ramírez encargada del Herbario de Botánica VALPL de la Universidad de Playa Ancha Ciencias de la Educación.

Obtención de extractos

Una extracción a partir de material vegetal ocurre cuando se ponen en contacto dos fases inmiscibles, las cuales pueden ser líquidas, gaseosas o sólidas. El mecanismo de extracción se basa en la separación de componentes tras la adición de un disolvente que selectivamente lo disuelve (79). El material fue secado en estufa a 40°C por 2 semanas, triturado y mezclado con solventes de polaridad ascendente y asistido con sonicación. Los solventes que se utilizaron fueron cuatro, *n*-hexano (H) para adquirir compuestos de tipo lipídico, diclorometano (D) extrae principalmente terpenoides, acetato de etilo (A) para obtener polifenoles y finalmente etanol (E) para extraer especialmente flavonoides. Luego de ello, mediante rotavaporación, se separaron los solventes del material vegetal obteniéndose así la extracción de trabajo (ver figura 6), las que fueron utilizadas para desarrollar los diferentes ensayos de caracterización y biológicas. A partir de cada uno de los extractos, se generaron diluciones los que llamaremos extractos madre de (H-D-A-E) a las siguientes proporciones, a 50mg de extracto madre por 1mL de E, y de ellos se realizaron los ensayos que detallaremos en este apartado (90).



Figura 6: Viales ámbar con los extractos realizados. MH: Extracto *n*-hexano de *M. caroliniana*; MD: Extracto diclorometano de *M. caroliniana*; MA: Extracto acetato de etilo de *M. caroliniana*; ME: Extracto de etanol de *M. caroliniana*.

Para cumplir con los objetivos propuestos en esta investigación se llevaron a cabo las siguientes actividades:

- Estimación de fitoconstituyentes.
- Análisis de capacidad antioxidante.
- Estudio de citotoxicidad.
- Evaluación de la producción de ROS.
- Evaluación de migración.

Evaluación de los fitoconstituyentes.

Contenido de fenoles totales

En este ensayo se utilizó el reactivo Folin & Ciocalteu como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. El reactivo permitió obtener el contenido de polifenoles mediante espectrofotometría, ya que este compuesto reacciona con moléculas orgánicas que presentan uno o más anillos aromáticos hidroxilados a pH básico (92).

Para desarrollar este experimento se utilizó el reactivo antes mencionado en una proporción 1:10, protegiéndolo de la luz ya que es fotosensible. El experimento se realizó por triplicado y para cada muestra se mezcló 500 μL (1mg/1mL) de los extractos de *M. caroliniana* (H-D-A-E) con el reactivo Folin & Ciocalteu (2,5 mL). Además, se preparó una muestra control, que en este caso le llamaremos muestra blanco, el cual se preparó con 500 μL de etanol. Una vez realizada la mezcla se agitó e incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Transcurrido el tiempo, la solución fue mezclada con carbonato de sodio Na_2CO_3 (2mL) y a mezcla fue agitada e incubada (resguardándola de la luz) a temperatura ambiente, durante 2 horas. Finalmente, se evaluó por espectrofotometría a 700 nm y los datos de absorbancia se cuantificaron con relación a una curva patrón calibrado de ácido gálico. El total del contenido de polifenoles fue expresado en mili mol de equivalentes a ácido gálico GAE ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

Contenido de flavonoides totales

Mediante reacciones con compuestos con AlCl_3 se determinaron contenidos de flavonoides mediante espectrofotometría, al formarse un quelato coloreado. Este ensayo se realizó por triplicado. Se mezclaron 5 mL de cada extracto (H-D-A-E) (1mg/mL) con 5 mL de solución AlCl_3 al 2% en E y se dejó reaccionar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron analizadas a una longitud de onda de 415 nm mediante absorbancia. Los datos fueron extrapolados en una curva de calibrado de quercetina. El resultado total de flavonoides se expresó en milimol equivalentes en quercetina (QE $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (80).

Contenido de antraquinonas totales

Tal como se realizó el ensayo para la determinación de la presencia de flavonoides, las antraquinonas son estructuras químicas capaces de formar quelatos cuando reaccionan con AlCl_3 , la diferencia radica en la longitud de onda con la que se reconocen, para estas la longitud de onda es de 485 nm. Para esto, se mezcló 5 mL de extracto (1mg/mL) con 5 mL de una solución de AlCl_3 (2% en E) y se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguido de ello se obtuvo la absorbancia de cada extracto, y mediante espectrofotometría, a la longitud de onda de 485 nm se leyeron los resultados para luego extrapolarlos en una curva estándar de emodina (EE). Las antraquinonas totales fueron expresadas en milimol de equivalentes de emodina ($\text{EE mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Este análisis fue realizado por triplicado (94).

Prueba de capacidad antioxidante total:

TRAP

Capacidad antioxidante total.

El potencial antioxidante de reactividad total se utiliza para evaluar la capacidad antioxidante de los metabolitos secundarios presentes en la muestra. Para esto se utilizaron los reactivos 2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS) a $150 \mu\text{M}$ y 2 amidino propano (ABAP) a $10 \mu\text{M}$, donde ambos se mezclaron en una proporción 1:1, y se mantuvieron a 45°C durante 30 minutos. Esta reacción tiene una coloración característica verdeazulada. Se preparó una muestra blanco con 1 mL de ABTS y las muestras problemas a analizar se prepararon 1mL de mezcla y $10 \mu\text{L}$ de extracto. La lectura se realizó a 734 nm cada 10 segundos hasta completar 50 segundos en total (95). Para analizar los resultados se utilizó la siguiente ecuación 1:

$$\text{Ecuación 1} \rightarrow \bar{A} = \frac{A_0 - A_{50'}}{A_{30'}}$$

La capacidad total de antioxidantes para TRAP se expresó en equivalentes mM Trolox (TEAC μM) con una curva estándar para Trolox®. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

FRAP

Ensayo del poder antioxidante reductor del hierro.

Es una técnica que se utiliza frecuentemente para la determinación de la capacidad antioxidante en extractos mediante el poder reductor férrico. El ensayo evalúa el poder que tienen los extractos de reducir Fe^{+3} a Fe^{+2} , mediante el reactivo FRAP el cual presenta 3 componentes, una solución Buffer acetato de 300mM, el reactivo 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triacin (TPTZ) a 10mM y cloruro férrico a 20mM, en las proporciones 10:1:1. Esta mezcla se debe utilizar de forma inmediata. Se preparó una muestra blanco con 300 μL de la mezcla, mas 300 μL de H_2O y 100 μL de E. Para las muestras de nuestro interés, se prepararon 300 μL de mezcla más 300 μL de agua y 100 μL de la muestra a trabajar (1mg/mL). Una vez lista la mezcla, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y se leyeron a una longitud de onda de 593 nm. Los valores de absorbancia fueron extrapolados en una curva de calibrado de TROLOX® y expresados como TEAC (Mm) (81).

DPPH•

Ensayo de actividad secuestradora de DPPH•.

Mediante la actividad captadora del RL DPPH• (2,2'-dinitrofenil-1-picrilhidracil), se evalúa la capacidad antioxidante de las muestras a tratar, en este caso de la planta *M. caroliniana*. Para desarrollar esta técnica se utilizó DPPH• a 50 μM en E absoluto, y se aumentó el volumen hasta aforar a 250mL sonicándolo. La muestra blanco se preparó con E y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm, obtenido de este modo (t_0). Para el resto de las muestras se realizaron triplicado y se prepararon de la siguiente forma: 2,9mL de DPPH• +100 μL de extractos (10, 5 y 1 mg/mL), se midió la absorbancia a 517 nm, tras 15 minutos de incubación. La determinación de la absorbancia esta medida por el descuento del color que se obtiene, entre la muestra blanco y las muestras problemas, y se calculó el % de secuestro del radical DPPH• con la ecuación 2 (82).

$$\text{Ecuación 2} \rightarrow \text{Porcentaje de secuestro (\%)} = \frac{(\text{Abs}_0 - \text{Abs } 15' - \text{Abs color}) \times 100}{\text{Abs}_0}$$

El resultado obtenido para cada concentración por extracto nos permitió calcular el IC_{50} , que representa la concentración de extracto que causa el secuestro del 50% del radical DPPH•.

Líneas celulares

Las líneas celulares procedentes de cáncer de mama sobre las que se generó la evaluación son MCF-7 y MDA-MB 231 y la línea celular inmortalizada de mama no tumoral utilizada como control corresponde a MCF-10A (98 - 100).

- **MCF-7** (ATCC código HTB-22) Adenocarcinoma de mama, proveniente de tejido glandular mamario.
- **MDA-MB-231** (ATCC código HTB-26) Adenocarcinoma de mama proveniente de tejido glandular mamario derivado del sitio metastásico.
- **MCF-10A** (ATCC) Célula epitelial de glándula mamaria no tumorigénica.

Evaluación de viabilidad celular

En placas de 96 pocillos se agregó medio de cultivo es DMEM-Ham's F12 complementado con suero fetal bovino 10%, estreptomycin a 100 µg/mL y penicilina a 100 µg/mL. Fueron sembradas 5×10^3 células por pocillo, las cuales se obtuvieron de la siguiente manera: Las células de las diferentes líneas a tratar fueron lavadas, tripsinizadas para posteriormente ser puestas en los pocillos. Una vez listas las placas con sus respectivas líneas celulares, se procedió a generar los tratamientos. Para ello, los extractos secuenciales de polaridad ascendente (H-D-A-E) de *M. caroliniana* ya diluidos en etanol a [50mg/mL] (Solución madre) se mantuvieron a -20°C. Para la realización de cada experimento se preparó un volumen específico de solución de trabajo diluyendo 1:10 en Agua estéril, la solución madre, la cual se aplicó en los volúmenes 10, 5, 2.5 y 1.25 µL en cada pocillo, por cuadruplicado. Seguido de esto, las células fueron incubadas a 37°C con atmósfera 5% CO₂/95% O₂ y tratadas con los extractos a las concentraciones indicadas durante 72h. Pasado el tiempo, las células se fijaron con ácido tricloroacético (TCA) al 50% con un volumen de 25 µL/pocillo e incubadas a 4°C durante 1h. Luego las células fueron lavadas con agua destilada, 3 veces mediante el mecanismo de inmersión. Después de lo cual, las células se tiñeron con 0,1% de Sulforrodamina B (SRB) disuelta en 1% de ácido acético (50 µL/pocillo) durante 30 min y finalmente fueron lavadas 3 veces con ácido acético al 1% con un volumen de 150 µL/pocillo para eliminar el colorante no unido. Para realizar la lectura de las placas, se utilizó 100 µL/pocillo de Tris Base a 100mM, y se analizó la densidad celular en un lector de placas a 540 nm (86).

Evaluación ROS por citometría de flujo

La producción de ROS en cada tratamiento fue medida usando la sonda fluorescente 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH₂-DA), sensible, lineal y precisa para la determinación de ROS. La sonda difunde a través de la membrana celular, donde es deacetilada por enzimas esterasas citosólicas y es transformada en un compuesto no fluorescente e impermeable llamado 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂). El DCFH₂, en presencia de ROS o RNS, es oxidado por dos electrones en dos sitios de su estructura (como se muestra en la Figura 7 y se convierte en 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), compuesto fluorescente. La DCF tiene un máximo de absorción a 503 nm y un máximo de emisión a 523 nm en solución acuosa y la intensidad de la fluorescencia dentro de las células es proporcional a la cantidad de ROS producido (87).

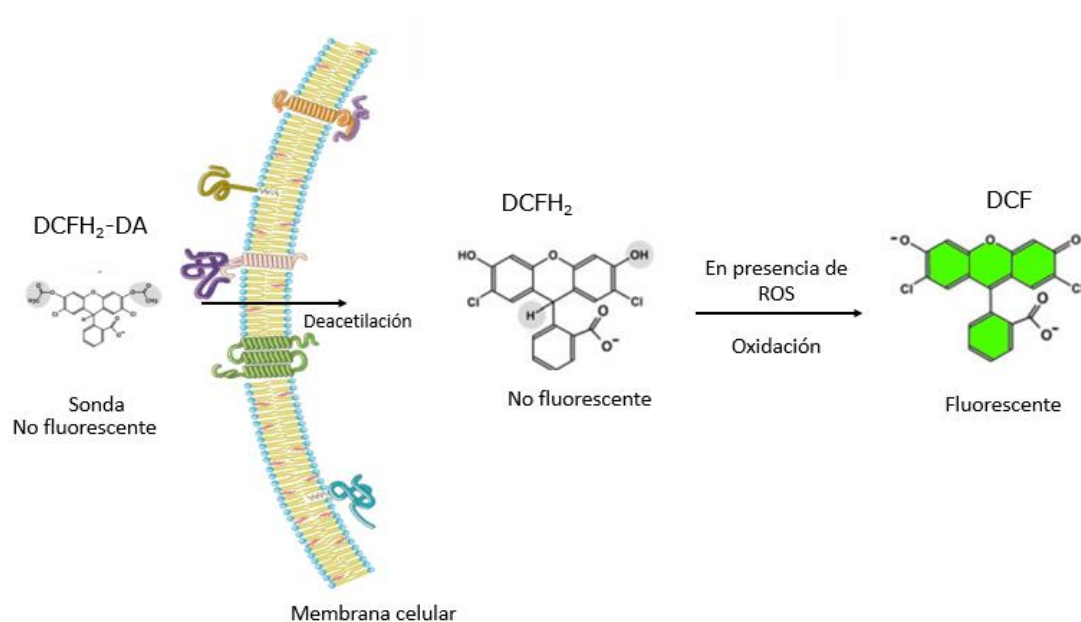


Figura 7: Esquema de la sonda fluorescente 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína al ingresar a la célula y tornarse fluorescente en presencia de ROS.

La DCFH₂-DA a 10mM, se mantuvo en oscuridad y se agregó en las placas de 12 pocillos sembradas con 1×10^5 células previamente, manteniéndolas durante 24h a 37°C con 5% de CO₂ y 100% humedad relativa, antes de aplicar los tratamientos experimentales. Se agregó la solución con la sonda DCFH₂-DA (10mM) para llegar a una concentración 20 μ M en los pocillos de la placa donde se sembraron las células. Además, se mantuvo un pocillo sin tratamiento como CS y posterior a esto se mantuvieron durante 30 a 60 minutos en oscuridad. Se eliminó el medio y se agregó cada uno de los tratamientos experimentales, como se explica a continuación: los extractos secuenciales (H- D A- E) de *M. caroliniana* a un IC₅₀ 200 (μ g/ mL), además se utilizó como control positivo (C+) a 2-amidinopropano (AAPH) y se dejó un pocillo sin tratar como control (CS). Tras la aplicación de los tratamientos, se dejó actuar durante toda la noche. Se recogió el medio celular en un tubo Eppendorf, se lavó y tripsinizó las células de los pocillos y se recogió todo en el mismo tubo eppendorf. Seguido de ello se centrifugó a 1500 rpm durante 7 minutos, se eliminó el sobrenadante y se realizó la resuspensión en 500 μ L de PBS. Finalmente se analizó en el citómetro de flujo con una excitación de 488 nm y de emisión 550nm.

Migración mediante ensayo de la cámara

Para este método se utilizó placas con 6 pocillos, cada uno con 3×10^5 células por pocillos, resuspendidas en 2mL de medio incubadas por 24h antes de la aplicación del tratamiento. El tratamiento consistió en la aplicación de los extractos secuenciales (H- D- A- E) a la concentración del IC₅₀ 250 μ g/ mL y se dejó actuar durante 24h. Posterior a ello, las células de cada pocillo fueron tripsinizadas y centrifugadas cada uno por separado para así ser llevadas a la cámara de migración. La cámara de migración consta de un pocillo para tejido de cultivo celular de 8 mm de diámetro, con una membrana porosa (cada poro de 8,0 μ m de diámetro), que se coloca en una placa de 24 pocillos para formar dos compartimentos (Ver figura 8). En el compartimento inferior se le agregó 250 μ L de medio completo con 10% de suero fetal bovino SFB. En el pocillo superior, el cual fue sembrado con 2×10^5 células con SFB suplementado al 1%), se agregó medio incompleto de 10 mL de medio PBS y 2 mL tripsina. Esta diferencia de concentración del medio permite que se forme un gradiente de concentración quimiotáctico *in vitro* para las células, con el objetivo de inducir la migración. La membrana fue retirada de la cámara y las células adheridas a la parte inferior de esta fueron fijadas y teñidas con 100 μ L de cristal violeta al 0,1 % p/v en metanol al 50% v/v durante 5' y luego lavadas con agua destilada para retirar el exceso de colorante. Luego, las células adheridas a la membrana se contaron en 40 campos a 40X en un microscopio óptico (88).

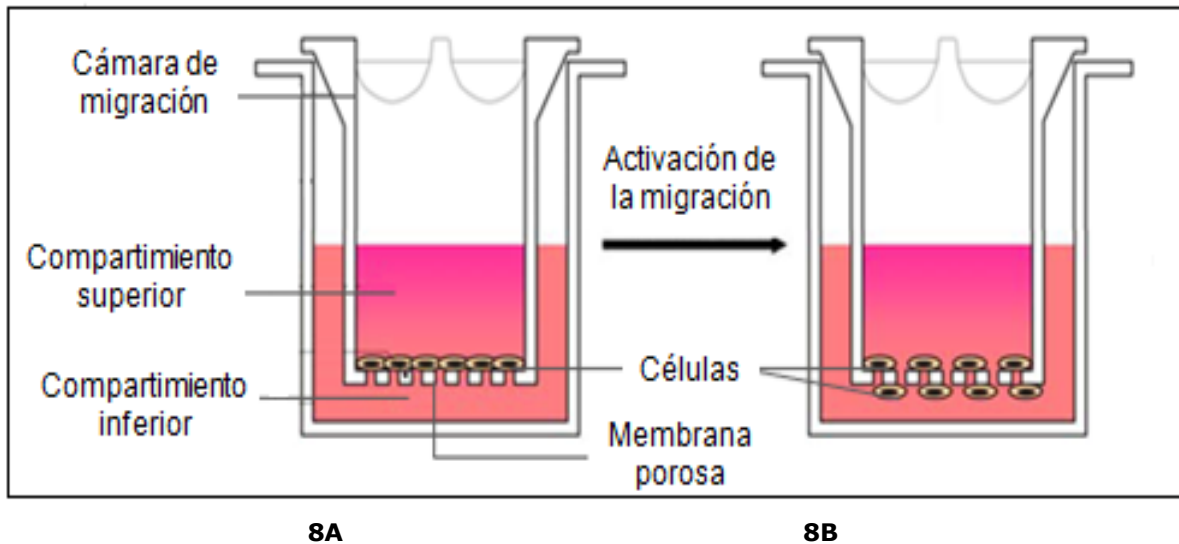


Figura N°8 cámara de migración. En esta figura se observa la cámara de migración que contiene un medio incompleto en el compartimento superior, con la membrana porosa en su inferior. Esta está en contacto con el medio completo que está inmerso en el compartimento inferior (8A). En la membrana las células están en la parte superior. En la figura (8B) las células migraron hacia la parte inferior de la membrana porosa. Imagen obtenida del protocolo de migración del laboratorio de Bioensayos de la Universidad de Valparaíso, facultad de Medicina a cargo del Dr. Joan Villena García.

Para obtener el % de migración se utiliza la siguiente ecuación 3:

Ecuación 3 →
$$\%MIGRACION = \frac{N^{\circ} \text{ CÉLULAS TRAT(H)}}{N^{\circ} \text{ CÉLULAS CONTROL}} \times 100$$

Estadística

Los datos obtenidos durante esta investigación fueron sometidos a análisis estadísticos, y los resultados de las pruebas de distribución precisan con qué tipos de datos nos encontramos, pudiendo ser estos paramétricos o no paramétricos. Para datos paramétricos, se utilizó ANOVA one way y para datos no paramétricos se utilizó ANOVA Kruskal-Wallis. El nivel de significancia fue de 0,05 para este estudio y los datos se presentan utilizando media $\pm$ desviación estándar (SD). Los softwares que se utilizaron fueron el Graph Pad Prism, Sigma Plot 12.0, Estadística 7.0. Todos los resultados en gráficos o tablas se presentan en SD y promedio.

No aplica comité de ética/bioética y bioseguridad.

Resultados

Obtención extracción secuencial

Como resultado de la extracción se obtuvieron cuatro extractos de polaridad ascendente (H-D-A-E) de la especie *M. caroliniana*. Estos extractos fueron utilizados para evaluar la composición de fitoconstituyentes, la capacidad antioxidante y analizar el efecto sobre la viabilidad celular, la generación de ROS y la migración celular en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.

Tabla N°1 Rendimiento de los extractos.

El mayor rendimiento se obtuvo para el extracto de E con un 4,47 %, seguido de ello fue A con un 3,05% y el porcentaje menor es para H con un % 1,53% en rendimiento.

Solvente	Extracto seco (gr)	Rendimiento %
H	2,73	1,53
D	1,15	2,90
A	0,84	3,05
E	1,60	4,47

Fitoconstituyentes

Concentración de fitoconstituyentes de *M. caroliniana*

Las plantas son una rica fuente en diferentes tipos de sustancias que se relacionan con diversas actividades biológicas, de ahí la relevancia de conocer la composición de fitoconstituyentes (56). En este trabajo se analizaron los siguientes grupos de fitoconstituyentes: fenoles, flavonoides y antraquinonas.

Estimación de fenoles totales:

Los fenoles son metabolitos secundarios que producen las plantas y que se han asociados con diversas propiedades, taxonómicas, sensoriales, nutricionales y farmacológicas (89, 89). Por ello la necesidad de realizar la cuantificación de estos constituyentes presentes en los extractos secuenciales: *n*-hexano, dicloro metano, acetato de etilo y etanol de *M. caroliniana*.

Para el análisis de fenoles se utiliza una curva de calibrado de ácido gálico, mediante la cual se determinan los equivalentes de ácido gálico GAE ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) para cada uno de los extractos de *M. caroliniana*, lo cual se muestra en el figura N°9.

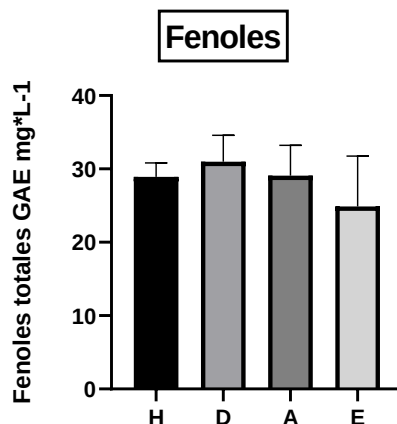


Figura N°9 Estimación de fenoles totales. Fenoles totales GAE ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) presentes extractos de *Modiola caroliniana*. H: *n*-hexano; D: diclorometano; A: acetato de etilo; E: etanol. $n=3$, promedio $\pm$ DE.

La figura N°9 muestra que, para el caso de Fenoles Totales, GAE $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ el extracto D obtuvo la mayor cantidad con $30,99 \pm 3,59$ GAE $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ con valores similares a, A ($29,1 \pm 4,14$) y H ($28,92 \pm 1,89$) en cuanto a E, hubo una mayor diferencia con un valor menor ($24,89 \pm 6,86$). Tras realizar el análisis estadístico de los extractos realizados de la especie con respecto a la concentración de fenoles totales, se obtuvo un $p = 0,516$ lo que indica que no hay diferencia significativa entre ellos. Las concentraciones a las que se realizaron las evaluaciones de los extractos son de $1\text{mg}/1\text{mL}$.

Estimación de flavonoides totales.

Para el análisis de flavonoides, se utilizó la curva de calibrado de quercetina, incluyendo los datos obtenidos en cada uno de los extractos de *M. caroliniana*. Los valores se expresaron como equivalentes de quercetina (QE $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) lo cual se muestra en la figura N°10.

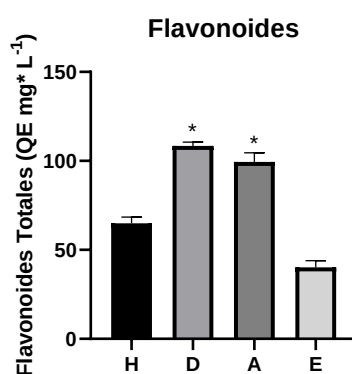


Figura N°10 Estimación de flavonoides totales. Flavonoides totales (QE $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de extractos de *M. caroliniana*. H: *n*-hexano; D: diclorometano; A: acetato de etilo; E: etanol. ($n=3$, promedio, DE), $p < 0,05$, las columnas que presentan un asterisco (*) sobre ellas representan la diferencia significativa con las otras.

Para flavonoides totales el valor más alto lo lleva el extracto D ($108,42 \pm 2,13$ QE $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), en segundo lugar, el extracto A ($99,41 \pm 5,13$ QE $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), seguido de esto encontramos al extracto H ($64,99 \pm 3,48$ QE $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y en último lugar a E ($40,17 \pm 3,77$ QE $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Además, el resultado de $p = 0,0156$ indica que existe diferencia significativa entre los extractos, siendo D y A los extractos con mayor concentración de este fitoconstituyente.

Estimación de antraquinonas totales.

Para analizar el contenido de antraquinonas presentes en los extractos de *M. caroliniana* se utilizó la curva de calibrado de emodina, mediante el cual se interpolan los datos obteniéndose valores de antraquinonas en ($\text{EE mg}^*\text{L}^{-1}$) para cada una de las muestras de extractos. Ver figura N°11.

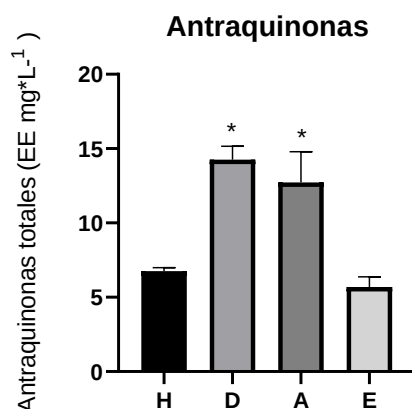


Figura N°11 Estimación de antraquinonas totales. La estimación de antraquinonas totales ($\text{EE}^*\text{mg}^*\text{L}^{-1}$) en base a los extractos de *M. caroliniana*. H: *n*-hexano; D: diclorometano; A: acetato de etilo; E: etanol. (n=3, promedio, DE) $p < 0,05$. Las columnas que presentan asterisco (*) sobre ellas representan la diferencia significativa con las otras.

El análisis estadístico del contenido total de antraquinonas en los extractos de *M. caroliniana* arrojó un $p = 0,0216$, por lo tanto, hay diferencia significativa entre el contenido de antraquinonas de estos extractos evaluados y se puede observar en la figura N°11 que los extractos de polaridad media (D y A) obtuvieron los resultados más elevados. El valor más alto es para D ($14,25 \pm 0,89 \text{ EE mg}^*\text{L}^{-1}$), seguido de ello encontramos al extracto A ($12,72 \pm 2,07 \text{ EE mg}^*\text{L}^{-1}$), el tercer lugar es para H ($6,76 \pm 0,234 \text{ EE mg}^*\text{L}^{-1}$) y finalmente E ($5,68 \pm 0,68 \text{ EE mg}^*\text{L}^{-1}$).

Capacidad antioxidante total para *M. caroliniana*.

La capacidad antioxidante que presentan los extractos de *M. caroliniana* fue determinada por ensayos fotométricos TRAP, FRAP. y DPPH•. Estos nos entregaran un panorama de la capacidad antioxidante de los extractos en estudio.

Capacidad antioxidante total TRAP

La capacidad antioxidante total TRAP, se basa en la capacidad de algunos antioxidantes de secuestrar un electrón desapareado del radical blanco. Para esto se utiliza el radical estable 2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS•), que presenta un color azulado y su absorbancia es calculada por espectrofotometría. Al haber presencia de antioxidantes en los extractos esta coloración disminuye y por lo tanto se presenta variabilidad en los valores de la absorbancia.

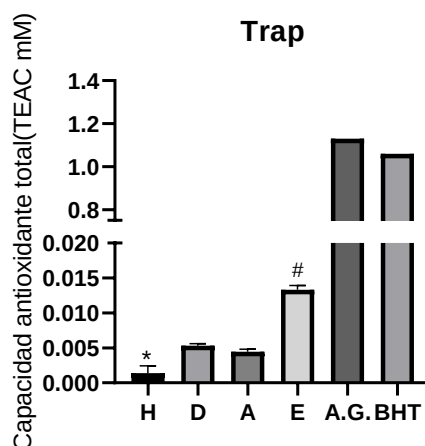


Figura 12 Capacidad secuestradora de radicales libres TRAP. Expresada en valores de mM TroloxTM (equivalente TEAC) de los Extractos de *M. caroliniana*. H: *n*-hexano; D: diclorometano; A: acetato de etilo; E: etanol. (n=3, promedio DE) p<0,05. Los diferentes iconos presentes sobre las columnas representan la diferencias significativas de los resultados obtenidos. Y los controles A.G: ácido, gálico y BHT: Butilhidroxitolueno.

El análisis estadístico correspondiente para este ensayo, indica que hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos, ($p= 0,0156$), lo que implica que hay diferente actividad antioxidante entre los extractos. El extracto E ($0,01 \pm 0,0005$ TEAC mM) presenta diferencia significativa con los demás extractos que destaca por su elevado valor, le sigue D ($0,0053 \pm 0,0003$ TEAC mM), continúa A ($0,0044 \pm 0,0003$ TEAC mM) y finalmente el menor valor para H ($0,0014 \pm 0,0010$ TEAC mM). En Cuanto a los controles positivos se utilizó BHT ($1,06 \pm 0,02$) y A.G. ($1,13 \pm 0,01$).

La capacidad antioxidante total FRAP

Los resultados determinados en este ensayo se obtienen a partir de la medición de la capacidad antioxidante medida por la reducción del ion férrico en cada uno de los extractos de *M. caroliniana*. Esta técnica relaciona la capacidad antioxidante con la capacidad de los compuestos de quelar metales, para este caso los cationes de hierro. Es un método medido por colorimetría en la figura N°13 se muestran los resultados obtenidos en este ensayo.

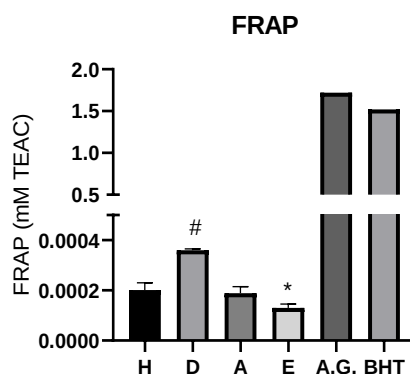


Figura N°13 Capacidad antioxidante total FRAP. Expresada en valores de mM TROLOX TM (Equivalentes en TEAC), para los extractos de *M. caroliniana*. H: n-hexano; D: diclorometano; A: acetato de etilo; E: etanol A.G.= ácido gálico y BHT= butilhidroxitolueno. (n=3 promedio, DE) $p<0,05$. Los diferentes iconos presentes sobre las columnas representan la diferencias significativas de los resultados obtenidos.

Los resultados estadísticos arrojaron que $p=0,0249$, por lo tanto, hay diferencias significativas entre los resultados de cada extracto. El extracto D ($0,0003 \pm 5,0688$ TEAC mM) es el extracto que representa el mayor valor y le asignamos un signo #. Para H ($0,0002 \pm 2,8918$ TEAC mM) y A ($0,0002 \pm 2,632$ TEAC mM) no poseen diferencias significativas entre ellos y no están representados por íconos distintivos. Los controles positivos BHT ($1,52 \pm 0,07$) y Ácido Gálico ($1,72 \pm 0,02$).

IC₅₀ del radical DPPH•

Esta determinación calcula los valores de concentración inhibitoria media (IC₅₀) de cada uno de los extractos evaluados de la especie *M. caroliniana* contra el radical libre estable DPPH• y esto se contrarresta con los patrones de referencia TROLOX™ y BHT como se muestra en la figura 14.

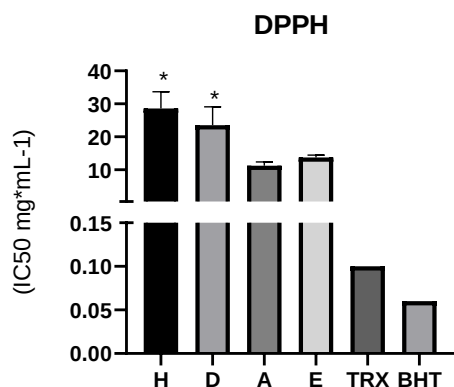


Figura N°14 IC₅₀ del radical DPPH•. IC₅₀ del radical DPPH• (IC₅₀ mg*mL) de los extractos de *M. caroliniana*. H: *n*-hexano; D: diclorometano; A: acetato de etilo; E: etanol, TRX: TROLOX ®(90). (n= 3, promedio, DE) $P<0,05$. Las columnas que presentan asterisco (*) sobre ellas representan la diferencia significativa con las otras. y BHT: Butilhidroxitolueno. (n= 3, promedio, DE) $P<0,05$. Las columnas que presentan asterisco (*) sobre ellas representan la diferencia significativa con las otras.

Los extractos E ($13,6773 \pm 0,76$ IC₅₀ mg*L⁻¹) y A ($11,1877 \pm 1,13$ IC₅₀ mg*L⁻¹) sin diferencias significativas entre ellas, representan un IC₅₀ mejor que el de los extractos H ($28,6067 \pm 5,03$ IC₅₀ mg*L⁻¹) y D ($23,4866 \pm 5,63$ IC₅₀ mg*L⁻¹), Las barras que tienen un asterisco tampoco poseen diferencias significativas entre ella, pero entre los grupos H-D y A-E, si las hay, ya que su $p<0,05$. Los controles positivos para este ensayo son TRX ($0,1 \pm 0,06$) y BHT ($0,06 \pm 0,0$).

Viabilidad celular

La actividad citotóxica de los extractos generados de *M. caroliniana* se determinó mediante el ensayo SRB, sobre las líneas de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y la línea celular inmortalizada de epitelio mamario no tumoral MCF-10A. Cada uno de los extractos (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol) fueron aplicados en 4 concentraciones 500-250-125-62,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Los resultados se expresan en porcentaje de viabilidad con respecto al 100% de la viabilidad de las células tratadas únicamente con el solvente etanol 1%, el cual se expresa en este caso como control solvente (CS). Se utilizó el software Graph Pad Prism para el análisis.

Porcentaje de viabilidad de la línea MCF-7.

En la figura 15 se observa el efecto sobre la viabilidad celular en la línea de cáncer de mama MCF-7 tras la aplicación de los extractos. Los resultados indican un efecto de dosis dependencia para todos los extractos estudiados.

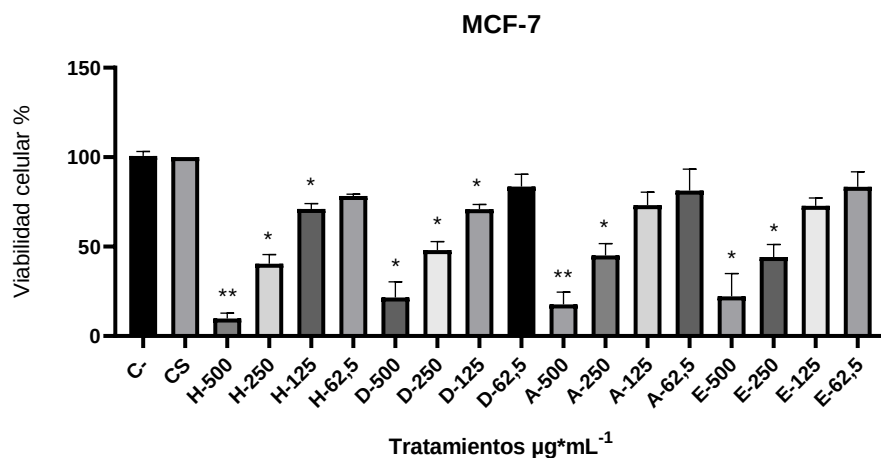


Figura N°15 Porcentaje de viabilidad de la línea MCF-7. Tras el tratamiento con los extractos de la especie *M. caroliniana* a diferentes concentraciones (500, 250, 125 y 62.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (H= extracto *n*-hexano, D=, extracto diclorometano, A=extracto acetato de etilo, E= extracto etanol). (* = $p < 0,05$) y (** = mayor significancia en la diferencia que *). Cada grafico representa el promedio de 3 experimentos con 4 réplicas cada uno (promedio $\pm$ desviación estándar).

El extracto más activo fue *n*-hexano ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) reduciendo el porcentaje de viabilidad celular hasta $9,2 \pm 2,05\%$. Todos los extractos utilizados presentan resultados similares reduciendo la viabilidad celular de forma significativa a las concentraciones de ($500, 250, \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y adicionalmente también para *n*-hexano y dicloro ($125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Porcentaje de viabilidad de la línea MDA-MB-23.

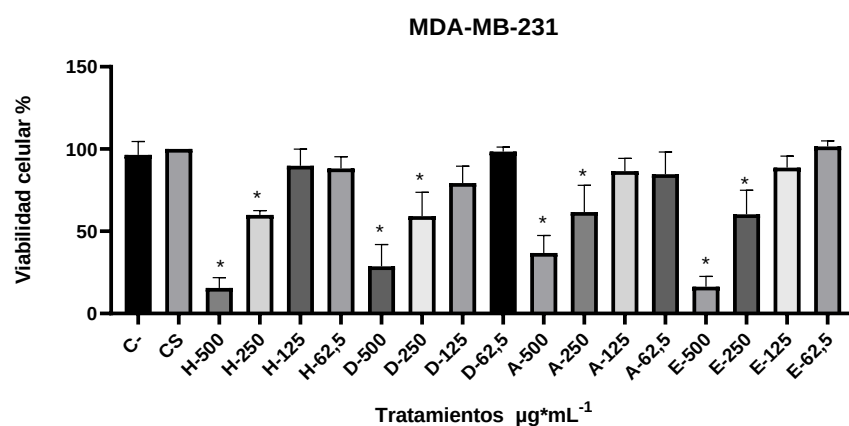


Figura N°16 Porcentaje de viabilidad de la línea MDA-MB-23. Tras el tratamiento con los extractos de la especie *M. caroliniana* a diferentes concentraciones ($500, 250, 125$ y $62.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (H= extracto *n*-hexano, D=, extracto diclorometano, A=extracto acetato de etilo, E= extracto etanol. (*)) ($p < 0,05$). Cada grafico representa el promedio de 3 experimentos con 4 réplicas cada uno (promedio $\pm$ desviación estándar).

En la figura 16 se puede observar que los valores de viabilidad de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 disminuyen conforme aumentan la concentración de los extractos de *Modiola caroliniana*. El extracto más activo fue el extracto de *n*-hexano (H) ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) reduciendo el porcentaje de viabilidad celular hasta el $15,6 \pm 6,2\%$. Todos los extractos utilizados presentan resultados similares reduciendo la viabilidad celular de forma significativa a las concentraciones de (500 y $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Porcentaje de viabilidad de la línea MCF-10A

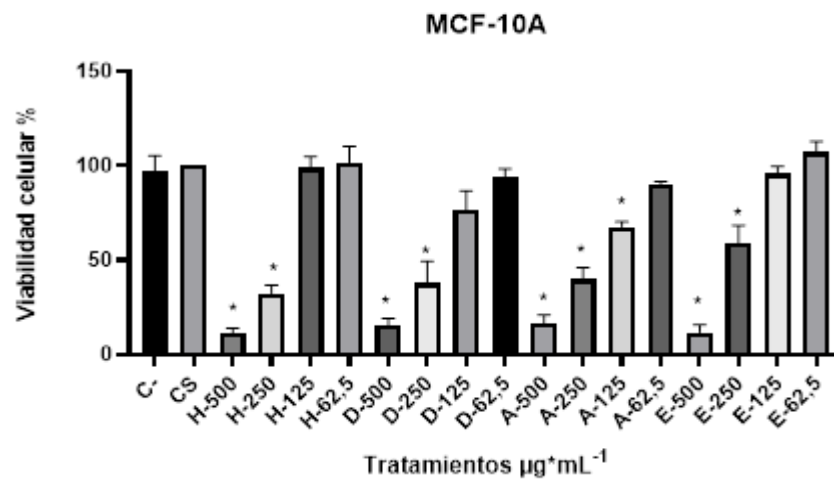


Figura N° 17 Porcentaje de viabilidad de la línea MCF-10A. Tras EL tratamiento con los extractos de la especie *M. caroliniana* a diferentes concentraciones (500, 250, 125 y 62.5 µg*mL⁻¹) (H= extracto *n*-hexano, D=, extracto Diclorometano, A=extracto acetato de etilo, E= extracto etanol. (*) ($p < 0,05$). Cada grafico representa el promedio de 3 experimentos con muestra (promedio $\pm$ desviación estándar).

La figura 17 indica que la viabilidad de la línea celular MCF-10A se reduce al aumentar la concentración de los extractos de *M. caroliniana* aplicados. El extracto más activo fue el extracto *n*-hexano a una concentración de 500 µg*mL⁻¹ disminuyendo la viabilidad celular hasta $11,0 \pm 2,97\%$ respecto del control solvente. Seguido del extracto etanol con una viabilidad celular de $(11,7 \pm 4,02\%)$. Los extractos utilizados presentan tendencias similares reduciendo la viabilidad celular a las concentraciones (500 y 250 µg*mL⁻¹).

Comparaciones de IC₅₀

A continuación, en la tabla N°2 se expresa el IC₅₀ de los tratamientos aplicados en las distintas líneas celulares estudiadas. Los datos obtenidos durante el análisis estadístico se realizaron mediante el programa Sigma Plot versión 12.0.

Tabla N°2: Tabla de IC₅₀. Comparaciones de los valores de los IC₅₀ obtenidos con respecto a la viabilidad celular para las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-10A.

	H	D	A	E
MCF-7	222,6 ± 19,9	236,2 ± 30,7	179,9 ± 11,7	237,0 ± 10,2
MDA-MB231	292,7 ± 23,9	200,7 ± 20,1	241,1 ± 22,3	266,7 ± 25,6
MCF-10	242,3 ± 0,7	203,8 ± 5,4	197,5 ± 20,7	265,8 ± 23,3

En la tabla N°2 se muestran los valores IC₅₀ obtenidos con respecto a la viabilidad celular. Destaca por sobre todos los extractos, el extracto de acetato de etilo (A), cuyos valores de IC₅₀ son más bajos para todas las líneas celulares excepto la línea MDA-MB-231.

Generación de ROS

Las ROS son moléculas químicamente reactivas que se forman como un subproducto natural del metabolismo normal del oxígeno en la célula. Tienen funciones importantes en la señalización y la homeostasis celular. En concentraciones moderadas están involucradas en varias vías de señalización, síntesis de estructuras celulares y defensa del huésped contra patógenos, pero a niveles altos se produce estrés oxidativo (EO), el cual puede generar daño a las moléculas estructurales de la célula (DNA, proteínas y lípidos), pudiendo generar incluso la muerte celular (91). Para analizar si la aplicación de los extractos induce cambios en la producción de ROS en las líneas celulares estudiadas (ver figuras N°15B, N°16 y N°17) se utilizó la sonda DCFH₂-DA, que en presencia de ROS y/o RNS es oxidada a un compuesto fluorescente analizado mediante citometría de flujo (ver Materiales y Métodos).

Porcentaje de ROS para MCF-7

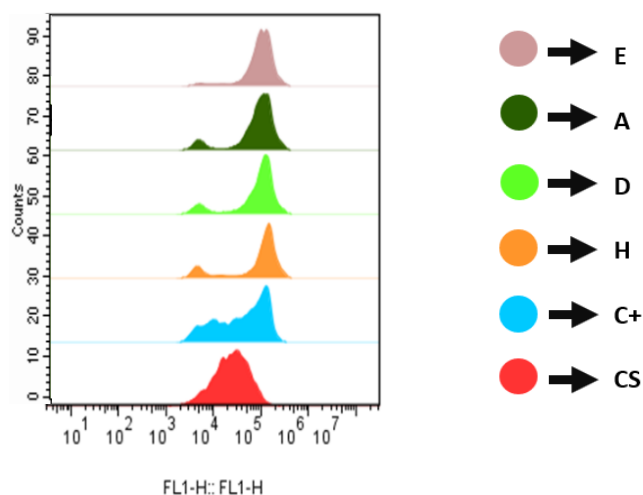


Figura N°18A Histograma de la generación de ROS en MCF-7. Histograma del ensayo de generación de ROS en la línea MCF-7. Se destaca en cada color para cada extracto las alzas en la cantidad de células detectadas con ROS. E= etanol, A= acetato de etilo, D= diclorometano, H= *n*-hexano, C+= control positivo, CS, control solvente, (220 µg*mL⁻¹).

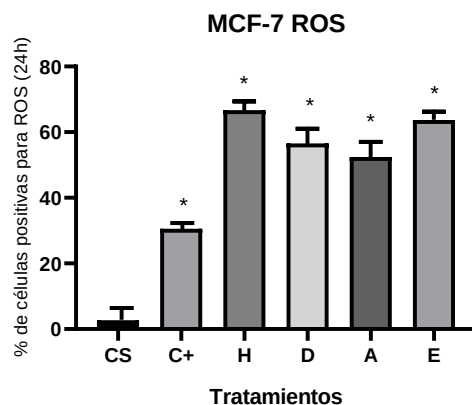


Figura N°18B Porcentaje de células positivas para ROS MCF-7.

Porcentaje de células positivas para ROS producido por los tratamientos aplicados durante 24h sobre la línea celular MCF-7. Se muestran los resultados obtenidos tras el tratamiento (24h) con los diferentes extractos ($220 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) por triplicado (promedio $\pm$ SD). CS: control solvente; C+: control positivo; H: *n*-hexano; D: diclorometano; A: acetato de etilo; E: etanol. El control positivo C+, se realizó con un potente productor de ROS llamado 2-amidinopropano (AAPH). Los asteriscos (*) representan diferencia significativa entre los resultados y el control solvente (CS).

La figura N°18B muestra la generación de ROS en la línea celular MCF-7. Los resultados indican que los extractos de *M. caroliniana* generan un incremento en el porcentaje de células positivas para ROS hoy de manera significativa en relación con el control solvente (CS). Además, se observa mayor cantidad de células positivas para ROS que en el control positivo (C+ AAPH) con todos los extractos utilizados. El tratamiento de *n*-hexano supera por más del doble el % de células positivas para ROS producido por control positivo (C+). Un resultado muy similar al que se obtiene con el extracto de etanol el cual también dobla dicho porcentaje. Por otra parte, los extractos de diclorometano y acetato de etilo casi doblan el porcentaje de células positivas para ROS obtenido para el control positivo (C+).

Porcentaje de ROS para MDA-MB-231

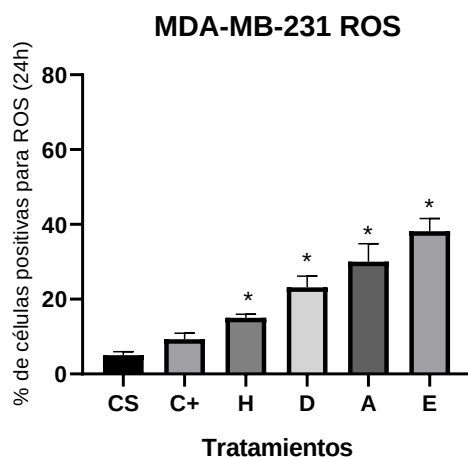


Figura N°19 Porcentaje de ROS para MDA-MB-231. El porcentaje de ROS producido por los tratamientos aplicados durante 24h sobre la línea celular MDA-MB-231. Se muestran los resultados obtenidos tras el tratamiento (24h) con los diferentes extractos ($220 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) por triplicado (promedio $\pm$ SD). CS: control solvente; C+: control positivo; H: *n*-hexano; D: diclorometano; A: acetato de etilo; E: etanol. El control positivo C+, se realizó con un potente productor de ROS llamado 2-amidinopropano (AAPH). Los asteriscos (*) representan diferencia significativa entre los resultados y el control solvente (CS).

La figura N°19 muestran que todos los tratamientos aplicados incrementan la generación de % ROS en la línea celular MDA-MB-231. Los resultados indican que los diferentes extractos de *M. caroliniana* generan mayor cantidad de ROS, que el C+ (AAPH). Todos los tratamientos sobrepasan a C+ siendo el extracto de etanol (E) el que induce mayor producción de ROS con un promedio de $(38,1 \pm 3,4)$. $P < 0,05$.

Porcentaje de ROS para MCF-10A

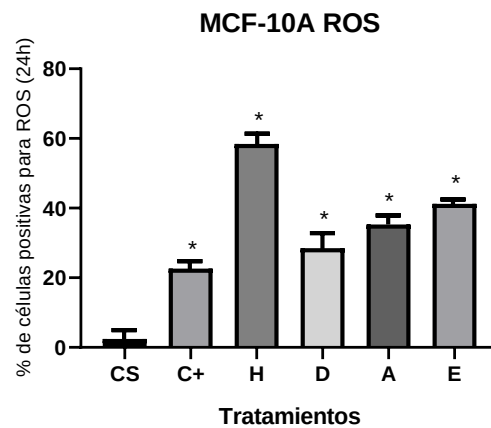


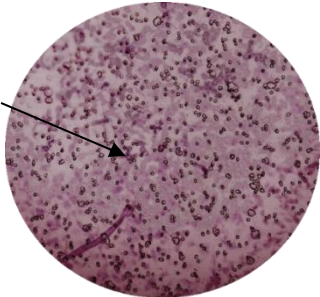
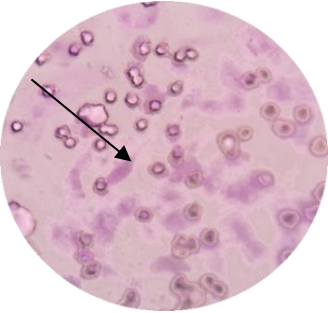
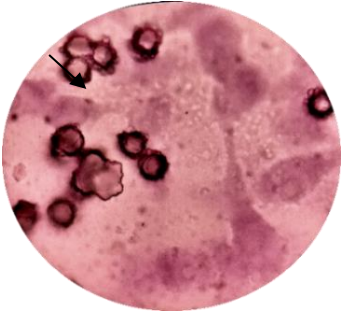
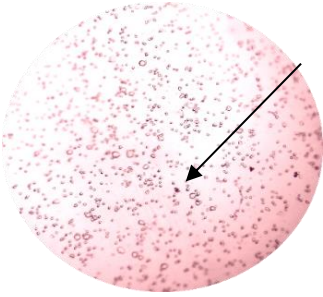
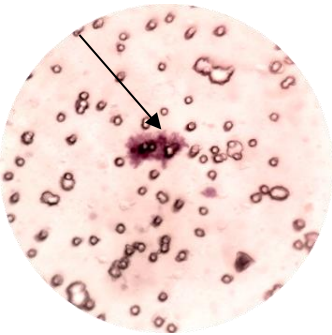
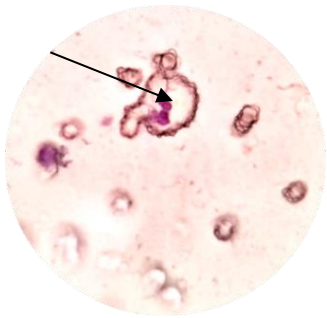
Figura N°20 Porcentaje de ROS para MCF-10A. Porcentaje de ROS producido por los tratamientos aplicados durante 24h sobre la línea celular MCF-10A. Se muestran los resultados obtenidos tras el tratamiento (24h) con los diferentes extractos ($220 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) por triplicado (promedio $\pm$ SD). CS: control solvente; C+: control positivo; H: *n*-hexano; D: diclorometano; A: acetato de etilo; E: etanol. El control positivo C+, se realizó con un potente productor de ROS llamado 2-amidinopropano (AAPH). Los asteriscos (*) representan diferencia significativa entre los resultados y el control solvente (CS).

En la figura N° 20 se muestra que todos los extractos de *M. caroliniana* generan un mayor porcentaje de ROS que el control positivo (AAPH) y que el control solvente. El tratamiento de *n*-hexano supera por casi el triple al porcentaje de ROS producido C+. etanol dobla el porcentaje de producción de ROS en comparación con el C+ al igual que *n*-hexano, dicloro y acetato finalmente sobrepasa por casi el doble en comparación con el C+.

Migración celular (ensayo de la cámara de Boyden o transwell)

Mediante el ensayo de la cámara de Boyden o transwell se estudió el efecto de los extractos de *Modiola caroliniana* sobre la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231, dado que esta línea celular tiene una gran capacidad migratoria. Tras los resultados obtenidos en los ensayos de ROS se quiso evaluar los efectos sobre la migración celular, dado que los ROS contribuyen a diferentes vías de señalización incluidas proliferación migración y metástasis en cáncer. Las células fueron expuestas a los distintos extractos de *M. caroliniana*. Se evaluó el efecto sobre la capacidad migratoria de las células pasadas las 24h de exposición con los extractos. en la figura N°18 se muestran fotografías representativas. La cuantificación de la figura N°21 se muestra en la tabla N°4 como el porcentaje de migración respecto el tratamiento control.

Objetivos

Extra-cto	10x	40x	100x
C			
	I	II	III
H			

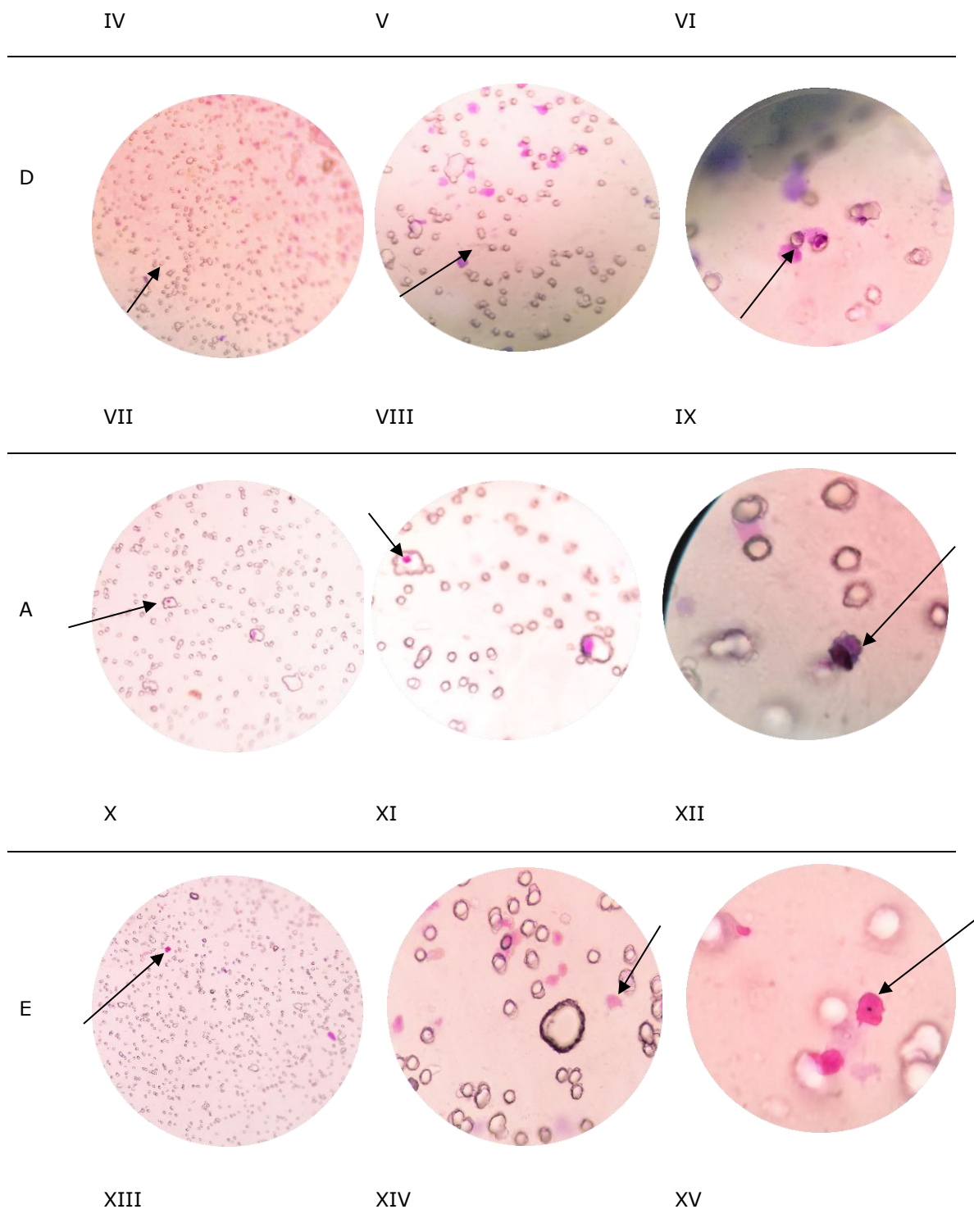


Figura N°21 Fotografías de las membranas transwell tras los tratamientos con los extractos de *M. caroliniana*. La columna 1 muestra las fotografías realizadas con el objetivo 10x, la columna 2 con el de 40x y la columna 3 con el objetivo 100X. Las flechas negras marcan las células teñidas con tonalidad rosácea- púrpura (tinción cristal violeta) que fueron capaces de migrar a través de los poros de la membrana que se distinguen en las imágenes. Se representan los diferentes tratamientos: C (control), H (*n*-hexano), D (diclorometano), A (acetato de etilo) y E (etanol). Cada fotografía esta enumera en números romanos desde la I hasta la XV.

En la figura N°21 se muestran imágenes representativas obtenidas tras los tratamientos con los diferentes extractos de *M. caroliniana* en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. Las imágenes control (C) muestran una alta proporción de células teñidas a los distintos aumentos utilizados. En 10X se observa el área con los poros de las membranas bastante definidos, mientras que las células son difíciles de percibir. En la imagen 40x las células migratorias son notorias, se ven de un color púrpura y se evidencia la diferencia entre estas y los poros de las membranas. En la imagen 100X, se observa un pequeño cumulo de células dentro de uno de los poros de la membrana. En el tratamiento con el extracto (D) se muestran una clara disminución en la cantidad de células por área en comparación con el control, las células en este caso también poseen una tinción púrpura-rosácea. Algo similar se observa tras la aplicación de los extractos de *n*-hexano, acetato de etilo y etanol de *M. caroliniana* a una concentración de $220 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. En general se observa en todos los tratamientos una reducción significativa, como indican los datos de la tabla N°3, que reflejan el porcentaje de células migradas en relación con el tratamiento control. En la cual se detalla la cuantificación de los resultados observados en la figura N°18 sobre la migración celular como el porcentaje migratorio (ver tabla N°3), en comparación con el tratamiento control.

Tabla N°3 Tabla porcentaje de células migradas en relación con el control. Tabla N°3 Cada dato representa la cuantificación de 40 imágenes (promedio +/- DE) vs el tratamiento control considerado como el 100%. Entre paréntesis se indica el número total de células contadas a partir del cual se calcularon los porcentajes de migración. $p < 0,05$.

Porcentaje de migración	
	Control (644) 100%
	H (201) 31,2%
	D (127) 19,7 %
	A (130) 20,1%
	E (143) 22,2 %

Discusión

Alrededor de 5000 son las especies vegetales que hasta hoy se conocen con usos terapéuticos en el mundo (92). Entre estas encontramos a una malvácea llamada *Modiola caroliniana* de la cual es conocida popularmente su uso como tratamiento para la inflamación (93). La inflamación sostenida en el tiempo es un precursor del cáncer, enfermedad crónica no trasmisible de alto índice de mortalidad en la población mundial (94), siendo el cáncer de mama el más diagnosticado a la fecha (32). Este dato nos guió a evaluar la actividad antioxidante, citotóxica y antimigratoria de los extractos de la especie *Modiola caroliniana* sobre líneas celulares de cáncer de mama.

Las plantas producen metabolitos primarios y secundarios, los primeros se relacionan con su crecimiento y generación de estructuras, (hojas tallos, semillas etc.) y los segundos cumplen funciones principalmente de supervivencia (como los flavonoides, fenoles, antocianinas, taninos, cumarinas, terpenos, entre otros) (95). Estos componentes poseen actividad biológica en células animales, como antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, etc. En este estudio evaluamos algunas de las actividades biológicas antes nombradas, para ello se realizaron extracciones con los solventes H, D, A y E, a partir de *M. caroliniana* puesto que estos solventes tienen la capacidad de extraer distintas moléculas de la planta según su polaridad (96).

Algunas fuentes de información describen que el género *Modiola* posee 13 especies (97), mientras que otras fuentes indican que este es un género monotípico que solo posee la especie *Modiola caroliniana* (L.) G. Don (98) y que los nombres asociados a especies del género en realidad son sinónimos de ella y se presentan en negrita en el siguiente párrafo, mientras que otros están pendientes por resolver si corresponden a sinónimos o a otras especies. (*Modiola decumbens*, ***Modiola eriocarpa***, *Modiola fissistipula*, ***Modiola geranioides***, ***Modiola lateritia***, *Modiola erecta*, *Modiola macropodia*, ***Modiola malvifolia***, ***Modiola multifida***, ***Modiola prostrata***, ***Modiola reptans***, ***Modiola urticifolia***) (99). Para esclarecer este asunto, nos quedaremos con que el género *Modiola* posee más de una especie, donde estas están aún en proceso de reconocimiento y validación de la comunidad botánica.

Modiola geranioides, es una especie validada por la comunidad científica y se encuentra documentada. Posee los siguientes sinónimos según las fuentes de información: *Modiolastrum gilliesii*, *Modiolastrum geranioides* y *Malva gilliesii*, (aceptada en 1841) (121, 122). Los estudios realizados de esta especie no existen análisis de fitoconstituyentes, citotoxicidad y/o antioxidantes.

Modiola lateritia, se presenta como una especie distinta a *M. caroliniana* aceptada por la comunidad botánica, denominada como sinónimo de *Modiolastrum lateritium* (Hook.) Krapov. Esta especie carece de estudios fitoquímicos, antioxidantes y/o de actividad biológica (102).

Modiola macropodia: la información es vaga con respecto a esta especie, pues no se especifica ni como otra especie ni como sinónimo de *M. caroliniana*. Tampoco hay ningún tipo de estudio sobre esta planta.

Modiola malvifolia, según fuentes de información esta especie distinta de *M. caroliniana* aceptada por la comunidad botánica (103) y también es conocida como *Modiolastrum malvifolium* (Griseb.) K. Schum. Es una especie que se le atribuye actividad analgésica utilizada comúnmente para mitigar el dolor de oídos (104). Un estudio realizado evaluó la capacidad antiinflamatoria de un extracto acuoso, la cual resultó ser baja en comparación con las otras especies evaluadas, *Araujia odorata* (Hook. & Arn.) Fontella & Goyder (Apocynaceae), *Schinus fasciculatus* (Griseb.) I.M. Johnston. var. *fasciculatus* (Anacardiaceae), *Jodina rhombifolia* (Hook. et Arn.) Reissek y (*Cervantesiaceae* y *Sphaeralcea bonariensis* (Cav.) Griseb. (Malvaceae) (105).

Con la finalidad de ampliar la información sobre *M. caroliniana*, se realizaron ensayos con los extractos de polaridad creciente obtenidos con los solventes H, D, A y E. Para analizar fitoconstituyentes, capacidad antioxidante, citotoxicidad, ROS y migración. En cuanto a *M. caroliniana* un estudio realizado por (Scheel,2011) y colaboradores (106), indican que mediante evaluaciones de distintas reacciones el extracto metanólico, presentó los siguientes flavonoides: metoxi-quercetina, quercetina hexosido-ramnosido, glucurónido de quercetina, derivados sulfatados de quercetina y derivados de apigenina. Mediante espectrofotometría, también encontramos presencia de flavonoides en los extractos estudiados, con mayor abundancia en A y D como era de esperar, puesto que en general los flavonoides son compuestos que se extraen a polaridad media con tendencia a mayor polaridad (107). En cuanto a fenoles en este mismo estudio se encuentra la presencia de ácido clorogénico en el extracto metanólico, mientras que los resultados de espectrofotometría indican la presencia de fenoles en todos los extractos sin diferencia significativa. A pesar de que según literatura, los solventes polares extraen mayor cantidad de fenoles (108). El estudio antes mencionado no muestra la presencia de antraquinonas, moléculas que si se encuentran presentes en extractos de *M. caroliniana* mediante la evaluación por espectrofotometría, donde se encuentra la mayor presencia en D y A, lo cual es coincidente con literatura descrita anteriormente ya que en la generalidad son estructuras apolares, pero pueden aumentar su polaridad dependiendo de los grupos funcionales que presenten, como OH o COOH, y estos interactuar con solventes de polaridad media (109). Además el estudio indica la presencia de otros componentes como saponinas, mucílagos, flavonoides, heterósidos cardiotónicos, heterósidos

con 2-desoxiazucres y mediante HPLC, se encuentran y flavonoides, ramnósido hexosido, EA sulfato glucurónico y hexosa ramnosa (110). Cabe mencionar que el estudio indicado solo hace el análisis en metanol, solvente levemente más polar que etanol, mientras que nuestro estudio realiza las evaluaciones en solventes de polaridad ascendente, H, D, A, E. Otro estudio reporta presencia de glicin betaina en altas cantidades en extracto metanólico, de *M. caroliniana* mediante la técnica CCF, RMN Y FAB, mientras que nuestros estudios fueron realizados por espectrofotometría y este compuesto no fue evaluado en nuestra investigación (111). Un tercer estudio indica que extractos acuosos de *M. caroliniana* presentan fenoles y flavonoides y estos son capaces de esparcirse en el suelo circundante de donde crece la planta y con esto disminuye la germinación y el crecimiento de plantas próximas, otorgándole ventajas por los recursos por sobre estas (112). Lo que nos podría dar una guía para comprender que la citotoxicidad de la especie está dada por estos compuestos presentes en ella.

La capacidad antioxidante es la facultad que poseen algunas moléculas para neutralizar el EO causado por RL los cuales se han asociado a envejecimiento y enfermedades como el cáncer (113). Los extractos vegetales contienen moléculas que pueden neutralizar el efecto de los RL y por consiguiente el EO en el cuerpo. Con la finalidad de comprender más minuciosamente los principios y propiedades antioxidantes de nuestras muestras de *M. caroliniana*, hemos sometido los extractos a un conjunto de ensayos como TRAP, FRAP y DPPH• (114). Y con estos resultados obtener nueva información para robustecer el conocimiento de la capacidad antioxidante de la especie.

Para TRAP estos resultados indican que el extracto E, presenta una mayor reacción con ABTS en comparación con el resto de los extractos evaluados. Es probable que este resultado este ligado a la mayor presencia de fenoles, flavonoides y antraquinonas de dicho extracto, como también se ha descrito en estudios anteriores (115).

Para FRAP, los resultados arrojan que la mayor actividad corresponde a D, lo que implica que moléculas de polaridad media son quienes posee la mayor capacidad reductora de Fe, lo que se podría asociar con presencia de fenoles, flavonoides y antraquinonas, presentes en mayor medida en este extracto. (116). Pero como se menciona anteriormente, el solvente D suele arrastrar a terpenoides, y está estudiado que algunos de ellos poseen la capacidad de formar quelatos con el Fe (117), lo que implicaría que estos terpenoides puedan estar impidiendo un mayor resultado de la actividad FRAP, y por lo tanto para dilucidar aquello, se proyecta la posibilidad de esclarecer los tipos de moléculas que se encuentran en este extracto (D) mediante técnicas más específicas.

Para el caso de DPPH•, los mejores resultados fueron los obtenidos con el extracto A (coincide con el mayor contenido de antraquinonas y flavonoides) y seguido de ello E, que presenta menor nivel de antraquinonas y flavonoides que los extractos de menor polaridad como D y A, lo que podría estar indicando es que estos compuestos y otros presentes en las muestras, actúan sinérgicamente o tienen una mejor potencia, que los compuestos presentes en los extractos más apolares. Un estudio del extracto metanólico de *M. caroliniana* indica que posee una baja actividad antioxidante con tan solo un 10% de acción en comparación con el control positivo ácido ascórbico (77). Los resultados de la presente investigación entregan datos similares para el extracto E (similar en polaridad con metanol) se obtiene una baja actividad antioxidante en comparación con los controles positivos y por lo tanto son coincidentes ambos resultados.

La metodología empleada para el análisis antioxidante de nuestros extractos incluye técnicas de transferencia de e- como es el ensayo FRAP y de transferencia de átomos H⁺ en el caso de TRAP. DPPH• por su parte se ha demostrado que mide la capacidad antioxidante por los dos mecanismos antes nombrados (120, 135). Por lo tanto, si establecemos relaciones de proporción de nuestros resultados obtenidos, TRAP es el experimento que arrojó los mejores resultados en cuanto a actividad antioxidante en comparación con sus controles positivos siendo el más alto índice antioxidante el extracto E. Por consiguiente, nos permitimos asociar que la mayor actividad antioxidante en los extractos de *M. caroliniana* ocurren por transferencia de H⁺. A este resultado se sigue DPPH• y en tercer lugar queda FRAP.

Se han establecido algunas relaciones entre las capacidades antioxidantes de especies vegetales y la citotoxicidad asociadas a algunas enfermedades como el cáncer (119). Es prudente destacar que aún la relación entre antioxidantes y el cáncer es compleja y todavía no está completamente entendida, algunos estudios han sugerido que la suplementación con antioxidantes puede tener un papel en la prevención del cáncer en ciertas poblaciones, mientras que en otras los antioxidantes pueden generar acción protectora en células sanas y cancerígenas (122).

El efecto citotóxico puede ser determinado mediante ensayos a partir de líneas celulares de humanos que han derivado de tejido tumorigénico y en que las células han experimentado una serie de cambios que les propician alteraciones de su ciclo celular, entre otras características. En el caso del control, se utilizan líneas celulares derivadas de tejidos normales que han sido inmortalizadas, lo que implica que no conservan todas las características propias del tejido original (84, 85). Los diseños experimentales incluyen estos dos tipos de líneas celulares, para poder establecer relaciones entre las actividades biológicas estudiadas y la selectividad en la aplicación

de los tratamientos, con la finalidad de establecer posibles dianas terapéuticas contra el cáncer (121). En relación con lo anterior, esta investigación evaluó la actividad citotóxica en las líneas de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y control MCF-10A.

Un estudio realizado el año 2018 con extractos de polaridad ascendente (H, D A y E) de la especie *M. caroliniana*, mostró efectos estimulantes de la proliferación y una nula actividad citotóxica en las líneas celulares de cáncer de páncreas e hígado, HEPG2 y HEP3B 2.1-7 respectivamente, y en la línea celular inmortalizada no tumoral PANC-1, a concentraciones de 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 µg/mL disueltos en DMSO (78). En contraste, las evaluaciones realizadas durante esta investigación en líneas de cáncer de mama demostraron que existe dosis dependencia respecto a la citotoxicidad sobre las líneas tumorales de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y línea no tumoral MCF-10A, en todos los extractos evaluados. La diferencia de los resultados obtenidos en ambas investigaciones podría darse por las concentraciones utilizadas y/o bien por el tipo de células en las que se evaluó la actividad de los extractos, este último parámetro no es aplicable a los extractos, ya que fueron realizados con los mismos solventes H, D, A y E.

MCF-7 con el extracto A con un IC_{50} (179,93 + 11,67) presenta la mayor citotoxicidad, para MDA-MB-231 es el extracto D el que generó mayor citotoxicidad con un IC_{50} (200,66 + 20,13) y para MCF-10A el extracto A con un IC_{50} (197,5 + 20,26). Nuestros resultados arrojan que no hay selectividad tras los tratamientos de *M. caroliniana* puesto que los IC_{50} son similares para las líneas tumorales como la no tumoral se presenta. Pese a los hallazgos de nuestra investigación, estudios previos demuestra que extractos de *M. caroliniana* no presentan toxicidad aguda al ser administrado por vía oral en ratones *Mus musculus* de la cepa Rockefeller, esto demostrado mediante el análisis toxicológico DL_{50} (77).

Para la línea MCF-7, los resultados arrojan que los mejores IC_{50} son para los extractos D y A, lo cual se puede asociar con la mayor concentración de antraquinonas presente en estos extractos. Ya que algunas de estas últimas se han caracterizado por tener algunas propiedades citotóxicas en las células tumorales y no tumorales, ejemplo de esto es la doxorrubicina, que es ampliamente utilizado en quimioterapias para matar células de forma no selectiva (122). Doxorrubicina pertenece a la familia de las antraciclinas del grupo de las antraquinonas.

Por lo general, los científicos se centran en investigar los efectos citotóxicos de compuestos fenólicos, debido a que ciertas variantes de estos compuestos han mostrado resultados significativos en cuanto a citotoxicidad (123). Nuestros estudio en este ámbito nos indican que la citotoxicidad más pronunciada se observa cuando los extractos contienen mayores proporciones de antraquinonas y flavonoides de polaridad media, (esto no lo excluye de presentar otras moléculas en el mismo extracto). Es importante destacar que el extracto A es los que contienen las mayores cantidades de estos compuestos junto con D (ver gráfico 10 y 11). Basándonos en nuestros experimentos, podemos establecer una relación entre la presencia de estos componentes y la actividad citotóxica observada. Esto se evidencia en los extractos H y E, donde también se encuentran presentes los compuestos mencionados, aunque en proporciones menores, H $222,6 \pm 199$ y E ($237,0 \pm 10,02$) exhiben valores de IC_{50} más elevados que y A ($179,9 \pm 11,7$), lo que refuerza aún más la asociación que hemos identificado.

Las ROS tienen la capacidad de inducir una amplia gama de respuestas celulares y pueden funcionar como mensajeros secundarios estimulando la supervivencia y/o muerte celular (143, 144). Y dependiendo del tipo, la concentración y de fitoconstituyente administrado, se pueden obtener efectos antioxidantes o prooxidantes , en las células tratadas(126). Algunos fitoconstituyentes han demostrado tener la capacidad de prevenir la formación de tumores y/o de frenar el desarrollo de estos influyendo en las vías de muerte celular (127). Los polifenoles pueden generar actividad antioxidante o aumentar ROS intracelular, influyendo en la eliminación selectiva de células cancerosas (130, 139). Este fenómeno resalta la complejidad de las interacciones celulares y subraya la importancia de comprender en profundidad los efectos de las ROS en el contexto de la señalización celular. En particular no se han encontrado investigaciones previas que analicen la producción de ROS de extractos de la especie *M. caroliniana*, lo que dificulta la comparación directa de los resultados que hemos obtenido en nuestro estudio.

Esta investigación arroja que a la concentración $200 \mu g \cdot mL^{-1}$, los extractos H, D, A y E generaron el aumento de ROS en diferentes proporciones en las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-10A, lo cual probablemente se deba a las diferencias de las interacciones moleculares de cada tipo de línea celular con cada extracto. El experimento de ROS sobre la línea MCF-7 obtuvo mayor % para todos los tratamientos salvo el CS, le sigue el experimento sobre la línea MCF-10A, con la misma salvedad que el anterior y el % inferior de producción de ROS fue para MDA-MB-231.

MCF-7 son las células que presentaron mayor % de células ROS positivas tras los tratamientos, predominando H doblando al control solvente AAPH resultados similares al resto de los extractos,

Teóricamente la extracción con el solvente H obtiene compuestos lipídicos, ceras, pigmentos y furanocumarinas, mientras que E extrae heterósidos en general (143). Como se mencionó antes, no hay estudios de esta especie con sus extractos de cualquier polaridad y su efecto sobre la producción de ROS. Pero según nuestros análisis encontramos presencia de fenoles, flavonoides y antraquinonas en diferentes concentraciones en los extractos H, D, A y E. Esto se puede deber a las distintas polaridades que pueden tener estos mismos compuestos por la interacción con distintos grupos funcionales. y por lo tanto puede verse afectada la solubilidad de los compuestos en los solventes. Por lo tanto, podemos deducir que este aumento de porcentaje de células con ROS está dado por fuente exógena a partir de la interacción entre los distintos componentes en nuestros extractos con las líneas celulares de mama evaluadas, ahora bien, es posible que este aumento de ROS sea dado por diferentes mecanismos.

En relación a MCF-7, en cuanto a fenoles y flavonoides son conocidos por tener actividades antioxidantes (130), y estas a su vez regulan a la baja los niveles de ROS intracelular (131). Lo que podría darnos una idea de porque tras la aplicación de los extractos D y A de *M. caroliniana* ocurre que los % para D y A de ROS sean menores que para H y E, justamente donde hay mayor presencia de los fitoconstituyentes fenólicos, flavonoides. Otra hipótesis que se baraja es que la presencia de algunos flavonoides de origen natural produce autofagia mediante el aumento de ROS, a través de la disfunción mitocondrial, lo cual nos podría dar una idea de cómo se llega a la baja en la viabilidad celular en las líneas de cáncer de mama estudiadas en esta investigación (132). Si bien muchas veces se relaciona a los compuestos antioxidantes con alzas en la viabilidad celular, en contextos específicos ciertos antioxidantes pueden presentar características citotóxicas, ya que se vuelven prooxidantes según su concentración y el contexto en el que se encuentren (133). Así que de esto emana la proyección de fraccionar los extractos y/o realizar una investigación de los fitoconstituyentes más exhaustiva, para comprender si las antraquinonas presentes están ejerciendo una actividad citotóxica en la línea MCF-7. Además de medir disfunción mitocondrial y muerte celular por autofagia para los extractos o fracciones de estos que comprenden mayor cantidad de flavonoides y así observar el comportamiento celular en la misma línea.

Para la línea MDA-MB-231, nuestros resultados indican que a medida que aumenta la polaridad de los extractos también aumenta la producción de ROS, esto puede deberse a que este aumento en la polaridad de los extractos incide en la interacción de sus componentes con la célula, produciéndose un aumento en el % de ROS, por fuente exógena. En teoría, esto puede deberse a que las moléculas liposolubles presentes en los extractos ejercen una menor actividad generadora de ROS, mientras que los componentes polares aumentan significativamente la producción de ROS

y o bien las células MDA-MB-231 poseen mayor cantidad de receptores para este tipo de moléculas, (las más polares) y que justamente su respuesta sea la mayor producción de ROS intracelular (134). Un estudio presenta una buena hipótesis en concordancia con nuestros resultados, ya que, tras los tratamientos H, D, A y E aplicados, aumenta el % de células positivas para ROS y aumenta la actividad de catalasa, pero al aumentar la concentración de los extractos se genera agotamiento de la enzima catalasa (CAT), lo que lleva a una mayor acumulación de ROS y deriva en EO (135). Pudiendo entonces ser esta la causa de muerte para las células tratadas con los extractos de *M. caroliniana*. Por lo tanto, se propone medir la presencia y actividad de la enzima catalasa tras los tratamientos de *M. caroliniana*. Para el caso de algunos fenoles de polaridad media como el carvacrol, se ha descrito que genera apoptosis y presenta actividad antiproliferativa alterando el potencial de membrana mitocondrial, incidiendo en la homeostasis del calcio y además generando EO y peroxidación lipídica. Por lo tanto, esta también podría ser una posibilidad para la actividad generada por nuestros extractos, puesto que en los cuatro extractos encontramos la presencia de fenoles que podrían estar ejerciendo la misma o muy parecida actividad (136). Por ello es por lo que se establece la posibilidad de agudizar la experimentación en cuanto a los componentes presentes en nuestros extractos a través de técnicas más especializadas como el HPLC.

En cuanto a nuestros resultados la producción de ROS para MCF-10A el extracto H destaca por sobre los otros extractos evaluados y a partir de D aumenta el % de ROS a medida que crece la polaridad. El mismo estudio de terapia oxidativa (137), indica que para la línea celular no tumoral MCF-10A tras el tratamiento oxidante aplicado, aumentan los niveles de radical superóxido intracelular, y en consecuencia aumenta la actividad del sistema antioxidante, además la cadena respiratoria no se ve alterada, es más, aumentaron los niveles de la actividad del complejo III (137). Por lo tanto, podríamos inferir que esta línea responde bien al aumento de ROS, esto podría implicar que el extracto H podría ser un potente prooxidante que induce que la célula entre en EO tras sus aplicación.

Entre los sellos distintivos del cáncer encontramos la proliferación descontrolada. Las células cancerosas suelen tener alteraciones en el ciclo celular, en la apoptosis (muerte celular regulada) y en los mecanismos de reparación del ADN, lo que les confiere en algunas ocasiones una mayor capacidad de supervivencia y resistencia a tratamientos convencionales contra el cáncer (138). Otro de los sellos distintivos del cáncer es que puede presentar capacidad de invasión y generar tumores secundarios mediante la migración y así hacer metástasis, diseminándose desde el sitio original del tumor a otros tejidos y órganos del cuerpo (139).

Dentro de la gama de organelos en la célula, las mitocondria presentan importante implicancia dentro de los procesos regulatorios de supervivencia y muerte celular (140), Ya que controlan la vía intrínseca apoptótica, mediante liberación de factores como citocromo c y activador de caspasas, asimismo se ven implicadas en otros tipos de muertes como la necroptosis y autofagia (141). Por lo tanto, nace una proyección para realizar experimentación de la liberación de citocromo c y poder dilucidar si la muerte celular inducida por nuestros extractos se relaciona con actividad mitocondrial apoptótica u otras muertes reguladas por la mitocondria.

En contextos normales estos organelos producen ROS intracelular los cuales participan en cascadas de señalización celular (142). El aumento de ROS vía exógena o endógena puede generar EO y mediante este provocar daño oxidativo aumentando finalmente la inestabilidad genómica en la célula y conduciendo así hacia enfermedades como el cáncer (143). La programación metabólica tumoral depende de los procesos de bioenergética que ocurren en la mitocondria y las funciones biosintéticas relacionadas a esta. Un contribuyente del deficiente funcionamiento asociado al cáncer es la sobre producción o sobreacumulación de ROS en la célula (146) . Así mismo en otras ocasiones el aumento de ROS parece tener efectos, antitumorales, ya sea incidiendo en la proliferación o en la estimulación de la apoptosis e inclusive afectando la migración tumoral (145).

En relación con nuestro estudio, nuestros datos indican que existe una baja en la viabilidad celular de la líneas MCF-7, MDA-MB-231 y MCF-10A tras la aplicación de los extractos de *Modiola caroliniana*. Este hecho podría estar relacionado con el alza de ROS en las células. Si bien no hemos determinado con precisión el mecanismo detrás de la reducción en la viabilidad celular en las líneas celulares, la evidencia sugiere que el aumento de ROS pueda desencadenar la muerte celular a través de la vía apoptótica (146). Esto resalta la necesidad de realizar investigaciones más específicas para comprender cómo es el impacto del aumento de ROS con respecto a la viabilidad celular y de este modo poder asociarlo con enfoques antitumorales. Para ello podría ser una diana de investigación analizar las vías de señalización que se activan en respuesta al aumento de ROS, identificando proteínas reguladoras y su modulación para potenciar efectos antitumorales. También podría ser necesario explorar con mayor detalle cómo es la regulación de ROS puede influir en las proliferación celular y la migración de células tumorales y junto con ello ver si los extractos de *M. caroliniana* tienen potencial para detener la propagación tumoral.

Por su parte la progresión de la metástasis está dada en cierta etapa por la capacidad migratoria que poseen algunas células cancerosas, y esta capacidad migratoria a su vez está relacionada con una familia de proteínas que influyen en la degradación de la matriz extracelular, entre otras funciones, estas proteínas son las MMP (metaloproteinasas de matriz).

La sobreexpresión de las MMP en cáncer de mama se asocia con la progresión del carcinoma en pruebas con ratones knock-out muestran que la proteína MMP3 está relacionada con la formación de nuevos tumores en glándula mamaria, tejido epitelial y en células estromales (147).

La MMP3 se relaciona con la degradación y remodelación de la MEC degradando una serie de constituyentes de esta al activar una cascada proteolítica asociada con las células de invasión. La sobreproducción de MMP3 ha implicado enfermedades del tejido conectivo, cómo artritis reumatoide osteoartritis y procesos de invasión y metástasis en cáncer (152, 153). Asimismo se ha demostrado que la presencia de MMP3 se ha relacionado con una mayor expresión células MDA-MB-231, el cual posee características migratorias en comparación con MCF-7 (no posee la expresión de MMP3) y tampoco actividad metastásica, por lo tanto es posible correlacionar la metástasis con la expresión de estas metaloproteinasas (150). De este modo la modulación de la expresión o de la degradación de estas proteínas exhibiría propiedades anti invasivas para cáncer de mama. Por lo tanto, al analizar nuestros resultados hubo una baja en la migración celular de la línea celular MDA-MB-231 luego de la exposición a los extractos y en consecuencia a lo anterior, una posibilidad que se baraja es que la baja en la actividad migratoria tras el tratamiento de los extractos de *Modiola caroliniana* sobre la línea celular de cáncer MDA-MB-231 afecte algunos de los niveles de regulación de la actividad catalítica de las MMP, por lo tanto puede ser que nuestros extractos generen algún cambio en la vía de señalización de la transcripción de MMP3.

Otra forma de regular la actividad de MMP es mediante los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de la matriz las TIMP, ya que se ha demostrado que estas funcionan como inhibidores al bloquear la capacidad de las MMP (151). Un estudio evaluó la subexpresión y sobreexpresión de TIMP-1 en la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 la cual se expresa en niveles moderados en esta línea celular. La eliminación de TIMP-1 no tuvo efecto detectable sobre la fisiología celular y la tumorigénesis, pero la sobreexpresión de TIMP-1 inhibió la invasión celular y generó cambio en la expresión genética in vitro (152). Por lo tanto, creemos que existe una posibilidad de que nuestros extractos pueden sobre expresar TIMP-1 y ser esta una de las causas de la baja en la migración en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231.

Es importante destacar que hay información contradictoria con respecto a TIMP, puesto que en algunos estudios relacionan cancers agresivos con la presencia de TIMP y se ha establecido que esto se debe al modelo de estudio, puesto que al parecer la actividad de TIMP se ve afectada en modelos in vivo y modelos in vitro (152) . Entonces la propuesta es medir, si los extractos inducen la sobreexpresión de TIMP-1, comprendiendo que estos puedan interactuar a diferentes niveles con las vías de señalización de la transcripción responsable de la regulación de TIMP-1, lo que podría

dar indicios de potenciales dianas terapéuticas.

En síntesis, esta investigación ha proporcionado una visión acerca del potencial terapéutico de los extractos de *Modiola caroliniana* en el contexto del cáncer de mama. Los resultados arrojados consisten en una disminución significativa de la viabilidad celular dosis/dependiente, presentando una baja selectividad con el control no tumoral. Además, este efecto lo hemos correlacionado con una significativa producción de ROS, lo que nos sugiere una posible implicación de estrés oxidativo como mecanismo subyacente que involucra la muerte celular o bien implicancias en la regulación del ciclo celular. Otro resultado arrojado tras esta investigación es la marcada reducción en la migración celular lo que subraya el potencial inhibitorio de los extractos de *M. caroliniana* para el contexto de la migración celular. Por su parte la caracterización de los extractos ha revelado bajos índices de antioxidantes y presenta fenoles, flavonoides y antraquinonas. Todos estos hallazgos respaldan hoy la hipótesis acerca de los efectos de *M. caroliniana* como fuente prometedora de agentes terapéuticos contra el cáncer de mama. No obstante para conocer el potencial real de los extractos de *M. caroliniana* es esencial realizar nuevas investigaciones adicionales que profundicen los mecanismos moleculares subyacentes y que exploren formas optimizadas para su aplicación clínica, por lo tanto este estudio presenta dianas beneficiosas sobre el conocimiento de la relación que existe entre los extractos de *M. caroliniana* y el cáncer de mama, para quienes deseen continuar con la investigación de terapias alternativas o coadyuvantes para el cáncer de mama.

Conclusiones

- Los extractos de *M. caroliniana* poseen fenoles, flavonoides y antraquinonas. Su mayor concentración se encontró en los extractos D y A. Para fenoles no presenta diferencia significativa, para flavonoides y antraquinonas, el contenido fue mayor en el extracto de D.
- Los extractos de *M. caroliniana* poseen baja capacidad antioxidante, para TRAP el extracto E obtiene los mejores resultados, pero no resultan significativos. Para FRAP el extracto D obtiene los mejores resultados, pero tampoco resultan significativos y DPPH el extracto A posee el mejor IC₅₀.
- Los extractos de *M. caroliniana* reducen la viabilidad celular en MCF-7, MDA-MB-231, MCF-10A. Sin diferencia significativa en los diferentes extractos H, A D, E. en relación dosis-dependencia, además no presentan selectividad.
- Los extractos de *M. caroliniana* aumentan la generación de ROS. Para MCF-7 todos los extractos aumentaron la producción de ROS, para MDA-MB-231 mientras aumenta la polaridad también aumentaba la generación de ROS. Para MCF-10A el extracto H destaca en la producción de ROS.
- Los extractos de *M. caroliniana*, generan disminución la migración celular en la línea celular MDA-MB-231. El extracto de D generó la mayor disminución del porcentaje de migración.

Bibliografía.

1. López MGH, Cedillo RFR, Raygoza NP, Solís MOV. Cáncer de mama en el hombre y factores socioculturales. waxapa. 14 de agosto de 2019;7(13):39-42.
2. García-Porrero JA, Hurlé JM, Padilla GB. Anatomía humana [Internet]. McGraw-Hill España; 2013 [citado 6 de enero de 2023]. Disponible en: <https://elibro.net/es/ereader/uvalparaiso/50188>
3. Creencias culturales y prácticas de alimentación complementaria en madres adolescentes con lactantes de 6 a 24 meses durante pandemia, Carabayllo-Lima [Internet]. [citado 6 de enero de 2023]. Disponible en: <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/90874>
4. Presas VY, Mastronardi LM, Saucedo S, Rojas Bilbao E. Mama ectópica en la región inguinal. Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia. 1 de abril de 2017;44(2):89-92.
5. Patología benigna de la mama - ClinicalKey [Internet]. [citado 6 de octubre de 2022]. Disponible en: https://www-clinicalkey-es.bibliotecadigital.uv.cl/#!/content/guides_techniques/52-s2.0-mt_fis_3026
6. REV. MED. ENERO 2009.indd.pdf [Internet]. [citado 18 de octubre de 2022]. Disponible en: http://www.clc.cl/Dev_CLC/media/Imagenes/PDF%20revista%20m%C3%A9dica/2009/1%20enero/10BENIGNAMAMA-10.pdf
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. marzo de 2011;144(5):646-74.
8. Hanahan y Weinberg - 2011 - Hallmarks of Cancer The Next Generation.pdf [Internet]. [citado 18 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2811%2900127-9>
9. Nourazarian AR, Kangari P, Salmaninejad A. Roles of Oxidative Stress in the Development and Progression of Breast Cancer. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 30 de junio de 2014;15(12):4745-51.
10. Xu et al. - 2019 - Apoptosis and apoptotic body disease message and .pdf [Internet]. [citado 20 de octubre de 2022]. Disponible en: https://watermark.silverchair.com/bsr-2018-0992.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAA9MwggPPBgkqhkiG9w0BBwagggPAMIIDvAIBADCCA7UGCSqGSIB3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMw_5rXN9S29bQ1uZiAgEQgIIDhiP9ZqogK-WXZ9HO9pIGDw-Pdm8HK9rjtP5ev2pihJvfDPY8aMPhyecMqlarYP7Pn4n1KQe4u3L_z65z_ATk-PnXafn6hlm9MDZpgRKfLQxpbexGH2EtzrZzTZJjUNTlz1NEWFoifXnFr2ZYtVCpdtRgWUVHOL0Ea3gDAmXpgxekj-i5gD3Qj1wSzN0Fj_eDcg0i-MWp7b59fYy9Xkf5mf4xeRBWW9WbZaS85I4Nk9QylaBgNY4gmLQv1mTYMA0wRgCwVRJAz-

QaI25nS11sfXUFHTkrH_bQASL6ehdP_d4qPAiVLbF76DVkBEF7u0d8Lsu7w-z4xvfia59woD-4gVM1p-gKaRHY7LB0xZqKb2o2ZYSeqr3Lebm7L8rJO0UkQ2O8iPwoAVrOp0aX8C_HSHWrosczRFxk6FAsVBJYJDq-J8ZyYAJbTjhxXqg5OCir2_u04C1_cF--

VdhNmaPiJmv5FkXdIkhbLEyMD8zWdOIbe7Zkk6uLgSPLAFSZYLZ2CQcylr-RyqRQ-f9ZiW0sp_oZooWfW5_zSYUnXy8hYf9bolxGBr21_IgnfG-h5Uda_T9hj4w6KtMFdz_xVUElqN-9E2wQMdHZoclz4TZcb5fl94uGhd5UJWRVEMgplxgtyj6RibVghDOJCRH6-aO9zrjqvg93hg36GdOEzoMFy36QSkphkSooyd-DLTMQX7mRF9Ri3oMF1-No_4exQUuq97dNAF8Vg8-

zBLAFrp7DglSbmk1FSITDeh5FuHmUgz9zogdd0VxTnee7qXmKmpw4KewPwuGO6nAlQIFhm1HRQoW3E2MNEtku_K7JnApEsrYp2g7kYVI6lcuIzNj_Lelf2J9KdHBPJdDf5RUhw7a1-cxR_CwOCvbTMSj6M-zwyI1MXDEQFSD7TI-_5526XhRxkPcA5ipEg0sfRmxpq5xpi3bpEcBxb-UK438yWhAQTwm9i1C1gyXU3zkzIA9jYoMcE-x554t0w9E4Kff6vWBv6Lj0UTjQRfmwA8k0GbGqkYcNZF6WZKH_h0nq1jGs7TQt6EPrCExZlbrRUfbETFKaSvd5oXu9woiJreZTzegJHGUKcmM4pVmewERN1I5H8fmql0sq_yHyIXlyPny1ZN6ukrq5Omgedp_sfOLA4YqKe27pyIAfxRy9VabHn9VC-ewjZKItkNR_KPltuD8o6ItBtsg9nY

11. Cristo AY. LA APOPTOSIS, UN PROCESO BÁSICO DE AUTODESTRUCCIÓN REGULADA. :30.
12. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. Bioscience Reports. 31 de enero de 2019;39(1):BSR20180992.
13. ¿Qué es el cáncer? - NCI [Internet]. 2007 [citado 18 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
14. Eccles SA, Welch DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. Lancet. 19 de mayo de 2007;369(9574):1742-57.
15. Massagué J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. Nature. enero de 2016;529(7586):298-306.
16. www.patologia.es/volumen42/vol42-num4/42-4n02.htm [Internet]. [citado 21 de octubre de 2022]. Disponible en: <http://www.patologia.es/volumen42/vol42-num4/42-4n02.htm>
17. González AG, Silva E, Montero S, Rodríguez DJ, Mansilla R, Villar JMN. Metástasis: un hito para el conocimiento, un reto para la ciencia. Revista Cubana de Medicina.
18. Ortega GM, Pardo JP, Sánchez GG, Carrillo KB, Ortega MM, González J, et al. Un vistazo a la morfología y dinámica de la mitocondria y a los sitios de producción de las especies reactivas de oxígeno. Rev Educ Bioquímica. 2021;40(3):111-27.
19. Breña y Carmona - TÍTULO Métodos Analíticos para la Determinación d.pdf [Internet]. [citado 9 de enero de 2023]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/54713/1/CRISTINA%20HUET%20BRE%C3%91A.pdf>
20. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA

damage response and apoptosis. *Cancer Lett.* 28 de mayo de 2013;332(2):237-48.

21. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:8416763.
22. Barja G. Commentary: Oxygen Radicals, A Failure Or A Success of Evolution? *Free Radical Research Communications.* 1 de enero de 1993;18(2):63-70.
23. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad [Internet]. [citado 8 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=79284>
24. Martínez EB. REGULACIÓN DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES BAJO CONDICIONES DE HIPOXIA.
25. Carvajal Carvajal C, Carvajal Carvajal C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica.* marzo de 2019;36(1):91-100.
26. Etchegaray-Armijo K, Bustos-Arriagada E, Etchegaray-Armijo K, Bustos-Arriagada E. Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo asociado al trastorno del espectro autista: Una revisión narrativa. *Revista chilena de nutrición.* febrero de 2022;49(1):117-23.
27. Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG, Halliwell B, Chang CJ, Kalyanaraman B, et al. Unraveling the Biological Roles of Reactive Oxygen Species. *Cell Metabolism.* 6 de abril de 2011;13(4):361-6.
28. Sarmiento-Salinas FL, Perez-Gonzalez A, Acosta-Casique A, Ix-Ballote A, Diaz A, Treviño S, et al. Reactive oxygen species: Role in carcinogenesis, cancer cell signaling and tumor progression. *Life Sciences.* 1 de noviembre de 2021;284:119942.
29. Nourazarian et al. - 2014 - Roles of Oxidative Stress in the Development and P.pdf [Internet]. [citado 22 de octubre de 2022]. Disponible en: https://pdfs.semanticscholar.org/8cbc/a95f0d7586244f0bc2fad5da4802d960cb67.pdf?_ga=2.76263250.690329998.1666476208-1817567795.1666476208
30. Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab.* 28 de noviembre de 2014;2:17.
31. González-Urbaneja I. Radicales libres: Algunas consideraciones clínicas. *Gaceta Médica de Caracas.* abril de 2006;114(2):91-8.
32. Cancer.Net [Internet]. 2012 [citado 18 de octubre de 2022]. Cáncer de mama - Estadísticas. Disponible en: <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-mama/estad%C3%ADsticas>
33. Snapshot [Internet]. [citado 18 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.net/es/tiposdec%C3%A1ncer/c%C3%A1ncerdemama/estad%C3%ADsticasmama/estad%C3%ADsticas>
34. Guerra Guerrero et al. - 2017 - Monitoring modifiable risk factors for breast canc.pdf

[Internet]. [citado 6 de enero de 2023]. Disponible en: <https://scielosp.org/pdf/rpsp/2017.v41/e80/en>

35. Castillo C del S, Cabrera MEC, Derio P. L, Gaete V. F, Cavada CH. G, Castillo C del S, et al. Resultados del tratamiento del cáncer de mama, Programa Nacional de Cáncer del Adulto. Revista médica de Chile. diciembre de 2017;145(12):1507-13.

36. Factores de riesgo asociados al cáncer de mama | Osorio Bazar | Revista Cubana de Medicina General Integral [Internet]. [citado 18 de octubre de 2022]. Disponible en: <http://www.revmgi.sld.cu/index.php/mgi/article/view/1147>

37. Durruthy LSP, Toirac R de JT, Hernández M de la CR, Fitz A de LT, Camejo YC, Madruga TG. Factores de Riesgo Reproductivo en pacientes con Cáncer de Mama. Archivos del Hospital Universitario «General Calixto García». 25 de abril de 2017;5(1):13-9.

38. Ginsburg O, Yip CH, Brooks A, Cabanes A, Caleffi M, Dunstan Yataco JA, et al. Breast cancer early detection: A phased approach to implementation. Cancer. 15 de mayo de 2020;126 Suppl 10:2379-93.

39. Cancer.Net [Internet]. 2017 [citado 23 de octubre de 2022]. Cáncer de mama metastásico - Estadísticas. Disponible en: <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-mama-metast%C3%A1sico/estad%C3%ADsticas>

40. Soto EC. Comunicación para la salud: aproximaciones epidemiológicas y socioculturales al cuerpo-enfermo de las mujeres con cáncer de mama. Revista de Comunicación de la SEECI. 13 de marzo de 2020;169-83.

41. 2019.01.23_PLAN-NACIONAL-DE-CANCER_web.pdf [Internet]. [citado 22 de octubre de 2022]. Disponible en: https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2019/01/2019.01.23_PLAN-NACIONAL-DE-CANCER_web.pdf

42. Departamento de Estadísticas e Información de Salud [Internet]. [citado 22 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://deis.minsal.cl/>

43. Defunciones y Mortalidad General - SAS® Visual Analytics [Internet]. [citado 22 de octubre de 2022]. Disponible en: https://informesdeis.minsal.cl/SASVisualAnalytics/?reportUri=%2Freports%2Freports%2F4013de47-a3c2-47b8-8547-075525e4f819§ionIndex=0&sso_guest=true&reportViewOnly=true&reportContextBar=false&sas-welcome=false

44. Yu J, Mu Q, Fung M, Xu X, Zhu L, Ho RJY. Challenges and opportunities in metastatic breast cancer treatments: Nano-drug combinations delivered preferentially to metastatic cells may enhance therapeutic response. Pharmacology & Therapeutics. 1 de agosto de 2022;236:108108.

45. Cancer statistics, 2019 - Siegel - 2019 - CA: A Cancer Journal for Clinicians - Wiley Online

- Library [Internet]. [citado 21 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21551>
46. Martín M, Herrero A, Echavarría I. El cáncer de mama. *Arbor*. 30 de junio de 2015;191(773):a234-a234.
47. Bazar NO. Factores de riesgo asociados al cáncer de mama. :13.
48. Bazar - Factores de riesgo asociados al cáncer de mama.pdf [Internet]. [citado 28 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubmedgenint/cmi-2020/cmi202i.pdf>
49. Amse NR, Nieto AB. Índice de estilos de vida y riesgo de presentar cáncer de mama en mujeres de Córdoba, Argentina 2008-2016 [Internet] [bachelorThesis]. 2017 [citado 28 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/4728>
50. Gómez BMB, Gómez DF, Estupiñán JG, Briceño RMR, Carrillo JJR, Castellanos A. PERCEPCIÓN Y CONOCIMIENTO DEL AUTOEXAMEN DE MAMA ANTES Y DESPUÉS DE UNA INTERVENCIÓN EDUCATIVA DE SALUD EN ADOLESCENTES. *REVISTA SALUD, HISTORIA Y SANIDAD*. 24 de julio de 2017;12(2):3-15.
51. 2018 - ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL.pdf [Internet]. [citado 28 de octubre de 2022]. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_nal.pdf
52. Recomendaciones de la Sociedad Americana Contra El Cáncer para la detección temprana del cáncer de seno [Internet]. [citado 28 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/pruebas-de-deteccion-y-deteccion-temprana-del-cancer-de-seno/guias-de-la-sociedad-americana-contra-el-cancer-para-la-deteccion-temprana-del-cancer-de-seno.html>
53. Baos MA. BASES DE LA MAMOGRAFIA. :14.
54. Tipos de tratamiento - NCI [Internet]. 2017 [citado 27 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>
55. S AL, S RO, V CM. *Caesalpinia spinosa*: EFECTO PROTECTOR FRENTE A RADIACIÓN UV EN LA LIPOPEROXIDACIÓN HEPÁTICA EN RATAS Y DETECCIÓN DE FITOCONSTITUYENTES. *REBIOL*. 30 de julio de 2020;40(1):13-20.
56. Ugaz OLS de. *Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales*. Pontificia Universidad Católica del Perú. Departamento de Ciencias; 2016.
57. Escorza - 2009 - LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL. BASES Y APLICACIONES.pdf [Internet]. [citado 4 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2009/reb093d.pdf>
58. 17811880.pdf [Internet]. [citado 9 de enero de 2023]. Disponible en:

- <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/2153/17811880.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
59. Estudio de la actividad antioxidante de las aguas .pdf [Internet]. [citado 9 de enero de 2023]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/38498/7/T37586.pdf>
60. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección [Internet]. [citado 4 de enero de 2023]. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-04622006000200010
61. Hernández Espinosa DR, Barrera Morín V, Briz Tena O, González Herrera EA, Laguna Maldonado KD, Jardínez Díaz AS, et al. El papel de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno en algunas enfermedades neurodegenerativas. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*. junio de 2019;62(3):6-19.
62. Estudio comparativo por gc-ms de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *lippia organoides* h.b.k., obtenidos por diferentes técnicas de extracción | *Scientia et Technica* [Internet]. [citado 5 de enero de 2023]. Disponible en: <https://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/5813>
63. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes [Internet]. [citado 5 de enero de 2023]. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0212-71992001000600010&script=sci_arttext&lng=pt
64. 24-CO_Ruiz_Medina_Marcos_Adrian.pdf [Internet]. [citado 29 de diciembre de 2022]. Disponible en: https://wp.ull.es/coesbiol/wp-content/uploads/sites/92/2022/03/24-CO_Ruiz_Medina_Marcos_Adrian.pdf
65. *Modiola caroliniana* - ficha informativa [Internet]. [citado 30 de diciembre de 2022]. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/malvaceae/modiola-caroliniana/fichas/ficha.htm>
66. Wilhelm de Mösbach y Aldunate - 1991 - *Botanica indígena de Chile*.pdf [Internet]. [citado 30 de diciembre de 2022]. Disponible en: <http://www.memoriachilena.gob.cl/archivos2/pdfs/MC0027380.pdf>
67. Santa_Cruz_1921.pdf [Internet]. [citado 10 de enero de 2023]. Disponible en: http://rchn.biologiachile.cl/pdfs/1921/1/Santa_Cruz_1921.pdf
68. Houghton PJ, Manby J. Medicinal plants of the Mapuche. *J Ethnopharmacol*. marzo de 1985;13(1):89-103.
69. ANATOMÍA FOLIAR DE HIERBAS TERRESTRES MEDICINALES QUE CRECEN EN LA REGIÓN RIOPLATENSE (BUENOS AIRES, ARGENTINA) on JSTOR [Internet]. [citado 30 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.jstor.org/stable/26413091>
70. Schmeda-Hirschmann G, Loyola JI, Sierra J, Retamal R, Rodríguez J. Hypotensive effect and enzyme inhibition activity of mapuche medicinal plant extracts. *Phytotherapy Research*.

1992;6(4):184-8.

71. Fuentes Parada N. Alien plant invasion in Chile - history, drivers, and risks [Internet] [Doctoral Thesis]. Universitäts- und Landesbibliothek Sachsen-Anhalt; 2009 [citado 30 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://opendata.uni-halle.de//handle/1981185920/6724>
72. Natusfera [Internet]. [citado 2 de enero de 2023]. Sanatodo (Modiola caroliniana). Disponible en: <https://spain.inaturalist.org/taxa/78087-Modiola-caroliniana>
73. Instituto de Botánica Darwinion [Internet]. [citado 1 de enero de 2023]. Disponible en: <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/DetalleEspecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=&especie=caroliniana&genero=Modiola&espcod=15410>
74. Flora Vascular - Toda la información detallada sobre la Flora Vascular | - Especie: Modiola caroliniana | BioScripts.net [Internet]. [citado 1 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.floravascular.com/index.php?spp=Modiola%20caroliniana>
75. fcc674e.pdf [Internet]. [citado 28 de diciembre de 2021]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2009/fcc674e/doc/fcc674e.pdf>
76. Imagina E. Radio Imagina. 2012 [citado 10 de enero de 2023]. SALUD// Gotas mapuches para el desánimo. Disponible en: <https://www.radioimagina.cl/2012/05/pila-pila-alternativa-natural-para-combatir-la-falta-de-animo/>
77. fcs315e.pdf [Internet]. [citado 6 de abril de 2022]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2011/fcs315e/doc/fcs315e.pdf>
78. Palacios et al. - 2018 - VI CONGRESO LATINOAMERICANO DE PLANTAS MEDICINALES.pdf [Internet]. [citado 10 de enero de 2023]. Disponible en: <http://solaplamed.org/wp-content/uploads/2019/01/MPC-1-1-4-2018-23-39.pdf>
79. Operaciones Básicas en el Laboratorio de Química. Extracción. Tipos de Extracciones [Internet]. [citado 10 de enero de 2023]. Disponible en: https://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_tip.html
80. Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P. [Standardization of propolis extract and identification of principal constituents]. J Pharm Belg. 1 de noviembre de 1994;49(6):462-8.
81. Nabiha B, Abdelfateh EO, Faten K, Paul WJ, Michel M, Moncef CM. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Laurus nobilis Floral Buds Essential Oil. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 1 de enero de 2009;12(6):694-702.
82. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology. 1 de enero de 1995;28(1):25-30.
83. Ficha de línea celular [Internet]. [citado 12 de enero de 2023]. Disponible en: <https://cic.ugr.es/servicios-y-unidades/ficha-Lineas-Celulares.php?codigo=48>
84. Ficha de línea Celular [Internet]. [citado 12 de enero de 2023]. Disponible en:

<https://cic.ugr.es/servicios-y-unidades/ficha-Lineas-Celulares.php?codigo=46>

85. Ficha de línea Celular [Internet]. [citado 12 de enero de 2023]. Disponible en: <https://cic.ugr.es/servicios-y-unidades/ficha-Lineas-Celulares.php?codigo=47>

86. Carrasco R. C, Ulloa V. V, Meneses S. S, Villena G. J. Citotoxicidad de ciclozonarona sobre líneas celulares de fibroblastos y de cáncer de próstata: Cytotoxicity of Cyclozaronone on fibroblasts and prostate cancer cellular lines. Revista ANACEM. diciembre de 2014;8(2):46-9.

87. Rothe G, Valet G. Flow Cytometric Analysis of Respiratory Burst Activity in Phagocytes With Hydroethidine and 2',7'-Dichlorofluorescein. Journal of Leukocyte Biology. 1990;47(5):440-8.

88. Leiva et al. - Equol and daidzein decrease migration, invasion an.pdf [Internet]. [citado 17 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/856/85638535008.pdf>

89. Moraga - 2014 - CARACTERIZACIÓN POLIFENÓLICA DE ORUJOS Y ESCOBAJOS.pdf [Internet]. [citado 10 de enero de 2023]. Disponible en: <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/147855/Cerda-%20Caracterizaci%C3%B3n%20polifen%C3%B3lica%20%282014%29.pdf?sequence=1>

90. García y Gutiérrez - VALESKA CUEVAS GONZÁLEZ.pdf [Internet]. [citado 24 de abril de 2023]. Disponible en: http://repositoriobibliotecas.uv.cl/bitstream/handle/uvscl/7644/Cuevas%20Gonz%C3%A1lez,%20Valeska_noaccesible_.pdf?sequence=1

91. Ortiz GG, Pacheco Moisés FP, Mireles-Ramírez M, Flores-Alvarado LJ, González-Usigli H, Sánchez-González VJ, et al. Oxidative Stress: Love and Hate History in Central Nervous System. Adv Protein Chem Struct Biol. 2017;108:1-31.

92. Berdonces DJL. Enciclopedia de fitoterapia y plantas medicinales. RBA Libros; 2019. 303 p.

93. Página:Memoria sobre las plantas medicinales de Chile.pdf/12 - Wikisource [Internet]. [citado 13 de julio de 2023]. Disponible en: https://es.wikisource.org/wiki/P%C3%A1gina:Memoria_sobre_las_plantas_medicinales_de_Chile.pdf/12

94. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 4 de marzo de 2011;144(5):646-74.

95. Guiance H. FLAVONOIDES: APLICACIONES MEDICINALES E INDUSTRIALES. 2019;

96. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. Journal of Food Engineering. agosto de 2013;117(4):426-36.

97. Índice Internacional de Nombres de Plantas [Internet]. [citado 3 de abril de 2023]. Disponible en: https://www.ipni.org/?f=f_generic%2Cf_familial%2Cf_infrac familial%2Cf_specific&sort=name_asc

&q=modiola

98. 03_060_06_Modiola.pdf [Internet]. [citado 6 de abril de 2023]. Disponible en: http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/03_060_06_Modiola.pdf
99. Resultados de la búsqueda — La lista de plantas [Internet]. [citado 21 de agosto de 2023]. Disponible en: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=modiola>
100. Cheek M, Mathew B. 431. MODIOLASTRUM GILLIESII: Malvaceae. Curtis's Botanical Magazine. 2001;18(4):214-8.
101. Sistema de Información de Biodiversidad [Internet]. [citado 5 de abril de 2023]. Modiolastrum gilliesii (-) | SIB, Parques Nacionales, Argentina. Disponible en: <https://sib.gob.ar/especies/modiolastrum-gilliesii>
102. Instituto de Botánica Darwinion [Internet]. [citado 5 de abril de 2023]. Disponible en: <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/DetalleEspecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=&especie=lateritium&genero=Modiolastrum&espcod=15425>
103. Instituto de Botánica Darwinion [Internet]. [citado 5 de abril de 2023]. Disponible en: <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/sinonimoespecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=&EspCod=15416&especie=malvifolia&genero=Modiola&SinGeneroDe=Modiolastrum&SinEspecieDe=malvifolium&sincod=15416>
104. Rondina - 2008 - Especies medicinales argentinas con potencial acti.pdf [Internet]. [citado 5 de abril de 2023]. Disponible en: <http://dominguezia.org/volumen/articulos/2414.pdf>
105. 34S09.pdf [Internet]. [citado 5 de abril de 2023]. Disponible en: <https://dominguezia.org/volumen/articulos/34S09.pdf>
106. fcs315e.pdf [Internet]. [citado 27 de enero de 2022]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2011/fcs315e/doc/fcs315e.pdf>
107. Cartaya O. Reseña bibliográfica FLAVONOIDES: CARACTERISTICAS QUÍMICAS Y APLICACIONES. Cultivos Tropicales. 31 de mayo de 2013;22(2):5-14.
108. Sebastián y Cesar - PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE ALCOHOLES, FENOL.pdf [Internet]. [citado 11 de mayo de 2023]. Disponible en: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/60016788/INFORME_7__PROPIEDADES_FISICAS_Y_QUIMICAS_DE_ALCOHOLES._FENOLES_Y_ESTERES20190715-121882-svcwoi-libre.pdf?1563231593=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DLab_Quimica_Organica_I_Informe_7_Caracte.pdf&Expires=1683841831&Signature=RL01c~oGpyfEuIMAm9UVSHIVKY88o1Wa6SN-xwEQAT3Aba7RqqnaQcECuX5LoS75CJuv1uWIXKpjNvdqH4ibJEWumchmNPOQiUbLtnEfKxmo1pvfIkzuhv4-hezi5ZeFGB5pkDkqzdo6Dv~XXEW631RVQlyf-wFMCKAyP9wuha~qWetQPaFOEQMYycX0SG2hAdGv2DIxAVg5-

gIogMJ9~3ZA9DXFSvutGYXFeCa0aP4dwX-

q7MS8npbHym9Vp69L5FMY1RM8HOdSk7vmhQI~v97Zk4LadZ8cTRrNtRgnvRKO7EnoSNdYkgQaUT
cCGAwTCKYh5Lx7TKBKMqthO1o80g__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

109. TESIS DE REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA-AQ-TENESACA_TITO.pdf [Internet]. [citado 13 de mayo de 2023]. Disponible en: https://dspace.ucacue.edu.ec/bitstream/ucacue/10026/1/TESIS%20DE%20REVISI%c3%93N%20BIBLIOGR%c3%81FICA-AQ-TENESACA_TITO.pdf
110. fcs315e.pdf [Internet]. [citado 5 de junio de 2023]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2011/fcs315e/doc/fcs315e.pdf>
111. Blunden G, Patel AV, Armstrong NJ, Gorham J. Betaine distribution in the Malvaceae. *Phytochemistry*. octubre de 2001;58(3):451-4.
112. 이희선. 국화잎아욱의 알레로파시 효과. Allelopathic Effects of *Modiola caroliniana* (L) G Don [Internet]. 2016 [citado 26 de agosto de 2023]; Disponible en: <https://oak.jejunu.ac.kr/handle/2020.oak/22017>
113. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov*. diciembre de 2013;12(12):931-47.
114. Ciz M, Čížová H, Denev P, Kratchanova M, Slavov A, Lojek A. Different methods for control and comparison of antioxidant properties of vegetables. *Food Control*. 1 de abril de 2010;21:518-23.
115. Leyton M, Mellado M, Jara C, Montenegro I, González S, Madrid A. Free radical-scavenging activity of sequential leaf extracts of *Embothrium coccineum*. *Open Life Sciences* [Internet]. 7 de mayo de 2015 [citado 15 de mayo de 2023];10(1). Disponible en: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/biol-2015-0027/html>
116. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 1 de febrero de 2001;72(2):145-71.
117. HJ S. Agentes quelantes del hierro para el tratamiento del paludismo.
118. Foti MC. Use and Abuse of the DPPH • Radical. *J Agric Food Chem*. 14 de octubre de 2015;63(40):8765-76.
119. Bogucka-Kocka A, Zidorn C, Kasprzycka M, Szymczak G, Szewczyk K. Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four *Kalanchoë* species. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 1 de mayo de 2018;25(4):622-30.
120. Llacuna L, Mach N. Papel de los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*. 1 de enero de 2012;16(1):16-24.
121. Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived

compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*. agosto de 2007;42(4):377-87.

122. TFG_LuciaFernandezAlvarez.pdf [Internet]. [citado 28 de agosto de 2023]. Disponible en: https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/63178/TFG_LuciaFernandezAlvarez.pdf?sequence=4&isAllowed=y

123. Koteswara Rao Y, Geethangili M, Fang SH, Tzeng YM. Antioxidant and cytotoxic activities of naturally occurring phenolic and related compounds: A comparative study. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 1 de octubre de 2007;45:1770-6.

124. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 1 de junio de 2011;82(4):513-23.

125. Fulda S. Modulation of Apoptosis by Natural Products for Cancer Therapy. *Planta Med*. agosto de 2010;76(11):1075-9.

126. Guija H, Troncoso L, Guija E. Propiedades prooxidantes del camu camu (*Myrciaria dubia*). *Anales de la Facultad de Medicina*. diciembre de 2005;66(4):261-8.

127. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 10 de marzo de 2006;160(1):1-40.

128. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. junio de 2011;82(4):513-23.

129. Tafani M, Sansone L, Limana F, Arcangeli T, De Santis E, Polese M, et al. The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:3907147.

130. Valenzuela GM, Cravzov AL, Soro AS, Tauguinás AL, Giménez MC, Gruszycki MR. Relación entre actividad antioxidante y contenido de fenoles y flavonoides totales en semillas de *Cucurbita* spp. 2014;30.

131. Espinal et al. - LA GUAYABA, FUENTE DE FENOLES CON ACTIVIDAD ANTIOX.pdf [Internet]. [citado 28 de agosto de 2023]. Disponible en: https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/19626/64783_60365.pdf?sequence=1

132. Jiang K, Wang W, Jin X, Wang Z, Ji Z, Meng G. Silibinin, a natural flavonoid, induces autophagy via ROS-dependent mitochondrial dysfunction and loss of ATP involving BNIP3 in human MCF7 breast cancer cells. *Oncology Reports*. 1 de junio de 2015;33(6):2711-8.

133. Therapeia63.pdf [Internet]. [citado 14 de julio de 2023]. Disponible en: <https://revistatherapeia.com/wp-content/uploads/2020/07/Therapeia63.pdf#page=33>

134. xi-simposio-argentino-xiv-simposio-latinoamericano-de-farmacobo_BqnCQCb.pdf [Internet]. [citado 29 de diciembre de 2021]. Disponible en: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/09/913192/xi-simposio-argentino-xiv-simposio-latinoamericano-de-farmacobo_BqnCQCb.pdf
135. Gutiérrez-Martínez PB, Torres-Morán MI, Romero-Puertas MC, Casas-Solís J, Zarazúa-Villaseñor P, Sandoval-Pinto E, et al. Evaluación de enzimas antioxidantes en hojas y raíces de plantas *Phaseolus vulgaris* bajo estrés de cadmio. *Biotecnia*. 2020;22(2):110-8.
136. Lim W, Ham J, Bazer FW, Song G. Carvacrol induces mitochondria-mediated apoptosis via disruption of calcium homeostasis in human choriocarcinoma cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2019;234(2):1803-15.
137. Díaz-Parrado E. Terapia oxidativa antitumoral en líneas celulares humanas de cáncer de mama [Internet] [<http://purl.org/dc/dcmitype/Text>]. Universidad de Sevilla; 2013 [citado 24 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=135961>
138. Morana O, Wood W, Gregory CD. The Apoptosis Paradox in Cancer. *Int J Mol Sci*. 25 de enero de 2022;23(3):1328.
139. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Sig Transduct Target Ther*. 12 de marzo de 2020;5(1):1-17.
140. Olvera Sánchez S, Gómez Chang E, Flores Herrera O, Martínez Montes F. Las mitocondrias: sus funciones, las relaciones con otros organelos, la supervivencia celular y la medicina mitocondrial. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2023;26(0):1-11.
141. Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. febrero de 2020;21(2):85-100.
142. Bouchez C, Devin A. Mitochondrial Biogenesis and Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS): A Complex Relationship Regulated by the cAMP/PKA Signaling Pathway. *Cells*. abril de 2019;8(4):287.
143. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*. 28 de febrero de 2017;387:95-105.
144. Yang Y, Karakhanova S, Hartwig W, D'Haese JG, Philippov PP, Werner J, et al. Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy: ANTIOXIDANTS FOR ANTICANCER THERAPY. *J Cell Physiol*. diciembre de 2016;231(12):2570-81.
145. Oliveira RD, Celeiro SP, Barbosa-Matos C, Freitas AS, Cardoso SM, Viana-Pereira M, et al. Portuguese Propolis Antitumoral Activity in Melanoma Involves ROS Production and Induction of Apoptosis. *Molecules*. enero de 2022;27(11):3533.
146. Xuan H, Li Z, Yan H, Sang Q, Wang K, He Q, et al. Antitumor Activity of Chinese Propolis in Human Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-231 Cells. *Evidence-Based Complementary and*

Alternative Medicine. 22 de mayo de 2014;2014:e280120.

147. Boonrao M, Yodkeeree S, Ampasavate C, Anuchapreeda S, Limtrakul P. The inhibitory effect of turmeric curcuminoids on matrix metalloproteinase-3 secretion in human invasive breast carcinoma cells. Arch Pharm Res. 1 de julio de 2010;33(7):989-98.

148. Participación de las metaloproteinasas de matriz extracelular en la EPOC [Internet]. [citado 12 de julio de 2023]. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0028-37462014000200005

149. Mehner C, Miller E, Nassar A, Bamlet WR, Radisky ES, Radisky DC. Tumor cell expression of MMP3 as a prognostic factor for poor survival in pancreatic, pulmonary, and mammary carcinoma. Genes Cancer. noviembre de 2015;6(11-12):480-9.

150. Boonrao M, Yodkeeree S, Ampasavate C, Anuchapreeda S, Limtrakul P. The inhibitory effect of turmeric curcuminoids on matrix metalloproteinase-3 secretion in human invasive breast carcinoma cells. Arch Pharm Res. 1 de julio de 2010;33(7):989-98.

151. Análisis comparativo de la expresión de metaloproteasas (MMP-2, MMP-9, MMP-11 y MMP-13) y del inhibidor tisular de la metaloproteasa 3 (TIMP-3) entre las biopsias previas negativas y las prostatectomías radicales - ScienceDirect [Internet]. [citado 17 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0210480619301925>

152. Bigelow RLH, Williams BJ, Carroll JL, Daves LK, Cardelli JA. TIMP-1 overexpression promotes tumorigenesis of MDA-MB-231 breast cancer cells and alters expression of a subset of cancer promoting genes in vivo distinct from those observed in vitro. Breast Cancer Res Treat. 1 de septiembre de 2009;117(1):31-44.