



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE MEDICINA

INFORME DE INVESTIGACIÓN SOBRE:

“EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS BAX Y BCL2 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA *IN VITRO* TRATADAS CON *AMARANTHUS HIPOCHONDRIACUS*”.

Requisito previo para optar por el Título de Médico:

Autora: Pérez Carrasco, María Cristina

Tutor: Dr. Esp. Josué Acosta Acosta

Ambato – Ecuador

Octubre, 2020

APROBACIÓN DEL TUTOR

Como Tutor del Proyecto de Investigación con el tema: **“EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS BAX Y BCL2 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA *IN VITRO* TRATADAS CON *AMARANTHUS HIPOCHONDRIACUS*”**, de María Cristina Pérez Carrasco, estudiante de la Carrera de Medicina; considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del jurado examinador, designado por el H. Consejo de la Facultad Ciencias de la Salud.

Ambato, Octubre 2020

EL TUTOR



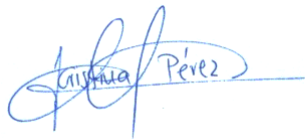
Dr.Esp. Josué Acosta Acosta

AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO

Los criterios emitidos en el presente trabajo de investigación “**EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS BAX Y BCL2 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA *IN VITRO* TRATADAS CON *AMARANTHUS HIPOCHONDRIACUS***” como también los contenidos, ideas, análisis y conclusiones son de responsabilidad de mi persona, como autora de este trabajo de grado.

Ambato, Octubre 2020

LA AUTORA



Pérez Carrasco, María Cristina

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato para que haga de este proyecto de investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi proyecto de investigación, con fines de expansión pública, aprobando la reproducción de este Proyecto de Investigación, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta producción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autora

Ambato, Octubre 2020

LA AUTORA



Pérez Carrasco, María Cristina

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Los miembros del Tribunal de Grado aprueban el Informe del Proyecto de Investigación, sobre el tema: **“EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS BAX Y BCL2 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA *IN VITRO* TRATADAS CON *AMARANTHUS HIPOCHONDRIACUS*”**; de María Cristina Pérez Carrasco, estudiante de la Carrera de Medicina.

Ambato, Octubre 2020

Para su constancia firman

PRESIDENTE/A

1er Vocal

2 do Vocal

DEDICATORIA

Se la dedico a Dios, al forjador de mi camino, a mi padre celestial, el que me acompaña y siempre me levanta de mi continuo tropiezo.

A todas las personas que contribuyeron positivamente para la consolidación del presente documento de aporte médico - científico.

PÉREZ CARRASCO, MARÍA CRISTINA

AGRADECIMIENTO

Mi gratitud a Dios, porque en cada paso dado esta conmigo, por llenarme de fortaleza e iluminar mi mente.

A todas las autoridades y personal que forman parte de la Universidad Técnica de Ambato, por confiar en mí, abrirme las puertas y permitirme realizar todo el proceso investigativo dentro de este establecimiento educativo.

A la Dra. Yenddy Carrero muchas gracias, sin duda un aporte invaluable, por brindarme su tiempo, colaboración, dedicación para que sea posible concluir con este trabajo. Las ideas siempre enmarcadas en su orientación han sido claves para realizar un buen trabajo.

Al Dr. Josué Acosta, por darme su confianza y valiosa ayuda para llegar culminar este estudio de la mejor manera, por sus conocimientos impartidos y su labor.

Phd. Alberto Bustillos y Dra. Esp. Vivian González quienes con la enseñanza de sus valiosos conocimientos han contribuido en mi crecimiento personal y profesional, gracias a cada una de ustedes por su amistad, paciencia, dedicación y apoyo incondicional.

A mis padres y hermana por darme la vida, una maravillosa formación, por su ternura y todo su amor y por contagiarme de sus mayores fortalezas.

PÉREZ CARRASCO, MARÍA CRISTINA

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO.....	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR.....	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICES	viii
RESUMEN.....	xiii
SUMMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
MARCO TEÓRICO	3
1.1.1. CONTEXTUALIZACIÓN.....	3
1.1.2 JUSTIFICACIÓN.....	3
1.1.3 ESTADO DEL ARTE.....	5
1.1.4. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICO – CIENTÍFICO.....	7
1.1.5. VARIABLE INDEPENDIENTE:.....	7
1.1.5.1. Generalidades del amaranto	7
1.1.5.2. Propiedades	8
1.1.5.3. Variedades de Amaranto	8
1.1.6. VARIABLE DEPENDIENTE:	10
1.1.6.1. ANATOMÍA MAMARIA- CÁNCER MAMARIO	10
1.1.6.2. EPIDEMIOLOGÍA	11
1.1.6.3.1. EDAD.....	12
1.1.6.3.2. SEXO	12
1.1.6.3.3. ENVEJECIMIENTO.....	13
1.1.6.3.4. GENÉTICOS.....	13
1.1.6.3.5. FAMILIARES.....	13
1.1.6.3.6. MENARQUIA Y CICLO MENSTRUAL	13

1.1.6.3.7. PARTOS	14
1.1.6.3.8. LACTANCIA.....	14
1.1.6.3.9. MENOPAUSIA.....	14
1.1.6.3.10. HORMONAS ENDÓGENAS	14
1.1.6.3.11. ANTICONCEPTIVOS ORALES	15
1.1.6.3.12. TERAPIA HORMONAL DE REEMPLAZO.....	15
1.1.6.3.13. ALCOHOL Y TABACO	17
1.1.6.4. Signos y Síntomas.....	18
1.1.6.5. Factores pronósticos moleculares relacionados con la invasión y metástasis.....	18
Crecimiento	19
Vascularización del tumor (angiogénesis)	19
Separación de las células del tumor e intravasación	20
Extravasación	21
Migración e invasión.....	21
1.1.6.6. Proceso de apoptosis	22
1.1.6.7. Tipos de cáncer de mama	23
1.1.6.8. Estadificación.....	24
1.1.6.9. El BI-RADS	25
1.1.6.10. Protocolo diagnóstico.....	27
1.1.6.11. Abordaje diagnóstico y terapéutico de los signos clínicos en patología mamaria: 28	
<input type="checkbox"/> Nódulos.-	28
<input type="checkbox"/> Quistes.....	28
<input type="checkbox"/> Masas sólidas.-	29
<input type="checkbox"/> Nodularidad asimétrica.-	29
<input type="checkbox"/> Telorrea.-	29
<input type="checkbox"/> Eczema:	30
<input type="checkbox"/> Infección local. -.....	30
1.1.6.12. Manejo terapéutico.....	31
1.1.6.13. Criterios para cirugía de mama	32
1.2.1. OBJETIVO GENERAL:	34
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	34
CAPÍTULO II	35
METODOLOGÍA	35
Materiales y Equipos.....	36

2.4.1.	Recolección de tallos y hojas de la planta	37
2.4.2.	Preparación de los extractos:	37
2.4.3.	Liofilización:	37
2.4.4	Células MCF-7 son descongeladas. -	37
2.4.5	Cultivo celular.....	37
2.4.6.	Cuantificación de proteínas	38
2.4.7.	Conteo celular y ensayo MTT	39
2.4.8.	Adición del extracto.	39
2.4.9.	Extracción y cuantificación de ARN.....	41
2.5.	Cuantificación y Determinación de la Pureza del ARN extraído:.....	42
2.5.1.	Mediante qRT-PCR expresión de los genes BAX Y BCL2.....	42
2.5.2.	Real time para BAX Y BCL2.-	43
2.5.3.	Diseño experimental.....	43
CAPÍTULO III.....		45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		45
3.1.	RESULTADOS.....	45
3.2.	DISCUSIÓN	49
CAPÍTULO IV.....		51
4.1.	CONCLUSIONES	51
4.2.	RECOMENDACIONES	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación del amaranto con distintas hortalizas en cien gramos de hojas.....	9
Tabla 2. Comparación de las semillas del A. hypochondriacus con arroz, trigo, maíz, avena	9
Tabla 3. Porcentaje de presentación de cáncer por sexo:	11
Tabla 4.-Estatificación del cáncer propuesto por la UICC (Unión internacional para el control del cáncer).....	24
Tabla 5.- BI-RADS léxico mamográfico.....	25
Tabla 6.- BI-RADS (Breast Imaging Report and Database System), léxico ecográfico.....	25
Tabla 7.- Categorías de evaluación BI-RADS.....	26
Tabla 8.- Conducta a seguir según el resultado de BI-RADS	27
Tabla 9.- Criterios de remisión y no remisión a cirugía de mama.....	32
Tabla 10.-Recursos	35
Tabla 11.-Materiales, Equipos y Reactivos utilizados en el trabajo de investigación.....	36
Tabla 12.- Cadena de los primer empleados.....	42
Tabla 13. Cuantificación de ARN	46
Tabla 14. Ct obtenidos de (técnica empleada) para BAX	47
Tabla 15. Ct obtenidos de (técnica empleada) para Bcl-2.....	47
Tabla 16. Anexo 1	52

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1.- Anatomía de la mama.....	10
Imagen 2.- Curva que permite obtener la concentración de proteínas a través del método de Bradford.....	38
Imagen 3.- Cámara de Neubauer	39
Imagen 4: Temperaturas necesarias para la amplificación de las proteínas BAX Y BCL2	43
Imagen 5.- Ensayo de Citotoxicidad.....	45
Imagen 6 y 7.- Expresión del gen pro-apoptótico Bax y del gen anti-apoptótico Bcl-2 con el método de cuantificación relativa $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ y el test de Tukey-Kramer	48

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE MEDICINA

“EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS BAX Y BCL2 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA *IN VITRO* TRATADAS CON *AMARANTHUS HIPOCHONDRICUS*”.

Autora: Pérez Carrasco, María Cristina

Tutor: Dr.Esp. Josué Acosta Acosta

Fecha: Octubre, 2020

RESUMEN

Introducción. – El cáncer de mama es una enfermedad sistémica, multifactorial que se produce por una proliferación maligna, acelerada, desordenada de las células con genes mutados, situación que por su alta incidencia y mortalidad se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial. En el año 2017 según el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC); el cáncer de mama se encuentra en el onceavo lugar dentro de las causas principales de muerte en el sexo femenino. Entre los años 2012 y el 2017; el 99,3 por ciento de las defunciones fueron del sexo femenino; en el año 2017 fallecieron 670 mujeres con diagnóstico de cáncer de mama y 3 hombres; representando una tasa de mortalidad del 3,99 por cada 100.000 ecuatorianos. Son considerables las desventajas causadas con la quimioterapia, radioterapia, generando efectos secundarios y colaterales que pueden o no llegar a presentarse en el paciente, motivo por el cual numerosas investigaciones se centran en la búsqueda de alternativas de tratamiento como el uso beneficioso de las plantas medicinales. Ecuador al ser un país megadiverso; es posible encontrar especies naturales con múltiples beneficios y propiedades; las cuales pueden aportar a estudios para la búsqueda de posibles tratamientos contra el cáncer.

Objetivo: Determinar la expresión de BAX Y BCL2 en células MCF-7 tratadas con extracto de *Amaranthus hypochondriacus*.

Metodología: En el presente trabajo se investigó los efectos en células de cáncer de mama (MCF-7), tratadas con extracto de *Amaranthus hypochondriacus* y se determinó la expresión de proteínas implicadas en la apoptosis por q RT-PCR.

Resultados: La expresión de BAX, fue superior en las células MCF-7 tratadas con *Amaranthus hypochondriacus*, mientras que la expresión de BCL-2 tuvo un comportamiento similar al grupo control. En ambos casos no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas

Conclusión: La dosis óptima de 1,451 microlitros de extracto de *Amaranthus hypochondriacus* puede llegar a favorecer la apoptosis en la línea celular de cáncer de mama, por lo tanto, podía ampliarse su estudio como un posible coadyuvante en el tratamiento.

Recomendación: Realizar más análisis cuantitativos, donde se investigue la expresión de las proteínas posterior a la exposición con el extracto de *Amaranthus hypochondriacus*, además de investigar otros productos naturales con el único fin de una búsqueda de posibles alternativas para el tratamiento contra el cáncer.

PALABRAS CLAVES: CÁNCER DE MAMA, APOPTOSIS, AMARANTHUS HYPOCHONDRICUS, CÉLULAS MCF-7, EXTRACTOS DE PLANTAS.

TECHNICAL UNIVERSITY OF AMBATO

FACULTY OF HEALTH SCIENCES

MEDICAL CAREER

"EXPRESSION OF BAX AND BCL2 PROTEINS IN BREAST CANCER CELLS *IN VITRO* TREATED WITH AMARANTHUS HIPOCHONDRIACUS"

Author: Pérez Carrasco, María Cristina

Tutor: Dr.Esp. Josué Acosta Acosta

Date: October, 2020

SUMMARY

Introduction: Breast cancer is a systemic, multifactorial disease that is produced by a malignant, accelerated, disorderly proliferation of cells with mutated genes, a situation that due to its high incidence and mortality has become a global health problem. In 2017 according to the National Institute of Statistics and Censuses (INEC); breast cancer ranks 11th among the leading causes of death in women. Between the years 2012 and 2017; 99.3% of the deaths were female; in 2017, 670 women with a diagnosis of breast cancer and 3 men died; representing a mortality rate of 3.99 per 100,000 Ecuadorians. The disadvantages caused by chemotherapy and radiotherapy are considerable, generating secondary and collateral effects that may or may not appear in the patient, which is why numerous investigations are focused on the search for treatment alternatives such as the beneficial use of medicinal plants.

Ecuador being a megadiverse country; it is possible to find natural species with multiple benefits and properties; which can contribute to studies to search for possible cancer treatments.

Objective: To determine the expression of BAX and BCL2 in MCF-7 cells treated with extract of *Amaranthus hypochondriacus*.

Methodology: In the present work, the effects on breast cancer cells (MCF-7), treated with *Amaranthus hypochondriacus* extract, were investigated and the expression of proteins involved in apoptosis was determined by q RT-PCR.

Results: BAX expression was higher in MCF-7 cells treated with *Amaranthus hypochondriacus*, while BCL-2 expression had a similar behavior to the control group. In both cases, no statistically significant differences were obtained.

Conclusion: The optimal dose of 1,451 microliters of *Amaranthus hypochondriacus* extract may favor apoptosis in the breast cancer cell line, therefore, its study could be expanded as a possible adjuvant in treatment.

Recommendation: Carry out more quantitative analyzes, where the expression of proteins after exposure is investigated with the extract of *Amaranthus hypochondriacus*, in addition to investigating other natural products with the sole purpose of a search for possible alternatives for the treatment against cancer.

KEY WORDS: *BREAST CANCER, APOPTOSIS, AMARANTHUS HYPOCHONDRIACUS, MCF-7 CELLS, PLANT EXTRACTS.*

INTRODUCCIÓN

El origen del cáncer se remonta al año 1600 antes de Cristo; surge así el término carcinos que fue utilizado por Hipócrates para denominar a la enfermedad (1). El cáncer, es una enfermedad sistémica de etiología multifactorial, producido por una proliferación de características malignas, aceleradas, desordenadas y descontroladas de las células que poseen genes mutados de tejidos mamarios, en específico a las células epiteliales que revisten los lobulillos de la mama (1). La alta incidencia y mortalidad del cáncer lo convierte en un problema de salud pública a pesar del pronóstico e incremento de la supervivencia en los últimos años (1).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, siendo las neoplasias de pulmón, de hígado, colorrectal, gástrico y de mama, las principales causas de muerte tanto en hombres y mujeres (2).

Generalmente el tratamiento no llega a ser tan efectivo, produciendo efectos secundarios en el paciente ya que un aproximado del 80% de ellos, acude a citas médicas en estadios avanzados de la enfermedad (3).

El cáncer de mama resulta el cáncer más común en las mujeres seguido del cáncer de cuello uterino, tiroides, estómago y colorrectal (4).

Se denominan carcinomas a los diferentes tipos de cáncer, estos son nombrados en dependencia de su ubicación y diseminación, entre los más frecuentes son el cáncer *in situ* (carcinoma ductal *in situ* y carcinoma lobular *in situ*) y cáncer de mama invasivo (carcinoma ductal invasivo y carcinoma lobular invasivo) (4).

En los últimos años, se ha incrementado el número de investigaciones relacionadas con el cáncer, en busca de la identificación de dianas terapéuticas y coadyuvantes de tratamiento, como elemento clave y necesario han sido consideradas las líneas celulares para un diagnóstico de tipo molecular del cáncer de mama que pueden ser utilizadas en estudios *in vitro*, contribuyendo al avance de conocimientos (5).

En un proceso tumoral se producen alteraciones como la apoptosis o muerte celular programada, el cual es un mecanismo biológico utilizado por las células en instancias normales para evitar el crecimiento descontrolado y mantener constante la cantidad de células

que conforman un organismo mediante cambios bioquímicos y morfológicos; cuando se produce el cáncer este mecanismo se ve alterado, alargando la supervivencia de las células tumorales y promoviendo el desarrollo de la neoplasia (6).

Con la biodiversidad que posee el Ecuador, varias especies naturales han sido utilizadas desde tiempos pasados de manera empírica como tratamientos de varias patologías, he ahí la importancia de continuar realizando estudios donde se generen sustentos científicos de los efectos que se producen, ya que han sido consideradas las propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antieméticas y coadyuvantes en varios tipos de cáncer; una de las especies naturales es el amaranto donde se ha descrito que contiene propiedades antioxidantes y pro-apoptóticas (6).

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

1.1.1. CONTEXTUALIZACIÓN

Factores predisponentes como estilos de vida, cambios hormonales y pautas reproductivas inciden directamente en la aparición del cáncer, muchas mujeres tienen su primer hijo a una edad más tardía y estos niños son amantados por menos tiempo por múltiples causas (7).

Mundialmente la cantidad de tumores se continua incrementando, en el año 2012 se registraron 14 millones de casos, en el año 2018 se presentaron 18,1 millones, y se estima que el número de casos nuevos aumentará en las dos próximas décadas llegando a los 29,5 millones para el año 2040 (3).

Hasta el año 2018 según registros encontrados en el Ministerio de Salud Pública del Ecuador se realizaron 1.287 atenciones, todas ellas con diagnóstico de carcinoma de mama, de este total 1.254 se detectaron en el sexo femenino lo que representa un 97,6%, resultados obtenidos del Registro Diario Automatizado de Consultas y Atenciones Ambulatorias (RDACAA 2018) y de la Plataforma de Registro de Atención en Salud (8).

1.1.2 JUSTIFICACIÓN

El cáncer conforma un grupo de enfermedades con mutaciones en el genoma celular a nivel molecular, celular, tisular y sistémico (9).

Las células cancerígenas para diseminarse; crecen, se dividen descontroladamente invadiendo órganos normales (10). Se producen variaciones en múltiples sistemas reguladores celulares modificando su comportamiento y con esto sus características lo que distinguen a las células con cáncer de las células normales (11).

Las células que forman el epitelio glandular pueden multiplicarse y transformarse en cancerosas, diseminarse por vía intramamaria, hematológica, linfática, provocando metástasis (12).

Se recomienda que sean implementados planes nacionales con el objetivo que las cifras disminuyan realizando hincapié en la promoción, prevención, detección, tratamiento oportuno, cuidados paliativos seguimiento y vigilancia epidemiológica (13).

Debido a que persisten las desigualdades en cuanto al acceso a la salud en caso de padecer cáncer, no solo por factores sanitarios sino también inherentes a conductas propias de los pacientes, ha generado detección tardía y por ende reducción de la esperanza de vida ; todo esto a pesar de los avances en cuanto a etiología, prevención y tratamiento de este tipo de cáncer (14).

Con el tratamiento convencional como quimioterapia, radioterapia se producen ciertos efectos adversos, dentro de sus desventajas se mencionan: la toxicidad y los efectos secundarios y colaterales (12).

En los últimos años se ha incrementado el número de estudios que incluyen algunas especies como el amaranto. En el año 2019 la evidencia de la acción del amaranto sobre células cancerígenas de colon HT-29; investigando el efecto anti-proliferativo; concluyó que la liberación de los péptidos inhibía la proliferación y favorecía la apoptosis de las HT-29 (15).

La gran variedad de flora del país, favorece el uso y la aplicación de plantas en la investigación como por ejemplo en el tratamiento del cáncer; debido a esto se podrá estudiar el comportamiento de la línea celular MCF-7 que derivan del adenocarcinoma de mama frente al extracto de amaranto, con la ventaja que al utilizar los extractos de plantas no tiene efectos secundarios, tanta toxicidad como con los fármacos empleados en el tratamiento convencional (8, 16).

Diferentes dolencias han sido tratadas con las plantas medicinales por ello al culminar este trabajo de investigación se podrá contar con un valioso aporte , que derive en tener una mayor comprensión del efecto de este extracto sobre la expresión génica de las proteínas de las células cancerígenas luego de ser tratadas con el extracto de *Amaranthus hypochondriacus* (17).

Pregunta de Investigación

1.- ¿El uso del extracto de *Amaranthus hypochondriacus in vitro* disminuye la actividad proliferativa celular en el desarrollo del cáncer de mama?

1.1.3 ESTADO DEL ARTE

Con la revisión de bibliografías relacionadas con el tema de esta investigación fueron encontrados algunos trabajos; los cuales se tomarán como apoyo para el proyecto en cuestión:

Vilcacundo Rubén (18) estudió el efecto de la digestión gastrointestinal simulada *in vitro* de proteínas de kiwicha (*Amaranthus caudatus*) acerca de las multifunciones de los péptidos liberados; como resultado se dio que la digestión gástrica presentó una actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE), durante 60 minutos la digestión gastroduodenal mostró la mayor actividad inhibitoria de la viabilidad de las células antioxidantes, dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), α -amilasa y Caco-2, los péptidos > 5 kDa fueron más efectivos inhibiendo la viabilidad celular del cáncer de colon, en tanto que los péptidos <5 kDa fueron los principales responsables de las actividades inhibitorias de antioxidantes, ACE, DPP-IV y α -amilasa, el análisis de la relación estructura-actividad de las secuencias identificadas estuvo dirigido a tres fragmentos de amaranto, FLISCLL, SVFDEELS y DFIILE, se consideraron como péptidos potenciales capaces de ejercer simultáneamente la capacidad antioxidante y la capacidad de inhibir tanto la ECA como la α -amilasa (18). Los resultados de este estudio demuestran, por primera vez, que la proteína kiwicha hidrolizada obtenida durante una digestión gastrointestinal simulada *in vitro*, es capaz de inhibir la peroxidación lipídica tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*; por lo tanto, esta especie de amaranto constituye una fuente prometedora de péptidos antioxidantes que podría ejercer un efecto preventivo contra los trastornos asociados al estrés oxidativo.

Jian-guo Wu (19) en el año 2017 estudió: “Anticancer and anti-angiogenic activities of extract from *Actinidia eriantha* Benth root”; en este estudio se empleó la raíz de *Actinidia eriantha*, esta raíz fue parte de la medicina tradicional China que se empleó como tratamiento del carcinoma gástrico, nasofaríngeo y de mama. El objetivo del estudio fue comprobar la actividad anticancerígena y antiangiogénica de la raíz de *Actinidia eriantha*; en este estudio

se utilizaron las líneas: MCF-7 (Cáncer de mama), SGC7901 (Carcinoma gástrico), CNE2 (Carcinoma Nasofaríngeo) y HUVECs (células endoteliales de la vena del cordón umbilical), estas últimas para comprobar la actividad antiangiogénica. En este estudio se obtuvo el extracto con maceración en alcohol, con el ensayo de MTT, para evaluar el efecto inhibitorio de los extractos en los cultivos celulares, a las células expuestas a los tratamientos durante 24 horas se les extrajeron el ARN usando trizol y se les realizó una qRT-PCR para medir la expresión de Bax y Bcl-2. Como resultado de la qRT-PCR se identificó que la raíz de *Actinidia eriantha* tiene un efecto apoptótico en las células SGC7901, CNE2 y HUVECs, ya que la expresión de Bax y las caspasas se incrementaron, mientras que Bcl-2 en su actividad se redujo significativamente. Se comprobó que el extracto de *Actinidia eriantha* inhibió la proliferación de las células HUVEC a través del bloqueo de la progresión de G1 a S del ciclo celular. Sobre las MCF-7 no tuvo efecto inhibitorio, esto se debe a las características de las células y su sensibilidad al extracto. En conclusión, la parte con mayor efectividad en la actividad anticancerígena es la raíz de *Actinidia eriantha*, la cual actúa mediante dos vías, la inhibición del crecimiento de células cancerosas (inducción de apoptosis) y la supresión de la angiogénesis (19).

Mengoni y Col investigaron los beneficios del *Amaranthus hypochondriacus*, mediante el estudio de la actividad antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica y antihipertensiva (20). En este estudio se demostró la actividad antiproliferativa que posee la lectina del amaranto, sin embargo, el extracto demostró tener menor actividad antitumoral y antiproliferativa (20).

López Adriana (24) en su estudio menciona que las semillas de amaranto contienen valiosa fibra y una fuente natural alternativa de escualeno (un triterpeno), que es un antioxidante que posee una amplia eficacia biológica contra el cáncer y la hipercolesterolemia, estas semillas pueden ser una fuente de compuestos fenólicos antioxidantes, principalmente en las zonas áridas donde no se pueden sembrar cultivos comerciales; fue evaluado la actividad antitumoral del *A. spinosus*; el cual que fue empleado en ratones albinos suizos que padecían de carcinoma de ascitis de Ehrlich (EAC), donde se evidencia un descenso en el tamaño del tumor y un incremento del tiempo medio de supervivencia, además de la restauración de los parámetros bioquímicos y hematológicos orientados hacia la normalidad (21).

Martínez Pablo Carpio (22) en su investigación mencionó que los péptidos bio-activos son fragmentos de proteínas específicas que influyen en funciones del cuerpo mejorando la salud por sus efectos antihipertensivos, antioxidantes, anti obesidad, antidiabéticos, hipocolesterolémicos y anticancerígenos; en el amaranto se han descrito péptidos producidos por hidrólisis enzimática *in vitro* con actividad antioxidante, antimicrobiana, anti fúngica y antihipertensiva, este estudio aporta información acerca del uso de los péptidos producidos por hidrólisis enzimática de las globulinas de amaranto (*Amaranthus Hypochondriacus*) con posible una actividad citotóxica en varias líneas celulares de cáncer, para los ensayos de citotoxicidad se utilizaron las líneas celulares cas ki (cáncer cervicouterino), HEP G2 (hepatocarcinoma), MCF7 (cáncer de mama) y VERO (células sanas de epitelio de riñón de mono verde) determinándose la influencia de la concentración de péptidos, del peso molecular y el tiempo de exposición en la viabilidad celular (22).

1.1.4. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICO – CIENTÍFICO

1.1.5. VARIABLE INDEPENDIENTE:

Amaranthus hypochondriacus

1.1.5.1. Generalidades del amaranto

El amaranto pertenece al género *Amaranthus*, existen aproximadamente 70 especies; 40 especies pertenecientes a América y las restantes se encuentran en Australia, África, Asia y Europa (23).

Dentro de las especies más importantes dentro de la producción del grano en México se encuentran especies como *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* (23). Se posee aproximadamente 16% de proteínas, gran contenido de vitamina E, péptidos bioactivos y con potencial agronómico como la tolerancia a la sequía, estrés salino y pronta adaptación a otro ambiente; por estas valiosas características es considerado como una especie con alto potencial de explotación y llegar a convertirse en un cultivo con la misma importancia agrícola y económica del maíz, trigo, sorgo, cebada, arroz (23).

El amaranto es conocido como “ataco”, “sangorache” o “quinua de castilla”, data de más de 4000 años en el continente americano, botánicamente, se encuentra dentro del orden

Centrospermales, familia Amaranthaceae, genero Amaranthus, han sido identificado más de 60 especies, con la característica de adaptarse a 2800 metros sobre el nivel del mar, a temperaturas de 18 a 24 °C, y requiere de 300 o 400 mm de precipitación anual, prospera mejor en suelos bien drenados con pH neutro o alcalino mayor a 6 (24).

Desde hace 5000 a 7000 años ha sido cultivado en América por las civilizaciones Inca, Maya y Azteca; llegó a ser cultivo fundamental de civilizaciones mesoamericanas y sudamericanas junto con el maíz y el frijol (24).

El valor alimenticio fue apreciado por los mayas, fueron los primeros en utilizar el cultivo por su alto rendimiento, los aztecas lo empleaban en los ritos religiosos y los Incas lo respetaban por sus poderes curativos, con la llegada de los españoles fue denominado como amaranto, que proviene del latín y cuyo significado es “flor que nunca muere” o “vida eterna” (24).

1.1.5.2. Propiedades

Por el alta calidad y cantidad de aceites, fibra dietética y minerales esenciales el amaranto es considerado como una especie prometedora (21). Con la ascendente intolerancia a los cereales se ha visto promovido el consumo de pseudocereales, por tal motivo las investigaciones han incrementado las propiedades biológicas, químicas y tecnológicas del amaranto (21).

El amaranto ha sido conocido como grano de Rama (Rajgira) en la India, contiene gran cantidad de antocianinas y polifenoles, ocho aminoácidos esenciales, y niveles muy altos de lisina, almidón, aceite, fibra, vitaminas (A, K, B6, C, E y B) y minerales tales como calcio, hierro y otros (21). Beneficios hipocolesteromiante, la estimulación del sistema inmunológico, actividad antitumoral, hipoglucemiante, hipotensor, antianémico y antioxidantes están relacionados al amaranto (21).

1.1.5.3. Variedades de Amaranto

- *A. caudatus*, conocido como “kiwicha”, cultivado en el Perú, análoga al *A. cruentus* que se cultiva en México, los colores de sus semillas pueden ser de color negro hasta rojo, siendo los más comunes blancos, con gran valor nutricional contenido en sus proteínas, aceites, micronutrientes tales como calcio y hierro (25).

- *A. hypochondriacus*, proveniente de suroeste de Estados Unidos de América y del norte de México, una planta color verde y una panoja erecta con pocas ramificaciones cortas, grano blanco y con una adaptación a zonas templadas de 1400-2400 msnm (25).
- *A. dubius*, localizado en ambientes secundarios como aceras, terrenos abandonados, es reconocidas por sus espigas terminales que son erectas, con semillas de 1-1.2 mm de diámetro y lenticulares en sección transversal, de colores vino tinto oscuro a marrón, con usos alimenticios, medicinales y como forraje (25).
- *A. viridis*, también se le conoce como *A. gracilis* y es cultivada como verdura (21).
- *A. tricolor*, es cultivada en el Sudeste de Asia, Sur de India, Taiwán, América del Norte y Jamaica; cultivada como verdura, con tallos parecidos al espárrago y se pueden utilizar tanto las plantas jóvenes como sus hojas (25).
- *A. hybridus*, conocido también como “quintonil”, de cultivo anual con tallos erectos y finos, localizada en regiones tropicales y subtropicales ; además de las regiones templadas del mundo (25).

Tabla 1. Comparación del amaranto con distintas hortalizas en cien gramos de hojas

COMPOSICIÓN	HUMEDAD(G)	PROTEÍNA (G)	CALCIO (MG)	TIAMINA (MG)	NIACINA (MG)	RIBOFLAVINA (MG)
Amaranto	86.9	3.5	267	0.08	1.4	0.16
Acelga	91.9	2.4	88	0.06	0.5	0.17
Col	87.5	4.2	179	-	-	-
Espinaca	90.7	3.2	93	0.10	0.06	0.2

- Fuente: (25).

- Elaborado por: Pérez, C (2020)

Tabla 2. Comparación de las semillas del *A. hypochondriacus* con arroz, trigo, maíz, avena

	MAIZ	AMARANTO	TRIGO
Proteínas	11,5	18,3	10,6
Grasas	5,15	8,3	2,3
Carbohidratos	82,8	68,5	79,5
Fibra	2,3	4,7	2,6
Calorías/ 100g	404	391	390

- Fuente: (25).
- Elaborado por: Pérez, C (2020)

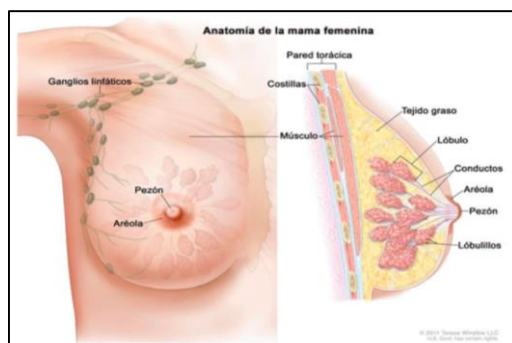
1.1.6. VARIABLE DEPENDIENTE:

Cáncer de mama

1.1.6.1. ANATOMÍA MAMARIA- CÁNCER MAMARIO

La mama es una glándula formada por tejido adiposo, en su interior posee una red de lóbulos y estos a su vez formados por lobulillos que contienen las glándulas de secreción de leche (26). La leche es transportada desde los lóbulos hasta el pezón en el centro de la areola a través de conductos diminutos que conectan las glándulas, los lóbulos y los lobulillos (26). Los ganglios linfáticos son órganos donde se produce la interacción entre los antígenos y los linfocitos y otras células inmunocompetentes lo que da lugar al inicio de la respuesta inmune específica, cuyo drenaje va desde los capilares linfáticos que recogen el exceso de líquido, antígenos tisulares y células cancerígenas hacia ganglios linfáticos axilares (26).

Imagen 1.- Anatomía de la mama



- Fuente: (26).
- Elaborado por: Pérez, C (2020)

El cáncer es considerado como un trastorno genético que genera mutaciones o activaciones anormales en los genes encargados de controlar la reproducción celular dando paso a un desequilibrio entre la proliferación y la apoptosis celular (27). La presentación de los cambios fenotípicos en las células produce modificaciones en las funciones normales, dejando de responder a limitaciones usuales en el crecimiento, adoptan poca adherencia entre ellas por lo que van a ser transportadas en el torrente sanguíneo y sistema linfático generando metástasis; en algunos tipos de cáncer se observa la capacidad de activar la producción de factor angiogénicos permitiendo una formación de nuevos vasos sanguíneos que aportan nutrientes que se requiere para el crecimiento del tumor maligno (28).

El descontrol de las células cancerosas genera anormalidades que se acumulan y se reflejan en el comportamiento celular, característica que los distinguen de las células normales (29).

El cáncer genera aumento en la proliferación de células que tapizan el interior de los conductos, los cuales en el periodo de lactancia son los encargados de transportar la leche desde los acinos glandulares hasta los conductos galactóforos (29). Las células se han convertido en perpetuas, con su capacidad reproductiva exagerada, inmaduras; con frecuencia se van a diferenciar y adoptar cualidades de distintas estirpes celulares llevando a metaplasia; por este motivo se acercan a las células totipotenciales (29).

Diferentes factores pueden alterar los genes involucrados en el control de la proliferación celular (proto-oncogenes), habiendo un daño en los genes, incrementando el crecimiento de las células tumorales; el cáncer se presentará cuando tan solo una sola célula contiene varias mutaciones, por lo general después de varios años evadiendo los procesos de control de la proliferación y muerte epitelio glandular (29).

1.1.6.2. EPIDEMIOLOGÍA

En ambos sexos el tipo de cáncer que con mayor frecuencia se presenta es el cáncer gástrico, próstata y pulmón en los hombres, mientras que en las mujeres el cáncer de mama y el de cuello uterino; información obtenida del Registro Nacional de Tumores (RNT) (30).

Tabla 3. Porcentaje de presentación de cáncer por sexo:

Hombres	PRÓSTATA	PIEL	ESTOMAGO	LINFOMAS	COLON RECTAL
	66,7 %	40,7 %	20,9%	17,1%	13,6%
Mujeres	MAMA	TIROIDES	PIEL	CUELLO UTERINO	ESTOMAGO
	41 %	40,6 %	37,5 %	18,5%	14,5%

- Fuente: (31)

- Elaborado por: Pérez, C (2020)

A nivel global el 89.2 % es la supervivencia media relativa del cáncer de mama tras cinco años (32). El estadio en el que se ha diagnosticado el cáncer influye en la supervivencia; siendo así el 98% en el estadio I y 24% en los estadios III (32).

1.1.6.3. FACTORES DE RIESGO

En tan solo el 12% de los pacientes que padecen cáncer de mama ha sido identificado el factor de riesgo, mientras que en el 88% de pacientes el factor de riesgo no ha sido determinado (33).

El Riesgo Relativo (RR), es la razón de la tasa de la enfermedad (incidencia o mortalidad) en los expuestos, sobre la tasa en los no expuestos y permite conocer el grado de relación entre una exposición a cierto factor con el riesgo de su presentación (33). Con RR se define en forma cuantitativa, el riesgo que una paciente tiene, que es positiva a la presencia de un factor en relación a otra que es negativa para el mismo; así, un riesgo relativo con valor de 1 significa que no existe un incremento de riesgo de padecer la patología, en tanto que un riesgo de 10 significa que existe un aumento en el riesgo 10 veces mayor (33).

1.1.6.3.1. EDAD

A medida que la edad avanza, se incrementa la probabilidad de padecer cáncer de mama; antes de los 30 años la probabilidad es baja (< 25 casos/100.00 mujeres); luego de los 50 años la probabilidad se incrementa hasta los 80 años (500 casos/100.000 mujeres) (34).

1.1.6.3.2. SEXO

En el sexo femenino es 100 veces más común que en los hombres; esto no descarta que los hombres también pueden presentarlo (34).

Esto se debe a que el sexo masculino tiene menores niveles de estrógenos y progesterona; hormonas que pueden promover el crecimiento de las células cancerosas (34).

1.1.6.3.3. ENVEJECIMIENTO

Alrededor de ocho casos de cáncer de mama son detectados en mujeres menores de los 45 años; en tanto que dos de tres casos de cáncer se producen en mayores de 55 años (34, 35).

1.1.6.3.4. GENÉTICOS

De un 5 a un 10% de los casos de cáncer de mama son hereditarios, generados por mutaciones heredadas de uno de los padres (34).

El cáncer de mama hereditario tiene mayor afectación a los genes BRCA1 y BRCA2 (35). Genes encargados de ayudar a prevenir el cáncer mediante la producción de proteínas que evitan el crecimiento anormal de las células; en caso de heredar una copia mutada de alguno de los padres, tienen mayor riesgo de cáncer de mama en el transcurso de su vida (34). Aunque en algunas familias que presentan mutaciones de BRCA1 el riesgo de padecer cáncer de mama es muy alto, alrededor del 80%, en promedio de 55 a 65% (36). En el caso de las mutaciones BRCA2, el riesgo es igual o menor del 45% (34).

El cáncer de mama asociado a mutaciones de estos genes se da por lo general en mujeres más jóvenes, en las dos mamas y pueden presentarse el cáncer en otros órganos como en el ovario; a diferencia del cáncer que no está asociado a estas mutaciones (35).

1.1.6.3.5. FAMILIARES

Cuando se ha presentado cáncer en familiares consanguíneos el riesgo se duplica o triplica; un 15% de posibilidades presentan las mujeres en quienes padres o hermanos han sufrido de cáncer; mientras que el 85% no tienen antecedentes familiares de esta enfermedad (34).

1.1.6.3.6. MENARQUIA Y CICLO MENSTRUAL

Mientras más tarde sea la edad que se presenta la menarquia, más bajo será el riesgo de padecer cáncer de mama, las mujeres cuya menstruación se presente a los 12 años tienen un RR de cáncer invasor de 1.3 comparadas con aquellas que comenzaron luego de los 15 años; por cada año de retardo el riesgo disminuye en cerca del 5% (35).

1.1.6.3.7. PARTOS

Las mujeres que han tenido al menos un embarazo que ha llegado a término tienen un 25% menos de probabilidades de padecer cáncer de mama (35).

La edad del primer embarazo a término independientemente del número total de embarazos afecta el riesgo de padecer de cáncer de mama; la protección es mayor a menor edad del primer parto a término (35). En un meta-análisis de estudios de países nórdicos se menciona que las mujeres que tuvieron su primogénito antes de los 20 años tuvieron un 30% menos riesgo de cáncer de mama a diferencia de aquellas que lo tuvieron después de los 35 años (35).

1.1.6.3.8. LACTANCIA

En países menos desarrollados donde el periodo de lactancia puede ser muy largo, se ha detectado la presencia de efectos protectores (35). Un estudio americano de hormonas esteroideas y cáncer de mama valoro y examinó la relación que hay entre lactancia materna y cáncer de mama en aproximadamente 4500 mujeres que padecían la enfermedad, llegando a la conclusión que las madres que dieron de lactar por 25 meses o más presentaron una probabilidad 33 % menor de padecer cáncer de mama (35).

1.1.6.3.9. MENOPAUSIA

Las mujeres que presentan la menopausia a una edad avanzada tienen un mayor riesgo de presentar cáncer de mama que aquellas que la presentan tempranamente, con un riesgo del 3% por cada año después de la edad promedio que se presenta la menopausia; las mujeres que presentan la menopausia hasta los 55 años o después muestran un RR de 1.22 comparadas con aquellas que la presentan hasta antes de los 45 años (35).

Así mismo se relaciona si la menopausia se presenta de manera natural o producto de una ooforectomía bilateral; ya que sugiere que el número total de ciclos menstruales ovulatorios a en la vida de una mujer constituye el factor de riesgo de cáncer de mama (35).

1.1.6.3.10. HORMONAS ENDÓGENAS

En estudios prospectivos de cohorte se han evaluado la relación entre las concentraciones séricas de hormonas con el riesgo de padecer cáncer de mama, en el caso de las mujeres postmenopáusicas, los estudios muestran una asociación positiva entre las concentraciones

de estradiol y riesgo; es decir que las mujeres postmenopáusicas con altas concentraciones de estradiol presentan un doble riesgo en relación a las mujeres con bajas concentraciones de esta hormona (35).

Lamentablemente no se cuenta con estudios de tipo prospectivos que impliquen el estradiol con las mujeres premenopáusicas y los pocos que hay, presentan resultados inconsistentes; una asociación positiva también ha sido observada en algunos estudios con otras hormonas sexuales como prolactina y factor 1 de crecimiento de tipo insulínico (35).

1.1.6.3.11. ANTICONCEPTIVOS ORALES

Se ha incrementado en un 25% el riesgo de padecer cáncer de mama en aquellas mujeres que usan anticonceptivos orales, riesgo que se presenta con el cese de su empleo de manera tal que 10 o más años después de suspender su empleo no se demuestra un incremento significativo en el riesgo, el riesgo no está relacionado con el tiempo de duración del uso de los anticonceptivos orales combinados (35). El efecto sobre el riesgo de cáncer de mama tampoco varía con el tipo de estrógeno o progestágeno utilizado (35).

El cáncer de mama no es común en mujeres jóvenes que es cuando más comúnmente se usan los anticonceptivos orales esto no ha reflejado un aumento en el número de casos de cáncer de mama, sin embargo, el uso de anticonceptivos de manera tardía en la vida reproductiva de una mujer podría aumentar el riesgo de padecer cáncer de mama (35).

1.1.6.3.12. TERAPIA HORMONAL DE REEMPLAZO

En esta etapa de la vida de la mujer, es decir en la post menopausia, se acentúan, a corto plazo, los síntomas por la falta de estrógenos, entre ellos, como principales motivos de consulta, los sofocos, la sequedad vaginal, la disminución de la libido, las alteraciones del sueño, todo esto en el corto plazo; y, a largo plazo, se producen la pérdida de masa ósea –con su consecuencia más delicada: las fracturas–, las alteraciones cardiovasculares y las alteraciones en el sistema nervioso central; esto determina que, para mejorar la calidad y expectativa de vida de la mujer en la post menopausia, sea válida la prescripción de TRHPM (37).

El uso de Terapia de Reemplazo Hormonal para la Menopausia (TRHPM) se da cuando la mujer presenta un alto riesgo de padecer cáncer de mama, alrededor de los años 70 la TRHPM

fue empleada y recomendada para mujeres con síntomas menopáusicos pero a partir de los 90 empezaron a aparecer estudios que relacionaban con el aumento en la incidencia de cáncer de mama (38).

Los hallazgos publicados sobre el riesgo de cáncer de mama asociado con diferentes tipos de terapia hormonal menopáusica (MHT) son inconsistentes, con información limitada sobre los efectos a largo plazo, los análisis principales utilizaron datos de participantes individuales de todos los estudios prospectivos elegibles que habían buscado información sobre el tipo y el momento del uso de THM; los estudios se identificaron mediante la búsqueda regular de muchas fuentes formales e informales desde el 1 de enero de 1992 hasta el 1 de enero de 2018, donde los usuarios actuales se incluyeron hasta 5 años (media 1 · 4 años) después del último uso de MHT informado, donde resultados arrojaron cocientes de riesgo ajustados (RR) que compararon grupos particulares de usuarios de MHT versus nunca usuarios (37).

Durante el seguimiento prospectivo, 108. 647 mujeres posmenopáusicas desarrollaron cáncer de mama a la edad media de 65 años; 55.575 (51%) habían usado MHT(37). Entre las mujeres con información completa, la duración media de la THM fue de 10 años en usuarias actuales y de 7 años en usuarias anteriores, y la edad media fue de 50 años en la menopausia y 50 años en comenzando MHT(37). Todos los tipos de THM, excepto los estrógenos vaginales, se asociaron con riesgos excesivos de cáncer de mama, que aumentaron de manera constante con la duración del uso y fueron mayores para los estrógenos-progestágenos que para las preparaciones con estrógenos solos (37). Después de suspender la THM, persistió cierto exceso de riesgo durante más de 10 años; su magnitud dependía de la duración del uso anterior, con un pequeño exceso después de menos de 1 año de uso de MHT(37).

Si estas asociaciones son en gran parte causales, para las mujeres de peso promedio en los países desarrollados, 5 años de THM, a partir de los 50 años, aumentaría la incidencia de cáncer de mama entre los 50 y los 69 años en aproximadamente una de cada 50 usuarias de estrógeno diariamente (37).

Estudios realizados con pequeños números de pacientes sobre el efecto de la terapia hormonal, sugieren que el empleo de preparaciones de estrógenos y progestágenos combinados , suman al riesgo de cáncer de mama, no obstante, no fue sino hasta que los resultados de un corte de 5 años del estudio Women's Health Initiative (WHI), un estudio

multi-institucional que matriculó más de 16.000 mujeres postmenopáusicas en edades entre los 50 y los 79 años valoró el riesgo-beneficio de la TRHPM usando las preparaciones más comunes de estrógenos solos y combinados con progesterona (39).

El tratamiento frente a casos de infertilidad lleva a una exposición a una variedad de drogas hormonalmente activas, incluyendo citrato de clomifeno, gonadotropina menopáusica humana y hormonas relacionadas con las gonadotropinas (29). Los estudios son pocos y limitados en sus diseños relacionados con el riesgo de cáncer de mama en relación a tales exposiciones, por lo cual no ha sido detectado un incremento de riesgo a causa de ellos (29).

1.1.6.3.13. ALCOHOL Y TABACO

Se ha observado en estudios observacionales que el consumir alcohol está relacionado con un incremento moderado del riesgo de cáncer de mama, debido a una estimulación del metabolismo de carcinógenos tales como el acetaldehído y disminución de la eficiencia en la reparación del ADN o reducción en la ingesta de nutrientes protectores(29).

Existen estudios en los cuales el consumo de alcohol se limitó al promedio de una copa al día o menos (12 gramos de alcohol aproximadamente) el RR no supera el 1.1 por lo que se considera que no afecta significativamente el riesgo para cáncer de mama (29). El riesgo aumenta a 1.21 con un consumo de 2 copas al día y a 1.4 para aquellas personas que consumían 3 copas al día en relación a las que no consumen alcohol (29). En ningún estudio se ha podido demostrar mayor riesgo de cáncer de mama entre mujeres alcohólicas por lo que se puede inferir que los estudios documentados acerca del consumo de alcohol y su incidencia en el cáncer de mama no sería mayor a 2 e indistintamente del tipo de alcohol consumido (vino, cerveza, entre otros) (29).

En el caso del cigarrillo, se ha relacionado a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) que se encuentran en el humo del cigarrillo y en el medio ambiente en general, los cuales pueden generar cambios en el metabolismo de las monooxigenasas del sistema Citocromo P450 (40). Este tipo de compuestos son eliminados del organismo gracias a sistemas que desintoxican y a la enzima de fase I monooxigenasa CYP1A1, que contribuye en el metabolismo de fármacos, síntesis de colesterol, esteroides y lípidos, además están involucradas en la bioactivación de un gran número de compuestos pre-carcinógenos (40).

Los compuestos pro-carcinógenos se convierten en compuestos carcinogénicos cuando son activados, los cuales alteran el ADN en caso de que no sea capaz de eliminarlas (40).

Los sistemas de reparación del ADN van a determinar el grado del daño producido por una exposición a agentes que tengan potencial cancerígeno, dichos mecanismos de reparación forman la “segunda línea” de defensa frente a posibles efectos tóxicos, complementando así los mecanismos de metabolización (40).

En el caso del alcohol.- El etanol se oxida a acetaldehído a través de las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH); el acetaldehído es considerado como el metabolito más tóxico del etanol, de tal manera que puede actuar como agente cancerígeno por múltiples mecanismos tales como la interferencia en la replicación, inducción de daño y formación de aductos de ADN ; el acetaldehído altera el material genético puede generar alteraciones cromosómicas macroscópicas (40).

1.1.6.4. Signos y Síntomas

Los signos y síntomas del cáncer de mama pueden llegar a ser distintos entre persona y persona, inclusive muchas de ellas no manifiestan ningún tipo de signos o síntomas, los más destacados son:

- Un bulto nuevo en la mama o la axila.
- Aumento del grosor o hinchazón de una parte de la mama.
- Irritación o hundimientos en la piel de la mama.
- Enrojecimiento o descamación en la zona del pezón o la mama.
- Hundimiento del pezón o dolor en esa zona.
- Secreción del pezón: leche o sangre.
- Cambio en el tamaño o la forma de la mama.
- Dolor en cualquier parte de la mama (41).

1.1.6.5. Factores pronósticos moleculares relacionados con la invasión y metástasis

El proceso invasivo-metastático incluye las siguientes fases:

- Crecimiento progresivo en la localización primaria.
- Vascularización del tumor (angiogénesis).

- Separación de las células del tumor.
- Entrada de las células tumorales en el torrente vascular (intravasación) ya sea sanguíneo o linfático.
- Circulación en el torrente sanguíneo.
- Detención en los vasos sanguíneos.
- Salida o extravasación.
- Migración e invasión por la célula tumoral del parénquima de un órgano (42).

Crecimiento

Las células cancerosas son neoplásicas y a la vez son capaces de invadir y colonizar los tejidos a su alrededor (42). Existe un paso previo antes de lograr la autonomía de crecimiento, que es la inestabilidad en el genoma, el cual permite que se facilite el desarrollo de alteraciones en el ADN, y que dicha célula no siga los mecanismos normales de destrucción (apoptosis) (42). Así, los oncogenes codifican proteínas que pueden ser cualquier componente de la cadena de transducción de la señal celular, y los genes supresores del tumor codifican proteínas que intervienen en condiciones normales en el control del ciclo celular (42).

Vascularización del tumor (angiogénesis)

El tumor para su crecimiento induce la formación de una red capilar que invade la masa tumoral respondiendo a una señal producida por el tejido que requiere aporte sanguíneo (42).

La respuesta de las células endoteliales tiene cuatro etapas en primer lugar, las células deben abrirse paso a través de una lámina basal que rodea los vasos ya existentes; durante la angiogénesis las células endoteliales van a segregar proteasas, las cuales permiten la digestión de distintos materiales a su paso por la lámina basal del capilar; en la siguiente fase, las células endoteliales se desplazan hacia el origen de la señal; seguidamente, proliferan y finalmente forman conductos y se manifiesta los cuatro componentes de la respuesta angiogénica, como es el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, de Vascular Endothelial Growth Factor), que actúa de forma selectiva en las células endoteliales, estimulando la angiogénesis, y que parece ser el responsable de la elevada irrigación sanguínea que presentan algunos tumores (42). Otros factores de crecimiento, incluyendo

algunos miembros de la familia del factor de crecimiento de los fibroblastos, también estimulan la angiogénesis (43).

Estos tipos de factores angiogénicos se liberan en el proceso de reparación, inflamación y crecimiento de los tejidos; son fabricados por distintos tipos de células, incluyendo los macrófagos, los mastocitos y los adipocitos (42). También se ha identificado a inhibidores de la formación de nuevos vasos sanguíneos, así, la angiogénesis parece que es regulada por complejas combinaciones de señales (42).

Separación de las células del tumor e intravasación

Las células de un tumor sólido son capaces de disminuir su adhesión con sus células vecinas originales a través de la pérdida de expresión de cadherina E, y otras moléculas de adhesión entre células del epitelio, tales como CD44, debiendo atravesar la membrana basal y migrar a través del estroma (invasión) para llegar hasta la circulación sanguínea o vasos linfáticos de modo que para que las células tumorales crucen una lámina basal deben tener receptores de laminina, que permitan a las células adherirse a la lámina y han de segregar colagenasas de tipo IV, que les ayuden a digerir la lámina (43,45). El proceso de invasión permite diferenciar carcinomas *in situ* los invasivos; cuando las células llegan a los vasos sanguíneos, penetran (intravasación) formando nuevas asociaciones con otros tipos de células, en ellos (42). Deben evitar la destrucción dentro de los vasos y moverse en dirección del flujo sanguíneo hacia sitios potenciales de crecimiento (42). El sistema circulatorio es considerado como un medio hostil, donde alrededor del 99% de las células cancerígenas son destruidas por mecanismos de estrés, destrucción proteolítica y respuesta inmune, implicando células del sistema inmune y proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, de Major Histocompatibility Complex) en las células cancerosas (42). En las células cancerígenas tienen lugar cambios en el MHC, las células T citotóxicas requieren proteínas MHC-I para la presentación antigénica, por lo que la pérdida de proteínas MHC supondrá un aumento en la supervivencia de las células cancerígenas (42).

Ensayos experimentales demuestran que una sobreexpresión de proteínas MHC-I disminuye el potencial metastásico, el cual se correlaciona inversamente con la expresión de MHC en líneas celulares de melanoma (42). La metástasis en los nódulos linfáticos de carcinoma de mama, colon y riñón tienen niveles de expresión de proteínas MHC-I inferiores a las células

de las que derivan; las células cancerígenas son transportadas en la sangre como células individuales, o bien formando agregados con linfocitos y plaquetas, la formación de estos agregados protege a las células de mecanismos de estrés y respuesta inmune, facilita la unión al endotelio y la posterior extravasación (42).

Extravasación

El paso de las células tumorales a la circulación sanguínea presenta tres etapas: unión a las paredes del endotelio, retracción de las células endoteliales que llevan unidas las células cancerígenas, destrucción de la membrana basal y migración al estroma adyacente, la retracción de las células endoteliales lleva consigo la exposición de glicoproteínas de la membrana basal que se unen a las células tumorales, las cuales digieren con proteasas y glicosidasas (42). Las proteínas de la membrana basal son laminina, colagenasa IV y fibronectina, todas ellas consideradas como ligandos de la familia de receptores de integrinas situadas en la superficie de las células tumorales, las integrinas $\alpha 1\beta 1$ reconocen colagenasa y laminina, mientras que las $\alpha 6\beta 4$ se unen a laminina, los receptores de laminina se expresan en niveles elevados en carcinomas de colon, mama y pulmón, todos ellos epiteliales (42).

Migración e invasión

Tras la extravasación, las células tumorales migran a nuevos sitios para formar colonias, lo que requiere la producción de proteasas que digieran la MEC, para lo cual intervienen las integrinas de las membranas de las células tumorales que median señales externas desde la matriz a la actina del citoesqueleto de las células; el movimiento se da por contracción y relajación del citoesqueleto (42). Los péptidos liberados durante la proteólisis de la MEC actúan como agentes quimiotácticos para atraer células cancerígenas, los péptidos de la matriz se unen a integrinas y de esta manera bloquean el acceso de las células a la matriz y facilitan la migración (42).

Otros péptidos que intervienen son los factores de motilidad, fundamentales para la migración, que pueden ser secretados por células normales y actúan de forma paracrina sobre otras células, o bien son producidos por las propias células tumorales actuando de forma autocrina (42).

1.1.6.6. Proceso de apoptosis

La apoptosis esta inducida por dos vías de señalización: la vía intrínseca, que es activada por la liberación de factores pro-apoptóticos mitocondriales (como el citocromo c y la proteína Smac/diablo) y la vía extrínseca, activada a través de receptores de muerte que se van a expresar en la superficie de la célula; ambas vías convergen, llevando a efecto su orden letal a través de la activación de las caspasas, proteasas intracelulares (6).

Las vías que forman parte de la apoptosis tanto la extrínseca como la intrínseca ; la extrínseca o receptor de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial; la primera vía mencionada es producida por la presencia de inflamación que activara a los linfocitos T citotóxicos que expresan proteínas inductoras de apoptosis como Fas-ligando (FasL), estas señales externas son captadas por las células dianas (células que van a sufrir el proceso de apoptosis) mediante los receptores Fas (receptores de muerte).

FasL y Fas se entrelazan y se unen a proteínas adaptadoras como el dominio de muerte, en la región intracelular estos dominios atraen a la pro-caspasa 8 activada y mediante una proteólisis se separa el predominio generando caspasa 8, una nueva ruptura produce un fragmento pequeño y otra grande, los fragmentos pequeños se unen y forman un tetrámero o caspasa 8 activa, estas moléculas conllevan a la muerte celular producto del procesamiento directo de otras proteasas de la misma familia como las caspasas 3, 6 y 7 produciendo la fragmentación del ADN y la posterior muerte celular (6, 44).

La vía intrínseca o vía mitocondrial se lleva a cabo en el interior de la célula, aumentando la permeabilidad mitocondrial y liberando moléculas pro-apoptóticas como el citocromo-C hacia el citoplasma, esta vía se produce mediante señales intracelulares de estrés biológico, que produce la activación de proteínas de la familia de Bcl-2 que ejercen su acción sobre la mitocondria (45).

Existen dos grupos principales de proteínas Bcl-2, las proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim y Hrk) las que actúan promovieron la liberación de citocromo-C y la activación de la caspasa 9 y las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1) que bloquean la liberación de citocromo-C.

La apoptosis no se ve afectada por la cantidad absoluta de las proteínas pro y anti-apoptóticas, sino más bien por la correlación y el equilibrio entre las dos familias en la membrana de la mitocondria (44).

Las dos vías ya anteriormente citadas confluyen en una vía común con la activación de las caspasas, principalmente la 8 y la 9, las mismas que producen una acción de tipo degradativa y activan a su vez a otras caspasas, llamadas caspasas ejecutoras, mismas que degradan el ADN, las nucleoproteínas, componentes de la matriz nuclear y el citoesqueleto concluyendo con la muerte de la célula (46).

1.1.6.7. Tipos de cáncer de mama

Los principales tipos de cáncer de mama son llamados carcinomas, los más comunes son: cáncer *in situ* (carcinoma ductal *in situ* y carcinoma lobular *in situ*) y cáncer de mama de tipo invasivo (carcinoma ductal invasivo y carcinoma lobular invasivo) (47).

- **Cáncer de mama no invasivo:** Este no atraviesa la membrana basal, motivo por el cual no afecta el tejido de sostén (grasa o fibroso), dentro de este se incluyen dos tipos: el carcinoma ductal *in situ* (más frecuente) y carcinoma lobulillar *in situ*, y confieren al individuo un mayor riesgo de padecer cáncer invasivo (48).

- **Cáncer de mama invasivo:** Atraviesa la membrana basal, afecta al tejido conectivo en la mama, sin requerir la presencia de metástasis o afectación linfática, con los tipos carcinoma ductal infiltrante o invasivo, el cual es el subtipo más común, presentándose en un 80% de todos los casos (48).

Los tipos histológicos más frecuentes en la patología de mama son los siguientes:

1. Carcinoma ductal *in situ* (CDIS) o carcinoma intraductal: Tiene sus inicios en los conductos mamarios, suele ser el más común 70-80%, la mayoría de los carcinomas ductales se inician en una forma no invasiva, intraductal o *in situ*, éste tipo no puede extenderse a distancia generando metástasis por lo que el tratamiento es la resección local. En este caso, si no se trata puede transformarse con el tiempo en cáncer invasivo, originando un verdadero cáncer de mama (49).

2. Carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS): Un 5-10% de los cánceres de mama se inician en los lóbulos mamarios (45, (50).

3. Cáncer invasivo o infiltrante: Se puede extender dentro de la mama, infiltrar en piel o músculos pectorales y proliferar por los conductos linfáticos a los ganglios axilares, teniendo la capacidad para invadir los vasos sanguíneos locales y generar células metastásicas que pueden emigrar a órganos como: hueso, pleura, pulmón, hígado (51).

1.1.6.8. Estadificación

El TNM es el estándar aceptado internacionalmente para realizar la estadificación del cáncer propuesto por la UICC (Unión internacional para el control del cáncer), se basa en:

- **T:** Tamaño del tumor. Se numera de 0 a 4.
- **N:** Extensión a los ganglios linfáticos regionales (nodo). Se numera de 0 a 3.
- **M:** Extensión a otras partes del cuerpo. Se numera de 0 a 1.
- **X:** Este parámetro añadido a los anteriores indica que no se puede evaluar (TX, NX, MX).

Tabla 4.-Estadificación del cáncer propuesto por la UICC (Unión internacional para el control del cáncer)

TX	Tamaño del tumor no evaluable.
T0	No se encontró tumor.
T1	El tumor es de 2 cm de diámetro o más pequeño.
T2	El tumor es de entre 2 y 5 cm de diámetro
T3	El tumor mide más de 5 cm de diámetro.
T4	Independientemente del tamaño, el tumor ha sido diseminado hacia la pared torácica o a la piel.
NX	Extensión a los ganglios linfáticos no evaluable.
N0	No hay afectación de los ganglios linfáticos.
N1	Están afectados de 1 a 3 ganglios linfáticos.
N2	Están afectados de 4 a 9 ganglios.
N3	Si el número es igual o superior a 10 ganglios. Los tumores que se encuentran en los ganglios linfáticos que no están en el área de drenaje de los órganos afectados, se consideran metástasis.
MX	Metástasis no evaluable.
M0	Tumores no metastásico.
M1	Tumores metastásico.

- Fuente: (51)

- Elaborado por: Pérez, C (2020)

1.1.6.9. El BI-RADS

(Breast Imaging Report and Database System) es un sistema de categorización de lesiones mamarias con el fin de estandarizar el informe y el lenguaje mamográfico para facilitar la comunicación entre los diferentes especialistas (52).

Tabla 5.- BI-RADS léxico mamográfico

COMPOSICIÓN DE LA MAMA	A. Las mamas son casi completamente grasa			
	B. Áreas dispersas de tejido fibroglandular			
	C. Heterogéneamente densas (puede ocultar nódulos pequeños)			
MASA	Forma	Oval, redonda, irregular		
	Margen	Circunscrito, microlobulado, indistinto, espiculado		
	Densidad	Alta, baja, grasa		
ASIMETRIA	Asimetría, global, focal, en desarrollo			
CALCIFICACIONES	MORFOLOGIA		DISTRIBUCIÓN	
	TEPICAMENTE BENIGNOS	ALTA SOSPECHA	A. Difusa	
	F. Cutáneas	O. Amorfas	B. Regional	
	G. Vasculares	P. Heterogéneas groseras	C. Agrupada	
	H. Groseras: palomitas de maíz	Q. Finas pleomorficas	D. Lineal	
	I. Barra	R. Finas lineales o finas lineales ramificadas	E. Segmentada	
	J. Redondas			
	K. En anillo			
	L. Distróficas			
	M. Leche de calcio			
	N. Sutura			
	CARACTERISTICAS ASOCIADAS	Retracción de la piel, retracción del pezón, engrosamiento cutáneo, engrosamiento trabecular, adenopatía axilar, distorsión de la arquitectura y calcificaciones		
	UBICACIÓN DE LA LESIÓN	Lateralidad, cuadrante y posición horaria, profundidad y distancia desde el pezón		

- Fuente: (53).

- Elaborado por: Pérez, C (2020)

Tabla 6.- BI-RADS (Breast Imaging Report and Database System), léxico ecográfico

Composición de la mama	A. Ecotextura de fondo homogénea grasa
	B. Ecotextura de fondo fibroglandular

	C. Ecotextura de fondo heterogénea	
Masa	Forma	Oval, redonda, irregular
	Margen	Circunscrito, microlobulado, indistinto, espiculado
	Orientación	Paralela y no paralela
	Patrón de eco	Anecoico, hiperecoico, complejo quístico y sólido, hipoeicoico, isoeicoico y heterogéneo
	Características posteriores	Ausente, sombreado, patrón combinado
Calcificaciones	A. Dentro de una masa	
	B. Fuera de una masa	
	C. Intraductales	
Características asociadas	Distorsión de la arquitectura, cambios ductales, cambios cutáneos, edema, vascularidad (ausente, interna, vasos al borde) y elasticidad	
Casos especiales	Quiste simple, microquistes, quiste complicado, lesiones sobre el espesor cutáneo, cuerpo extraño (incluyendo implantes), nódulo linfático intramamario, nódulo linfático axilar, anomalías vasculares, malformaciones arteriovenosas, colecciones posquirúrgicas y necrosis grasa	

- Fuente: (53).

- Elaborado por: Pérez, C (2020)

Tabla 7.- Categorías de evaluación BI-RADS

CATEGORIA 0	Mastografía: incompleta. Evaluación de imagen adicional necesaria y/o mastografías anteriores para su comparación Ultrasonido y resonancia magnética: incompleta. Evaluación de imagen adicional necesaria		
CATEGORIA 1	Negativa		
CATEGORIA 2	Benigna		
CATEGORIA 3	Probablemente benigna		
CATEGORIA 4	Sospechosa	Mastografía y ultrasonido	4A: Baja sospecha de malignidad
			4B: Moderada sospecha de malignidad
			4C: Alta sospecha de malignidad
CATEGORIA 5	Altamente sugestiva de malignidad		
CATEGORIA 6	Diagnóstico maligno comprobado por biopsia		

- Fuente: (53).

- Elaborado por: Pérez, C (2020).

Tabla 8.- Conducta a seguir según el resultado de BI-RADS

Categoría BI-RADS	Interpretación	Recomendación
0	Estudio Incompleto necesita estudios adicionales	Estudios adicionales con mamografía, proyecciones localizadas o magnificadas y/o eco-tomografía.
1	Normal examen negativo	Control según indicación.
2	Normal o con hallazgos no patológicos	Control según indicación.
3	Anormalidad (hallazgos probablemente benignos)	Hallazgos probablemente benignos: realizar seguimiento.
4	Anormalidad sospechosa de malignidad sugerir estudio histológico	Hallazgos sospechosos, sugerir estudio histológico.
5	Alta probabilidad de malignidad, realizar estudio histológico	Hallazgos altamente sospechosos, realizar estudio histológico.
6	Cáncer de Mama diagnosticado y/o tratado, control.	Control con especialista

- Fuente: (53)

- Elaborado por: Pérez, C (2020)

1.1.6.10. Protocolo diagnóstico

La confirmación del diagnóstico del cáncer de mama se basa en el examen clínico, los estudios de imagen y el estudio histopatológico (54). En el interrogatorio debe indagarse sobre el estatus menopáusico de la paciente, el examen físico se basa en la palpación bimanual de la mama y la región axilar en busca de masas (48).

Pasados los 35 años, se recomienda realizar una mamografía cada dos años, mientras que en mujeres de menor edad se prefiere la ultrasonografía mamaria (48). Toda paciente con sospecha de cáncer de mama debe poseer estudio de las dos mamas (48).

En los últimos años han surgido exámenes como la resonancia magnética (MRI), la mamografía 3D, el ultrasonograma 3D y la mamografía espectral con realce de contraste, aunque no son estudios de rutina y poseen indicaciones específicas (54).

1.1.6.11. Abordaje diagnóstico y terapéutico de los signos clínicos en patología mamaria:

➤ **Nódulos.-** Son hallazgos de mayor importancia, se deben valorar características como: forma, bordes, tamaño, localización y consistencia; ante su presencia se debe solicitar una mamografía diagnóstica y ecografía en las pacientes mayores de 35 años, y en las menores de esta edad ecografía mamaria (55).

➤ **Quistes.**

1. **Simples.-** Son espacios llenos de fluido originados en la unidad ducto-lobulillar terminal o en un ducto obstruido, en su mayoría son múltiples y bilaterales, se presentan generalmente en mujeres mayores de 30 años (55). En su mayoría no son palpables, y los palpables son masas de bordes bien definidos, blandas, dolorosas o no dolorosas (55). En el eco se observa como una masa anecoicas, de forma redonda y con reforzamiento sónico posterior; y son clasificados como BIRADS 2 (55).

Los quistes asintomáticos no requieren un tratamiento; mientras que los quistes a tensión (dolorosos) o los macro quistes (> 5 cm) se pueden drenar por punción para aliviar el dolor (55). En los casos en los cuales, en el momento de la punción, se obtiene material o contenido hemático no traumático (no lesión de algún vaso sanguíneo), o cuando el quiste recurre en el mismo lugar más de 2 veces, se debe remitir la paciente a cirugía de mama (55).

2. **Quistes complicados.-** Se suelen presentar en mayores de 30 años, y tienen el mismo comportamiento clínico (55). Ecográficamente la imagen líquida se asocia con masa sólida en su interior, septos o paredes gruesas, es catalogado como BIRADS 4 por lo cual siempre debe tener diagnóstico histológico mediante biopsia con aguja trucut guiada por una ecografía del componente sólido en el interior del quiste, o bacaf guiado por ecografía cuando no tiene componente sólido en el interior, es decir, en el caso de septos gruesos o paredes gruesas, este tipo de quistes deben ser remitidas a cirugía de mama (55).

➤ **Masas sólidas.-** Se presentan como lesiones que pueden ser medidas con bordes bien definidos (tumores benignos) o mal definidos (cáncer), pueden ser o no dolorosas, y de consistencia blanda, semiblanda o dura (55). Ecográficamente se caracterizan como una lesión hipoecoica, identificable por ecografía en dos proyecciones a 90 grados; con bordes que pueden ser: definidos, angulados, lisos, irregulares o regulares; y su forma: lobulada, bilobulada o redondeada (55). Su clasificación puede ser desde BIRADS 2 en el caso de los tumores benignos, hasta BIRADS 4 o 5 en el caso de patología maligna (55). Dentro de los tumores sólidos más frecuentes se encuentran: fibroadenoma, adenoma, hamartoma y los tumores papilares (descritos previamente) (55).

➤ **Nodularidad asimétrica.-** Es identificable en algún cuadrante de una sola mama, sin estar presente en la mama contralateral (55). Generalmente se localiza en los cuadrantes supero externos, este tipo de lesión siempre requiere estudios de imagen; en pacientes menores de 35 años se debe ordenar ecografía y en las mayores de dicha edad se requiere mamografía diagnóstica más ecografía mamaria (55). Se clasifica como BIRADS 3, en estos casos se debe solicitar cono de compresión y ecografía mamaria (55). Si la asimetría persiste con el cono, y la ecografía es negativa, se requiere seguimiento cada 6 meses por 18 meses; pero si en la ecografía se muestra nódulo sólido BIRADS 3 se debe ordenar biopsia trucut guiada por ecografía (55).

➤ **Telorrea.-** La salida de secreción líquida a través de los pezones y se clasifica en fisiológica y patológica (55). En el pezón convergen los conductos galactóforos en los que drenan las células del tejido glandular mamario (56). Dentro de la anamnesis es importante diferenciar si la telorrea se da de manera espontánea o es producida por expresión del pezón, si es o no persistente y si se relaciona con masa o invasión del pezón, en el caso de la telorrea fisiológica ocurre por la compresión externa del pezón y se considera patológica si se produce fuera del periodo de lactancia, es espontánea y persistente (27). La secreción fisiológica se caracteriza por ser de color blanquecino, amarillento, verdoso o café a diferencia de la patológica suele ser serosa, hialina, sanguinolenta o serohemática (55).

1. **Telorrea blanquecina:** Si la secreción es no espontánea, se considera fisiológica y puede ser ocasionada por situaciones como el embarazo, hiperprolactinemia, hipotiroidismo y por algunos medicamentos que estimulan de los lactotropos o que

inhiben la dopamina incluyendo fenotiacinas, benzodiazepinas, haloperidol, metoclopramida, opiáceos, algunos anticonceptivos orales, entre otros.

2. **Telorrea sospechosa: hialina, hemática, serohemática, serosa unilateral, espontánea o persistente:** Se relaciona con tumores papilares, los cuales pueden ir desde lesiones benignas como el papiloma intraductal, hasta un cáncer en el caso del carcinoma papilar, los mismos que deben ser remitidos a cirugía de mama sin importar el resultado de los exámenes paraclínicos(55).

3. **Telorrea amarillenta, verdosa, café espontánea o no espontánea (ectasia ductal):** La ectasia ductal es una patología benigna consistente en la dilatación de los conductos terminales desde 0,5 hasta 5mm. Usualmente son 3 o 4 ductos ectásicos (55).

➤ **Eczema:** Pueden deberse por procesos dermatológicos y comprometer tanto la areola como el pezón o únicamente la areola, y con el tratamiento adecuado deben desaparecer en un tiempo corto, en un aproximado de 15 días, cuyo tratamiento es:

1. Tratamiento tópico con corticoide durante 10 días.
2. Cambio del tipo de jabón que se utiliza normalmente.
3. Lavado manual del sostén con jabón de tocador sin mezclarlo con otras prendas.
4. Uso de sostén de algodón.
5. Si no mejora después de 15 días, se debe remitir la paciente a cirugía de mama para toma de biopsia con el fin de descartar enfermedad de Paget.

➤ **Infección local.** - Presencia de eritema, calor local y dolor en una o en toda la mama, además de celulitis o absceso; cuyo tratamiento es antibiótico por 10 días, y en el caso de absceso, el drenaje del mismo (percutáneo o quirúrgico) (55). Si no hay mejoría de los cambios inflamatorios a nivel local después del terminar el antibiótico se debe remitir a cirugía de mama (55).

➤ **Edema.**- Es un signo clínico de cáncer de mama localmente avanzado, se presenta por bloqueo linfático axilar o por compromiso tumoral de los linfáticos de la dermis (55).

➤ **Ulceración.** - Pérdida de la solución de continuidad en la piel y junto con la retracción de la piel o del complejo areola pezón, y la inversión de inicio reciente del mismo, solicitar paraclínicos y remitir la paciente a cirugía de mama de forma prioritaria (55).

➤ **Mastalgia.-** O mastodinia es el síntoma relacionado con la mama más frecuentemente referido en la consulta (55). La importancia clínica de la mastalgia no solamente está relacionada con la intensidad del dolor (48).

1.1.6.12. Manejo terapéutico

Se debe considerar ciertos factores al momento de brindar tratamiento, siendo estos: etapa tumoral, subtipo del tumor, estado del receptor hormonal (ER, PR) y de HER2, marcadores genómicos, edad (menopausia), estado de salud general y la mutaciones en genes como BRCA1 o BRCA2, estos genes producen proteínas supresoras de tumores, ayudando a reparar el ADN dañado de las células, por lo tanto, tienen el papel de asegurar la estabilidad del material genético de cada una de las células (47).

Cuando cualquiera de estos genes tienen una mutación, no se va a producir la proteína o no cumplirá con su función correctamente y como resultado puede originarse el cáncer; mencionando que las mutaciones específicas que se heredan en los genes BRCA1 y BRCA2 van a incrementar el riesgo de cánceres de seno y de ovario (47).

Existen una serie de tratamientos, la cirugía es la más recomendada por los médicos oncólogos, la lumpectomía es la práctica más recurrente, donde se va a extirpar el tumor y el tejido sano que se encuentra alrededor del mismo, y la mastectomía que es la extirpación del seno total; como siguiente alternativa terapéutica esta la radioterapia, donde se emplean rayos x de alta gama, con el fin de destruir las células cancerígenas (57). Finalmente está la terapia con medicación, que puede ser suministrado por vía intravenosa, intramuscular, oral o subcutánea (47).

Los procedimientos más utilizados para el cáncer de mama son: quimioterapia (ciclofosfamida, etc.), terapia hormonal (tamoxifeno), terapia dirigida (cuando HER2 es positivo se emplea el de medicamentos como trastuzumab, etc.) e inmunoterapia (atezolizumab) (47).

La aparición de efectos secundarios tales como anemia, alopecia, cambios en la piel y en las uñas, delirio, diarrea, falta de apetito, fatiga, náuseas, vómito, entre otros; en pacientes que se someten a tratamientos para destruir las células cancerígenas; motivo por el cual se ha impulsado la búsqueda de nuevas terapias con una efectividad superior a las ya existentes y

con menos efectos colaterales de los tratamientos utilizados actualmente, mejorando su calidad de vida (58). Los recursos naturales son parte importante para descubrir y desarrollar nuevas alternativas terapéuticas contra el cáncer, ante la aprobación de nuevos medicamentos para el cáncer, el departamento de Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos resalta que el 62% son de origen natural ya que poseen una estructura molecular muy diversa se les atribuye una actividad más específica, que las drogas sintéticas (49,59).

1.1.6.13. Criterios para cirugía de mama

Tabla 9.- Criterios de remisión y no remisión a cirugía de mama

Indicaciones de remisión a cirugía de mama	1. Pacientes con masa palpable o nodularidad asimétrica que no tenga representación en exámenes paraclínicos (BIRADS 1 o 2), que genere sospecha clínica o duda diagnóstica.	
	2. Biopsias mamarias que reporten cualquiera de los siguientes:	<ul style="list-style-type: none"> • Lesión papilar. • Hiperplasia ductal o lobulillar con atipias.
		<ul style="list-style-type: none"> • Tumor bifásico no clasificado en la patología. • Neoplasia lobulillar <i>in situ</i>
		<ul style="list-style-type: none"> • Tumor Phillodes. • Fibroadenoma complejo o con atipias.
		<ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma ductal <i>in situ</i> • Carcinoma infiltrante de cualquier histología.
3. Mamografía de tamización o diagnóstica y ecografía mamaria cuyo resultado sea:	<ul style="list-style-type: none"> • Resultado de biopsia no conclusiva o cualquier diagnóstico patológico que no conozca su significado clínico. 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Mamografía BIRADS 4 o 5. • Mamografía BIRADS 3 con masa palpable • Ecografía con masa sólida reportada como BIRADS 3, 4 o 5 y quiste complejo (BIRADS 4). 	
4. Seguimiento de lesión mamográfica (microcalcificaciones, nódulo o asimetría) o ecográfica (quiste complicado) BIRADS 3 que cambie en el control de 6 meses.		
Indicaciones	1. Mastalgia.	

	2. Quistes simples (BIRADS 2).
	3. Quistes complicados (BIRADS 3).
	4. Mamografía de tamización reportada BIRADS 2 o 3 con ECM negativo y con ecografía negativa
	5. Biopsia que reporte contenido de quiste, mastopatía fibroquística, fibroadenoma sin atipia y que no sea complejo y sin indicación de cirugía.

- Fuente: (55)

- Elaborado por: Pérez, C (2020)

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GENERAL:

- Determinar la expresión BAX Y BCL2 en células MCF-7 tratadas con extracto de *Amaranthus hypochondriacus*

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar el efecto del tratamiento del extracto vegetal de *Amaranthus hypochondriacus* en la línea celular MCF7.
- Correlacionar la expresión de proteínas con un efecto pro o antiapoptotico

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

En este estudio se comprobará la acción apoptótica producida por el extracto *amaranthus hypochondriacus* en la línea celular de cáncer de mama (MCF7 ATCC® HTB-22TM); por este motivo es de tipo no experimental.

Según Reffino M, define al estudio no experimental como aquel que se indaga; mismo que permite la obtención de resultados a través de acciones y reacciones para posteriormente ser interpretados (2).

2.2. FINANCIAMIENTO

La presente investigación forma parte del macroproyecto titulado **“Estudio etnobotánico y bioensayos de plantas medicinales relacionadas con el tratamiento de cáncer de cérvix en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua, Ecuador”**; 0904-CU-P-2018 dirigido por la Dra. Carrero Castillo, Yenddy Nayghit PhD.

2.3. RECURSOS Y MATERIALES

Tabla 10.-Recursos

Humanos	Infraestructura
<ul style="list-style-type: none">• Docente tutor del proyecto de investigación.• Personal del laboratorio de investigación de la Universidad Técnica de Ambato del Campus Querochaca	<ul style="list-style-type: none">• Instalaciones de la Facultad de Ciencias de la Salud y Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad Técnica de Ambato; en el Campus Querochaca

- **Elaborado por:** Pérez, C (2020)

Materiales y Equipos

Los reactivos utilizados para el desarrollo del trabajo de investigación pertenecen al Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad Técnica de Ambato en el Campus Querochaca.

Tabla 11.-Materiales, Equipos y Reactivos utilizados en el trabajo de investigación

	PARA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO	PARA LOS CULTIVOS CELULARES	PARA LA EXTRACCIÓN DE ARN	PARA QRT-PCR
MATERIALES	Botellas color ámbar	Frascas Roux 75 cc	Tubos tipo Falcon (15 - 50 mL)	Pipetas
	Papel filtro Whatman #1	Multiplacas de 2x3		
	Probeta	Pipetas	Tubos Eppendorf (1,5 - 2,5 mL)	
	Vaso de precipitación	Pipetas Graduadas (5-10-25 mL)	Pipetas	Puntas
	Matraz aforado	Puntas	Puntas	Placas para RT-PCR (96)
	Recipiente de boca ancha	Tubos tipo Falcon (15 - 50 mL)	Cartucho giratorio	
	Papel Aluminio	Tubos Eppendorf (1,5 - 2,5 mL)		
	EQUIPO	Estufa	Baño María Eléctrico	Vortex
Balanza (mod: EQ-510)		Centrifuga (Sigma Zentrifugen)	La cabina de Flujo laminar vertical	
Filtrador al vacío (WELCH)		Cabina de Bioseguridad clase II	Centrifuga (Sigma Zentrifugen)	Primer Forward
Rotavapor (ELEYA N-1100 Series)		Microscopio Invertido de contraste	La cabina de Flujo laminar vertical	Placas para RT-PCR (96)
pHmetro (Thermo Scientific)		Incubadora	Nanodrop (Thermo Scientific)	Termal Cycler (CFX96** Real-time System)
Liofilizador (Virtis Sp)				
REACTIVOS	Agua destilada	DMEN (Dulbecco Modified Eagle Medium)	PureLink® ARN Mini Kit	SuperScript III
	Alcohol al 96°	Suero Fetal Bovino (FBS)		

	PBS 1X	Glutamina	Buffer de lisis	Primer Forward
		Penicilina/Estreptomicina	Buffer de lavado I	Primer Reverse
		Tripsina-EDTA 0,25%	Buffer de lavado II	2X SYBR green
		PBS 1X	ARNsa-Free	ARN Template
		Células MCF-7	Water	

- **Elaborado por:** Pérez, C (2020)

2.4. MÉTODOS

2.4.1. Recolección de tallos y hojas de la planta

2.4.2. Preparación de los extractos: Una vez recogidas las hojas y tallos de la planta se colocaron a 41°C de temperatura durante 24 horas, posterior a esto fueron trituradas y pesadas, tomando 60 gramos incorporándolo a 200 ml de etanol al 20%, luego fue colocado a 80°C durante una hora, ya para eliminar el etanol se colocó en el rotavapor.

2.4.3. Liofilización: Para esto se utilizó el liofilizador VirTisBench Top (SPScientific) para después ser re suspendido en PBS 1X (buffer fosfato salino), fueron utilizados filtros de 0,22 um para esterilizarlas muestras.

2.4.4 Células MCF-7 son descongeladas. - Las preservar la línea celular MCF-7, se requiere de (-196°C) de atmosfera de nitrógeno líquido, las células fueron colocadas a baño maría durante 1 minuto, y luego fueron transferidas del criovial a un falcón de 15 mililitros que contenía 5 ml de (Dulbecco Modified Eagle Medium) DMEN para causar inhibición de (Dimetilsulfóxido) DMSO.

Previo a la eliminación del sobrenadante fue centrifugado a 500 gravedades durante 5 minutos, una vez realizado esto fue re suspendido en 500 microlitros del medio de cultivo y se pasó a una frasca que contenía 10 mililitros de medio de cultivo previamente suplementado y se colocó después a 37°C y a una atmosfera de 5% de CO₂ (5).

2.4.5 Cultivo celular. – Se utilizó el medio de cultivo DMEN ya complementado con 10 por ciento (v/v) de FBS, 1 por ciento de penicilina 100 U/ml, estreptomicina 10 ug/ml y 2Mm de L-glutamina durante uno o dos días, para que así puedan las células crecer, posteriormente se retiró el medio de la frasca y fue agregado 5 mililitros de tripsina y colocadas en la

incubadora para que las células se despegaran y luego se recogieron las células en tubos falcón.

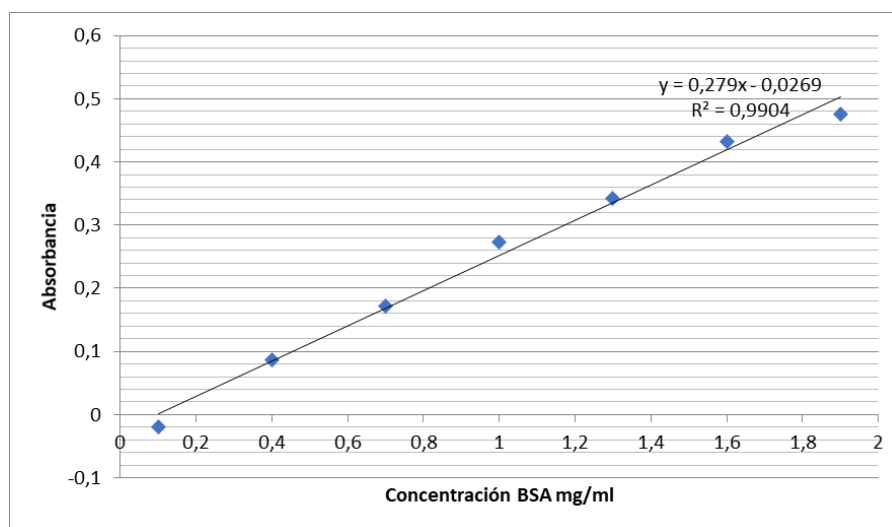
Se obtuvo el sobrenadante de la tripsina y el pellet de las células, el PBS se colocó en el pellet y se desechó el sobrenadante; este procedimiento se realizó por 3 ocasiones para eliminar completamente la tripsina ya que resulta tóxica para las células, cuando se obtuvo el concentrado se re suspendió en 3 – 5 mililitros de medio.

2.4.6. Cuantificación de proteínas

El método de Bradford con su curva estándar con BSA (Albúmina de Suero Bovino) fue utilizado para cuantificar las proteínas; que posee concentraciones entre 0,25 a 1,75 miligramos/mililitros.

El procedimiento fue realizado en 96 pozos de una placa fue colocado 5 microlitros del extracto de *amaranthus hypochondriacus* con 150 microlitros de reactivo BRADFORD, fue incubado durante cinco minutos y fue leído en el equipo VICTOR X3 de PerkinElmer's, fue realizado por triplicado obteniéndose una concentración de proteínas de 0,689 miligramos/mililitros.

Imagen 2.- Curva que permite obtener la concentración de proteínas a través del método de Bradford



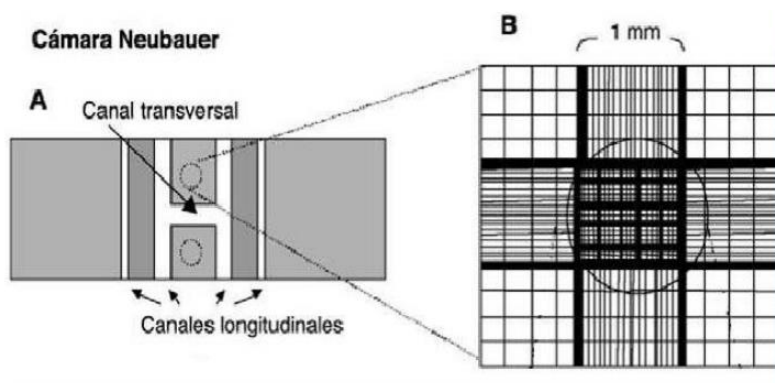
- **Elaborado por: Pérez, C (2020)**

2.4.7. Conteo celular y ensayo MTT

Para el conteo celular se utilizó la cámara de Neubauer, se realizó el cálculo para conocer la cantidad precisa de la suspensión para posterior realizar el ensayo MTT; con una proporción 50-50 de tripan.

Fue utilizado el método de MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) de Thermo Fisher para el ensayo de citotoxicidad; el cual fue realizado con la concentración de proteínas de 0.689 miligramos/mililitros.

Imagen 3.- Cámara de Neubauer



- **Elaborado por:** Pérez, C (2020)

2.4.8. Adición del extracto.

V1=?
C1= 0,689 mg/ml
V2=10 ml
C2= 0,001

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$V1 = \frac{V2 \times C2}{C1}$$

$$V1 = \frac{10 \text{ ML} \times 0,001}{0,689 \text{ mg/ml}}$$

$$V1 = \frac{0,01 \text{ ml}}{0,689 \text{ mg/ml}}$$

$$V1 = 0,01451 \text{ ml}$$

$$\begin{array}{ccc}
 10 \text{ ml} & \begin{array}{c} \nearrow \\ \searrow \end{array} & 1000 \text{ ul} = \boxed{1,451 \text{ ul}} \\
 0,01451 \text{ ml} & \begin{array}{c} \searrow \\ \nearrow \end{array} & X
 \end{array}$$

Fue utilizado el valor obtenido por el método de Bradford, V2= 10 mililitros del medio, C2= 0.001 producto del ensayo de citotoxicidad con el MTT, valores que después de ser sustituidos en la fórmula $V1 \times C1 = V2 \times C2$ donde se obtuvo un volumen de 0,01451 miligramos; y después de la realización de la regla de tres se determinó que 1,451 microlitros que coloco en cada frasca.

Se colocó 1,451 microlitros ya filtrado y diluido en PBS1X con los cultivos que tuvieron un 80% -100% de confluencia para ser después ser incubado por 24 horas a 37°C y a 5% CO2 de atmosfera. Transcurrido el tiempo se observó con el microscopio invertido, se eliminó el DMEN con un lavado de 10 mililitros de PBS1X y se extrajo las células que fueron tratadas para posteriormente agregar 1 mililitro de tripsina/EDTA y fue ingresado a la incubadora a 37°C con 5% CO2 durante cinco minutos para luego ser neutralizada con 2 mililitros de

DMEN y fue colocada en un falcón de 15 mililitros para ser centrifugada por 5 minutos a 500 gravedades, por último se eliminó el sobrenadante y se conservó el pellet a -80°C (59).

2.4.9. Extracción y cuantificación de ARN. –

Una vez transcurridas las 24 horas de las células expuestas al tratamiento, se utilizó el kit comercial PureLink® ARN Mini Kit, Thermo Fisher Scientific) (60) (61).

Para producir la ruptura de la membrana celular el pellet fue resuspendido, fue centrifugado a 2000 xg por un tiempo de cinco minutos a 4 °C para producir el sedimento del mismo, se el PBS se desechó y se añadió 300 microlitros de tampón de lisis 2 mercaptoetanol, para generar el sedimento y producir la lisis celular se colocó en el vortex por dos minutos, luego fue pasado siete veces el lisado en una aguja de 18-21 de calibre colocado en una jeringuilla (60) (61).

Para que hubiera una homogenización se agregó al producto que se obtuvo 300 microlitros de etanol al 70%, mismo que fue colocado en el vortex para mezclarlo y se disuelva cualquier precipitado formado.

Purificación: Para que se purifique los 700 microlitros producidos, fueron transferidos mediante el tubo de recolección a la columna y luego se centrifugó a temperatura ambiente a 12.000 xg por quince segundos, desechando el líquido que atravesó la columna e insertando el cartucho en el tubo de recolección donde fue añadido 700 ul de tampón de lavado I a la columna y fue centrifugado a temperatura ambiente a 12,000 xg durante quince segundos se desechó le flujo y el tubo de recogida. En un nuevo tubo de recolección se colocó el cartucho giratorio y se agregó 500 µl de tampón de lavado II mas etanol al cartucho giratorio y fue centrifugado a temperatura ambiente a 12,000 xg durante quince segundos. El líquido que se obtuvo fue desechado y el cartucho giratorio fue insertado en el mismo tubo de recolección. Más adelante el cartucho giratorio se centrifugo a una velocidad de 12,000 xg por uno o dos minutos para secar la membrana con el ARN unido (60) 61).

Se insertó el cartucho en el tubo de recuperación, en tanto que se desechó el tubo de recolección previa la colocación en el centro del cartucho de 30 microlitros de agua libre de ARNasa y a temperatura ambiente fue incubado durante un minuto; fue centrifugado de

nuevo a temperatura ambiente el cartucho giratorio por 2 minutos a $\geq 12,000$ xg para la extracción del ARN adherido a la membrana del tubo de recuperación para finalmente almacenar el ARN purificado a -80°C (60, 61).

2.5. Cuantificación y Determinación de la Pureza del ARN extraído: Se colocó 1 microlitro del producto que se obtuvo en el nanodrop de Thermo Scientific y se leyó produciéndose una curva en las absorbancias 260 nm y 280 nm; cuando se obtiene un resultado menos a dos quiere decir que el ARN es puro (60).

Para la realización de la qRT-PCR se llegó a diseñar la siguiente secuencia de primer:

Tabla 12.- Cadena de los primer empleados

	CEBADORES DE SENTIDO (5´-3´)	CEBADORES ANTISENTIDO (5´-3´)
	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
BAX	CAAGACCAGGGTGGTTGGG	ATCTTTGTGGCGGAGTG
BCL-2	CATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	GCCGGTTCAGGTACTIONCAGTCA

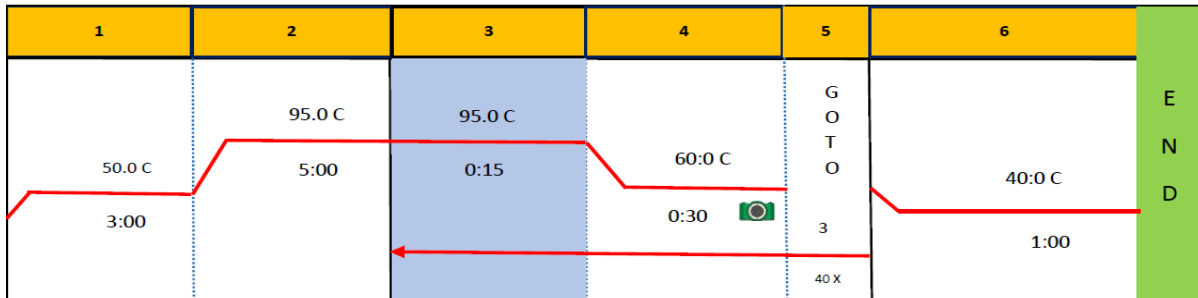
- **Elaborado por:** Pérez, C (2020)

2.5.1. Mediante qRT-PCR expresión de los genes BAX Y BCL2

Para determinar la expresión de los genes fue colocado 25 μL de 2X SYBR Green Reaction Mix con 1 μL de SuperScript III RT/Platinum® Taq Mix con 1 μL del primer Forward (10 μM) con 1 μL del primer Reverse (10 μM) con 500 ng/ μL de ARN (1 μL) para ser complementado con agua libre de ARNasa, se colocó en un vortex por cinco segundos y luego en el cytospin durante 1 minuto (65).

Se programó el equipo CFX96** Real- Time System de BIO-RAD (50 grados centígrados por un tiempo de 3 minutos, 95 grados centígrados durante 5 minutos y 40 ciclos de 95 grados centígrados durante 15 segundos seguido de 60 grados centígrados por 30 segundos, para culminar se coloca 1 minuto a 40°C) (62).

Imagen 4: Temperaturas necesarias para la amplificación de las proteínas BAX Y BCL2



- Elaborado por: Pérez, C (2020)

2.5.2. Real time para BAX Y BCL2.- Se empleó el método el método descrito en 2001 por Livak y Schmittgen $\Delta\Delta Ct$ que constan de:

$$\Delta Ct = Ct (\text{gen diana}) - Ct (\text{Control endógeno})$$

$$\Delta Ct (\text{Calibrador}) = Ct (\text{gen diana control}) - Ct (\text{Control endógeno})$$

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct (\text{calibrador})$$

Con el empleo de las fórmulas antes mencionadas fueron obtenidos los CT tanto del gen diana como del control endógeno, se corrigieron los CT del Housekeeping gen para la eliminación de variaciones producidas por errores en el pipeteo, la parcial degradación del ARN o diferencias de la eficiencia de la retrotranscripción de ARN a ADNc (62).

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{Aumento de expresión del gen diana sobre el calibrador}$$

Se normalizo los resultados obtenidos a valor de 1 con la ecuación anterior, y así los valores de la expresión fueron directamente proporcional a la cantidad absoluta del transcrito (62).

2.5.3. Diseño experimental

Se realizaron por duplicado los procedimientos de esta investigación, fueron analizado con el programa GraphPad InStat3, para edición de gráficos se usó GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software) y mediante análisis de la varianza de una sola vía ANOVA se realizó el análisis estadístico.

2.5. HIPÓTESIS

El *Amaranthus hypochondriacus* posee un efecto pro-apoptótico en las células cancerígenas de mama

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RESULTADOS

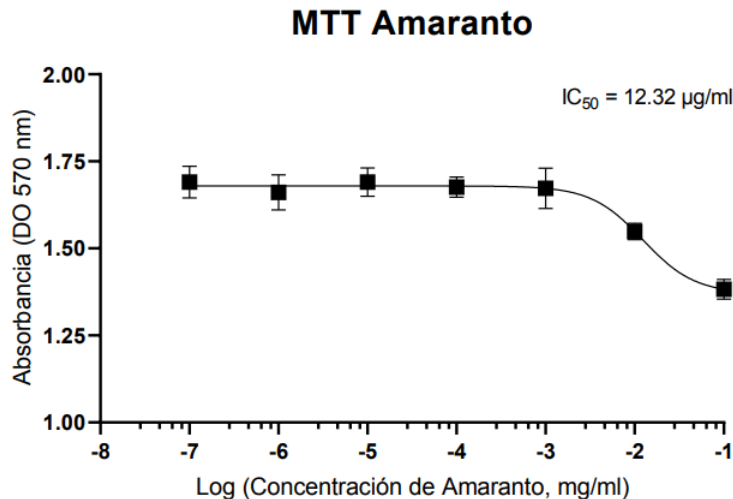
3.1.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

Se obtuvo una concentración de proteínas de 0,689 mg/ml a través del método de Bradford

3.1.2. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

A través del método de MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) de Thermo Fisher se realizó el ensayo de citotoxicidad, realizado con el extracto de *amaranthus hypochondriacus* con una concentración de proteínas de 0.689 miligramos/mililitros diluido en una escala logarítmica 10 desde -1 a -11. Con el IC₅₀ de 12.32 ug/ml se determinó la dosis optima de a 10⁻³ (0.001).

Imagen 5.- Ensayo de Citotoxicidad



3.1.3. CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE *AMARANTHUS HYPOCHONDRIACUS* PARA EL CULTIVO CELULAR

El cálculo de la dosis optima del tratamiento con *Amaranthus hypochondriacus* para las frascas del cultivo se aplicó:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

Dónde:

- ✓ V1= Extracto (vlm)
- ✓ C1= 0,689 mg/ml; concentración proteínas obtenidas por el Método de Bradford.
- ✓ V2= 10 ml de medio en cada frasca
- ✓ C2= 0.001 obtenido a través del ensayo de citotoxicidad con el MTT.

Una vez que fueron reemplazados los valores en la fórmula mencionada anteriormente se obtuvo un valor de 0,01451 mililitros, valor que fue transformado a microlitros mediante regla de tres obteniéndose 1,451 ul; volumen que fue agregado como tratamiento a cada frasca, durante 24 horas.

3.1.4. CUANTIFICACIÓN ARN EN NANODROP

Cuando se recogieron las células ya tratadas y las células control, se extrajo y cuantifico el ARN, se colocó 1 µl del producto en el nanodrop y se leyó la curva en las diferentes absorbancias 260nm y 280nm y se obtuvo:

Tabla 13. Cuantificación de ARN

# Sample ID	NucleicAcidConc.	Unit	A260	A280	260/280
1 BLANC	-0,2	ng/µl	-0,005	-0,014	0,39
2 AM1	33,4	ng/µl	0,836	0,402	2,08
3 AM1	19,2	ng/µl	0,481	0,285	1,69
4 AM2	89,8	ng/µl	2,245	1,087	2,07
5 CT2	23,1	ng/µl	0,579	0,298	1,94

- Elaborado por: Pérez, C (2020)

3.1.5. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN- CONCENTRACIÓN DE ARN

En la Tabla 13 Se observan varias concentraciones de ARN de las células con tratamiento y sus controles. Mediante la técnica de cromatografía basada en adsorción y desorción de

ácidos nucleicos en membranas de sílice en presencia de Trizol, se extrajo el ARN; mejor detallado en la metodología.

Para la obtención de los CT (cycle threshold) se utilizó SYBR Green Reaction Mix, el kit SuperScript III RT/Platinum Taq Mix, primer forward, primer reverse, ARN y agua libre de ARNasa, y esta solución se colocó al vortex y fue colocada en el Cytospin.

Se obtuvieron los CT (Cyclethreshold) para el gen pro-apoptótico Bax y anti-apoptótico Bcl-2, con la programación del Software Biorad CFX96 Real time de BIO-RAD; detallados a continuación:

Ct obtenidos en la qRT-PCR para el gen Bax

Tabla 14. Ct obtenidos de (técnica empleada) para BAX

Ct obtenidos de (técnica empleada) para BAX			
Muestra	Ct		Media
	1° día	2° día	
AMARANTO CONTROL	29,82	29,82	29,82
AMARANTO CÉLULAS	30,73	21,06	25,90

- Elaborado por: Pérez, C (2020)

ANALISIS E INTERPRETACIÓN

En la Tabla 14, se observan las medias de los CT obtenidas del gen pro-apoptótico Bax con las muestras que fueron tratadas con su réplica, obtenidas en el Software Biorad CFX96 Real time.

Ct obtenidos en la qRT-PCR para el gen BCL-2

Tabla 15. Ct obtenidos de (técnica empleada) para Bcl-2

Ct obtenidos de (técnica empleada) para Bcl-2			
Muestra	Ct		Media
	1° día	2° día	
AMARANTO CONTROL	29,11	27,24	28,18
AMARANTO CÉLULAS	28,86	27,97	28,42

- Elaborado por: Pérez, C (2020)

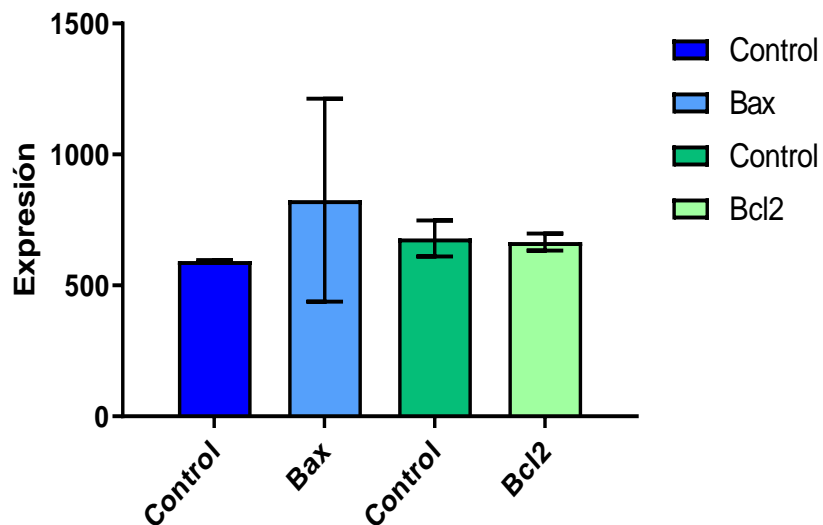
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la Tabla 15, se observan las medias de los CT que se obtuvieron para el gen anti-apoptótico Bcl-2 con las muestras que fueron tratadas con su réplica, obtenidas en el Software Biorad CFX96 Real time.

PCR- Cuantificación relativa.

Ya obtenidos los valores de CT para cada gen, se utilizó el método del año 2001 descrito por Livak&Schmittge ($\Delta\Delta C_T$), utilizando como gen de control endógeno los CT de GAPDH del control es decir no contenían tratamiento con sus controles de los genes BAX y BCL-2 (Anexo 1). Ya calculados los ΔC_T se realizó la corrección logarítmica para sí minimizar la varianza de los valores por la naturaleza exponencial de la curva de qPCR.

Imagen 6 y 7.- Expresión del gen pro-apoptótico Bax y del gen anti-apoptótico Bcl-2 con el método de cuantificación relativa $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ y el test de Tukey-Kramer



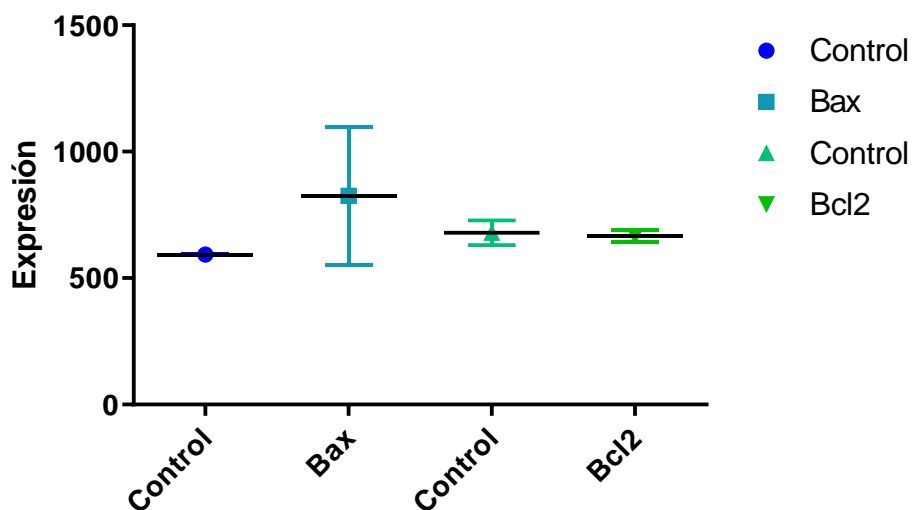


IMAGEN 6 y 7.-

Se relacionó la expresión de los genes BAX y BCL-2 con el control, con la realización de las gráficas se observó que el tratamiento de *Amaranthus hypochondriacus* incremento la expresión del gen pro-apoptótico BAX en relación al control; mientras que en el gen BCL-2 mantiene la expresión similar al control.

3.2. DISCUSIÓN

Para el año 2030 serían diagnosticados 22 millones de casos nuevos de cáncer de mama mundialmente razón por la cual los padecimientos oncológicos son considerados como problemas de salud pública y por el sinnúmero de efectos adversos y colaterales producidos por el tratamiento convencional como la quimioterapia, radioterapia; varias industrias farmacéuticas se han enfocado en la realización de productos derivados de materiales naturales por el sin fin de compuestos bioactivos llegando a ser posibles tratamientos de enfermedades oncológicas; con este argumento el presente estudio tiene como fin aportar con información para evidenciar las actividades biológicas de *amaranthus hypochondriacus* en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

Mengoni A; en el año 2016 realizó investigaciones donde se evaluó la actividad antiproliferativa de la lectina del *Amaranthus hypochondriacus* y *Amaranthus mantegazzianu* sobre células cancerígenas de colon humano las CaCO2/TC7 permitió

concluir que; *Amaranthus mantegazzianus* genero efectos en las células tumorales a menor concentración que *Amaranthus hypochondriacus*, motivo por el cual se sugirió la profundización de investigaciones sobre el mecanismo de la especie natural mencionada (63).

Barba de la Rosa AP, en el 2019 presento un artículo donde relaciona las condiciones para obtener un buen crecimiento y acumulación en las hojas de *Amaranthus hypochondriacus* de flavonoides y ácidos fenólicos, que son moléculas que se van adherir en dependencia de las condiciones ambientales y se afirma además que los flavonoides poseen efectos protectores para las enfermedades cardiovasculares y cáncer ya que son considerados como antioxidantes, antiproliferativos, antiinflamatorios o antibacterianos (59).

Sabbione AC, en el 2019 estudió la inducción antiproliferativa de las proteínas y péptidos de *Amaranthus mantegazzianus* en la línea celular HT-29 obtenida de cáncer de colon humano; donde se presentó inhibición en la reproducción de dicha línea celular después de estar en contacto por 24 horas. Se realizó el estudio de lactato deshidrogenasa en que se produjo disminución de la integridad y lisis de la membrana de las células HT-29 generando apoptosis. Permitió concluir que los péptidos de amaranto liberados posterior a la absorción gastrointestinal produjeron una acción anti proliferativa viable sobre las células tumorales HT-29 (64).

En una de las proteínas estudiadas; BAX se observó un incremento en su expresión con respecto al control, cuando se incluye las células MCF-7 al tratamiento con el extracto *Amaranthus hypochondriacus*; sin embargo, no se observó diferencia significativa en los grupos con relación a la proteína Bcl-2, con esto no se descarta la posibilidad de que el amaranto posee efecto en las células de cáncer de mama; por tal motivo se recomienda la realización de estudios de carácter cuantitativo para que sea demostrado o descartado la acción provocada por el amaranto.

Conforme se realizaba la investigación, se corrobora que el *Amaranthus hypochondriacus* puede tener un efecto pro-apoptótico en células de cáncer de mama, ya que las proteínas que se estudiaron pertenecen a la cascada de la apoptosis o muerte programada y una de ella eleva su expresión al tener contacto con la dosis optima del extracto.

CAPÍTULO IV

4.1. CONCLUSIONES

- Los hallazgos obtenidos nos permiten inferir que el extracto de *Amaranthus hypochondriacus* tiene un efecto sobre la apoptosis.
- La expresión de las proteínas Bax se incrementó, mientras que Bcl2 mantiene su expresión sin cambios cuando son expuestas al tratamiento a base de *Amaranthus hypochondriacus*.
- Los factores de riesgo juegan un papel determinante en la prevención del cáncer de mama, su identificación tempranamente contribuye a reducir la morbimortalidad de mujeres con alto riesgo.

4.2. RECOMENDACIONES

- Llevar a cabo estudios cuantitativos, donde se estudie la expresión de las proteínas posteriormente al ser expuestas a un tratamiento a base de especies naturales como el *Amaranthus hypochondriacus*.
- Estudiar diversas especies naturales buscando opciones que pueden ser consideradas como tratamiento del cáncer aportando a la disminución de efectos no deseados producidos con el tratamiento convencional.

	SAMPLE	CT	Ct GAPDH	CT MUESTRA	CT CALIBRADOR	$\Delta\Delta$ CT	2(- $\Delta\Delta Ct$)	Promedio 2(-$\Delta\Delta Ct$)	DESVIACIÓN ESTANDAR	VARIANZA
BAX	CONTROL	29,82	19,34	10,48	10,480000	8,86	78,50	78,50	0,0000	9,861945833
	CONTROL	29,82	19,34	10,48	10,480000	8,86	78,50			
	AMARANTO	30,73	19,34	11,39	10,480000	7,95	63,20	186,83	6,8377	
	AMARANTO	21,06	19,34	1,72	10,480000	17,62	310,46			
BCL2	CONTROL	29,11	19,34	9,77	9,770000	9,57	91,58	111,23	1,3223	
	CONTROL	27,24	19,34	7,90	9,700000	11,44	130,87			
	AMARANTO	28,86	19,34	9,52	9,700000	9,82	96,43	105,57	0,6293	
	AMARANTO	27,97	19,34	8,63	9,700000	10,71	114,70			

Tabla 16. Anexo 1

- **Elaborado por:** Pérez, C (2020)

BIBLIOGRAFÍA

- American Cancer Society. (2012). Datos y Estadísticas sobre el Cáncer entre los Hispanos/Latinos. Atlanta, Estados Unidos: American Cancer Society.
- American Cancer Society. Global Cancer. 2nd Edition. (2011). American Cancer Statistic. Atlanta: American Cancer .
- Asamblea Nacional Constituyente. (2008). Constitución del Ecuador. Alfaro: Registro Oficial.
- Arce, C., Bargalló, E., Villaseñor, Y., Gamboa, C., Lara, F., Pérez Sánchez, V., & Villarrea, P. (2011). Cáncer de Mama. (I. N. Cancerología, Ed.) Cancerología 6 (, 77 – 86
- Bandi, P., Barrera, E., Graves, K., Hargrove, T., Maitin-Shepard, M., Naishadham, D., . . . Wagner, D. (2014). Datos y Estadísticas sobre el Cáncer entre los Hispanos/Latinos. Atlanta, Georgia: Sociedad Americana contra el Cáncer.
- Baumgartner KB, Hunt WC, Baumgartner RN. (2007). Association of body composition and weight history with breast cancer prognostic markers: divergent pattern for Hispanic and non-Hispanic White women. Am J Epidemiol.
- Bickell NA, Shastri K, Fei K. (2008). tracking and feedback registry to reduce racial disparities in breast cancer care. Journal of the National Cancer Institute.
- Brandan, M. E., & Villaseñor Navarro, Y. (2006). Detección del Cáncer de Mama: Estado de la Mamografía en México. Cancerología 1, 147 - 162.
- Brophy, J., Keith, M., Watterson, A., Park, R., Gilbertson, M., Maticka-Tyndale, E., Luginaah, I. (2012). Breast cancer risk in relation to occupations with 139 exposure to carcinogens and endocrine disruptors: a Canadian case– control study . Environmental Health, 1-17.
- Cárdenas, J., Bargalló, E., Erazo, A., Maafs, E., & Poitevin, A. (2013). Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario (Quinta revisión ed.). Colima: Elsevier

- Chlebowski RT, Chen Z, Anderson GL, et al. (2005). Ethnicity and breast cancer: factors influencing differences in incidence and outcome. *J Natl Cancer Inst.*
- Collaborative Group on Hormonal. (2006). Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet.*
- Cortés, J. (2011). *El pronóstico del cáncer de mama, mejor en mujeres casadas.* Madrid, España: Hospital Vall d'Hebron.
- Cotran, R., Robbins, S., & V, K. (1999). *Patología Estructural y Funcional (Sexta ed.).* McGraw Hill
- Díaz, S., Piñeros, M., & Sánchez, O. (2005). Detección temprana del CaMa: aspectos críticos para un programa de tamizaje organizado en Colombia. *Rev Colomb Cancerol*, 9(3), 93-104.
- Fejerman L, John EM, Huntsman S. (2017). Genetic ancestry and risk of breast cancer among U.S. Latinas. *Cancer Research.*
- Freedman RA, He Y, Winer EP, Keating NL. (2018). Trends in racial and age disparities in definitive local therapy of early-stage breast cancer. *Journal of clinical oncology.* American Society of Clinical Oncology
- INEGI. (2014). *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER.* Aguas Calientes, México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
- La Vecchia C. (2003). Menopause, hormone therapy and breast cancer risk. *European J Cancer Prevention.*
- Reynolds, S. (2012). *Obesidad e Investigación del Cáncer.* Boletín del Instituto Nacional de Cáncer, 2.
- Stuver SO, Zhu J, Simchowitz B, Hassett MJ, Shulman LN, Weingart SN. (2011). Identifying women at risk of delayed breast cancer diagnosis. *Qual Patient Saf.*

Torres Trujillo, Román . (2010). Tumores de mama diagnóstico y tratamiento. México: Editorial Americana Mc Graw Hill .

LINKOGRAFÍA

American Cancer Society . (2013). Cáncer de seno: detección temprana . Obtenido de
Importancia de encontrar el cáncer de seno en sus inicios: www.cancer.org

American Cancer Society. (15 de Octubre de 2013). Riesgo del cáncer de seno. Obtenido de
<http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/recursosadicionales/embarazo-y-cancer-de-seno>

American Cancer Society. (31 de Enero de 2014). Señales y síntomas del cáncer de seno.
Obtenido de <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/recursosadicionales/fragmentado/cancer-de-seno-deteccion-temprana-signs-symptoms-br-ca>

American Society of Clinical Oncology (Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica).
(2011). Guía de cáncer de mama. Estados Unidos : Conquer Cancer Foundation.
Obtenido de www.cancer.net

American Society of Clinical Oncology. (Enero de 2013). ASCO. Obtenido de Cáncer de
mama: <http://www.cancer.net/cancernet-enespa%C3%B1ol/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-demama/factores-de-riesgo>

OMS. (9 de Julio de 2013). Octubre: Mes de Sensibilización sobre el Cáncer de Mama.
Obtenido de http://www.who.int/cancer/events/breast_cancer_month/es/

OMS. (1 de Febrero de 2014). Centro de Prensa. Obtenido de Nota descriptiva N° 297:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

OMS. (1 de Enero de 2014). Globalcan. Obtenido de Estimated Incidence, Mortality and
Prevalence Worldwide in 2012:
http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

Profamilia Sede Nacional. (2014). Conozca los seis pasos para realizar correctamente el
autoexamen de seno. . Obtenido de Bogotá D.C. - Colombia :

http://www.profamilia.org.co/index.php?option=com_content&view=article&id=252:autoexamen-de-seno

Smith, M., Ziev, D., Eltz, D., Slon, S., & Wang, N. (19 de Diciembre de 2012). American Cancer Society recommendations for early breast cancer detection in women without breast symptoms. Obtenido de <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001993.htm>

Vida Saludable – Consejos de Salud . (12 de Marzo de 2014). Discrepancias de cáncer de mama. Obtenido de <http://www.davidmsc.com/discrepancias-decancer-de-mama.html>

CITAS BIBLIOGRÁFICAS – BASE DATOS UTA

EBSCOHOST: Sánchez, C., Petric, G., Militza, D. (2014). Características clínico-patológicas y sobrevida de pacientes con cáncer de mama bilateral sincrónico. (Spanish). Recuperado el 23 de octubre de 2014. Disponible en: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/detail/detail?vid=6&sid=2e2243d8-089d-4034-b912-b75428e0252f%40sessionmgr198&hid=109&bdata=Jmxhbm9ZXMmc2l0ZT1laG9zdC1saXZl#db=a9h&AN=97230628>

EBSCOHOST: Baré, M., Galcerán, J., Ascunce, N., Zubizarreta, R. (2012). Efecto de resultados falsos positivos en reattendance en los programas de cribado de cáncer de mama en España . Recuperado el 23 de octubre de 2014. Disponible en: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/detail/detail?vid=10&sid=2e2243d8-089d-4034-b912-b75428e0252f%40sessionmgr198&hid=109&bdata=Jmxhbm9ZXMmc2l0ZT1laG9zdC1saXZl#db=a9h&AN=76281377>

EBSCOHOST: Tonani, M., Carvalho, E. (2008).CANCER RISK AND PREVENTIVE BEHAVIOR: PERSUASION AS AN INTERVENTION STRATEGY. 2 ecdcava@usp.br Recuperado el 23 de octubre de 2014. Disponible en: <http://web.b.ebscohost.com/ehost/detail/detail?vid=10&sid=2e2243d8-089d-4034-b912-b75428e0252f%40sessionmgr198&hid=109&bdata=Jmxhbm9ZXMmc2l0ZT1laG9zdC1saXZl#db=a9h&AN=76281377>

EBRARY: Lachaise Cala, S., Benavides Lachaise, S. (2009) Aspectos bioéticos en el diagnóstico precoz del cáncer de mama Recuperado el 23 de octubre de 2014. Disponible en: <http://site.ebrary.com/lib/utasp/docDetail.action?docID=10306911&p00=cancer%20mama>

EBRARY: Sandín, B., Chorot, P. (2012). Screening del cáncer de mama: afectación psicológica Recuperado el 23 de octubre de 2014. Disponible en: <http://site.ebrary.com/lib/utasp/docDetail.action?docID=10623879&p00=cancer%20mama>