



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Baroni, María Verónica

Acción antitumoral del ácido carnósico, sobre células humanas de cáncer colorrectal



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Baroni, M. V. (2014). *Acción antitumoral del ácido carnósico, sobre células humanas de cáncer colorrectal. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/87>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Acción antitumoral del ácido carnósico, sobre células humanas de cáncer colorrectal

TESIS DOCTORAL

María Verónica Barni

vero369@hotmail.com

Resumen

El cáncer de colorrectal (CCR) es una de las enfermedades de mayor incidencia a nivel mundial y la segunda causa de muerte en Argentina. El presente estudio pretende contribuir al conocimiento de los efectos antitumorales del ácido carnósico, principal bioactivo de la planta de *Rosmarinus Officinalis* L. sobre líneas celulares de CCR de origen humano. El ácido carnósico (AC) es el principal diterpeno y uno de los compuestos bioactivos mayoritario que hemos identificado de un extracto de *R. Officinalis*. En este trabajo, se estudió su acción antitumoral sobre diferentes líneas celulares de cáncer colorrectal (CCR) humanas.

Se determinó que el AC posee acción antiproliferativa, de modo dosis dependiente, sobre tres líneas de CCR: Caco-2, HT29 y LoVo.

En la línea celular Caco-2, se determinó que la exposición al AC provocó la inducción de la muerte celular mediante procesos asociados a la apoptosis.

Se llevaron a cabo investigaciones a nivel celular para dilucidar el efecto del AC sobre diversos procesos involucrados en la progresión tumoral del CCR como adhesión, migración e invasión celular. Se estableció que el AC inhibió la migración y la invasión celular en la línea Caco-2. Se observó además que el diterpeno inhibe la adhesión celular a sustratos de la matriz extracelular (MEC) como colágeno tipo I y fibronectina. En cuanto a la búsqueda de potenciales blancos moleculares de acción del AC involucrados en los procesos anteriormente mencionados, se encontró que el AC fue capaz de reducir la expresión y la actividad proteolítica de proteasas de la MEC como ser la metaloproteasa 9 (MMP-9) y el activador del plasminógeno del tipo uroquinasa (uPA).

Además, dada la eficacia del AC para inhibir la adhesión celular sobre distintos sustratos de la MEC, se estudió su efecto sobre el camino de señalización de la quinasa de adhesión focal (del inglés "focal adhesión kinase", FAK), que desempeña un papel fundamental en la migración celular, invasión y en la organización del citoesqueleto celular. Los resultados revelaron que el AC fue capaz de alterar la fosforilación de proteínas que median los contactos focales, así como de regular la organización del citoesqueleto de actina y también de disminuir significativamente la capacidad invasiva de las células Caco-2 sobre una membrana de matrigel, todos estos, eventos claves en la progresión tumoral.

Por otro lado, se observó un efecto inhibitorio del AC sobre la expresión a nivel de ARNm y proteico de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), proteína asociada a procesos inflamatorios que se sobreexpresa en células de CCR.

Por último, se evaluó *in vivo* la toxicidad y los efectos antitumorales del AC en animales de experimentación (ratones). El AC administrado a 5mg/kg durante 15 días, no evidenció nefrotoxicidad o hepatotoxicidad y no alteró significativamente parámetros bioquímicos y fisiológicos en los ratones. Se obtuvieron indicios auspiciosos sobre la acción antitumoral de AC en tumores producidos a partir de la línea celular HT29.

En resumen, los resultados de este trabajo de tesis doctoral indicarían el potencial uso del AC como nueva

alternativa terapéutica contra el cáncer colorrectal humano ya sea como un posible agente preventivo o terapéutico.

Palabras claves: Ácido carnósico, *Rosmarinus Officinalis* L., antitumoral, cáncer colorrectal, antiproliferativo, apoptosis, adhesión, migración, invasión, metaloproteasas, activador de plasminógeno del tipo uroquinasa, quinasa de adhesión focal, citoesqueleto de actina, "spreading", ciclooxygenasa-2.

Lugar de trabajo: Laboratorio de Bioquímica Vegetal, Fundación Instituto Leloir; Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Índice

1. Abreviaturas

2. Introducción

2.1. Generalidades

2.2. Cáncer

2.2.1. Generación de estímulos para el crecimiento celular

2.2.2. Insensibilización de inhibidores del crecimiento

2.2.3. Evasión de la apoptosis

2.2.4. Ilimitado potencial para reproducirse

2.2.5. Angiogénesis sostenida

2.2.6. Invasión tisular, metástasis

2.2.6.1. Adhesión celular

2.2.6.1.1. Contacto focal

2.2.6.1.2. Quinasa de adhesión focal (FAK)

2.2.6.2. Degradación proteolítica de la matriz extracelular

2.2.6.3. Migración de células tumorales

2.2.7. Microambiente inflamatorio

2.2.7.1. Ciclooxigenasa-2 (COX-2)

2.3. Cáncer colorrectal

2.3.1. Anti-inflamatorios no esteroideos

2.3.2. Quimioprevención

2.4. Compuestos antitumorales de origen vegetal

2.4.1. Inhibición de la fase invasiva

2.4.2. Apoptosis

2.5. Rosmarinus Officinalis L

2.5.1. Farmacología R. Officinalis

2.6. Antecedentes del trabajo de tesis

2.6.1. Ácido carnósico, acción antitumoral y anti-inflamatorios

2.7. Trabajos previos del laboratorio

3. Hipótesis y objetivos

3.1. Hipótesis

3.2. Objetivos generales

3.2.1. Objetivos particulares

4. Materiales y métodos

4.1. Material vegetal

4.1.1. HPLC: Caracterización del extracto de romero

4.2. Líneas celulares de adenocarcinoma de colon humanas

4.3. Actividad antitumoral in vitro

4.3.1. Viabilidad celular

4.3.1.1. Dosis Efectiva que inhiben el 50% de las células (DE50)

4.4. Apoptosis celular

4.4.1. Microscopía de fluorescencia

4.4.2. Citometría de flujo

4.5. Capacidad invasiva de la célula

4.5.1. Adhesión celular

4.5.2. Western Blot: detección de proteínas de los contactos focales

4.5.3. Inmuno fluorescencia indirecta (IFI)

4.5.4. Actividad degradativa de la matriz extracelular

4.5.4.1. Caseinólisis radial

4.5.4.2. Zimografía cuantitativa

4.5.4.3. Western Blot: detección de la proteína MMP-9

4.5.5. Ensayo de cicatrización de la herida

4.5.6. Ensayo con cámara de “transwell”

4.6. Actividad anti-inflamatoria del AC

4.6.1. RT-PCR: expresión del ARNm de la COX-2

4.6.2. Western Blot: Expresión proteica de la COX-2

4.6.3. Transfección plasmídica: plásmido del promotor de la COX-2

4.7. Actividad del ER y AC in vivo

4.7.1. Toxicidad del ER y el AC

4.7.2. Acción antitumoral del AC in vivo

5. Resultados

- 5.1. Identificación de los principales bioactivos del *Rosmarinus Officinalis* L. por HPLC
- 5.2. Efecto del AC sobre la viabilidad celular
 - 5.2.1 Inhibición de la viabilidad de tres líneas celulares de CCR
 - 5.2.2. Identificación y determinación de células apoptóticas
- 5.3. Acción del AC sobre la actividad de proteasas de la matriz extracelular
- 5.4. Efecto del AC sobre la migración celular
- 5.5. Efecto del AC sobre la invasión celular
- 5.6. Efecto del AC sobre la capacidad de adhesión celular
- 5.7. Efecto del AC sobre la regulación de proteínas del contacto focal de adhesión
- 5.8. Efecto del AC sobre los contactos focales y el citoesqueleto de actina
- 5.9. Acción del AC sobre la expresión de la COX-2 a nivel de ARNm y de proteína
- 5.10. Efecto del AC sobre la regulación de la transcripción de la COX-2
- 5.11. Toxicidad del AC in vivo
- 5.12. Actividad antitumoral del AC in vivo
- 6. Discusión y conclusiones
 - 6.1. Discusión
 - 6.2. Conclusiones
- 7. Perspectivas
- 8. Publicaciones
 - 8.1. Publicaciones completas en revistas/libros internacionales con referato
 - 8.2. Presentaciones en congreso
- 9. Bibliografía
- 10. Agradecimientos

1. Abreviaturas

AC	ácido carnósico
ADN	ácido desoxiribonucleico ADNc ácido desoxiribonucleico copia
AINE	anti-inflamatorios no esteroideo
AP-1	del inglés “activator protein 1” AR ácido rosmarínico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATCC	del inglés “American Type Culture Collection”
CAS	del inglés “Crk-associated substrate”
CCR	cáncer colorrectal
COX-1	ciclooxigenasa 1
COX-2	ciclooxigenasa 2
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DE50	dosis efectiva que inhibe el 50% de la viabilidad celular
DMEM	del inglés, “Dulbecco's Modified Eagle's medium” EDTA ácido etilendiaminotetraacético
ER	extracto de romero
ERNs	especies reactivas del nitrógeno
EROs	especies reactivas del oxígeno
EGF	del inglés, “epidermal growth factor”
FAK	quinasa de adhesión focal, del inglés “focal adhesion quinasa”
FITC	Fluoresceína 5-isotiocianato
TNF- α	factor de necrosis tumoral- α
GFs	factores de crecimiento, del inglés “growth factors”

HPLC	del ingles, "High Performance Liquid Chromatography"
IFI	inmunofluorescencia indirecta
MC	medio condicionado
MEC	matriz extracelular
MMP	metaloproteasa
MTS	del inglés, "3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2- (4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt"
NF-kB	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, del ingles, "nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells"
OMS	organización mundial de la salud
PAGE	del inglés, "polyacrylamide gel electrophoresis"
PBS	del ingles, "phosphate buffered saline"
PG	prostaglandinas
PI3K	del inglés, "phosphatidylinositol 3-kinase"
PVDF	membrana de Fluoruro de polivinilideno
RIPA	del inglés, "radioimmunoprecipitation assay buffer"
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, del inglés "reverse transcription polymerase chain reaction"
SFB	suero fetal bovino
TWEEN	monooleato de polioxietileno sorbitan
tPA	del inglés, "tissue plasminogen activator" VEGF del inglés, "vascular endothelial growth factor"
uPA	activador del plasminógeno tipo uroquinasa

2. Introducción

2.1. Generalidades

En los últimos años la búsqueda de alternativas terapéuticas a partir de productos naturales para aliviar o curar diversas patologías para las cuales no existen medicamentos efectivos, como el cáncer se ha intensificado. La obtención de nuevos fármacos a partir de la biodiversidad vegetal es un área de gran interés, tomando en consideración la potencialidad de encontrar nuevas estructuras capaces de ejercer acciones específicas y que sean menos agresivas para el organismo humano (Ji *et al.*, 2009).

El cáncer es una de las enfermedades con mayor incidencia en humanos y es la principal causa de mortalidad a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones, dato previsto en el año 2012, a 22 millones en las próximas dos décadas (OMS, 2014). Esta enfermedad se puede desarrollar en general en todos los animales superiores, forma parte de una patología compleja ya que no existe un solo tipo de cáncer y abarca un grupo heterogéneo con más de 200 tipos de tumores malignos. Cada tipo de cáncer posee características particulares, pudiendo considerarse enfermedades independientes, con sus causas, su evolución y su tratamiento específico.

En el mundo occidental el riesgo de contraer cáncer es mayor, debido a los hábitos de vida poco saludables como el tabaquismo, el sedentarismo o el consumo de dietas hipercalóricas. En particular, la incidencia del cáncer colorrectal (CCR) está asociado a la dieta, dado que las grasas saturadas derivadas de ciertos alimentos, influirían en el daño oxidativo celular (Bruce *et al.*, 2000). El CCR presenta una incidencia anual de aproximadamente 1 millón de casos y una mortalidad anual de más de 500.000, siendo en frecuencia la segunda causa de mortalidad por cáncer entre hombres y mujeres (WGO/IDCA, 2007).

Las plantas son una fuente muy rica de compuestos naturales con diversidad de actividades biológicas, tal es así que en la actualidad más del 60% de las drogas probadas contra el cáncer, derivan de plantas superiores, entre ellas el taxol, la camptotecina, la vinblastina y la vincristina. La búsqueda de nuevas moléculas vegetales, más efectivas y menos dañinas para el organismo humano, que actúen inhibiendo la proliferación e invasión de las células tumorales y que además presenten acciones anti-inflamatorias, incentivan el estudio de la farmacología de compuestos de origen vegetal (Storz *et al.*, 2005; Balkwill *et al.*, 2010).

2.2. Cáncer

La tumorigénesis en humanos está determinada por un conjunto de múltiples procesos producidos por alteraciones genéticas que conducen a la transformación progresiva de las células normales a malignas. El complejo proceso de la oncogénesis con sus cambios moleculares, bioquímicos y celulares, puede sintetizarse en seis alteraciones esenciales adquiridas, aplicables a prácticamente todas las neoplasias malignas (Hanahan *et al.*, 2000).

Hasta hace poco, el estudio de la oncogénesis estaba focalizada en la célula neoplásica, pero en los últimos 10 años los investigadores han dirigido su atención a estudios que evidencian que la inflamación crónica, causada por diversos factores como ser: infecciones bacterianas, virales, químicos irritantes pueden predisponer a un individuo al desarrollo del cáncer (Shacter *et al.*, 2002; Terzić *et al.*, 2010).

Estudios del microambiente inflamatorio de los tejidos neoplásicos malignos han confirmado que hoy en día la inflamación crónica es considerada como el séptimo proceso fundamental de la tumorigénesis (Mantovani *et al.*, 2009) (**Figura 1**).

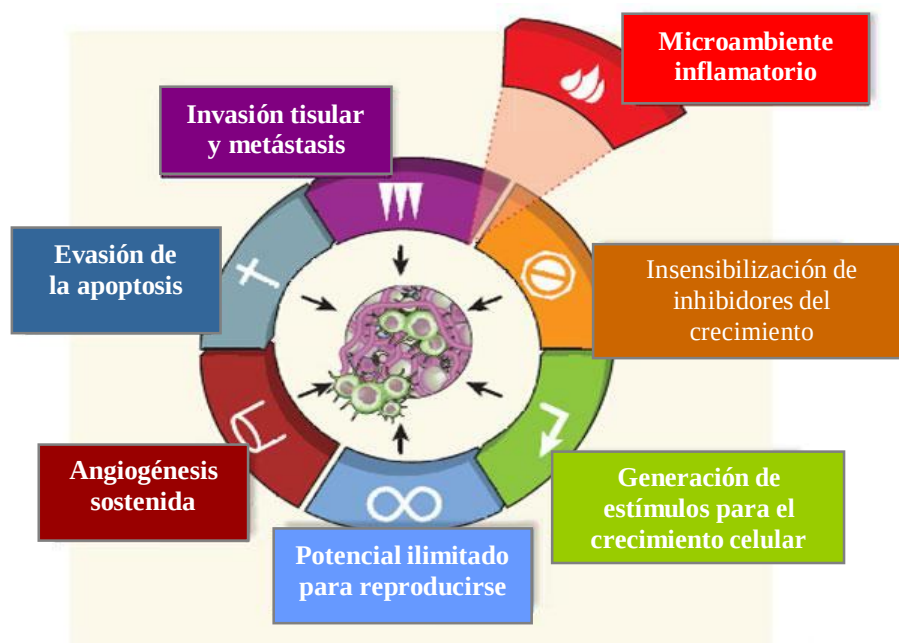


Figura 1. Procesos involucrados en el progreso tumoral (adaptado de Mantovani *et al.*, 2009).

2.2.1. Generación de estímulos para el crecimiento celular

Mediante este proceso se reduce la dependencia de la estimulación del microambiente del tejido normal adyacente. Entre las estrategias que desarrollan las células tumorales para adquirir la autonomía se destaca la producción de factores de crecimiento que interaccionan con los receptores de superficie celular y estimulan la señalización de crecimiento en el interior de las células.

2.2.2. Insensibilización de inhibidores del crecimiento

Se caracteriza por la evasión de las señales que las células normales utilizan para inhibir la proliferación como ser el bloqueo del ciclo celular, específicamente en la transición de la fase G1 a la S.

2.2.3. Evasión de la apoptosis

Las células normales poseen mecanismos de control o “checkpoints”, que actúan analizando la normalidad de la progresión del ciclo celular. Cuando estos sistemas de control detectan anomalías, actúan deteniendo el ciclo, activando mecanismos de reparación y finalmente en el caso de no poder resolver las anomalías, desencadenan la muerte celular programada o apoptosis. Las células tumorales se caracterizan por la pérdida de estos controles, lo que permite la acumulación de errores en el ADN que conducen a la inestabilidad genética característica de las células tumorales. Los sistemas de control deberían inducir a la apoptosis de estas células que proliferan anormalmente, pero su alteración impide la muerte de las mismas (Mantovani *et al.*, 2008).

2.2.4. Potencial ilimitado para reproducirse

Este proceso es consecuencia de las capacidades adquiridas por las células como ser autosuficiencia para generar estímulos que promueven el crecimiento celular, insensibilidad para la señalización de inhibición de crecimiento y evasión de la apoptosis. Las células de mamíferos pierden durante cada replicación generacional entre 50-100 pb del ADN telomérico de las terminaciones de todos los cromosomas en cada ciclo celular, esta pérdida cromosomal inhabilita la actividad de la ADN polimerasa para completar la replicación durante cada fase S, resultando en la muerte celular. Mientras que en las

células tumorales existen mecanismos que protegen las terminaciones de los ADN teloméricos, inmortalizando así a las células (Bryan *et al.*, 1995).

2.2.5. Angiogénesis sostenida

En la formación de nuevos tejidos los procesos de angiogénesis, crecimiento de nuevos capilares sanguíneos, son transitorios y cuidadosamente regulados. Muchos factores de crecimiento, además del pH bajo y los niveles bajos de oxígeno que se encuentran en los tumores, estimulan la expresión del VEGF ("Vascular endothelial growth factor"), que luego puede activar la expresión de otros factores involucrados en la angiogénesis como las metaloproteasas (MMPs) y las moléculas de adhesión celular. De esta forma el VEGF actúa como el mediador clave de la angiogénesis tumoral, estimulando el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos desde los capilares adyacentes, permitiendo que los tumores tengan acceso al oxígeno y a los nutrientes que necesitan para crecer y desarrollar metástasis.

2.2.6. Invasión tisular y metástasis

Los cánceres son capaces de propagarse por el cuerpo debido a dos mecanismos: invasión y metástasis. La invasión es la migración y la penetración directa por las células del cáncer en los tejidos vecinos. La metástasis es la capacidad de las células del cáncer de penetrar en los vasos sanguíneos y linfáticos, circular a través de la circulación sanguínea, y después crecer en un nuevo foco (metástasis) en tejidos normales de otra parte del cuerpo.

La matriz extracelular (MEC) está formada por gran cantidad de componentes que se clasifican en tres grandes grupos: proteoglicanos y glucosaminoglicanos, proteínas estructurales (colágeno y elastina), y proteínas de adhesión (fibronectina y laminina). El potencial invasivo de las células malignas depende principalmente de tres fenómenos, en donde interactúan las células con la MEC: adhesión celular; degradación proteolítica de la matriz extracelular y migración de las células tumorales (Cascales *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2007; Roycik *et al.*, 2009).

2.2.6.1. Adhesión celular

El citoesqueleto interacciona tanto con moléculas intracelulares como con los receptores de adhesión, conectando así el microambiente externo con el interior de la célula. Se sabe que los cambios en el citoesqueleto pueden modular la actividad de los receptores de adhesión y de otros oncogenes, y participar, de esta manera, en la

progresión tumoral. El citoesqueleto de actina es el que está involucrado en la regulación de la forma, la movilidad y la adhesión celular, por lo que alteraciones en su función contribuyen a la transformación (DeMali *et al.*, 2003; Ridley *et al.*, 2003). En las células normales los microfilamentos de actina son muy estables y, por lo tanto, las células tienen muy poco movimiento; en las células cancerosas la desorganización del citoesqueleto de actina impide la formación de contactos célula- célula y facilita la migración mediada por la degradación de componentes de la matriz extracelular.

La invasión tumoral provoca alteraciones en los sistemas de adhesión celular, que juegan un papel dual en los procesos invasivos. Por un lado, las células tumorales deben debilitar las uniones que estabilizan su localización normal, o anclajes, pero al mismo tiempo necesitan mantener y /o desarrollar mecanismos de adhesión al sustrato que le garanticen los puntos de apoyo necesarios para avanzar a través del tejido circundante y que les proporcionen señales de supervivencia y de proliferación. Las moléculas de adhesión entre células del mismo tipo (homotípicas) suelen actuar como supresoras de invasión y la reducción de este tipo de uniones intercelulares permite a las células tumorales separarse de las células vecinas a las que normalmente están unidas.

El papel dual de los sistemas de adhesión celular en los procesos invasivos es especialmente notable en el caso de las adhesiones célula-sustrato, de tal manera que el carácter dinámico de las mismas es crucial en tales procesos.

2.2.6.1.1. Contacto focal

La matriz extracelular, las integrinas y proteínas del citoesqueleto celular conforman los sitios llamados contactos focales (**Figura 2**). Los contactos focales son un grupo de proteínas estructurales y regulatorias, entre ellas se destacan: la quinasa de adhesión focal (FAK); Src tirosina quinasa también conocido como proto-oncogen c- Src; p130Cas (Crk-associated substrate (CAS); Paxilina, que traducen la señalización del exterior al interior celular y también puede emitir señales intracelulares para generar la activación de integrinas en la superficie celular (Calderwood *et al.*, 2003). Las integrinas constituyen la principal familia de receptores celulares que participan en la relación entre la célula y la matriz extracelular, así como en las interacciones célula-célula. Las interacciones en las que participan las integrinas están muy relacionadas con la regulación de un gran número de funciones celulares, entre ellas el desarrollo embrionario, el crecimiento de células tumorales, la metástasis (Clark *et al.*, 1995). Las integrinas están formadas por dos subunidades α y β , que median la unión a diversas moléculas de la matriz extracelular, tales como laminina, fibronectina, vitronectina y colágenos, y poseen dominios tanto intracelular como extracelulares. El corto dominio intracelular carece de actividad

enzimática intrínseca y se cree que funciona acoplándose a dos tipos distintos de proteínas, el primer tipo son proteínas citoplasmáticas que inducen la formación de grandes complejos proteicos, entre ellos se encuentran proteínas del citoesqueleto y proteínas que intervienen en la formación y organización de las placas de adhesión (Sastry *et al.*, 1993).

Las uniones de las integrinas a la paxilina, proteína multidominio del citoesqueleto celular que se localiza en el extremo de las fibras de estrés de la actina y a la talina, reclutan a la FAK y a la vinculina para formar el contacto focal (**Figura 2**). La α -actinina es una proteína del citoesqueleto que es fosforilada por FAK, se une a la vinculina y une entre sí a la actomiosina, fibras de estrés que se unen a los contactos focales. La Zixina y la α -actinina están presentes en los contactos maduros.

Además de las proteínas mencionadas también se destacan la proteína Src, la cual es una tirosina kinasa que se asocia a membrana y la proteína adaptadora p130Cas (Defilippi *et al.*, 2006), estas a su vez se unen a los contactos focales para formar un cluster con las integrinas. La activación de FAK, mediada por las integrinas, depende en parte de la unión a la matriz y de los cambios que se producen en los vínculos que mantienen con el citoesqueleto celular. La composición de un contacto focal varía constantemente en función de las señales externas y las respuestas celulares.

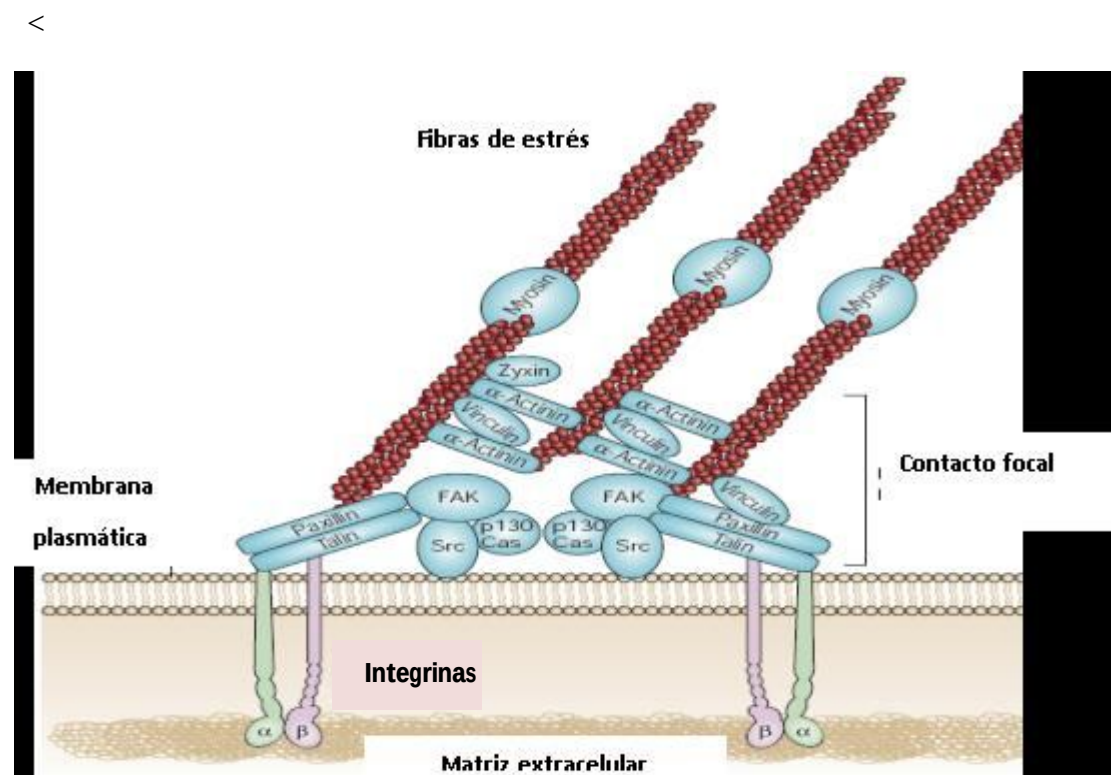


Figura 2. Arquitectura molecular del contacto focal. Las fibras de estrés se conectan a la membrana plasmática mediante el contacto focal, y este a la matriz extracelular, mediante las integrinas (adaptado de Satyajit *et al.*, 2005).

2.2.6.1.2. Quinasa de adhesión focal (FAK)

El anclaje de las células epiteliales normales a la membrana basal mediada por las integrinas es necesario para la supervivencia celular. Cuando este anclaje desaparece, tiene lugar el proceso de apoptosis (Golubovskaya *et al.*, 2003). Las células tumorales se hacen resistentes a este fenómeno, en parte mediante la activación permanente de proteínas como la FAK (Gabarra-Niecko *et al.*, 2003; McLean *et al.*, 2005). La activación de esta proteína se da cuando las integrinas se agrupan y se unen a la matriz extracelular y transmiten señales al interior celular (Kornberg *et al.*, 1992). La FAK ha demostrado estar involucrada en diferentes eventos celulares mediados por integrinas, incluidos la promoción de la migración celular, la proliferación, el “spreading” y la inhibición de la apoptosis celular (Cary *et al.*, 1999). Para llevar a cabo dichas actividades la FAK interacciona con diversas proteínas del citoesqueleto para activar distintas vías de señalización.

La FAK contiene tres dominios estructurales y varios sitios de fosforilación (**Figura 3**). El dominio FERM (“protein 4.1, ezrin, radixin and moesin homology”), media la interacción de la FAK con receptores EGF (“epidermal growth factor”). El dominio FAT (“focal adhesion targeting”) recluta a la FAK en los contactos focales por asociación con proteínas como la talina y la paxilina (**Figura 2**). FAK puede ser fosforilada (P) en varios residuos de tirosinas: en Y397 promueve sitios de unión para Src, PLC β (phospholipasa C β) y SOCS (“suppressor of cytokine signalling”).

La activación de FAK para promover la migración celular se da por la interacción de esta con las moléculas Src y p130Cas. También FAK puede promover el “spreading” celular formando complejos principalmente con las proteínas Src y paxilina.

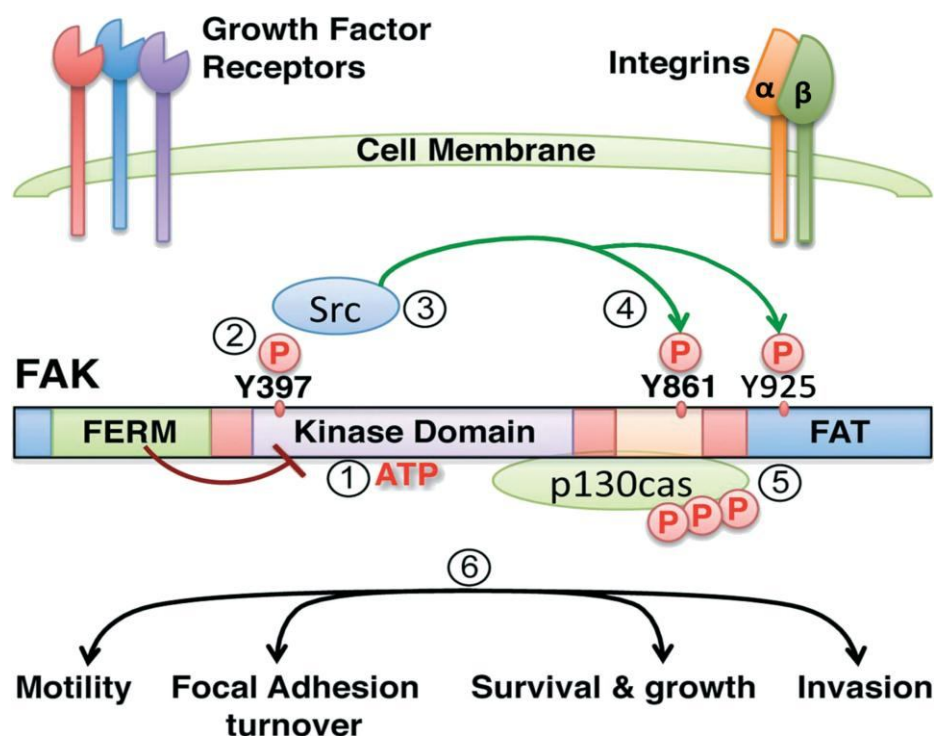


Figura 3. Dominios estructurales, sitios de fosforilación y función de la FAK. La FAK está constituida por tres dominios: FERM, dominio quinasa y FAT. El paradigma actual de la activación de FAK implica una secuencia de eventos: **1-** factores de crecimiento o integrinas agrupados inician las señales que liberan la interacción de auto-inhibición de FERM a dominios quinasa que conduce a la activación de FAK quinasa, por unión a ATP ; **2-** FAK se autofosforila en la tirosina (Y) 397; **3-** se crea un sitio de unión de alta afinidad por Src; **4-** FAK se transfosforila en los 2 residuos claves Y861 y Y925; **5-** p130Cas se une a dominios de fosforilación de FAK ricos en prolinas y se FAK se fosforila; **6-** la activación de FAK provoca cambios en la morfología celular y en su comportamiento, incluyendo cambios en la movilidad, la adhesión focal, la supervivencia, el crecimiento y la invasión. (Adaptado de Lechertier *et al.*, 2012).

FAK promueve la inhibición de la apoptosis, por mecanismos que involucran a PI3K “phosphatidylinositol 3-kinase” y a otra proteína quinasa Akt “PKB/Akt” que es una serina/treonina quinasa y por otro mecanismo que envuelve a PLA2 “phospholipase- A2”, PKC y p53. Por esta razón la FAK es propuesta por varios autores como una proteína clave en la progresión tumoral (Steven *et al.*, 2009). Diversos trabajos sugieren que la FAK es una proteína clave en la señalización celular de los procesos invasivos del cáncer. Se han determinado altos niveles de FAK (ARNm y proteína) en tumores humanos altamente invasivos con metástasis como el cáncer de colon (Han *et al.*, 1997), y pobres tasas de supervivencia. La sobreexpresión de FAK en células transformadas con v-Src aumenta su capacidad para invadir Matrigel (Schaller *et al.*, 2004). La desregulación de las uniones célula-célula mediada por Src es dependiente de la señalización de FAK (Avizienyte *et al.*,

2002). También se reportó que durante la conversión de adenoma a carcinoma aumentó el número de copias del gen FAK en un modelo *in vitro* de cáncer de colon humano (Agochiya *et al.*, 1999).

En los últimos años se describieron pequeñas moléculas inhibidoras de FAK que se dirigen al sitio de unión a ATP y bloquean la actividad quinasa de FAK, uno de los inhibidores fue descrito por Novartis: NVP-TAE226 y dos por Pfizer: PF-573 228 y PF-562 271 (Slack-Davis *et al.*, 2007). Sin embargo, estos inhibidores inhiben secuencias consenso de unión a ATP y presentan efectos secundarios no deseados. Recientemente se encontró un nuevo inhibidor sintético de FAK del sitio Y397, en un estudio de 140.000 compuestos en el Instituto Nacional del Cáncer, que disminuyó la viabilidad celular y la clonogenicidad de la línea de colon SW620 (Golubovskaya *et al.*, 2012),

2.2.6.2. Degradación proteolítica de la matriz extracelular

Los tumores benignos permanecen confinados debido a que las membranas basales de los epitelios y la matriz extracelular de los tejidos conectivos constituyen una barrera física infranqueable para las células que los componen, impidiendo eficazmente su diseminación local y sistémica. La superación de esta barrera por las células invasivas implica la degradación localizada de los distintos componentes de la matriz extracelular. Este fenómeno corresponde a la segunda etapa de la invasión tumoral y constituye el aspecto mejor estudiado del proceso invasivo. El aumento de la actividad proteolítica tiene lugar como consecuencia de la alteración del balance entre los niveles de proteasas activas y de sus inhibidores. La actividad proteolítica secretada por las células es un elemento indispensable para la invasión celular. Esta actividad está dada por una batería de enzimas como las colagenasas, metaloproteasas, elastasas y zimógenos secretados por la célula hacia el espacio extracelular, su principal actividad es degradar la matriz extracelular en su medio ambiente inmediato y activar factores de crecimiento, receptores de superficie y moléculas de adhesión.

La plasmina es una importante enzima degradativa que es secretada por la célula como zimógeno, denominado plasminógeno. El plasminógeno queda retenido en la matriz extracelular no teniendo actividad proteolítica sobre ella. La molécula que convierte al plasminógeno en plasmina se denomina activador de plasminógeno y es secretada por la célula en respuesta a ciertos estímulos. Existen dos tipos de activadores del plasminógeno el uPA (“urokinase plasminogen activator”) que se describió originalmente en la orina, de donde proviene su nombre y el tPA (“tissue plasminogen activator”) (Aertgeerts *et al.*, 2003). Estos convierten al plasminógeno en plasmina la cual degrada la fibronectina, la

laminina y colagenasas. El uPA es una serino-proteasa de 45-55 kDa, según la especie, que en su forma activa es un dímero, con cadenas A y B unidas por puentes disulfuro. En la cadena A se encuentra el dominio de unión a su receptor ("uPAR"), que se encuentra anclado en el lado exterior de la membrana citoplasmática por una cadena de glicosil fosfatidilinositol. La activación del plasminógeno por el uPA se incrementa hasta 40 veces cuando éste está unido a su receptor, focalizando así el frente de degradación (Blasi *et al.*, 1997). Las MMPs son proteasas extracelulares requeridas en numerosos procesos relacionados con el desarrollo y la regeneración celular (Sternlicht *et al.*, 2001), y su principal actividad es degradar moléculas de la superficie celular y otras proteínas pericelulares. Se han descrito 25 miembros de la familia MMP, que se clasifican en cinco subfamilias: colagenasas, gelatinasas, estromelisin, metaloproteasas de membrana (MT-MMP) y otras MMPs (Overall *et al.*, 2002; Folgueras *et al.*, 2004). Todas ellas difieren en su estructura y especificidad de sustrato, pero su acción combinada es capaz de conducir a la degradación de prácticamente la totalidad de los componentes macromoleculares de la MEC. Este hecho, junto con su capacidad de actuar a pH fisiológico, convierte a estas enzimas en candidatos que participan en la destrucción tisular que acompaña al cáncer. En particular las MMP2 (72 kDa) y MMP9 (92 kDa) (gelatinasas A y B), se distinguen por la inserción de tres repeticiones ricas en cisteína en el dominio catalítico (Overall *et al.* 2002). Estos insertos se parecen a las repeticiones de unión al colágeno tipo II de la fibronectina y se requieren para unirse y romper colágeno y elastina. La actividad proteolítica de las MMPs se regula a tres niveles: transcripción, activación de la proenzima e inactivación (López-Otín *et al.*, 2008). Estos mecanismos operan coordinadamente para asegurar que la expresión y actividad de las MMP se circunscriban a aquellos sitios y condiciones en los que es necesaria su actividad. Sin embargo, los tumores malignos han generado estrategias para evadir estos mecanismos reguladores lo cual conduce a la actividad proteolítica incontrolada que acompaña, la invasión y la metástasis en el cáncer (López-Otín *et al.*, 2007; Cascales *et al.*, 2010), procesos que además involucran la migración celular.

2.2.6.3. Migración de células tumorales

La migración de las células tumorales es fundamental en el proceso de invasión primaria, para alcanzar un lecho vascular, y en la colonización de un nuevo órgano. Se ha demostrado que la movilidad de las células tumorales se correlaciona directamente con su potencial metastático (Volk *et al.*, 1984).

Las células invasivas pueden moverse en respuesta a factores extracelulares solubles de una manera direccional (quimiotaxis) o aleatoria (quimiocinesis), o en respuesta a

componentes inmovilizados en la matriz extracelular (haptotaxis). Este movimiento es de tipo ameboide, implica reordenaciones constantes del citoesqueleto y alteraciones continuas de las uniones con la matriz extracelular.

Los microfilamentos (o filamentos de actina) se encuentran normalmente localizados cerca de la membrana plasmática en las células animales. Se forman por la polimerización de dos tipos de proteínas globulares: α -actina y β -actina, siendo esta última la más frecuente y presente en la mayoría de las células eucariotas. La despolimerización de los filamentos de actina en la parte posterior de la célula en movimiento y su ensamblaje en la región anterior da lugar a tres tipos de protuberancias en el mismo: filopodios, lamalipodios y pseudópodos, consecutivamente. En estas protuberancias se establecen uniones focales mediante la interacción de las integrinas presentes en la membrana plasmática de las células tumorales con sus ligandos de la matriz extracelular, uniones que proporcionan el anclaje necesario para el desplazamiento de la célula, al tiempo que este tipo de uniones focales se debilita en la parte posterior, permitiendo su retracción. La fuerza necesaria para el desplazamiento parece estar proporcionada por la contracción de los filamentos de actina (Lauffenburger *et al.*, 1996). Diversos factores pueden estimular la migración de las células tumorales, por ejemplo la presencia de proteínas que componen la MEC como la vitronectina, la fibronectina, la laminina, el colágeno tipo I y IV además de factores de crecimiento (Woodhouse *et al.*, 1997).

El proceso de migración (**Figura 4**) celular implica, por tanto, interacciones dinámicas de las células con su sustrato así como una reorganización del citoesqueleto de actina donde intervienen integrinas, las cuales a su vez pueden actuar como receptores o activadores de la expresión de MMPs. Las MMPs que junto con el sistema uPA-uPAR proporcionan una conexión evidente entre los mecanismos de adhesión, degradación de la membrana basal en las células tumorales, incentivando así el desarrollo de la carcinogénesis.

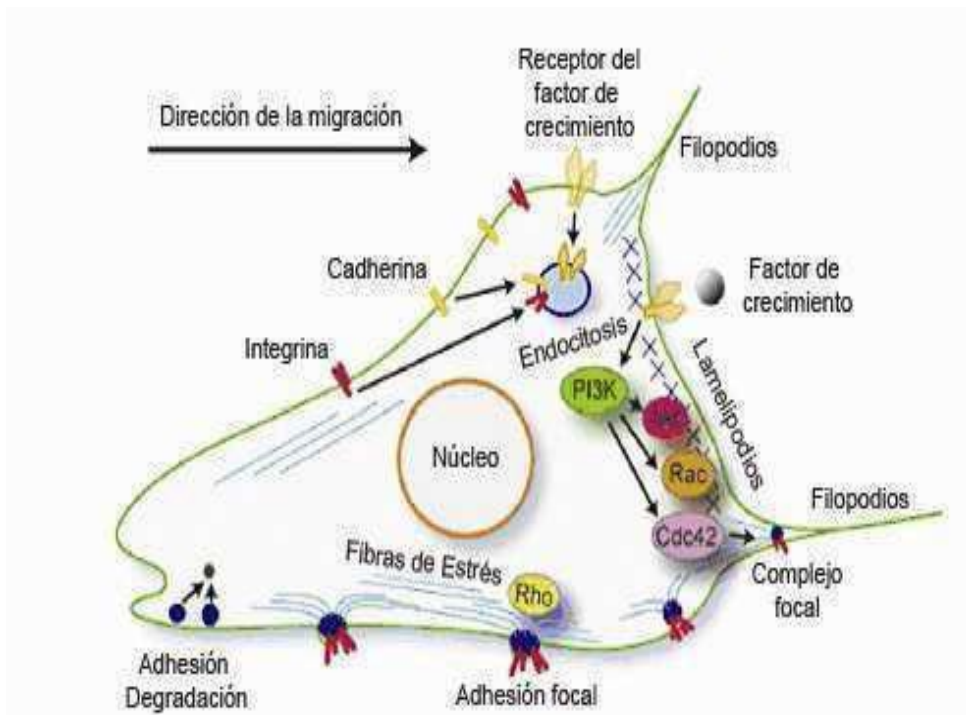


Figura 4. Migración celular. 1-Se forma una protrusión (lamelipodio) en el borde de la célula que está en la dirección del movimiento; 2-se produce el anclaje de la membrana al sustrato en el borde frontal a través de la adhesión focal (estructuras de adhesión con integrinas); 3-se contrae la red de fibras de estrés de actina, que genera la tensión suficiente para tirar a la células hacia adelante; 4- se desarman las adhesiones focales, permitiendo a la célula retraerse y ser arrastrada en la dirección del movimiento (Broussard *et al.*, 2008).

2.2.7. Microambiente inflamatorio

El proceso de inflamación -cáncer se puede desarrollar a través de dos vías: extrínseca, es promovida por ciertas condiciones inflamatorias infecciosas y no infecciosas y la intrínseca, es activada por alteraciones genéticas capaces de causar inflamación y neoplasia, como los oncogenes que estimulan la producción de mediadores inflamatorios y la formación de un microambiente inflamatorio en el tumor (Mantovani *et al.*, 2008; Schottenfeld *et al.*, 2006).

La inflamación es la principal reacción de la inmunidad innata para defender al organismo frente a los patógenos. Además de las infecciones bacterianas y virales, las injurias físicas como la radiación UV y las químicas como las producidas por las especies reactivas del oxígeno (EROs) y del nitrógeno (ERN), pueden inducir la inflamación de los tejidos. Tales estímulos activan señales intracelulares que regulan la expresión de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina-1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la interleuquina-6 (IL-6), junto con quimioquinas y moléculas de adhesión celular,

para promover el reclutamiento y la activación de células del sistema inmune (Kerlikowske *et al.*, 2010). Si el estímulo causante de la reacción no es eliminado o falla su autolimitación, la inflamación se transforma en crónica.

Diversas enfermedades están asociadas a la persistencia de la respuesta inflamatoria, entre ellas el cáncer (Karin *et al.*, 2005). La inflamación crónica se caracteriza por un daño tisular sostenido, proliferación celular inducida por ese daño, y reparación tisular. Los pacientes que sufren de desórdenes inflamatorios del colon, como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, tienen un riesgo mayor de desarrollar cáncer de colon, mientras que el tratamiento de la colitis con drogas anti-inflamatorias reduce ese riesgo (Eaden *et al.*, 2000, Ying *et al.*, 2005, Coussens *et al.*, 2002).

2.2.7.1. Ciclooxygenasa-2 (COX-2)

Las ciclooxygenasas (COX) son enzimas que catalizan la síntesis de prostaglandinas (PG) a partir del ácido araquidónico. El primer paso de la síntesis de las PG es la hidrólisis de los fosfolípidos para liberar ácido araquidónico. Luego, la actividad ciclooxygenasa de la prostaglandina-endoperoxido sintasa (PGHS) cataliza la reacción del oxígeno molecular con el ácido araquidónico para formar un intermediario inestable, la PGG₂, que es rápidamente convertida a PGH₂ por la actividad peroxidasa (POX) de la misma enzima. Diversas isomerasas específicas convierten la PGH₂ en las distintas PG bioactivas y en tromboxano A₂. Existen dos isoformas ampliamente caracterizadas de la PGHS: COX-1 y COX-2. Ambas isoformas están localizadas en la superficie luminal del retículo endoplasmático y en la membrana nuclear, tanto interna como externa. Se han descripto ampliamente la actividad de las isoenzimas de ciclooxygenasa (Smith *et al.*, 2001, Tanabe *et al.*, 2002): COX-1 es expresada constitutivamente en muchos tejidos y produce prostaglandinas esenciales para el mantenimiento de funciones fisiológicas como la homeostasis vascular o las funciones gástricas y renales (Lopez Parra *et al.*, 2002). Por su parte la COX-2 responde a la inducción de factores de crecimiento, oncogénesis, carcinógenos y esteroides de formol promotores de tumores, en forma inmediata (Liao *et al.*, 2007; Duque *et al.*, 2006), sus niveles se ven incrementados con la inflamación y en algunos tipos de cáncer. Esta elevada en más del 90% de los carcinomas de colon esporádicos y en el 40% de los adenomas colónicos. Las concentraciones de COX-2 aumentan durante toda la oncogénesis y la expresión promueve la angiogénesis y la proliferación (Raymond *et al.*, 2003; DuBois *et al.*, 1998; Coussens *et al.*, 2002; Grivennikov *et al.*, 2010).

Diversos estudios en modelos animales han documentado el papel de la COX-2 en la carcinogénesis. Por ejemplo, en un modelo de poliposis intestinal, la expresión de COX-2

correlaciona con la delección de APC (“adenomatous polyposis coli”), un gen supresor de tumores crítico durante la carcinogénesis (Oshima *et al.*, 2001). Además, se demostró la capacidad de modular la invasividad de las células tumorales mediante la reducción de la expresión de la caderina E, y el aumento de la motilidad celular y de la expresión y actividad de distintas metaloproteasas (Xianmin *et al.*, 2011). Otros estudios demuestran que el aumento de componentes de la matriz extracelular como el colágeno tipo I está regulado por la COX-2 y activa la FAK en las células (Alique *et al.*, 2011). Estos y otros datos sugieren que la COX-2, tienen un papel importante en la carcinogénesis y la progresión neoplásica. La diversidad de receptores y sus diferentes vías de señalización sugieren que los efectos pro-tumorigénicos de la COX-2 dependen del tipo celular.

La correlación existente entre el desarrollo tumoral y la expresión de COX-2, revelaría el potencial de esta enzima como blanco de terapias quimiopreventivas. Dirigiendo estas terapias a inhibidores selectivos de la COX-2 (Fournier *et al.*, 2000).

2.3. Cáncer colorectal

El cáncer de intestino grueso o cáncer colorrectal (CCR) es en la actualidad un problema importante por su alta incidencia y su alta mortalidad en humanos. De hecho, la mitad de la población mundial desarrolla antes de los setenta años de edad un adenoma en el colon, y uno de cada diez casos progresa a carcinoma. Así el CCR constituye el segundo en incidencia y mortalidad en Argentina y uno de los más importantes del mundo con medio millón de muertes y un millón de nuevos casos diagnosticados cada año (Gloeckler *et al.*, 2003; Meyerhardt *et al.*, 2005).

Los datos sobre incidencia apuntados anteriormente, indican que en la susceptibilidad al CCR influyen tanto factores alimenticios (dieta rica en grasas y proteínas y pobre en fibra y vegetales, fundamentalmente), como el progresivo envejecimiento de la población. Aunque el factor hereditario tiene escaso impacto en la incidencia poblacional (menos de un 5% de los casos de CCR). No obstante, se han descrito ciertos síndromes hereditarios como son: la Poliposis Adenomatosa Familiar, relacionado con mutaciones en los genes supresores de tumores APC o p53 y el Cáncer de Colon Hereditario No Polipósico o Síndrome de Lynch, relacionado con mutaciones en genes de reparación (Benito *et al.*, 2006). Los avances en la biología molecular así como el conocimiento de los mecanismos de acción de los diferentes fármacos antineoplásicos, han puesto de manifiesto la relación entre determinados factores moleculares y biológicos con la agresividad, la capacidad de proliferación y la diferenciación tumoral, la migración, la adhesión, la invasión, la capacidad apoptótica, las funciones inmunes y la respuesta al tratamiento en el CCR avanzado. Los

antineoplásicos que se utilizan para el tratamiento del cáncer colorrectal se presentan en la **Tabla 1.**

Tabla 1. Medicamentos antineoplásicos contra CCR.

Medicamento	Blanco de acción
5 fluoruracilo, Tomudex, Capecitabina, Tegafur, Ftorafur, Multitarget-antifolate (MTA), BOF-2	Inhibidor de Timidilato Sintasa (TS).
Oxaliplatino, Topotecán (TPT), Irinotecán (CPT-11)	Inhibidor de ADN-Topoisomerasa I
Bevacizumab (Avastin)	Inhibidor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

Uno de los principales obstáculos en el tratamiento de esta neoplasia es el fenotipo de resistencia a los diferentes fármacos antineoplásicos que conducen a una pérdida de eficiencia de los mismos. La mayoría de los tumores de colon son intrínsecamente resistentes a la quimioterapia, lo cual limita susceptiblemente su tratamiento. La quimioterapia sistémica, utilizando los agentes estándares, presenta una tasa de respuesta objetiva (parciales o completas) inferior al 40%.

Estos factores impulsan la búsqueda de nuevos compuestos mas efectivos y menos dañinos para el organismo humano que tengan como objetivo inhibir el crecimiento de las células tumorales y modular otros blancos moleculares que potencian la actividad tumoral en estas células, como ser moléculas que se expresan en los entornos inflamatorios o que contribuyen a la migración e invasión celular.

2.3.1. Anti-inflamatorios no esteroideos

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) son un grupo de fármacos que comparten una serie de características clínicas y farmacológicas a pesar de ser químicamente diferentes, en la actualidad se los conoce más por el acrónimo AINEs, para diferenciarlos de los glucocorticoides, el otro gran grupo de fármacos usados para el tratamiento de la inflamación. El principal mecanismo de acción de estos fármacos es la inhibición de la actividad de la enzima ciclooxigenasa, las cuales catalizan la síntesis de prostanoïdes (Sabichi *et al.*, 2004).

La aspirina, ácido salicílico, es el inhibidor enzimático más conocido de las COXs, usándose tradicionalmente para combatir dolor, fiebre e inflamación. Su propiedad más característica es la poca especificidad a la hora de inhibir tanto la COX-1 como la COX-2,

bloqueando la producción de PGs tanto en procesos patológicos como en procesos fisiológicos, pudiendo causar serios daños gastrointestinales (Thun *et al.*, 1993). Recientemente se han desarrollado nuevos AINEs, que inhiben de forma selectiva COX-2 como el Celecoxib y Rofecoxib (Pinheiro *et al.*, 2002). Dado que la COX-2 es capaz de modular distintas vías de señalización asociadas con a la progresión tumoral (**Figura 5**), los inhibidores de COX-2 son menos tóxicos y mas específicos y por lo tanto son más adecuados como agentes quimiopreventivos.

En particular se sabe que la incidencia del CCR está asociada a procesos inflamatorios y recientemente se ha reportado que existe una clara relación entre microambiente inflamatorio y desarrollo tumoral (Sutcliffe *et al.*, 2013a y 2013b). Varios trabajos han descripto que los AINES son propuestos como quimiopreventivos contra CCR (Ricchi *et al.*, 2003). Por esta razón es importante motivar la búsqueda de nuevos compuestos que presenten esta selectividad por la inhibición de la COX-2 sin afectar la COX-1 y que sean seguros para el uso, en pacientes que sufren de inflamaciones crónicas, como es el caso del cáncer colorrectal.

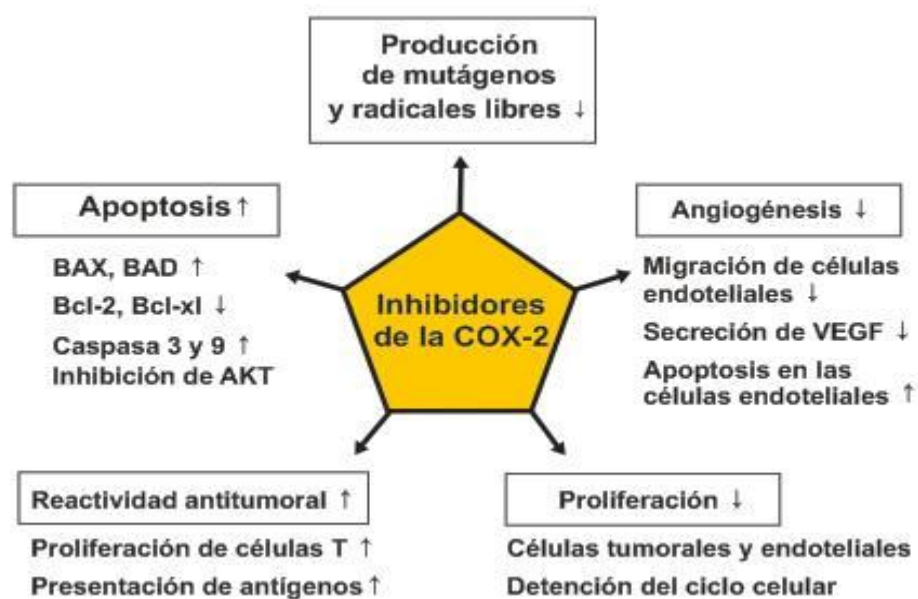


Figura 5. Efectos antitumorales de inhibidores de la COX-2. Los inhibidores de COX-2 afectan ciertos procesos celulares: disminuyen la producción de mutágenos y radicales libres, disminuyen los procesos de la angiogénesis, disminuyen la proliferación y aumentan la reactividad antitumoral y la apoptosis celular.

2.3.2. Quimioprevención

La quimioprevención se puede definir como una vía de prevención contra la aparición

de ciertas enfermedades, mediante la ingesta de uno o más compuestos de origen natural, químico o sintético (Siddiqui *et al.*, 2008). La quimioprevención es una alternativa que puede complementarse durante la ingesta diaria de alimentos. Numerosos estudios epidemiológicos han relacionado el consumo de frutas y verduras con un menor riesgo de contraer cáncer (Aggarwal *et al.*, 2006; McCullough *et al.*, 2011).

La dieta está considerada como uno de los mayores factores etiológicos en el desarrollo del CCR. Sin embargo, determinar la relación entre la dieta y el cáncer es difícil debido al largo intervalo requerido para el proceso de la carcinogénesis (Park *et al.*, 2005). Lo recomendado actualmente para prevenir este tipo de cáncer es disminuir el consumo de carnes rojas y grasas, las cuales aumentan la producción de ácidos biliares en el organismo y que a su vez pueden inducir hiperproliferación de la mucosa intestinal, y alterarse así diversos genes asociados con la transformación neoplásica de las células colónicas como el AP-1("activator protein 1") (Glinghammar *et al.*, 1999). Así el aumento de la ingesta de productos de origen vegetal como fibras, frutas y verduras, podrían prevenir y apalejar el desarrollo del cáncer colorrectal.

2.4. Compuestos antitumorales de origen vegetal

Históricamente, el desarrollo de la farmacología estuvo íntimamente ligado a la farmacognosia, es decir al reconocimiento y la descripción de los productos naturales con capacidad de sanar. Entre las fuentes naturales más comúnmente utilizadas se encontraban los mismos organismos que eran utilizados para la alimentación, como los hongos y las plantas. Con el advenimiento de la medicina moderna, acompañado por nuevas técnicas de análisis de actividad biológica y purificación de compuestos bioactivos, uno de los mayores logros ha sido aislar y caracterizar las drogas responsables de la actividad farmacológica, provenientes de fuentes naturales.

Los compuestos bioactivos provenientes de una planta medicinal, son ciertas moléculas orgánicas de bajo peso molecular sintetizadas por la planta, responsable de una o varias actividades biológicas. En su conjunto, las plantas producen una gran diversidad de productos naturales de bajo peso molecular, la cual abarca alrededor de 1×10^5 compuestos orgánicos, conocidos como metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios se distinguen de los intermediarios del metabolismo primario, por que generalmente no son esenciales para los procesos metabólicos básicos de la planta. Los metabolitos secundarios se clasifican en tres grupos químicos principales: productos secundarios nitrogenados, terpenos, y compuestos fenólicos (Taiz *et al.*, 2002).

La gran variedad de estos compuestos cumplen en las plantas diversos roles ecológicos como combatir y crear resistencias contra microorganismos e insectos patógenos, y favorecer la integridad de las plantas que se encuentra en continua exposición a factores ambientales de estrés como ser radiaciones ultravioletas y altas temperaturas. Dichos compuestos se hallan en la totalidad de los alimentos procedentes de las plantas como ser verduras, legumbres, frutas, frutos secos y bebidas como vino, cerveza, cacao, café e infusiones de plantas aromáticas y medicinales (Kliebenstein *et al.*, 2004; Lambert *et al.*, 2005).

En la actualidad, una gran cantidad de drogas de distinto origen se comercializa como productos farmacéuticos. Un censo realizado por la Auditoría de Prescripciones Nacionales de los Estados Unidos señala que 1 de cada 4 drogas prescritas como medicamentos posee uno a más principios activos de origen botánico (Kumar *et al.* 2004). La **Tabla 2** muestra metabolitos secundarios aislados de plantas capaces de modular blancos moleculares en diferentes tipos celulares.

Tabla 2. Compuestos vegetales con actividad antineoplásica

Droga	Blanco	Efecto	Referencia
Quercetina Genisteína	Proteínas tirosina quinasas (PKT)	Inhibición de las vías de transducción de señales	Lin <i>et al.</i> , 2004.
Apigenina Curcumina	Proteína quinasa C (PKC) y enzimas de la ruta de metabolización del ácido araquidónico		
Genisteína, lapigenina, luteolina quercetina	Células de leucemia HL-60, diferenciación a granulocitos y monocitos	Inducción de la diferenciación celular	Choi <i>et al.</i> , 2001. Mata-Greenwood <i>et al.</i> , 2001
Vincristina Vimblastina	Microtúbulos	Inhibidores de la polimerización ó desestabilizantes de microtúbulos	Margolis <i>et al.</i> , 1977.
Taxol		Potenciadores de la polimerización o estabilizantes	Xiao <i>et al.</i> , 2006

Ciertos compuestos vegetales poseen acción sobre diferentes procesos involucrados en la progresión tumoral lo que puede conducir a su potencial uso como agentes citostáticos en las últimas etapas de la carcinogénesis más que como elementos preventivos de las primeras fases (Heinrich *et al.*, 2006; Fresco *et al.*, 2010).

2.4.1. Inhibición de la fase invasiva

La posibilidad de bloquear el crecimiento tumoral por inhibición de la angiogénesis representa uno de los objetivos primordiales en el tratamiento de tumores sólidos. Las MMPs, los factores de crecimiento angiogénicos y sus receptores son los principales objetivos para la inhibición de la angiogénesis. Por ejemplo, se ha reportado que el galato de epigallocatequina (EGCG), uno de los flavonoides del té verde, es un potente inhibidor de la MMP-2 y MMP-9 y de la quinasa de adhesión focal (FAK) que inhibe la invasión y metástasis de las células cancerígenas (Zhen *et al.*, 2006).

2.4.2. Apoptosis

La supervivencia de un organismo multicelular depende del balance entre la vida y la muerte de sus células. La apoptosis o "muerte celular programada" se puede definir como el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula, que concluyen con la muerte de la célula de una forma ordenada y silenciosa, sin producir ningún tipo de reacción en los tejidos. La apoptosis es un proceso de autodestrucción celular controlada que permite al organismo su correcta morfogénesis y la eliminación de las células que amenacen su supervivencia además de ser necesaria para evitar la sobreproducción celular. La muerte celular programada es parte integral del desarrollo de los tejidos tanto de plantas como de animales pluricelulares. La célula apoptótica rápidamente es fagocitada por macrófagos o por células vecinas debido a la exposición de marcadores de fagocitosis en la superficie celular como la fosfatidilserina, evitando la exposición del material intracelular al sistema inmune que podría desencadenar una respuesta inflamatoria. La célula apoptótica sufre una serie de cambios morfológicos y bioquímicos característicos (Zhen *et al.*, 2006):

- Cambios morfológicos: la membrana plasmática se altera, existe una pérdida de estructura de la superficie celular, disminuye el volumen celular y se produce la condensación del citoplasma. Además se produce la pérdida de orgánulos principalmente mitocondrias, el engrosamiento del retículo endoplásmico, alteraciones en la membrana nuclear, así como condensación y fragmentación nuclear dando lugar a la formación de los llamados cuerpos picnóticos ó apoptóticos.

- Cambios bioquímicos, entre los mecanismos que se barajan se encuentra: la disminución de las EROs, la regulación de la expresión de proteínas de choque térmico, la modulación de las vías de señalización, la inhibición de la actividad de la topoisomerasa I/II, la liberación de citocromo c con la subsiguiente activación de las caspasas-3 y -9, la represión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL y aumento de la expresión de Bax y Bak (proteínas proapoptóticas), activación de la endonucleasa G y la supresión de la

proteína Mcl-1. La inducción de la rotura del ADN y la fragmentación proteica es otro posible mecanismo.

La pérdida de regulación de la apoptosis es un factor crítico en la oncogénesis. La inducción de la apoptosis de células tumorales o el impedimento de su inhibición son hipotéticos mecanismos antitumorales de algunos compuestos vegetales.

Estas evidencias demuestran que la naturaleza provee gran cantidad de metabolitos de origen vegetal con actividad farmacológica de utilidad para combatir el crecimiento de células tumorales, por esta razón es pertinente aislar y caracterizar los compuestos bioactivos de un extracto vegetal y estudiar sus mecanismos de acción.

2.5. *Rosmarinus officinalis* L.

Rosmarinus officinalis L., conocido tradicionalmente como romero, es un arbusto leñoso aromático de hojas perennes y muy ramificado, perteneciente a la familia Labiatae (ex Lamiaceae) (**Figura 6**). Las plantas maduras alcanzan alrededor de un metro de alto. Los tallos jóvenes son tiernos y se vuelven leñosos al madurar. Las hojas, pequeñas y muy abundantes, son simples, enteras y lineales. Se disponen de forma opuesta y son además sésiles y coriáceas, con los bordes hacia abajo y están cubiertas de glándulas secretorias que liberan compuestos responsables del característico aroma de esta especie.

Las flores son pequeñas, de unos 5 mm de largo. La corola es de una sola pieza bilabiada, y presenta coloración en tonos celeste, lila, rosa o blanco. Son flores axilares, que nacen como ramilletes a partir de los meristemas ubicados en la zona de unión de la hoja con el tallo y se localizan por lo general en la cima de las ramas. El fruto es un tetraquenio de color marrón pardo. La floración se da dos veces al año, a comienzos de otoño y a finales de primavera.

A**B**

Figura 6. *Rosmarinus Officinalis* L. **A** Cultivo de *R. officinalis*. **B** Aspecto general de la inflorescencia, imagen extraída de internet.

R. officinalis crece en regiones secas y cálidas, adaptándose muy bien a los suelos pobres. Estas regiones abarcan zonas litorales y de baja montaña (laderas y collados), desde la costa hasta 2,800 metros de altitud. Su distribución geográfica comprende principalmente el sur de Europa, especialmente el área Mediterránea, de donde es originario. En Argentina crece mayormente en las provincias de San Luis, Córdoba, y del Noroeste.

Entre los principales metabolitos secundarios aislados de las hojas de la planta de *R. officinalis*, se encuentran:

Terpenoides: se destaca el diterpeno fenólico, ácido carnósico (**Figura 7A**), que es convertido por oxidación a carnosol. A su vez, el carnosol puede ser oxidado a otros diterpenos tricíclicos como el rosmanol, el epirosmanol y el 7-metilepirosmanol. También se encuentran presentes triterpenos como el ácido ursólico y el ácido oleanólico.

Flavonoides: Los principales compuestos son las flavonas como la hesperidina y la genkwanina (apigenina 7-metil ether) y los glicósidos de flavonas, como la fegopolina.

Ácidos fenólicos: Principalmente el ácido rosmarínico (**Figura 7B**), cuyo precursor es el ácido caféico y otros derivados como el ácido clorogénico, ácido sinápico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico.

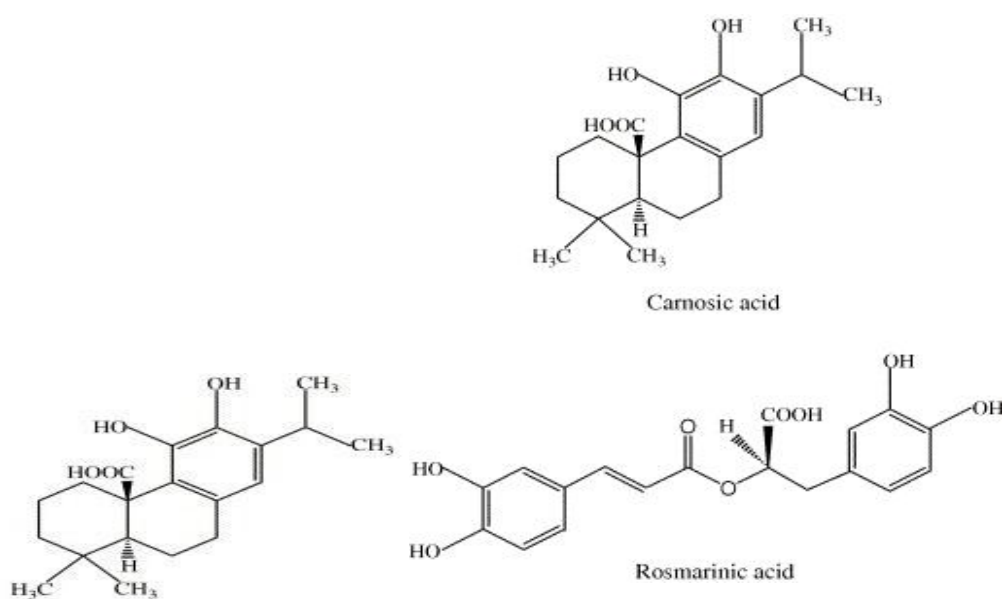
A**B**

Figura 7. Estructuras química. A Ácido Carnósico. **B** Ácido Rosmarínico.

Aceites esenciales: Comprenden un conjunto de terpenos volátiles, obtenidos por destilación. Las hojas contienen una composición muy variable de aceites esenciales, dependiendo de las condiciones de cultivo y el estado de desarrollo en el que la planta es cosechada. Los componentes principales son 1,8-cineol, α -pineno y alcanfor, entre otros.

2.5.1. Farmacología de *R. officinalis*

La actividad antioxidante es una de las propiedades más importante que presentan los extractos de las hojas del romero, tal es así que su acción es comparable con los antioxidantes sintéticos hidroxianisol butilado (BHA, del inglés “butylated hydroxyanisole”) y hidroxitolueno butilado (BHT, del inglés “butylated hydroxytoluene”) (Edwin *et al.*, 1996). El extracto de romero presenta gran cantidad de diterpenos, y se ha reportado que tienen la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas en riñones de ratas, acción que demuestra la habilidad de estos compuestos para proteger tejidos contra el daño oxidativo (Hiroyuki H. *et al.*, 1995). Otros estudios demuestran que los

componentes del extracto de romero presentan una importante acción antibiótica contra bacterias y hongos (Angioni *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2007; Barni *et al.*, 2009). Una de las actividades más importantes que presenta el extracto de romero, descritas hasta el momento, es su acción antitumoral sobre el crecimiento de líneas de melanoma humanas (Russo *et al.*, 2009), y junto con derivados de la vitamina D se demostró su capacidad antitumoral en un modelo murino de leucemia mielóide (Sharabani *et al.*, 2006). Esta capacidad de inhibir el crecimiento de células tumorales se ve acompañada de otras actividades que presentan el extracto como la ya mencionada acción antioxidante (Cheung *et al.*, 2007; Parmar *et al.*, 2011) o anti-inflamatoria (Peng *et al.*, 2007).

Recientemente se reportó que el ácido carnósico inhibe la producción de IL6, IL8 y que además, disminuye la producción de óxido nítrico, TNF- α y la prostaglandina E2 de macrófagos murinos (Oh *et al.*, 2012).

El extracto de romero sin diluir se ha observado que causa irritación moderada, aplicado directamente en piel de conejos, en ensayos de determinaciones antiinflamatorias (Newall *et al.*, 1996). Sin embargo diferentes estudios han demostrado que los extractos y aceites de romero presentan baja toxicidad y pueden actuar como antimutagénicos (Lemonica *et al.*, 1996).

Toda la evidencia científica reportada hasta ahora, indica que las diferentes acciones biológicas de los extractos de romero son debidas a la presencia de diversos compuestos del extracto capaces de modular diferentes blancos moleculares dentro de las células eucariotas y procariotas. Por esta razón es interesante, a los fines de este trabajo de tesis, identificar individualmente los bioactivos presentes en el extracto de romero que presentan una potencial actividad antitumoral y anti-inflamatoria.

2.6. Antecedentes del trabajo de tesis

2.6.1. Ácido carnósico, acción antitumoral y anti-inflamatoria

El ácido carnósico es uno de los componentes mayoritarios del extracto de hojas de la planta de romero, y es considerado un potente antioxidante (Munné-Bosch *et al.*, 2001).

En los últimos años mediante estudios farmacológicos se ha demostrado que el ácido carnósico es capaz de inhibir la proliferación y aumentar la diferenciación de la línea celular leucémica humana, HL60-G, arrestando el ciclo celular o induciendo la apoptosis celular (Steiner *et al.*, 2001; Danilenko *et al.*, 2001; Danilenko *et al.*, 2003). También, se reportó que el compuesto en combinación con otros polifenoles de plantas alimenticias como

cúrcuma inhibió la actividad de las proteínas caspasas 8, 9 y 3 y de la proteína proapoptótica Bid en las líneas leucémicas humanas HL-60 y KG-1a, postulando su uso potencial en el tratamiento y/o prevención de leucemia mieloide aguda (Pesakhov *et al.*, 2010). También, el ácido carnósico es capaz de modular transportadores de drogas en la línea HL60 (Xiao-Ning *et al.*, 2008). Además de la acción antiproliferativa, el compuesto vegetal es capaz de ejercer otras acciones farmacológicas sobre células normales. Sobre la línea celular HUVEC ("Human Umbilical Vein Cells"), previamente estimulada con IL-1B y tratada con ácido carnósico se demostró una significativa inhibición de la expresión de moléculas de adhesión y la adhesión de estas a la línea de células endoteliales, U937 (Ya-Mei *et al.*, 2009). También es capaz de reducir la migración celular de la línea celular HASMC (Human Aortic Smooth Muscle Cells) por la inhibición de la expresión y actividad de la metaloproteasa-9 (Yu *et al.*, 2008). Otra actividad que presenta el ácido carnósico es una clara acción anti-inflamatoria pues es capaz de inhibir la enzima 5- lipoxigenase en leucocitos polimorfonucleares humanos (Poeckel *et al.*, 2008).

Se sabe muy poco sobre la actividad antiproliferativa del ácido carnósico sobre células de cáncer colorrectal. Visanji *et al.*, (2006) reportó en la línea celular Caco-2, que el compuesto arresta el ciclo celular en la fase G2/M, sin embargo sus resultados muestran que el ácido carnósico produce una leve reducción de los niveles de ciclina A y una alteración parcial de los niveles de ciclina B. Por lo tanto, hasta el día de hoy no se conoce exactamente el mecanismo de acción antitumoral del ácido carnósico sobre CCR humano.

2.7. Trabajos previos del laboratorio

Reportamos efectos anti-inflamatorios tópicos, de un extracto etanólico de romero con alto contenido de ácido carnósico y del compuesto puro aislado de hojas frescas de *R. officinalis* L., sobre la inflamación inducida por forbol 12-miristato 13 acetate (PMA) en dos modelos de inflamación aguda en ratón (Mengoni *et al.*, 2011). En el mismo trabajo se reportó la regulación diferencial en la expresión de genes asociados con inflamación *in vivo*, en la piel del ratón. Se encontró también que el diterpeno aislado redujo la expresión de IL-1 β , TNF- α e inhibió selectivamente la COX-2 pero no la COX-1. *In vitro*, el extracto etanólico inhibió la producción excesiva de óxido nítrico en la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7. Se realizaron otros trabajos en el laboratorio en donde se estudiaron los efectos del extracto de *R. Officinalis*, con alto contenido de ácido carnósico y además el compuesto puro, sobre la proliferación y diferenciación celular de una línea normal murina 3T3-L1 con el fin de identificar bioactivos que afecten las funciones de proliferación y/o diferenciación en células de mamíferos. Se demostró que el ácido carnósico inhibió *in vitro*

la proliferación de la línea celular normal 3T3-L1 murina sin presentar efectos citotóxicos significativos (Gaya *et al.*, 2013). Se disponía de ensayos preliminares llevados a cabo *in vitro* para investigar el efecto antiproliferativo del *R. officinalis* sobre células de cáncer colorrectal humano. Utilizando la línea celular Caco-2 se observó que el extracto vegetal disminuyó la proliferación de manera dosis dependiente y luego del tratamiento durante 5 días presentó una DE50= 25 µg/ml. Además, se encontró que 20 µg/ml del ER no afectó la viabilidad de fibroblastos murinos 3T3-L1 luego de 7 días de tratamiento (Altamirano *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos, previos a este trabajo de tesis, sugirieron que los extractos de *R. officinalis* con alto contenido de ácido carnósico tendrían gran potencial para comenzar a investigar las acciones antiproliferativas y antitumorales de los mismos sobre células de CCR.

3. Hipótesis y objetivos

3.1. Hipótesis

El ácido carnósico es uno de los principales constituyentes de las hojas de *Rosmarinus officinalis*, hierba utilizada en la dieta humana. En los últimos años se ha observado que además de su alta capacidad antioxidante presenta importantes acciones farmacológicas. El ácido carnósico es referido en trabajos científicos como compuesto antiproliferativo sobre ciertas células leucémicas, presenta la capacidad de inhibir la adhesión y la migración de ciertas células normales, además exhibe claros efectos anti-inflamatorios sobre células de mamíferos. Por lo tanto, en este trabajo doctoral se pone a prueba la hipótesis de su capacidad para modular procesos involucrados en el desarrollo tumoral en CCR como ser: proliferación, adhesión, migración e invasión celular.

La confirmación de dicha hipótesis tendría importantes implicancias para considerar al ácido carnósico como un potencial agente terapéutico contra el cáncer colorrectal.

3.2. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de Tesis Doctoral es estudiar los efectos del ácido carnósico, principal bioactivo de la planta de *Rosmarinus Officinalis* L., sobre líneas celulares de carcinoma colorrectal (CCR) de origen humano.

3.2.1. Objetivos particulares

- Evaluar *in vitro* la capacidad antiproliferativa de un extracto de romero y de sus principales bioactivos: el ácido carnósico y el ácido rosmarínico, utilizando líneas celulares de CCR humano.
- Estudiar el efecto del ácido carnósico sobre procesos celulares involucrados en la tumorigénesis de líneas celulares de CCR. Entre los procesos a estudiar se evaluarán: la apoptosis, la adhesión, la migración y la invasión celular.
- Investigar si el ácido carnósico es capaz de modular posibles blancos moleculares involucrados en procesos tumorales. Entre ellos, proteínas que degradan la matriz extracelular, y proteínas involucradas en adhesión, migración e invasión celular.
- Evaluar el efecto del ácido carnósico sobre la enzima COX-2, proteína involucrada en

procesos inflamatorios y asociada al desarrollo tumoral en CCR.

- Analizar los efectos tóxicos de un extracto de romero rico en ácido carnósico, y del compuesto puro, *in vivo*.
- Evaluar la eficacia antitumoral del ácido carnósico sobre un modelo murino.

4. Materiales y métodos

4.1. Material vegetal

El material vegetal, hojas de *R. officinalis* L., fue cosechado en marzo del 2008 en el Valle de Lerma (Salta, Argentina). Se preparó un extracto etanólico como se describió en Moreno *et al.*, 2006. El proceso se realizó a partir de hojas secas de plantas de romero, las cuales se molieron en mortero y por destilación se separaron los aceites esenciales de los componentes no volátiles. Luego se realizó una extracción, utilizando etanol como solvente, sobre el residuo no volátil, producto de la destilación. Finalmente, para el proceso de almacenamiento, el solvente utilizado fue eliminado por evaporación y posterior liofilización, obteniéndose un residuo sólido finamente particulado que fue fraccionado y almacenado a -20°C hasta el momento de su uso. Nos referiremos en la presente tesis a este material, como extracto de romero (ER).

Los compuestos fenólicos puros: ácido rosmarínico (AR) y ácido carnósico (AC), obtenidos a partir de *R. officinalis*, fueron comprados a Alexis Biochemicals Co., (USA).

El ER, el AC y el AR se disolvieron en etanol 100% antes de cada experimento y luego se diluyeron a las concentraciones de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 y 256 µg/ml en medio de cultivo, obteniéndose una concentración final de etanol 0,01%. Para todos los ensayos realizados se realizó el control sin compuesto, etanol 0,01%.

4.1.1. HPLC: caracterización del extracto de romero

El contenido de compuestos fenólicos del ER, fue analizado mediante HPLC (del inglés "High Performance Liquid Chromatography") utilizando la metodología previamente empleada en el laboratorio (Moreno *et al.*, 2006). El ER seco se resuspendió en etanol a una concentración final de 2,5 mg/ml, luego la solución se centrifugó a 5000 rpm (revoluciones por minuto) durante 15 min a temperatura ambiente, y se filtró la muestra por membrana 0,45. A partir de esta solución de ER se aisló y se identificó al AC y al AR, para ello se utilizó un equipo de HPLC (LKB Bromma) equipado con detector de arreglo de diodos y una columna analítica Luna C18 de 250 mm × 4,6 mm (Phenomenex; USA), empleada como fase estacionaria. La fase móvil utilizada para la separación, consistió en un gradiente (5 a 100%) de acetonitrilo: agua (ácido acético 3%, v/v) y se utilizó un flujo de 1 ml/min, el volumen de inyección de cada muestra analizada fue de 20 µl.

Para identificar los compuestos fenólicos mayoritarios (AR y AC) del ER se utilizaron estándares de los compuestos puros comerciales, y se compararon los correspondientes tiempos de retención, y de este modo los compuestos de interés del ER pudieron ser cuantificados. La detección del AC se realizó a una longitud de onda de 280 nm y la del AR a 330 nm, a dichas longitudes de onda se registran las áreas máximas de absorbancias para los respectivos compuestos.

4.2. Líneas celulares de adenocarcinoma de colon humanas

Las líneas celulares de cáncer colorrectal (CCR) utilizadas fueron:

- La línea celular **Caco-2**, la cual proviene de células epiteliales humanas heterogéneas de adenocarcinoma colorrectal, extirpado de un hombre de raza caucásico. Estas células fueron utilizadas por el Instituto Sloan-Kettering para la investigación del cáncer llevada a cabo por el Dr. Jorgen Fogh. Presentan morfología epitelial y presenta mutaciones en los oncogenes p53, K-ras.
- La línea celular **HT29**, fue aislada de un tumor primario de colon en el año 1964 por Dr. Jorgen Fogh. El tumor extirpado de una mujer de raza caucásica, era un adenocarcinoma de colon moderadamente diferenciado de grado II. Esta línea presenta morfología epitelial, produce CEA (carcinoembryonic antigen) en cultivo, presenta una mutación en el gen p53 en el codon 273, es positiva para la expresión de los oncogenes c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, Myb y no expresa p21, no presentan inestabilidad de microsatélites (fenotipo RER negativo).
- La línea celular **LoVo**, fue aislada de un tumor metastásico de colon en el año 1971. *El cultivo* fue aislado de un nódulo metastásico en la región supraclavicular izquierda de un varón de raza caucásica diagnosticado como un adenocarcinoma de colon. Esta línea presenta morfología epitelial, tiene el gen p53 silvestre (*wild type*), es positiva para la expresión de los oncogenes c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, Myb y presenta inestabilidad de microsatélites (fenotipo RER positivo).

Las células de CCR de las tres líneas evaluadas, fueron crecidas en medio de cultivo completo, compuesto por: medio de cultivo DMEM (GIBCO, Invitrogen, USA) y HyQ Ham's/F-12 (HyClone, Thermo Scientific, USA), suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) (Internegocios, Argentina), 100 μ g/ml estreptomicina y 100 U/ml penicilina-G. Se incubaron las células a 37°C y a 5% CO₂. Las células se crecieron hasta un 70% de confluencia y se subcultivaron de 2 a 3 veces por semana, para permitir el desprendimiento celular de la placa se utilizó 0,25% tripsina-EDTA (GIBCO, Invitrogen, USA).

4.3. Actividad antitumoral *in vitro*

4.3.1. Viabilidad celular

Se evaluó la viabilidad celular de las tres líneas CCR tratadas con ER, AC y AR, mediante el reactivo MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolium) con el acoplante de electrones, PMS (metosulfato de fenazina) (Promega, USA). El MTS es reducido por el metabolismo celular al producto formazan el cual da un coloreado violeta con un máximo de absorbancia a 492 nm (**Figura 8**).

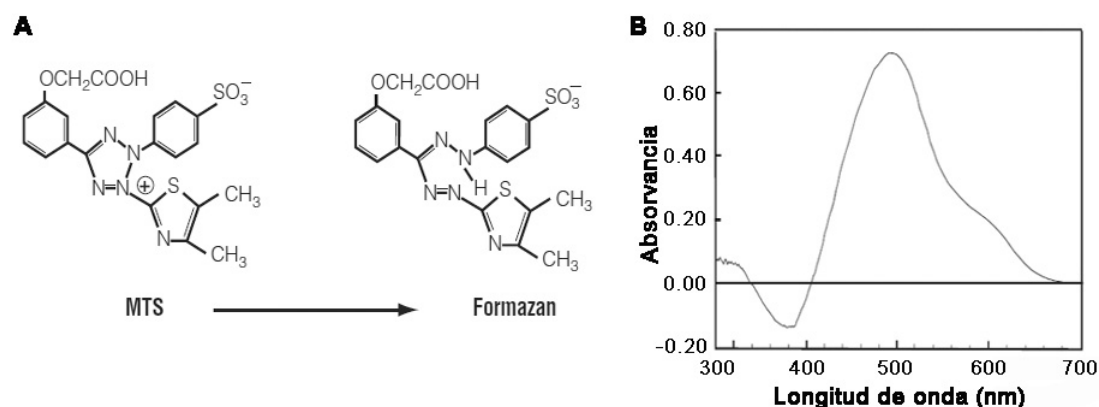


Figura 8. Reacción del reactivo de MTS para determinar viabilidad celular. A Estructura del MTS y de su producto formazan. B Espectro de absorbancia del MTS/formazan luego de la biorreducción por células K562. Adaptado de Promega Co. *Technical Bulletin* #TB169.

Para los ensayos de viabilidad celular se sembraron las células, Caco-2, HT29 y LoVo independientemente en microplacas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 1×10^4 células/pocillo (conteo mediante cámara de Neubauer). Luego de 24 hs, las células fueron lavaron con 20 μ l de buffer fosfato (PBS) y se procedió a colocar el medio de cultivo con los correspondientes tratamientos de ER, AR o AC (rango de concentraciones de 0-128 μ g/ml) se preparó paralelamente el control 0,01% de etanol, y se incubaron las células durante 24 hs a 37°C y a 5% CO₂.

Luego del tratamiento, se lavaron las células dos veces con PBS y el medio de cultivo se reemplazó por un medio preparado con MTS-PMS (333 μ g/ml MTS y 25 μ M PMS), se incubaron las células durante 2hs para dar lugar a la reacción de MTS y luego se determinó la viabilidad celular de las células tratadas, mediante la lectora de microplacas (Beckman Coulter DTX880 Multimode Detector). La absorbancia se determinó a 595 nm en lugar de 492 nm para disminuir el nivel basal de absorbancia del medio de cultivo *per se*, habiéndose verificado previamente que a esta longitud de onda se mantiene la relación lineal entre la absorbancia y el número de células viables. Cada ensayo se realizó por triplicado y en dos experimentos independientes.

4.3.1.1. Dosis Efectiva que inhiben el 50% de la viabilidad celular (DE50)

Se determinaron las dosis efectivas que inhiben el 50% de la viabilidad celular (DE50) de las tres líneas CCR tratadas individualmente con ER, AC y AR mediante los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular y se utilizó para ello el software Microcal Origin 6.0 Professional.

El análisis estadístico de diferencias significativas entre tratamientos se realizó con el programa Infostat, utilizando la función "Test de Student para muestras independientes".

4.4 Apoptosis celular

4.4.1. Microscopía de fluorescencia

Las células Caco-2 fueron sembradas en microplacas de 24 pocillos (3 x 10⁴) con 500 µl de medio de cultivo completo, se incubaron a 37°C y 5% CO₂ hasta un crecimiento en la placa del 50 % de confluencia. Luego las células se trataron con AC (rango de concentración de 0-128 µg/ml) durante 24 hs, se lavaron con PBS dos veces y se fijaron a con 4% formaldehído en PBS durante 1h. Luego se lavaron los pocillos dos veces con H₂O, se colocó por pocillo 300 µl de PBS y se incubaron las placas durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente las células se tiñeron con 300 µL de DAPI (Molecular Probes, USA) (30 nM en PBS) durante 5 min en oscuridad. Las células fijadas y teñidas fueron observadas por microscopía invertida de fluorescencia (Axiovert 135M, Zeiss) y se fotografiaron con cámara de alta resolución. Se tomaron fotografías de 3 campos por placa y se determinaron los porcentajes de células apoptóticas totales, se compararon con el número total de células control (100 a 300 células). Cada condición fue ensayada por duplicado. La tinción con el fluoróforo DAPI permite identificar células apoptóticas, entre los cambios morfológicos que el fluoróforo permite evidenciar se puede observar por microscopía la condensación de la cromatina, la pérdida de la arquitectura nuclear normal y la formación de cuerpos apoptóticos.

La fosfatidilserina que se expone a la superficie de las células apoptóticas, fue detectada por la proteína de unión a fosfatidilserina Annexin A V conjugada con Cy3.18 utilizando el kit de detección de apoptosis Annexin V-Cy3 (Sigma Aldrich, USA).

Las células Caco-2 (3 x 10⁴) se sembraron en microplacas de 24 pocillos y se incubaron durante 24 hs, luego las células fueron tratadas con AC (DE50) durante 24 hs, con su respectivo control. Las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron con 50 µl de la solución de tinción doble (conteniendo 1 mg/ml de AnnCy3 y 100 mM 6-carboxyfluoresceína diacetato) durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Las células luego fueron lavadas 3 veces con 50 µl de buffer de unión y seguidamente se observaron en microscopio confocal y de fluorescencia (LSM 5 Pascal, Axioplas 2 Imaging).

La combinación de 6-carboxyfluorescein diacetate (6- CFDA) con Cy3-conjugated annexinV permite la diferenciación entre células vivas (verde), necróticas (rojo), y apoptóticas (verde y roja).

4.4.2. Citometría de flujo

Las células Caco-2 fueron sembradas en microplacas de 24 pocillos a una densidad de 5×10^5 células/ml, se incubaron 24 hs y se trataron con AC (ED50) durante 24 hs al igual que las células control. Las células se lavaron 2 veces con PBS, se tripsinizaron, se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular con 2 ml de buffer de unión, y nuevamente se centrifugaron las células a 5000 rpm durante 5 min descartando el sobrenadante y luego las células se resuspendieron en 250 µl de solución de tinción Annexina V- FITC/ Ioduro de propidio del kit comercial (Biovision, USA) y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad, las células nuevamente se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2 ml de buffer de unión. Finalmente las células se resuspendieron nuevamente en 1 ml de buffer de unión y se analizaron las células por citometría de flujo (Flow citomer, BD FACSCALIBUR), los parámetros de medición fueron ajustados con el fin de disminuir los agregados y restos celulares que interfieren con la lectura de los eventos celulares. Se analizaron un mínimo de 5000 eventos para cada muestra y se analizaron los resultados mediante el software

4.5. Capacidad invasiva de la célula

4.5.1. Adhesión celular

Se evaluó la adhesión celular de las células Caco-2 tratadas con AC, para ello se utilizaron diferentes componentes de la matriz extracelular como sustratos de adhesión, preparados y disueltos en PBS de la siguiente manera: SFB:PBS (1:4), Fibronectina 40 µg/ml o 40µg/ml Colágeno Tipo I.

Se sembraron 50 µl de cada sustrato independientemente en microplacas de 96 pocillos y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. Se realizaron 2 lavados con PBS, y se bloquearon los pocillo con 100 µl de PBS 1% BSA, durante 2 hs a 37°C. Luego los pocillos se lavaron con 100 µl PBS.

Por pocillo se sembraron $2,5 \times 10^4$ células/100 µl en medio de cultivo completo con los respectivos tratamientos de AC (en el rango de concentraciones de 4 a 128 µg/ml), también se realizó el control con 0,01% de etanol. Como control negativo se incubaron pocillos con SFB. Cada tratamiento se realizó por sextuplicado. Se incubaron las placas a 37°C durante 1 h. Transcurrido ese periodo de tiempo se lavó cada pocillo suavemente con 50 µl de H₂O_{bd}, para retirar las células no adheridas al sustrato, luego se fijaron las células

adheridas con 50 µl de metanol por pocillo. Se agregaron 60 µl de cristal violeta 0,1% en agua y se incubaron las placas durante 10 min a temperatura ambiente. Se lavaron las placas tres veces por inmersión suavemente en H₂O y se dejaron secar hacia abajo sobre papel secante.

Las células se solubilizaron con 100 µl de 10% metanol- 5% ácido acético, durante 10 min y luego se midió la densidad óptica en el Lector de microplacas a la longitud de onda de 595nm. El análisis estadístico se realizó mediante el Test de Student.

El mismo ensayo se realizó pre-tratando las células con AC (4, 8, 16, 32, 64, 128 µg/ml) durante 24 hs, luego los pocillos se lavaron y se incubaron las células con medio completo sin tratamiento 1 h.

La morfología celular se determinó por microscopía óptica (Axiovert 135M, Zeiss). Se tomaron fotografías de las células control y tratadas con AC (DE50) durante 1 h y pre-tratadas durante 24 hs. Se cuantificaron las células adheridas a los distintos sustratos, tomando como 100% de células adheridas, al control sin tratamiento.

4.5.2. Western Blot: detección de proteínas de los contactos focales

Se trataron monocapas celulares de la línea Caco-2 sembradas en placas de 35mm, con AC (16 y 32 µg/ml) y como control células tratadas con 0,01% de etanol durante 2 hs.

Luego se lisaron las células con 100 µl tampón de lisis RIPA (20 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1% de Nonidet P-40, 0,5% de desoxicolato de sodio, 1 mM de EDTA y 0,1% de SDS). Los lisados se mezclaron con tampón de siembra con 5% de β-mercaptoetanol, se calentaron a 70°C durante 10 min. Luego se sembraron 50 µg de cada extracto proteico en las calles de un gel de poliacrilamida al 13%. Se corrieron los geles a temperatura ambiente, 60 min a 150 Volts, luego se transfirieron los geles a membranas de PVDF durante toda la noche a 4°C con agitación a 15 Volts. Se bloquearon las membranas 2 hs en solución de bloqueo (PBS con 3% de leche desnatada y 0,05% Tween 20) en agitación, luego se lavaron con PBS 0,05% Tween 20 y se incubaron durante 16 hs a temperatura ambiente, con los anticuerpos primarios de ratón diluidos en PBS-0,05% Tween 20 (1:1000): anti-p130Cas (total), anti-Paxillin (total), anti-phospho-FAK (Y397) (BD Transduction Laboratories) y anticuerpos de conejo: anti phospho-Paxillin (Y118) (Chemicon), anti phospho-FAK (Y861) (Cell Signaling), anti phospho-p130Cas (Y410) (Biosource). Los anticuerpos fueron cedidos gentilmente por el Dr. Osvaldo Rey (Universidad de California, USA). Luego las membranas se lavaron extensivamente con PBS-0,05% Tween 20 y se incubaron durante 3 hs con el anticuerpo secundario horseradish peroxidase- conjugated: GE Healthcare diluido (1:5000) en PBS-0,05% Tween 20 a temperatura ambiente. Después de los lavados con PBS-0,05% Tween 20, las señales en las membranas se detectaron utilizando el sustrato GE Healthcare. Se analizaron las

imágenes mediante escáner (LAS-4000 mini Fujifilm Life Sciences) y se cuantificaron las señales (Multi Gauge (Fujifilm Life Sciences)).

4.5.3. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Para la detección de la Paxilina, proteína que forma parte de la estructura de los contactos focales celulares, y de los microfilamentos de actina del citoesqueleto, se utilizó IFI. Para ello se crecieron células Caco-2 sobre vidrio (cubreobjetos) ó en cajas de plástico de 35 mm y se trataron con AC (32 µg/ml) durante 3 hs. Se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Paxilina (BD Transduction Laboratories) y un segundo anticuerpo acoplado a Fluor Alexa-568 (Invitrogen) (rojo). La visualización de actina polimerizada (microfilamentos) se logró con Faloidina conjugada con Alexa-488 (Invitrogen) (verde), los anticuerpos fueron cedidos por el Dr. Osvaldo Rey, (Universidad de California, USA). Se tomaron fotografías de las células mediante la visualización por microscopia de fluorescencia (Zeiss Axio Imager. A2).

4.5.4. Actividad degradativa de la matriz extracelular

La actividad de la metaloproteína MMP-9 y del activador de plasminógeno uroquinasa (uPA), moléculas secretadas a la matriz extracelular por la línea celular Caco-2, fue evaluada utilizando medios condicionados (MC) de las células. Para ello se sembraron 4 x 10⁴ células en placas 35mm con 2 ml de medio completo DMEN:F12 (10% SFB) y se crecieron en estufa a 37°C y con 0,5% CO₂, hasta llegar a una monocapa de 70% de confluencia. Luego se retiraron los medios de cultivo, se lavaron las placas con PBS y se colocó 1ml de medio DMEN:F12, sin SFB, con AC a distintas concentraciones (4, 8, 16 y 32 µg/ml), se realizó un control (0,01% de etanol). Las muestras se realizaron por triplicado. Luego de 48 hs de tratamiento, se retiraron los MC, los cuales se centrifugan, para retirar las células del sobrenadante, se fraccionan en “eppendorf” y se conservaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

Para la correlación entre actividad proteolítica y concentración proteica, se lisaron las monocapas semiconfluentes con 100 µl de 1% de Tritón-X100 en PBS, se centrifugaron, se tomaron los sobrenadantes y luego se cuantifico la concentración proteica mediante el método de Bradford.

4.5.4.1. Caseinólisis radial

La actividad de uPA se determinó mediante el método de caseinólisis radial. Se prepararon geles de caseína-agarosa ricos en plasminógeno (2 mg/ml) en los que se efectuaron hoyos de 4 mm de diámetro. Se sembraron 10 µl de los MC (preparados en el punto 5.6.4) por hoyo y los geles se incubaron 48 hs en cámara húmeda a 37°C. Se

midieron los diámetros de los halos de degradación. La actividad de uPA se refirió a una curva standard de enzima uroquinasa (0,1 a 50 UI/ml) y los resultados se normalizaron según el contenido proteico de las monocapas originales y luego el porcentaje de actividad de uPA de las muestras se determinó tomando el control como el 100% de actividad.

El análisis estadístico de los datos se realizará mediante el "Test de Student".

4.5.4.2. Zimografia cuantitativa

Se evaluó la capacidad gelatinolítica de MMP-9 utilizando los MC (preparados en el punto 5.6.4), mediante el método de zimografia cuantitativa. Se sembraron 10 µl de los MC, de cada tratamiento, en gel de poliacrilamida (9%) SDS-PAGE copolimerizado con 1 mg/ml de gelatina, en condiciones no reductoras. Luego el gel se lavó, durante 20 min, con 2,5% Tritón X-100 para eliminar el SDS. Los geles se incubaron por 72 hs a 37°C en un tampón con 0,25 M Tris-HCl pH 7,4, 1 M NaCl y 25 mM CaCl₂. Luego de la incubación, el gel se fijó y se tiñó con 0,5% Coomassie Brilliant Blue. Las bandas gelatinolíticas, producidas por la degradación enzimática, se observaron por tinción negativa y se midieron utilizando un densitómetro digital (GS-700). Los datos se expresaron en unidades arbitrarias (UA) y se normalizaron con el contenido proteico (µg de proteínas) del cultivo celular del cual se obtuvo cada medio condicionado y luego el porcentaje de actividad de MMP de las muestras se determinó tomando al control como el 100% de actividad. El análisis estadístico de los datos se realizará mediante el "Test de Student".

4.5.4.3. Western Blot: detección de la proteína MMP-9

Se evaluó por Western Blot la acción del AC sobre la proteína MMP-9. Para este fin se sembraron 4 x 10⁴ células en placas 35 mm con 2 ml de medio completo DMEN:F12 (10% SFB) durante 24 hs a 37°C y con 0,5% CO₂, luego se descartaron los medios, se lavaron las células con PBS y estas fueron tratadas con AC (4, 8, 16 y 32 µg/ml) y el control con el respectivo vehículo (0,01% de etanol) en medio completo durante 24 hs.

Se lisaron las células con 100 µl tampón de lisis por placa. El procedimiento de sembrado de 50 µg de extracto proteico en gel de poliacrilamida y transferencia, se realizó como el punto 5.6.2. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios: MMP-9 (Abcam), y β-actin (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) como control. Luego la membrana se lavó y se incubó con ECL anticuerpo secundario (1:5000) (GE Healthcare UK) y se reveló con el kit (ECL Plus, GE Healthcare). Los resultados se determinaron mediante escaner (Molecular Dynamics Storm B40).

4.5.5. Ensayo de cicatrización de la herida

Se evaluó la capacidad migratoria de las células mediante el ensayo de cicatrización de heridas. Para ello se sembraron $1,5 \times 10^5$ células en placas de 35 mm, con medio completo DMEN:F12 (10% SFB). Al llegar el crecimiento celular de 100% de confluencia, formación de monocapas, se realizaron las heridas de $\sim 400 \mu\text{m}$ con la punta de tips p200 estériles. Luego se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS y se colocaron medios completos con 2% de SFB en presencia de AC a distintas concentraciones (4, 8, 16 y 32 $\mu\text{g/ml}$) o con 0,01% de etanol para el control, todas las muestras se realizaron por triplicado. Los cultivos se incubaron a 37°C.

Se tomaron fotografías en diferentes zonas de las heridas a tiempo 0 (momento en el que se colocan los medios con tratamiento) y a las 24 hs de exposición (finalización del ensayo). Las imágenes obtenidas se analizaron por densitometría cuantitativa, utilizando el programa Image-Pro Plus versión 4.5 (Media Cybernetic). Los resultados se expresaron como porcentaje de migración, calculados como la proporción del área final ocupada por las células migrantes respecto de la herida original. Se tomó como el 100% de migración a la muestra control. El análisis estadístico se realizó mediante el "Test de Student".

4.5.6. Ensayo con cámara "transwell"

Para evaluar la capacidad invasiva de las células Caco-2 frente al tratamiento con AC (ED50) se utilizó una cámara "transwell" de 24 pocillos con membrana de $8 \mu\text{m}$ de tamaño de poro, se agregó en el centro de cada inserto 20 μl de Matrigel 1:3 (2 mg/ml de proteína en SFB). Se colocaron en la parte superior de la cámara en cada pocillo $1,5 \times 10^5$ células Caco-2 con 100 μl de DEMEN y el tratamiento de AC (32 $\mu\text{g/ml}$). En la parte inferior de cada pocillo se colocaron 300 μl de DMEN y se incubó la cámara "transwell" 24 hs a 37°C en atmósfera húmeda y CO₂ al 5%. Luego de la incubación se retiró el medio de cultivo y se colocó 0,5 ml de formaldehído durante 10 min a temperatura ambiente, luego se retira el formaldehído y se lavan las cámaras 3 veces con PBS. Cuidadosamente se retiran las células que invadieron la membrana y se las tiñe con 0,5 ml de solución DAPI (1:2000 en PBS) durante 5 min a temperatura ambiente, se aspira la solución DAPI y se lavan las células 3 veces con PBS. Se cuentan las células teñidas a través de la membrana por microscopía con objetivo de 40x (aproximadamente 10 campos) (Lochter *et al.*, 1997).

4.6. Actividad antiinflamatoria

4.6.1. RT-PCR: expresión del ARNm de la COX--2

Las células Caco-2 fueron sembradas en placas de 6 pocillos (5×10^4 células/pocillo) con medio completo durante 24 hs, luego se lavaron con PBS los pocillos y se trataron con AC (en un rango de concentraciones de 0 a 128 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 hs. El RNA total fue

extraído usando el reactivo TriZol (Invitrogen) según las instrucciones de proveedor. Para la reacción de RT-PCR, se utilizó ADNc, los “primers” descritos en **Tabla III** y el kit de M-MLV transcriptasa reversa (Promega, Madison WI USA).

Tabla III. Secuencias de “primers” utilizados para las reacciones de PCR.

Primer	Secuencia 5'-3'	Secuencia 3'-5'
COX-1	GAGCGTCAGTATCAACTGCG	ATTGGAACTGGACACCGAAC
COX-2	TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT	AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT
GAPDH	CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA	TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCAC

La mezcla de reacción de PCR fue preparada en un volumen de 50 µl con 30 ng de ADNc templado, 5 µl de tampón de reacción (10x), 0,25 mM dNTPs (Promega, Madison WI USA), 0,25 µM de cada primer (**Tabla III**), y 1 U de Pfu DNA polimerasa (Instituto Leloir, Argentina). La reacción de PCR fue realizada en un termociclador (GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer) bajo las siguientes condiciones: 94°C/1 min; 60°C/1 min, 72°C/1 min durante 35 ciclos. Los DNAc amplificados se corrieron por electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Los resultados fueron cuantificados con el software Scion Image.

4.6.2. Western Blot: detección de la proteína COX-2

Se determinó por Western Blot la detección la proteína COX-2, de células tratadas con AC. Para este fin se sembraron 4 x 10⁴ células en placas 35mm con 2 ml de medio completo DMEN:F12 (10% SFB) durante 24 hs a 37°C y con 0,5% CO₂, luego se descartaron los medios, se lavaron las células con PBS y se trataron con AC (en el rango de concentraciones de 4 a 32 µg/ml) y el control con el respectivo vehículo (0,01% de etanol) en medio completo durante 24 hs.

Se lisaron las células con 100 µl buffer de lisis RIPA: 150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 0.5% deoxycholate, 100 µg of phenylmethylsulfonyl fluoride durante 30 min en hielo. Se levantaron con rastrillo y se centrifugaron a 13.000 rpm a 4°C por 15 min.

El procedimiento de sembrado de 50 µg de extracto proteico en gel de poliacrilamida y transferencia, se realizó como el punto 5.6.2. Luego se incubó la membrana durante toda la noche con los respectivos anticuerpos policlonales primarios COX-2 (1:1000) y β-actina

(1:1000, Santa Cruz Biotechnology) como control. Subsecuentemente la membrana se lavó y se incubó con ECL anticuerpo secundario (1:5000) (GE Healthcare UK) y se reveló la membrana con el kit (ECL Plus, GE Healthcare) y se monitoreo mediante el escaner (Molecular Dynamics Storm B40).

Los resultados fueron analizados y cuantificados con el software Scion Image.

4.6.3. Transfección plasmídica: plásmido del promotor de la COX-2

Las células Caco-2 se sembraron en placas de 24 pocillos, a una densidad de $1,25 \times 10^5$ células por pocillo, cubriendo entre el 50-70% de la superficie del pocillo. Se prepararon soluciones de transfección: 0,5 µg del plásmido con el promotor humano de la COX-2, que contiene el gen reportero de luciferasa: p2-1900, completo, (cedido gentilmente por el Dr. Miguel A. Iñiguez del Centro de Biología Molecular Severo Ochea, laboratorio de Biología Molecular e Inmunología, Madrid, España), con 0,1 µg del plásmido pRL-TK-*Renilla* como control interno, 0,5 µl de Lipofectamina TM2000 (Invitrogen) y 50 µl de DMEN (sin ATBs, ni SFB). Se incubó la placa a temperatura ambiente 30 min. Se retiró el medio de las células y se añadieron por pocillo 150 µl de medio DMEN y 50 µl del complejo ADN-lipofectamina, luego se incubaron a 37°C durante 3 hs, se removió el medio de cultivo y se añadió medio de cultivo completo con el agente estimulador de expresión de la COX-2, el éster de forbol, TPA (50ng/ml) y el AC (32µg/ml) y se incubó durante 16 hs. Se procedió a determinar la actividad de ambas luciferasas según el kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega). Posteriormente se lisaron las células con 100 µl de tampón de lisis comercial (Promega).

Se realizaron las lecturas correspondientes en el lector de microplacas de ELISA y se determinaron los contenidos protéicos mediante el ensayo de Bradford. Se realizaron 2 experimentos independientes por triplicado.

4.7. Actividad del ER Y AC *in vivo*

4.7.1. Toxicidad del ER y el AC

Para los experimentos de toxicidad *in vivo* se utilizaron ratones machos BALB/c (endocriados en el Bioterio del Instituto Angel Roffo, Argentina), los animales tenían de 8 a 10 semanas de vida, y poseían un peso variable aproximado de 30 g. Se mantuvieron a una temperatura estable (21-23°C), con humedad relativa del 40-60%, con ciclos luz/oscuridad de 12 hs, según la normativa internacional vigente (Dirección de la CEE 86/609, OJ L358.1, 12 de Diciembre de 1987 y Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud, NIH. Publ. No. 85-23, 1985).

Se evaluaron 4 grupos de ratones, con 5 ratones por grupo. **1-Control**, correspondiente al tratamientos con el vehículo: 2% DMSO-1% TWEEN-80 en solución

fisiológica, **2-**Tratamiento con ER 30 mg/kg, **3-** Tratamiento con AC 10 mg/kg y **4-** Tratamiento con AC 5 mg/kg. Las dosis fueron administradas de forma intraperitoneal (i.p), 1 vez por día durante 15 días.

Para la evaluación del efecto de los tratamientos del ER y del AC sobre los ratones, se determinaron los siguientes parámetros:

- **Peso de los animales**, registrado cada 3 días durante los 15 días de tratamiento.
- **Recuento leucocitario de sangre periférica**, para ello se tomaron muestras de sangre del seno retroorbital del ratón y la concentración de leucocitos se determinó por conteo diferencial en cámara de Neubauer de 200 células en frotis, teñidos con la técnica de May Grünwald-Giemsa.
- **Parámetros bioquímicos en suero**, glucosa, insulina y enzimas transaminasas como la glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT), glutamato-piruvato transaminasa (GPT) y la GT (glutamyl transpeptidasa mediante un kit comercial (Greiner bio-one).

Finalizado el período experimental de 15 días, los animales fueron sacrificados y se procedió a la disección de los órganos (hígado, riñón, corazón, pulmón y bazo) para su estudio anatomopatológico. Fracciones de cada tejido fueron fijados, incluidos en parafina y se realizó la coloración de Hematoxilina/Eosina, en el laboratorio de patología del Instituto de Oncología Angel H. Roffo.

4.7.2. Acción antitumoral del AC *in vivo*

Se utilizaron ratones nu NIH (S) machos de 4 a 5 semanas de edad (endocriados en la Facultad de Veterinaria, Universidad de La Plata). Los animales se mantuvieron durante 1 semana en el bioterio de la Fundación Instituto Leloir para su acondicionamiento, tuvieron libre acceso a la bebida y el alimento (*ad libitum*) y mantuvieron un régimen de 12 hs de luz y oscuridad.

Los ratones fueron inoculados en el dorso izquierdo de modo subcutáneo, con una solución celular de células HT29 (5×10^6 células en medio DMEN:F12 con 10% de SFB). Al cabo de 2 semanas, cuando el volumen tumoral promedio alcanzó los 100 mm³, se comenzaron los tratamientos correspondientes.

Se evaluaron 2 grupos, de 5 ratones cada grupo: **1-** Control, vehículo (2% DMSO 1 % TWEEN-80 en solución fisiológica) y **2-** Tratamiento con AC 5 mg/kg.

Los tratamientos de Control y de AC 5 mg/ml fueron administradas, en los ratones, de forma intratumoral 3 veces por semana durante 18 días. También antes de cada tratamiento se procedió a pesar a los animales y a medir el diámetro tumoral con calibre (Venier).

La pérdida de peso corporal se calculó según: $[(\text{peso corporal final} - \text{peso tumoral}) / \text{peso corporal inicial}] \times 100$ y el volumen tumoral (en mm³) se calculó según: $(A \times B^2) / 2$, donde A y B son los diámetros mayor y menor respectivamente.

Finalizado el período experimental (18 días), los animales fueron sacrificados y se procedió a la disección de los tumores y separación de órganos para su posterior análisis.

5. Resultados

5.1. Identificación de los principales bioactivos del *Rosmarinus Officinalis* L. por HPLC

En estudios previos del laboratorio de Bioquímica Vegetal de la Fundación Instituto Leloir se caracterizaron extractos de hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), y se reportó que extractos alcohólicos poseen un alto contenido de compuestos fenólicos, entre ellos, el diterpeno: ácido carnósico y el compuesto fenólico derivado del ácido cafeico: ácido rosmarínico (Moreno *et al.*, 2006).

A partir de estos estudios se determinó la concentración de los compuestos fenólicos mayoritarios de un extracto etanólico de hojas de *R. Officinalis* cosechadas en marzo del 2008 en el Valle de Lerma (Salta, Argentina).

En la **Figura 9A** se observa el perfil cromatográfico de elusión de los compuestos mayoritarios del extracto de romero (ER) mediante la utilización de HPLC. Los máximos de absorción corresponden al ácido rosmarínico (AR) y al ácido carnósico (AC), caracterizados por sus tiempos de retención 36,4 y 83,9 minutos respectivamente. Para confirmar la identidad de los compuestos, además de compararlos con estándares comerciales, se determinaron sus espectros de UV (**Figura 9B**). Los compuestos fenólicos absorben a distintas longitudes de onda, el AR lo hace a 330 nm y a 280 nm, mientras que el AC absorbe a 240 nm y 280 nm.

Los contenidos porcentuales de los compuestos en estudio del ER, se determinaron mediante el cálculo de las áreas obtenidas en el perfil cromatográfico, registrándose un mayor contenido de AC (20%) con respecto al AR (3%).

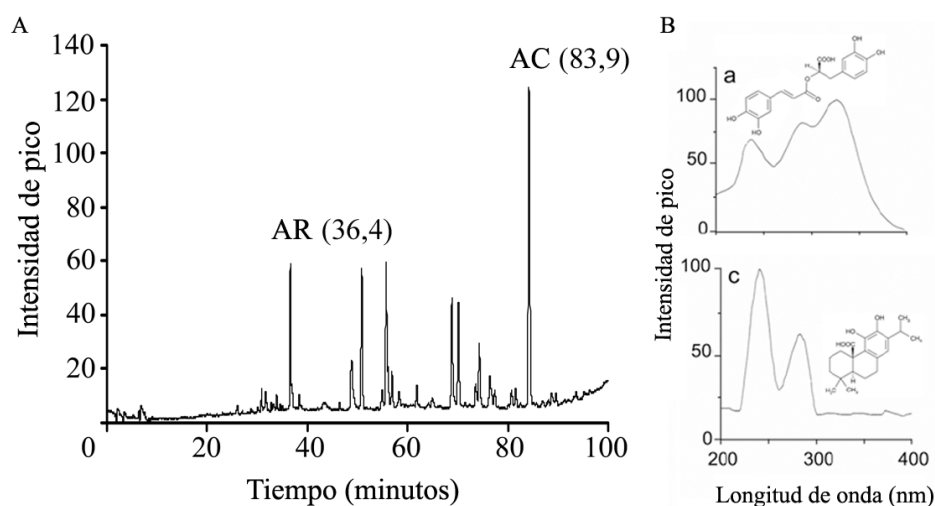


Figura 9. Cromatografía del extracto de *Rosmarinus Officinalis* L. y espectros del AR y el AC. A Cromatogramas registrados a 280 nm y 330 nm, donde se indican los picos de absorción del ácido rosmarínico (AR) y el ácido carnósico (AC), caracterizados por tiempos de

retención de 36,4 y 83,9 minutos, respectivamente. **B** Espectros de absorción UV de los compuestos puros: el AR (a) presentó máximos de absorbancia a 330 nm y 280 nm mientras que el AC (c) a 240 nm y 280 nm.

5.2. Efecto del AC sobre la viabilidad celular

5.2.1. Inhibición de la viabilidad de tres líneas celulares de CCR

Se evaluó la viabilidad celular de las líneas de CCR humano: Caco-2, HT29 y LoVo. Las células se crecieron hasta un 70% de confluencia, momento en el cual el medio de cultivo fue suplementado con ER, o alternativamente con los compuestos puros AC o AR (0-128 µg/ml). Luego de 24hs se determinó la viabilidad celular mediante el reactivo de MTS.

Para la línea Caco-2 se observó que el ER inhibió la viabilidad celular de aproximadamente el 30% de las células a una concentración 128 µg/ml (**Figura 10A**). Se determinó que el ER tuvo un fuerte efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la línea celular HT29 (DE50) de $32 \pm 4,5$ µg/ml (**Figura 10B**). Mientras que para la línea LoVo se obtuvo un DE50 de $128 \pm 9,2$ µg/ml (**Figura 10C**).

Cuando se testearon los compuestos puros, el AC presentó una fuerte inhibición de la viabilidad celular de manera dosis dependiente en las tres líneas de CCR evaluadas, [DE50 (µg/ml): Caco-2, $30,38 \pm 2,13$; HT29, $16 \pm 4,6$ y LoVo, $8,74 \pm 0,91$]. Por otro lado, el AR tuvo una escasa acción inhibitoria sobre la viabilidad en las tres líneas ensayadas, inhibiendo entre un 30-40% la viabilidad de la línea celular HT29 (**Figura 10B**) como máximo y se observó una DE50 de $128 \pm 5,9$ µg/ml para la línea LoVo (**Figura 10C**).

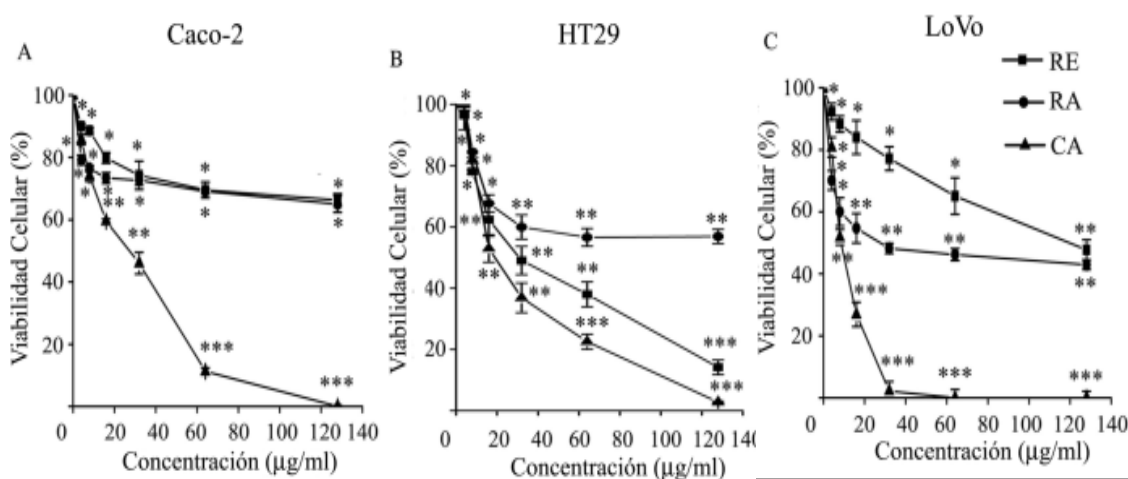


Figura 10. Viabilidad celular de tres líneas de CCR humanas tratadas con ER, AR y AC. Las líneas celulares **A-** Caco-2, **B-** HT29 y **C-** LoVo, se trataron con ER, AR y AC en un rango de concentraciones (0 a 128 µg/ml) durante 24 hs, transcurrido dicho período de tiempo la viabilidad celular fue determinada mediante el reactivo MTS. Los valores corresponden a la

media de tres experimentos independientes $\pm$ ES. (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs control).

De acuerdo a los resultados obtenidos el AC sería el compuesto del ER con mayor capacidad para inhibir la viabilidad celular de las líneas de CCR humanas estudiadas, las cuales presentan diferentes “background” genéticos: (Caco-2 (p53m), LoVo (p53wt) y HT29 (p53wt)).

Se evaluó también el efecto del AC sobre la viabilidad celular de otras líneas humana no tumorales: HFL-I (“Human fetal lung fibroblast”) y FHS (“human fetal small intestinal”) tratadas con AC. Se determinaron las DE_{50} para dichas líneas celulares. Los resultados indicaron que el AC inhibe la viabilidad celular, a concentraciones efectivas [DE_{50} ($\mu\text{g/ml}$) HFL-I, $16,21 \pm 4,3$ y FHS, $16,46 \pm 2,76$], que resultaron comparables con las DE_{50} determinados para las líneas CCR. Se sabe que la mayoría de las drogas antitumorales de uso comercial (Haglund *et al.*, 2012) tienen fuertes efectos no deseados sobre células tumorales y también sobre células normales.

Dado el efecto antiproliferativo del AC fue interesante continuar con los ensayos para determinar el tipo de muerte celular provocado por el compuesto vegetal y evaluar si este era capaz o no de modular blancos moleculares que afecten la capacidad invasiva de las líneas de CCR.

Resultados previos del laboratorio sugerían que un ER rico en AC era capaz de arrestar el ciclo celular de la línea Caco-2 en la fase G2/M (Altamirano *et al.*, 2006). Otro autor (Visanji J.M *et al.*, 2006) demostró que el carnosol, derivado del AC, arrestaba el ciclo celular de la línea Caco-2 en la fase G2/M, y que dicho evento celular estaba asociado a cambios en los niveles de ciclina A y ciclina B1, sin embargo el AC no mostró una modulación clara de dichas ciclinas.

De acuerdo a los resultados obtenidos de inhibición de la viabilidad del AC sobre las líneas CCR, resultó interesante estudiar el/los procesos por el cual el compuesto inhibió la viabilidad y la proliferación celular.

En particular se utilizó la línea celular Caco-2, la cual se encuentra ampliamente estudiada como modelo *in vitro* (Hidalgo *et al.*, 1989) y además, es ampliamente usada como modelo de estudio de cáncer de colon humano (Coskun *et al.*, 2014). Por esta razón, se utilizó dicha línea celular para la evaluación del efecto del AC a nivel celular y molecular en los siguientes estudios con el objetivo de evaluar si el AC es capaz de modular procesos y blancos moleculares involucrados en el desarrollo de la progresión tumoral.

5.2.2. Identificación y determinación de células apoptóticas

Se sabe bien que la viabilidad de las poblaciones de células tumorales está determinada

por el balance entre proliferación y muerte celular, por eso se estudió el efecto del AC sobre la viabilidad de la línea Caco-2 para evaluar si el mecanismo por el cual el compuesto vegetal induce la muerte de las células sería por apoptosis. Se utilizaron técnicas de tinción por fluorescencia para determinar distintos procesos celulares involucrados en la muerte celular por apoptosis.

Luego del tratamiento de las células en ausencia (control) y en presencia de AC (DE₅₀) durante 24 hs, se evaluó mediante la doble tinción con Anexina V-Cy3 y 6-CFDA la translocación de la fosfatidilserina del interior al exterior de la membrana celular, fenómeno evidenciado en células que sufren estadios tempranos de apoptosis (**Figura 11A**). Se tomaron fotografías mediante la observación por microscopía confocal de fluorescencia. Las células vivas que fluorescen en color verde (6-CFDA) están representadas por la fotografía en el panel superior de la **Figura 11A**, correspondientes al tratamiento control. Mientras que la fotografía del panel inferior corresponde al tratamiento con AC (DE₅₀) y se observa la doble tinción: verde (6-CFDA) en el interior de la célula y roja (Anexina V-Cy3) en el exterior de la membrana celular, lo que indica que las células estarían en proceso de muerte celular por apoptosis.

Se realizaron experimentos adicionales por tinción de los núcleos con el colorante fluorescente DAPI (**Figura 11B**). Las fotografías tomadas por microscopía de las células teñidas con DAPI tratadas en ausencia (control) o en presencia de AC (DE₅₀), revelaron que las células tratadas con AC presentaron las típicas características de las células apoptóticas, como son la condensación de la cromatina, la pérdida de la estructura nuclear normal y los cuerpos apoptóticos.

A partir de estos resultados obtenidos se determinó que el porcentaje de células apoptóticas tratadas en un rango de concentración de AC (4 a 64 µg/ml) aumentaba conforme aumentaba la dosis de AC (**Figura 11C**). Los resultados indican además que dicho efecto se promueve también tratando las células con dosis a la mitad y al cuarto de su DE₅₀.

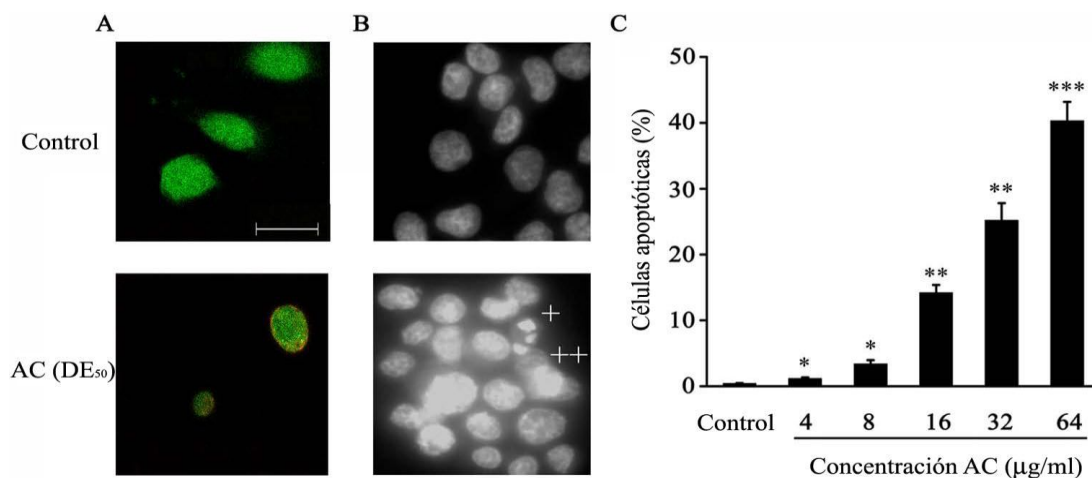


Figura 11. Inducción de muerte por apoptosis celular de la línea Caco-2 tratada con AC. **A** Detección de la translocación de la fosfatidilserina en la membrana celular. **B** Tinción con DAPI para detección de cuerpos apoptóticos (+) y condensación del material nuclear (++). Las células fueron fotografiadas con microscopio confocal y de fluorescencia. Escala 200 µm. **C** El porcentaje de células apoptóticas se cuantificó luego de la tinción con DAPI (B). Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes $\pm$ ES. (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs control).

Para confirmar la inducción de apoptosis por el AC, las células se trataron con AC (DE₅₀) durante 24 hs y se cuantificó la fluorescencia de la población celular mediante la doble tinción con Ioduro de propidio y Anexina-V FITV por citometría de flujo.

Las células muertas se detectaron por la tinción con Ioduro de propidio en el canal FL2 y las células en estado de apoptosis temprana correspondieron a las células que fluorescen luego del tratamiento con Anexina V-FITC y fueron detectadas en el canal FL1.

En la **Figura 12** muestra el control de las células sin tratar en donde las células se concentran en el cuadrante inferior izquierdo correspondiente a células vivas. Mientras que en el panel derecho de la **Figura 12** muestra la representación de la distribución poblacional de las células tratadas, las células vivas representaron el 75,03% (cuadrante, inferior izquierdo), las células necróticas el 0,92% (cuadrante, superior izquierdo), las células apoptóticas el 12,56% (cuadrante, inferior derecho) y las células apoptóticas tardías el 11,53% (cuadrante, superior derecho). Estos resultados indican que bajo estas condiciones el AC provoca, la muerte celular por apoptosis sobre un 24,09 % en la población de la línea Caco-2. Este porcentaje representa la cantidad de células en apoptosis más las células en estado de apoptosis tardías de la población celular total evaluada.

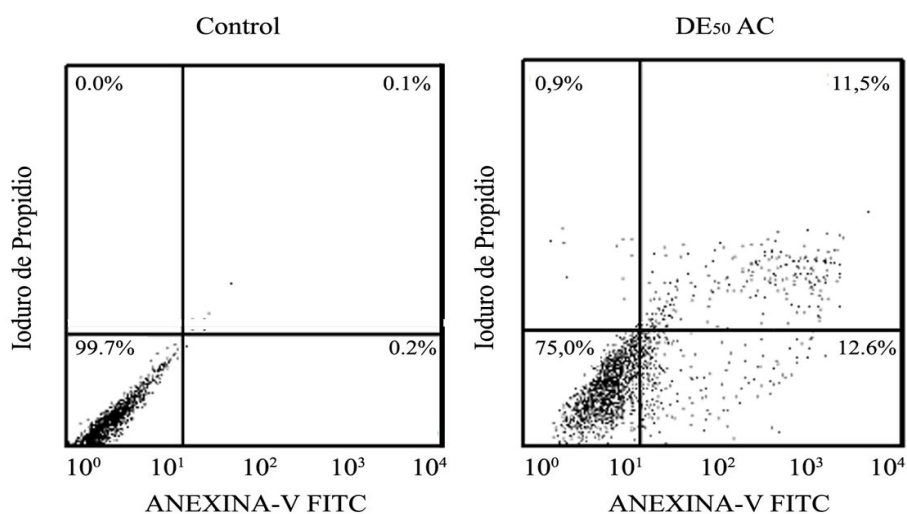


Figura 12. Distribución poblacional de las células Caco-2 tratadas con AC. Las células se trataron en ausencia (control) y en presencia de AC (DE₅₀) durante 24 hs. Los porcentajes descriptos en la parte superior izquierda de los gráficos indican la proporción de células necróticas, superior derecha: células apoptóticas tardías, inferior derecha: células apoptóticas e inferior izquierda: células vivas. Se realizaron dos ensayos independientes.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en el ensayo de tinción con DAPI (**Figura 11C**). Por lo tanto, el tratamiento de las células Caco-2 con una concentración de 32 µg/ml de AC sería capaz de inducir la muerte celular por apoptosis en aproximadamente un 25%.

5.3. Acción del AC sobre la actividad de proteasas de la matriz extracelular

Como se ha reportado que el AC es capaz de inhibir la migración de células de mamíferos (Yu *et al.*, 2008), se evaluó si el AC es capaz de modular dicho proceso celular en las células Caco-2. En primer lugar se estudió su efecto sobre la actividad de proteasas específicas que se sabe degradan la membrana basal en un proceso activo en una zona localizada y cercana a la superficie tumoral. En el grupo de proteinasas envueltas en la degradación de la matriz se identifican, entre otras, las metaloproteinasas (MMP) y las uroquinasas activadoras de plasminógeno (uPA).

Para ello, se investigó la acción del AC sobre la actividad degradativa de las proteasas presentes en los medios condicionados de cultivos celulares de la línea Caco-2. Se observa en la **Figura 13A** la fotografía de la zimografía cuantitativa en gel de poliacrilamida, correspondiente al efecto del AC sobre la actividad degradativa de la MMP-9. Las bandas de degradación fueron medidas por densitometría como se explica en materiales y métodos. El AC presenta una inhibición dosis dependiente de la actividad proteasa de la MMP-9 y se

observa que a dosis de 16 µg/ml de AC se inhibe aproximadamente un 60% la actividad de la MMP-9.

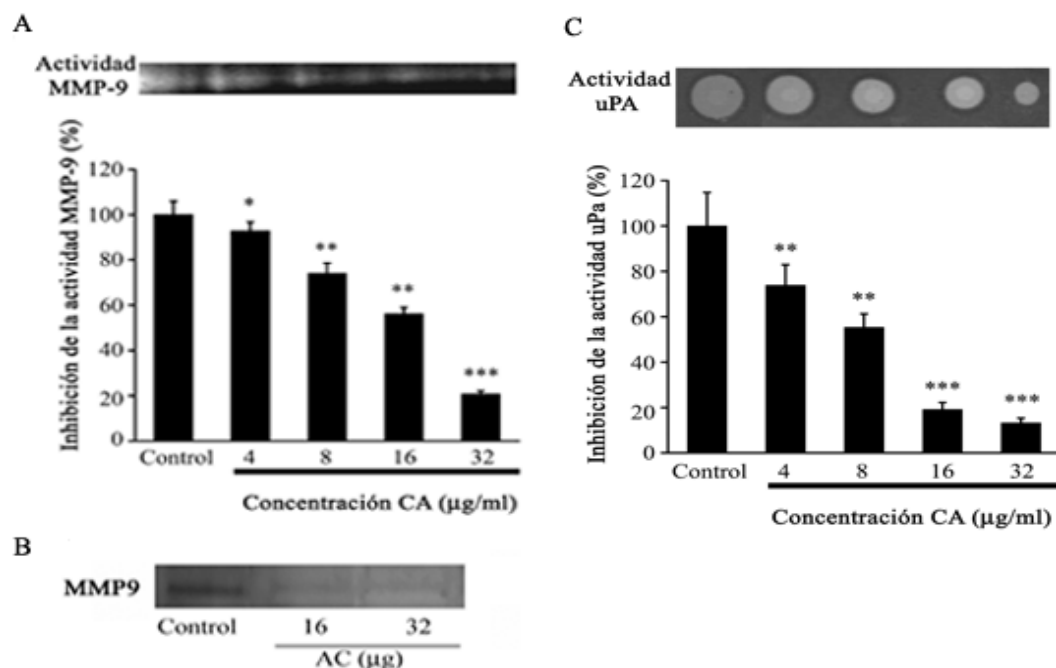


Figura 13. Inhibición de la actividad y la expresión de proteasa secretadas por células Caco-2 tratadas con AC. Las células se incubaron en presencia de AC (4 a 32 µg/ml) y ausencia (control) durante 48hs y se colectaron los medios condicionados. **A** Por zimografía cuantitativa se determinó la actividad proteolítica de MMP-9, que resulto dosis dependiente del tratamiento. **B** Por Western blot se determinó la inhibición de la expresión proteica de la MMP-9. **C** Por caseinólisis radial se determinó la inhibición de la actividad uPA. Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes $\pm$ ES. (* $P < 0,01$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs control).

Mediante la técnica de Western Blot se evaluó la expresión de la MMP-9 en la línea celular Caco-2 tratada con AC. En la **Figura 13B** se observan los niveles de expresión proteica de la MMP-9, control y tratada con AC durante 24 hs. Los resultados indican que el tratamiento con AC logró inhibir significativamente la expresión de la MMP-9.

Se evaluó también el efecto del AC sobre la actividad del uPA. En la **Figura 13C** se observa el efecto inhibitorio, dosis dependiente, del AC sobre la acción degradativa del uPA. Se determinó que a una dosis de 8 µg/ml de AC se inhibió en un 60% la actividad de uPA.

5.4. Efecto del AC sobre la migración celular

Los resultados anteriormente mencionados sugirieron que el AC podría estar alterando la capacidad migratoria de la línea Caco-2 tratada con AC. Por ello, se realizó el ensayo de cicatrización de la herida. En la **Figura 14A** se observa un claro efecto inhibitorio del AC sobre



la actividad migratoria de la línea celular Caco-2, el tratamiento con 16 $\mu\text{g/ml}$ de AC es capaz de inhibir un 50% la migración celular.

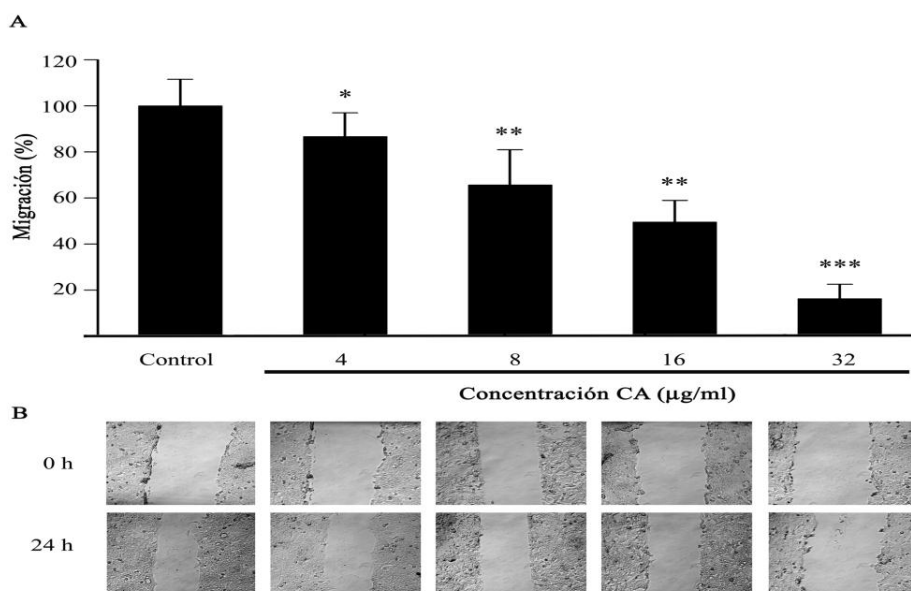


Figura 14. Inhibición de la migración de las células Caco-2 tratadas con AC. **A** % migratorio de células tratadas con AC (4-32 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 hs. **B** Fotografías comparativas de los anchos migratorios celulares a tiempo 0 y 24hs de tratamiento. El 100% de la migración corresponde al grupo control. Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes $\pm$ ES. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control).

En la **Figura 14B** se observan fotografías de los cultivos celulares, tomadas a tiempo 0 y 24 hs. A partir de estas fotografías se calcularon los anchos migratorios, correspondientes al cierre de la herida y se determinaron los % de migración.

5.5. Efecto del ac sobre la invasión celular

Estudiamos la capacidad invasiva de las células Caco-2 en respuesta al tratamiento con AC (32 $\mu\text{g/ml}$), durante 24 hs, utilizando el sustrato “matrigel” en cámaras “transwell”. Observamos en la **Figura 15**, que las células tratadas con AC (DE50) muestran una disminución significativa de su capacidad invasiva sobre la membrana de matrigel.

Luego se cuantificó el porcentaje de células con capacidad invasiva considerando el 100% al número de células con capacidad invasiva presentada por el control, previamente las células fueron fijadas y teñidas con DAPI.

En la parte superior de la **Figura 15**, se observan las fotografías del microscopio de fluorescencia de los campos obtenidos para las células control y para las células tratadas con AC (DE50), luego de la tinción de los núcleos con DAPI. Los resultados muestran que sólo el

20,51% de las células lograron invadir la membrana, con respecto al control. Este resultado muestra que el AC tiene la capacidad para inhibir *in vitro* la invasión celular de células de CCR.

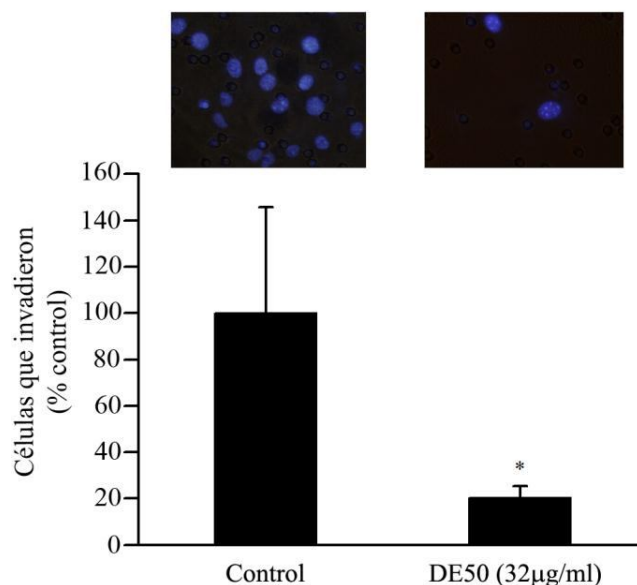


Figura 15. Efecto del AC sobre la invasión celular. Se evaluó la capacidad invasiva de las células Caco-2 tratadas con AC a la DE50 (32µg/ml) en cámara de “transwell” luego de 24 hs de tratamiento. Las células que invadieron la membrana de matrigel fueron fijadas y teñidas con DAPI y se determinó el % de células con capacidad invasiva y se tomó como el 100 % de células que invadieron al tratamiento control. Los valores corresponden a la media de dos experimentos independientes $\pm$ ES. (* $P < 0.05$ vs control).

5.6. Efecto del AC sobre la capacidad de adhesión celular

Para que una célula tumoral pueda separarse de la masa tumoral y migrar, necesita que las adhesiones fuertes entre matriz-célula se rompan, mientras que, por el contrario, cuando las células se desprenden del tumor original se adhieren en primer lugar a la matriz extracelular para continuar con el proceso de diseminación (Cascales *et al.*, 2008). En este proceso están involucradas distintas glucoproteínas como ser las integrinas que se unen con gran afinidad a componentes de la matriz extracelular como la fibronectina, colágeno tipo I, fibrina, vitronectina y trombospodina. Estas interacciones controlan la proliferación, la migración, la supervivencia y la apoptosis entre otros procesos celulares. Para determinar como el AC es capaz de modular la adhesión de las células tumorales a distintos componentes de la matriz extracelular (fibronectina y colágeno tipo I) se realizaron ensayos de adhesión celular, tratando las células con AC en un rango concentración de 0 a 128 µg/ml durante 1 h (**Figura 16A**). En otros experimentos se pre- trataron las células durante 24 hs, se lavaron y se

expusieron a los diferentes componentes de la matriz durante 1 h para evaluar su capacidad de adhesión (**Figura 16B**).

Los resultados de la **Figura 16A** muestran que la adhesión de las células Caco-2 a fibronectina y colágeno tipo I disminuye claramente luego del tratamiento con el AC durante 1 h, logrando valores de inhibición del 60% utilizando AC a 32 μ g/ml, utilizando como control las células en las mismas condiciones sin tratamiento. Dicho efecto inhibitorio se confirmó luego del pre-tratamiento de las células durante 24 hs con el AC dado que el compuesto vegetal logró valores de inhibición mayores (aproximadamente 80-90%) sobre la adhesión celular (**Figura 16B**).

Además, mediante microscopía óptica (**Figura 16C**) se observó que el AC (DE₅₀) fue capaz de producir un cambio en la morfología celular, se pudo visualizar una clara inhibición del “spreading” celular y sobre la extensión de pseudopodios en las 2 matrices ensayadas (fibronectina y colágeno tipo I).

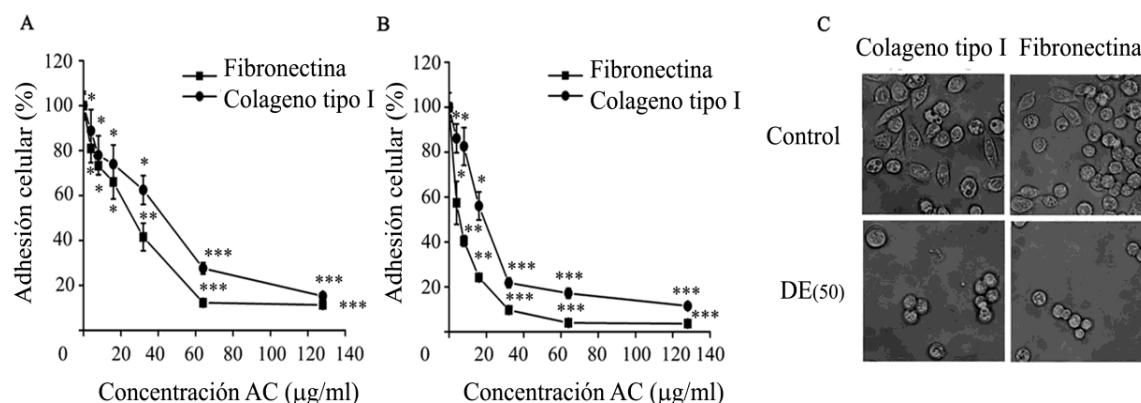


Figura 16. Inhibición de la adhesión celular por el tratamiento con AC. **A** El tratamiento con AC durante 1 h inhibió la adhesión celular de la línea Caco-2 sembradas sobre los componentes de la matriz: colágeno tipo I y fibronectina de forma dosis dependiente. **B** Las células pretratadas durante 24 hs con AC presentaron inhibición sobre la adhesión celular, sin embargo dicho efecto se observó a concentraciones más bajas de AC que en (**A**). **C** Imágenes obtenidas por microscopía óptica que muestran la inhibición del “spreading” celular de las células tratadas con AC del ensayo (**A**). Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes $\pm$ ES. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control).

5.7. Efecto del AC sobre la regulación de proteínas del contacto focal de adhesión

Los resultados obtenidos en ensayos anteriores, mostraron que el AC es capaz de inhibir la adhesión y el “spreading” celular de la línea Caco-2, de este modo se sugiere que el compuesto vegetal podría estar modulando ciertas proteínas involucradas en la adhesión y migración celular. Las proteínas que conforman el contacto focal, son claves en procesos de

proliferación, adhesión, migración e invasión celular, los cuales contribuyen a la progresión de las células tumorales (Wang *et al.*, 2012). Además, se sabe que FAK puede promover el “spreading” celular formando complejos principalmente con las proteínas Src y paxilina (Larsen *et al.*, 2003) y está sobreexpresada en adenocarcinomas de colon.

Entonces, se evaluó la capacidad de AC para inhibir la fosforilación de FAK. Se estudió su efecto sobre el sitio Y397 (sitio de autofosforilación que induce la activación del dominio quinasa, implicado en la fosforilación de varias proteínas del contacto focal de adhesión: paxilina, Grb2 y p130CAS). También en el sitio Y861 (que es transfosforilado por Src, y aumenta la afinidad del dominio SH3 en FAK hacia p130CAS). El tratamiento con AC fue capaz de inhibir la fosforilación de los dos sitios entre un 30-40% (**Figura 17A**).

Además, se investigó el efecto del AC sobre el sitio de fosforilación Y118 de la paxilina (proteína adaptadora de las integrinas y las fibras de actina) y Y410 de p130CAS (que actúa como conector de la FAK a la Scr, principalmente). Para ello, se trataron las células Caco-2 con AC (16 y 32 µg/ml) durante 1 h. Los resultados indican que el AC a las dos concentraciones ensayadas, fue capaz de inhibir el sitio de autofosforilación (Y118) de la proteína paxilina (**Figura 17B**), mientras que el sitio de fosforilación Y410 de p130CAS, fue inhibido entre un 50 y 55% (**Figura 17C**).

La disminución de la expresión de los sitios de fosforilación de FAK, paxilina y p130CAS sugieren que el AC podría inhibir la capacidad adhesiva de las células Caco-2, comprometiendo, en el interior de la célula, la interacción de estas proteínas, con las fibras de actina del citoesqueleto y hacia la matriz extracelular con las integrinas.

De esta forma, los procesos celulares relacionados con el progreso tumoral, dependientes de la adhesión celular, como ser migración e invasión celular podrían ser inhibidos por el tratamiento con el AC. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los ensayos de migración (ensayo de cicatrización de la herida), invasión y adhesión celular.

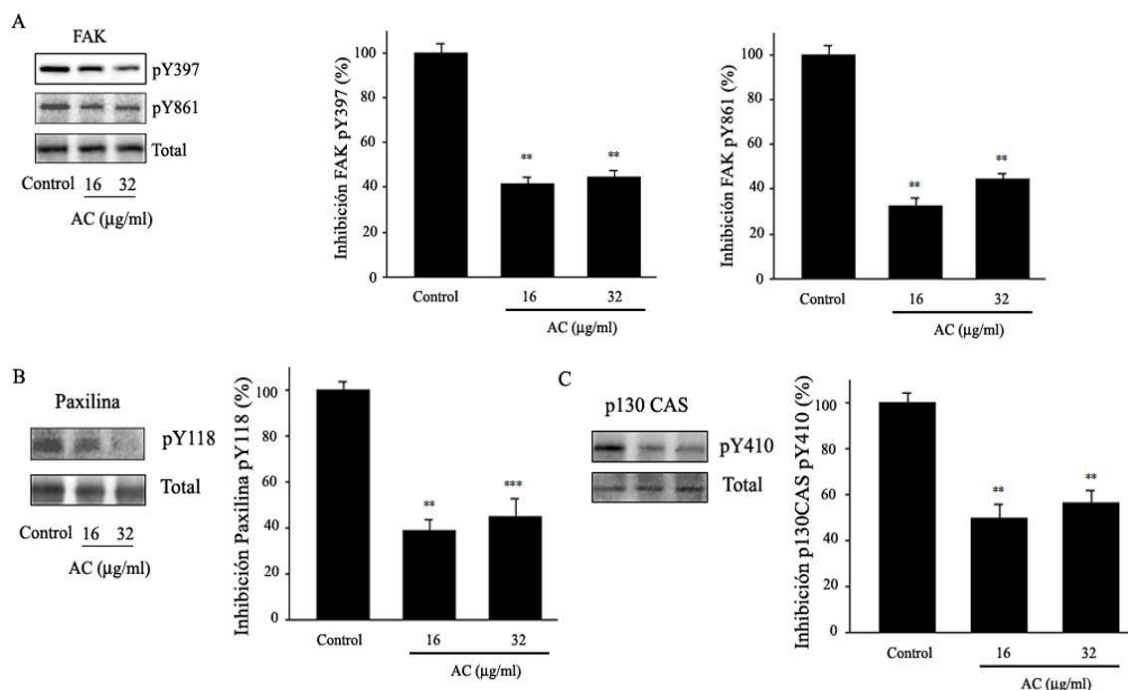


Figura 17. Inhibición de la fosforilación de proteínas que median los contactos focales de células Caco-2 tratadas con AC. **A** El tratamiento de las células con AC (16 y 32 µg/ml) durante 1 h, inhibió la fosforilación de dos sitios de fosforilación de FAK Y397 e Y861 (30-40%). **B** El tratamiento también logró inhibir (entre 40-45%) la fosforilación del sitio Y118 de la proteína Paxilina. **C** Y se logró inhibir (50-55%) la fosforilación del sitio Y410 de la proteína p130CAS. Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes $\pm$ ES. (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs control).

5.8. Efecto del AC sobre los contactos focales y el citoesqueleto de actina

De acuerdo a los resultados obtenidos sobre el efecto inhibitorio del AC sobre ciertos sitios de fosforilación de proteínas que conforman los contactos focales como FAK, Paxilina y p130CAS, se estudió el efecto del AC sobre las adhesiones focales y el citoesqueleto de actina de las células Caco-2 mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) (**Figura 18**).

Para ello, se crecieron las células Caco-2 bajo dos condiciones experimentales: sobre cubreobjetos de vidrio (**Figura 18A**) y sobre cajas de plástico de 35 mm (**Figura 18B**). Se trataron las células durante 3 hs con AC (DE50), se fijaron y se realizó IFI utilizando un anticuerpo y un fluoróforo específicos para detectar la paxilina y los microfilamentos de actina, respectivamente. Se visualizó la localización subcelular de los constituyentes celulares, utilizando un microscopio de fluorescencia (**Figura 18**) y microscopio confocal (**Figura 19**).

Como era de esperar, las células control (tratadas con vehículo) evidenciaron mayor adhesión sobre plástico con respecto al vidrio (**Figura 18**). Los resultados demuestran que las células tratadas con AC al cabo de 3 hs de tratamiento, en ambas superficies, afectan la distribución de contactos focales luego de la detección con el anticuerpo anti- paxilina (rojo),

observándose una reorganización sin dirección aparente. Además, se observó, mediante la utilización de la toxina faloidina acoplada al fluoróforo Alexa 488 (verde), que luego del tratamiento con el AC se localizan los filamentos de actina agrupados en el borde celular (**Figura 18A y 18B**).

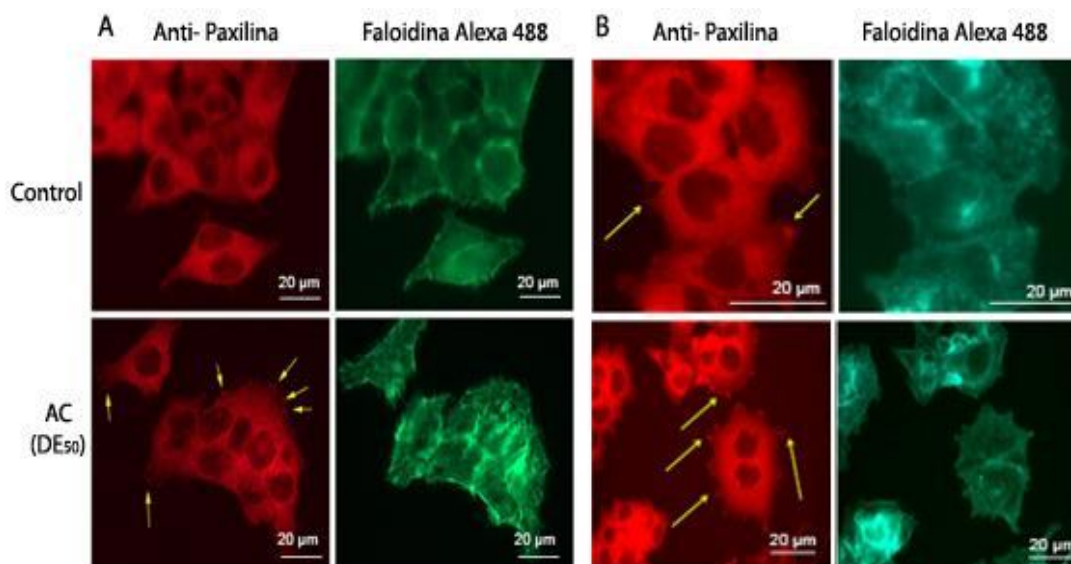


Figura 18. Reorganización de contactos focales y citoesqueleto de actina por el tratamiento con AC. **A** Se crecieron las células sobre vidrio (cubreobjetos) y **B** en cajas de plástico de 35 mm, se trataron con 32 $\mu\text{g/ml}$ de AC durante 3 hs (AC DE₅₀) y sin el compuesto (Control). Se realizó IFI para detectar Paxilina (rojo) y fibras de actina (verde). Las fotografías fueron tomadas por microscopia de fluorescencia. Las flechas amarillas señalan los contactos focales presentes en las células.

Para una mejor visualización del efecto del AC sobre el citoesqueleto de actina, se crecieron las células en cajas de plástico de 35 mm hasta un 30 % de confluencia, se trataron las células a dos concentraciones de AC (DE₅₀ o DE₂₅) durante 3 hs y se realizó IFI utilizando la toxina faloidina acoplada al fluoróforo Alexa 488 para visualizar las fibras de actina bajo el microscopio confocal (**Figura 19**). En la **Figura 19** se observa que las células control (tratadas con el vehículo) presentan su forma irregular típica de las células epidérmicas y con volumen bien definido. La fluorescencia se observa definida y altamente homogénea, indicando que hay una gran cantidad de filamentos de actina en forma bien organizada en toda la población celular y no presenta mayor intensidad en otras zonas celulares como en los bordes celulares. Por el contrario, se observa una morfología celular más redondeada en las células tratadas con AC 16 $\mu\text{g/ml}$ (correspondientes a la DE₂₅). Además, la fluorescencia correspondiente a la distribución de filamentos de actina se agrupa hacia los bordes celulares, efectos que se ven incrementados en las células tratadas con AC 32 $\mu\text{g/ml}$ (DE₅₀) donde las células pierden su

morfología normal, se redondean completamente, y el ordenamiento de los filamentos de actina se encuentra completamente distribuido hacia los bordes celulares.

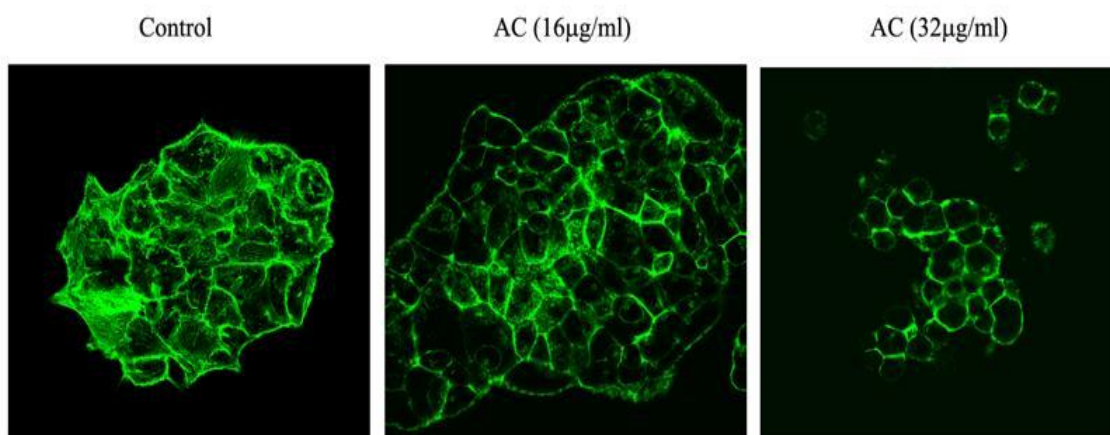


Figura19. Reorganización del citoesqueleto de actina. En el tratamiento control se observa una distribución homogénea de los filamentos de actina, mientras que para los tratamientos con AC a 16µg/ml (DE₂₅) y 32µg/ml (DE₅₀) los filamentos de actina se distribuyen hacia los bordes celulares y las células se redondean perdiendo su estructura normal. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado.

En otra serie de experimentos se trataron las células bajo condiciones similares pero omitiendo 10% de suero en el medio utilizado (DMEM) y se observaron los mismos efectos producidos por el AC, aunque con efectos más intensos sobre las estructuras celulares (Dato no mostrado).

Los resultados indican que el AC a las dos concentraciones ensayadas, es capaz de modular y reorganizar tanto las adhesiones focales como el citoesqueleto de actina, eventos que son claves en los procesos de migración e invasión celular.

5.9. Acción del AC sobre la expresión de la COX-2 a nivel de ARNm y de proteína

En los seres humanos, la COX-2 juega un rol importante en el progreso tumoral y en enfermedades inflamatorias, particularmente desarrolladas en el tracto gastrointestinal. El aumento de la expresión de la COX-2 en CCR se asoció con una peor supervivencia con más de un 68% de riesgo de mortalidad, lo que indica que la expresión de COX-2 es un marcador de mal pronóstico clínico (Rahman *et al.*, 2012). Además, existen estudios que asocian la modulación de componentes de la MEC mediado por la COX-2 y la FAK (Alique *et al.*, 2011).

La COX-2 en particular se encuentra sobreexpresada en la línea Caco-2. Se ha evaluado el efecto del AC, con tratamientos de 24 hs, sobre la expresión a nivel de ARNm y proteína de la COX-2 mediante RT-PCR y Western Blot respectivamente.

Luego del ensayo de RT-PCR se identificaron las bandas correspondientes al ARNm de

la COX-1, COX-2 y GAPDH de 0,3, 0,4 y 0,6 kb, respectivamente en geles de agarosa (**Figura 20A**). Los resultados indican que a dosis de AC 16 y 32 $\mu\text{g/ml}$ disminuyeron los niveles de ARNm de COX-2 en un 60 y 20%, respectivamente, con respecto al control de GAPDH. Además se observó que dichas dosis o menores parecen no tener efectos significativos sobre la expresión del ARNm de la COX-1 (gen expresado constitutivamente en células normales)

En la **Figura 20B** se observa que el tratamiento con AC a 16 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 hs reduce en aproximadamente un 40% la expresión de la proteína COX-2, siendo más significativo el tratamiento con 32 $\mu\text{g/ml}$ de AC, el cual reduce la expresión de la proteína COX-2 en un 70%, se toma como 100% de expresión proteica de COX-2 al control correspondiente a las células sin tratar.

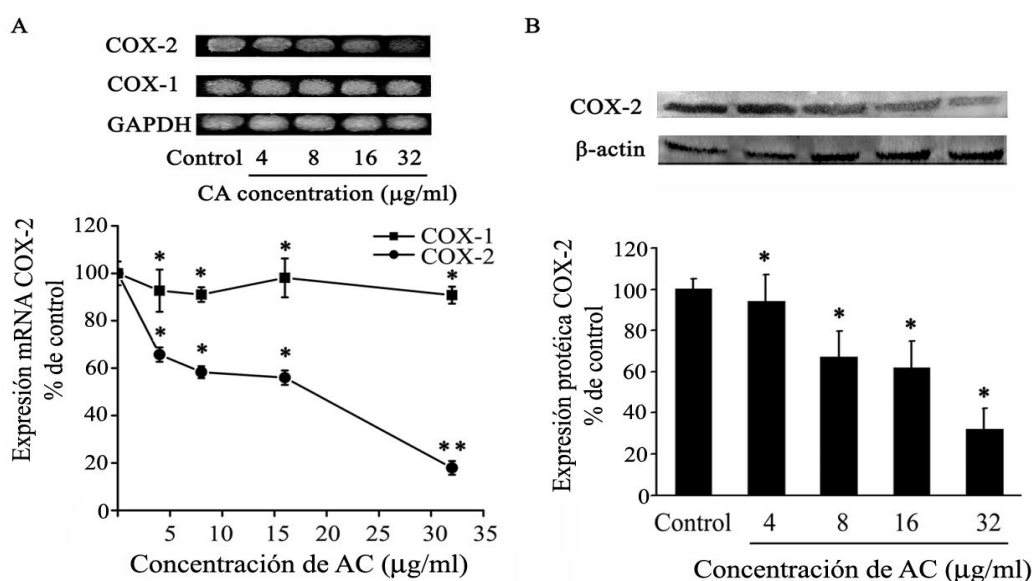


Figura 20. Inhibición de la expresión de la COX-2. **A** El AC (16 y 32 $\mu\text{g/ml}$) redujo significativamente la expresión del ARNm de la COX-2, mientras que no altera los niveles de ARNm de la COX-1. **B** La expresión de la COX-2 a nivel de proteína también fue inhibida por el tratamiento con AC. Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes $\pm$ ES. (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs control).

Estos resultados indican que el tratamiento con AC logra reducir expresión de la COX-2 tanto a nivel de ARNm y como de proteína, que se encuentra en niveles detectables en la línea tumoral Caco-2. Dado que la enzima COX-2 se encuentra involucrada en ciertos procesos de progresión de la tumorigénesis, como ser disminución de apoptosis y aumento de proliferación y angiogénesis, los resultados resultan interesantes a la hora de proponer a la COX-2 como posible blanco de acción del AC. Además, al no ser afectada significativamente la expresión de COX-1, podría cumplir con otra propiedad de relevancia en la búsqueda de nuevos compuestos AINEs selectivos contra la COX-2.

5.10. Efecto del AC sobre la regulación de la transcripción de la COX-2

Por último se evaluó si el AC era capaz de modular a la COX-2 a nivel de su transcripción. Para ello, se utilizaron construcciones plasmídicas conteniendo el promotor humano de la COX-2 ligado al gen reportero de luciferasa (cedidas por el Dr. Miguel Ángel Iñiguez, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad de Madrid, España). La construcción plasmídica denominada p2-1900 contiene el promotor completo de la COX-2 humana que incluye los sitios de unión de los factores de transcripción: NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells", NFAT ("nuclear factor of activated T cells") y CRE ("cyclic AMP response element"). En la **Figura 21** se muestran los resultados, se trataron las células transfectadas con el TPA (acetato de tetradecanoilforbol), conocido inductor químico de inflamación, que fue capaz de aumentar la activación de la expresión del gen de la COX-2. Dicho efecto se evidenció por la expresión del gen de la luciferasa medido en unidades relativas de luciferasa (URL) y se observó que el TPA aumentó la expresión de COX-2 en un 80% en las células transfectadas con el plásmido p2-1900. Para determinar si el AC era o no capaz de modular la activación de COX-2 inducida por el TPA, las células Caco-2 transfectadas con el plásmido p2-1900 se trataron con AC (16 μ g/ml). Los resultados indicaron que en presencia del compuesto vegetal se inhibió en un 70% la inducción de la expresión del gen de COX-2 (**Figura 21**).

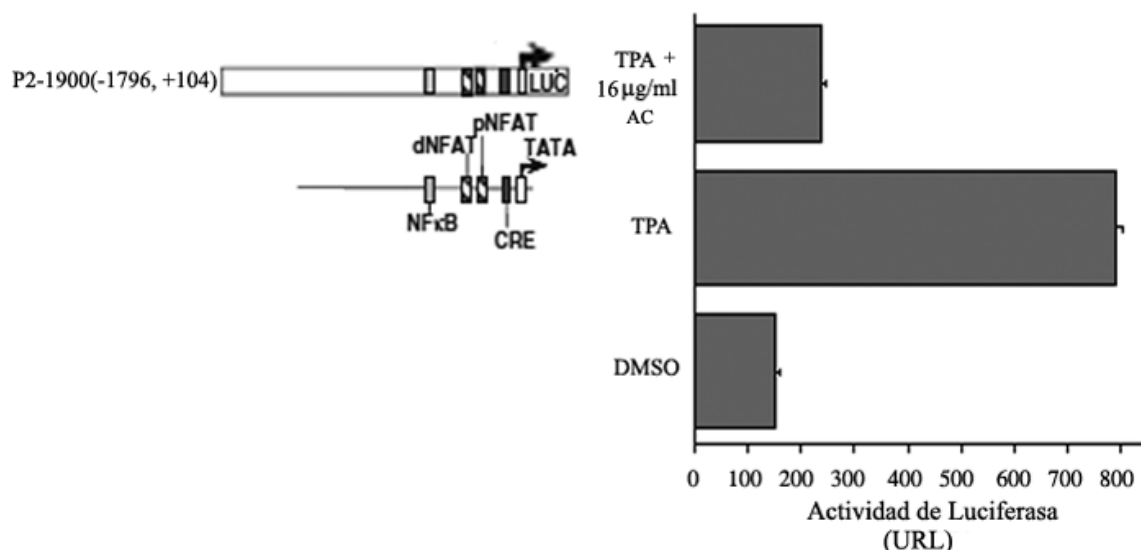


Figura 21. Efecto del AC sobre la regulación de la transcripción del gen de la COX-2. La línea celular Caco-2 se transfectó con el plásmido P2-1900, se trató con TPA en

presencia o ausencia de 16 µg/ml de AC. Los ensayos se realizaron por triplicado y se normalizaron con la co-transfección del plásmido *Renilla*. Los ensayos se realizaron por triplicado en 3 ensayos independientes.

5.11. Toxicidad del AC *in vivo*

La introducción de un nuevo fitofármaco lleva implícito la realización de un conjunto de investigaciones que incluyen, no solo la comprobación de un efecto biológico relevante, sino también la ejecución de estudios toxicológicos, cuya finalidad es establecer el uso seguro del fármaco (Zbinden *et al.*, 1991).

En el presente Trabajo de tesis se llevaron a cabo estudios toxicológicos en ratones Balb/c. Se utilizaron 4 grupos de ratones: Control (vehículo), Tratados con ER (30 mg/Kg de peso) o Tratados con AC (5 a 10 mg/Kg de peso). Los tratamientos se realizaron vía intraperitoneal (i.p) cada 3 días, durante 15 días.

Se evaluaron parámetros fisiológicos como el peso de los animales, el estado general, estado del pelaje, comportamiento de los animales y también parámetros bioquímicos como ser: recuento de leucocitarios totales y fórmula de sangre periférica (polimorfonucleares, PMN, neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y los mononucleares (linfocitos y monocitos). En casos particulares se realizaron análisis patológicos de diferentes órganos del animal.

Se observó que los animales del grupo tratado con ER (30 mg/kg) no presentaron pérdidas significativas en el peso de los animales (**Figura 22B**), ni cambios en el aspecto físico ya sea perdida del pelaje o agresión aparente de los animales. Tampoco hubo cambios en los recuentos leucocitarios comparados con los del grupo control (**Figura 23A y B**).

El tratamiento con AC 10 mg/kg, provocó en los animales un leve descenso de peso (**Figura 22 A y C**), pero no se observaron diferencias en el recuento leucocitario a los 15 días de tratamiento comparado con el grupo control (**Figura 23 A**), sin embargo se observó la inversión en la fórmula leucocitaria al cabo de 15 días de tratamiento, entre PMN y linfocitos (**Figura 23B**). También, en los estudios anatomopatológicos realizados, se determinaron algunos focos aislados necro-inflamatorios en hígado, pero el compuesto parece no afectar significativamente el riñón de los animales porque no se observan signos de deformación del tejido renal (Datos no mostrado).

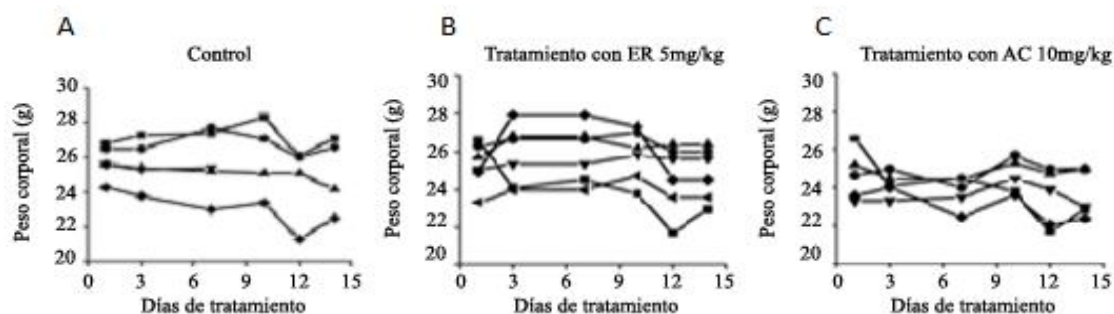


Figura 22. Pérdida de peso. A Los animales del grupo control no presentaron pérdida de peso. B Los animales del grupo ER no presentaron pérdida de peso aparente. C Los animales del grupo AC 10mg/kg de peso presentaron una leve pérdida de peso. Las administraciones i.p de los tratamientos en los ratones se realizaron cada tres días durante 15 días. Se utilizaron 4-6 animales por grupo.

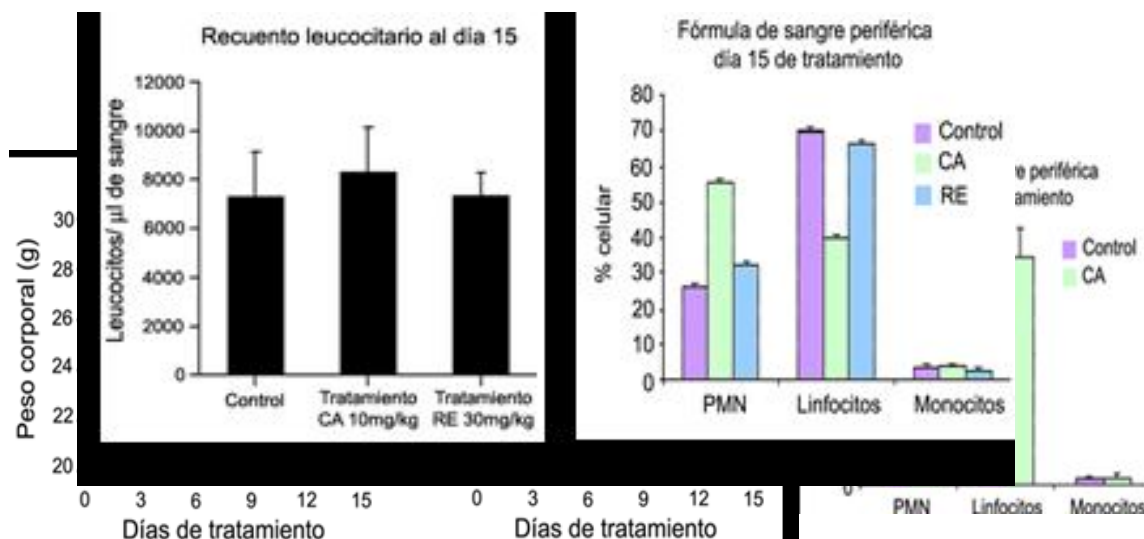


Figura 23. Recuento Leucocitario. A Los recuentos leucocitarios fueron similares en los 3 grupos. B La fórmula de sangre periférica de los animales tratados con AC 10 mg/kg de peso, mostró inversión de fórmula leucocitaria. Se utilizaron 4-6 ratones para cada grupo ensayado.

Los resultados obtenidos para el grupo de animales tratados con AC 10 mg/kg, demostraron tener una leve toxicidad en los animales, por dicha razón se procedió a realizar ensayos de toxicidad con el compuesto AC a una dosis menor correspondiente a 5 mg/kg de peso. El ensayo se realizó en las mismas condiciones que el ensayo anterior, pero disminuyendo la concentración de AC a dosis de 5 mg/kg de peso. En este caso en general los animales no sufrieron pérdida de peso durante los 15 días de tratamiento, comparando con el control, salvo un animal que inicialmente presentaba un peso menor al resto de los animales

(Figura 24A). Además, los ratones no presentaron cambios en su pelaje ni estado de agresión aparente durante los días del tratamiento. Más aún, la fórmula leucocitaria obtenida de sangre periférica de los animales fue normal y no se detectaron cambios en otros parámetros bioquímicos en suero como: glucosa y enzimas (GOT, GPT y TG) en los ratones tratados con AC respecto a los controles (Figura 24B).

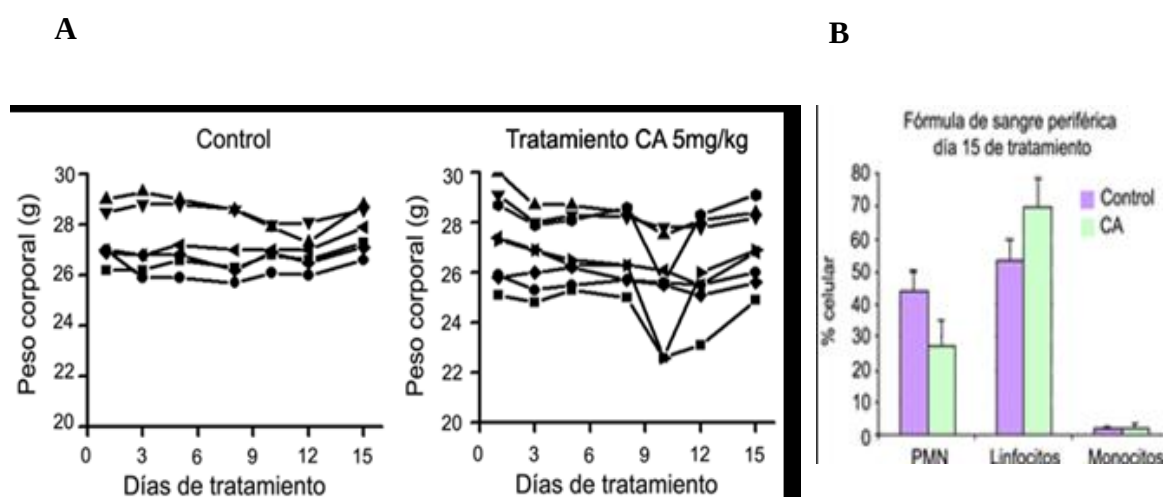


Figura 24. Citotoxicidad *in vivo*. **A** El tratamiento con dosis de AC 5 mg/kg de peso no alteró el de peso de los animales comparado con el grupo control. **B** No se observó inversión de la fórmula leucocitaria. Se utilizaron 5-7 ratones por cada grupo ensayado.

Se realizaron análisis anatomopatológicos del bazo, corazón, hígado, pulmón y riñón de los animales tratados con dosis de AC 5 mg/kg y de animales control. Ambos grupos de animales fueron comparables y no se observaron daños hepáticos en los ratones del grupo tratado (Figura 25).

Los parámetros bioquímicos en suero de glucosa y enzimas (GOT, GPT y TG) de los ratones tratados AC, fueron similares a los del control (Datos no mostrados).

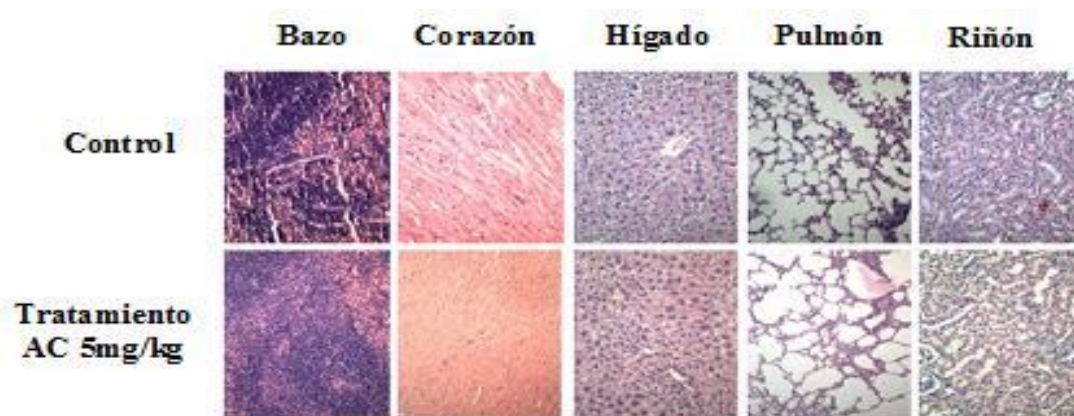


Figura 25. Análisis anatomopatológicos. Se observaron por microscopía cortes de los órganos: bazo, corazón, hígado, pulmón y riñón de los ratones control y tratados con AC 5 mg/kg. No se observaron cambios significativos en la estructura de los órganos estudiados. Los análisis se realizaron por cuadruplicado utilizando 3 animales de cada grupo.

Los resultados indican que de los ratones tratados con dosis de AC 5 mg/kg de peso no mostraron signos de toxicidad, al menos en las condiciones del ensayo realizado.

Por lo tanto se elige la dosis de AC 5 mg/Kg de peso para realizar el ensayo de actividad antitumoral *in vivo*.

5.12. Actividad antitumoral del AC *in vivo*

Se evaluó la actividad antitumoral del AC *in vivo* utilizando un modelo de ratón atímicos en el cual se indujo la producción de tumor inoculando células de CCR humanas (Cafferata *et al.*, 2009).

Se procedió a inyectar de modo subcutáneo en la dorso derecho de los ratones atímicos $2,5 \times 10^6$ células de CCR de la línea celular HT29 que se sabe inducen la aparición de tumores que alcanzaron un volumen de aproximadamente 100mm^3 (entre el día 5 a 7 posterior a la inoculación). A partir de dicho período se comenzaron los tratamientos (**Figura 26A**). Se dividieron los animales en dos grupos: Control (vehículo) y Tratado con AC 5 mg/kg. Se procedió a aplicar de modo intratumoral dosis de vehículo (**Figura 26B**) o de AC 5 mg/kg (**Figura 26C**) cada 3 días durante 18 días.

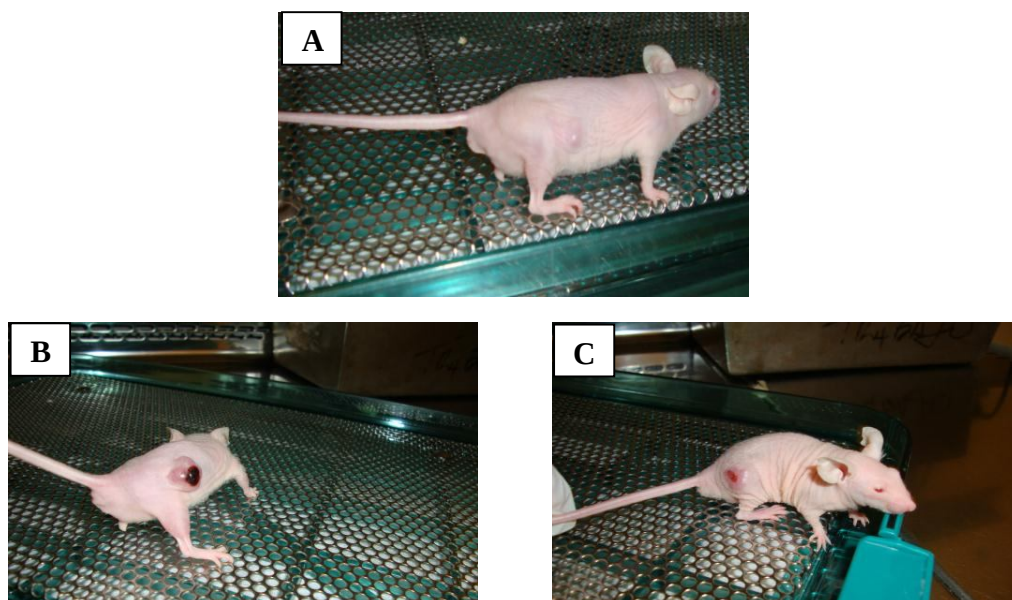


Figura 26. Inducción de tumor in vivo y tratamiento con el AC. **A** Crecimiento tumoral de ratón inoculado con células HT29 al día 7. **B** Crecimiento tumoral de ratones tratados con vehículo al día 18. **C** Crecimiento tumoral de ratón tratado con AC 5 mg/kg al día 18. Se realizó el ensayo con al menos 5 animales por grupo.

Se determinó el peso y el estado general de los animales, cada 3 días durante 18 días y no se observó pérdida de peso los ratones tratados tanto en el grupo control como en el tratado con AC 5 mg/ml (**Figura 27**).

A

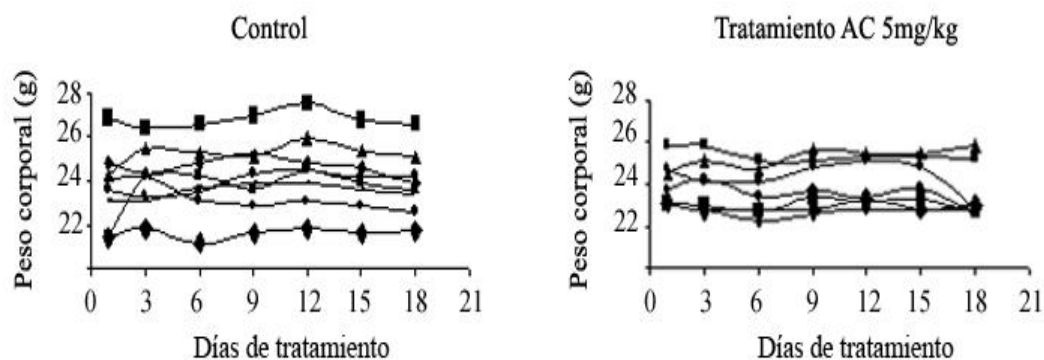
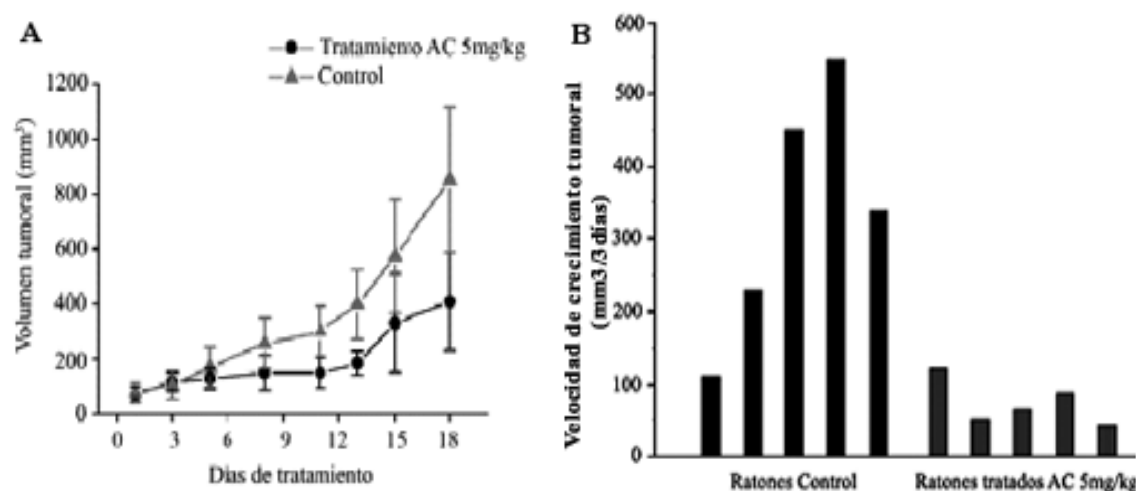


Figura 27. Evaluación del peso corporal de los animales. Los pesos de los animales control y tratados con AC 5 mg/Kg son comparables. El ensayo se evaluó con 6-8 animales por grupo.

Se evaluó el crecimiento tumoral de los animales grupo Control y Tratado con AC 5 mg/kg (**Figura 28A**). Los resultados obtenidos muestran que los animales tratados con AC, presentaron tumores con volúmenes más reducidos comparados con los tumores de los animales controles, como se observa en la **Figura 22B y C**, efecto que se observó más notorio entre los días 6 a 13 de tratamiento. En la **figura 28B** se observan las velocidades de crecimiento tumoral individuales de cada animal al día 18 de tratamiento, para los grupos de ratones Control y tratados con AC 5mg/kg. Se determinó que el AC podría causar la reducción de la velocidad de crecimiento tumoral, ejerciendo una acción antiproliferativa sobre las células HT29 que conforman el tumor.



B

Figura 28. Acción antitumoral *in vivo*. **A** Los promedios de los volúmenes tumorales de los ratones tratados con AC fueron menores que los determinados para los del grupo control durante los 18 días de tratamiento. **B** Las velocidades de crecimiento individuales de los tumores de los ratones tratados con AC fueron determinadas en el período de tiempo entre los días 13 a 18. El ensayo se evaluó con 5 ratones por grupo.

Los resultados de la evaluación de toxicidad *in vivo* del AC, así como de la eficacia como compuesto vegetal antitumoral *in vivo* contra una línea tumoral HT29 en ratones, sugieren que el AC administrado a dosis de 5 mg/kg no ejercería efectos tóxicos en los principales órganos de ratones y podría ejercer una acción antitumoral contra CCR de origen humano.

6. Discusión y conclusiones

6.1. Discusión

Las principales causas de riesgo de CCR están asociadas tanto a factores ambientales como dietarios. La guía de la Sociedad Americana Contra El Cáncer ("American Cancer Society" o ACS, por sus siglas en inglés) recomienda una alimentación a base de un alto contenido de frutas, verduras y granos integrales y un bajo consumo de carnes rojas y alimentos procesados para lograr una disminución del riesgo del cáncer colorrectal. La identificación de factores del microambiente que contribuyen a un aumento de la supervivencia de las células precursoras tempranas de cáncer llevaría al entendimiento molecular de la quimioprevención. Además, diferentes vías de señalización regulados por nutrientes, actualmente surgen como importantes blancos para la prevención del cáncer colorrectal y como potenciales blancos de drogas antitumorales. Por esta razón, en los últimos años, se le ha dado particular importancia al estudio de nuevos agentes farmacológicamente activos que son capaces de inhibir la progresión de células tumorales con potencial acción sobre blancos moleculares específicos asociados con la proliferación e invasión celular. Entre ellos, se ha enfocado la búsqueda de compuestos obtenidos de fuentes naturales, especialmente de las plantas.

Rosmarinus officinalis L. es una planta considerada medicinal, utilizada como antioxidante desde la antigüedad, fundamentalmente por su elevado contenido de polifenoles como son el ácido rosmarínico y el ácido carnósico. Dichos bioactivos vegetales poseen además diversas acciones farmacológicas en células eucariotas y procariotas (Mengoni *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2006; Gaya *et al.*, 2013).

Previamente a la realización de este trabajo de Tesis Doctoral se sabía que el AC ejercía acciones antiproliferativas sobre células leucémicas humanas (Steiner *et al.*, 2001). Se reportó que el compuesto presentaba efectos antileucémicos por la inhibición del ciclo celular en la fase G1 a concentraciones de 2,5-10 μ M, mientras que otros estudios reportaron que las células leucémicas tratadas con 100 μ M de AC induciría la apoptosis asociada a la activación de caspasas -9 y -3 (Pesakhov *et al.*, 2010).

Los resultados de la Tesis Doctoral demuestran que el AC es el compuesto bioactivo del ER, responsable de la inhibición de la viabilidad celular, de manera dosis dependiente, de las tres líneas celulares humanas de CCR estudiadas: LoVo, HT29 y Caco-2 (**Figura10**), las cuales poseen diferentes "backgrounds" genéticos.

En la literatura hay pocos estudios que evalúan el efecto del AC en células de CCR y son contradictorios en los efectos observados. Se reportó que el AC a una concentración de 8 μ g/ml (23 μ M) inhibe la duplicación del ADN, mediante ensayos realizados con

Timidina tritiada (3H), mientras que a una concentración de 50 μ M arresta el ciclo celular en forma transiente en la fase G2/M, aunque inhibe parcialmente la ciclinas A en las células Caco-2 (Visanji *et al.*, 2010).

Nuestros resultados indican que el tratamiento del AC durante 24 hs, sobre la línea celular Caco-2 fue capaz de inhibir la viabilidad celular a una DE₅₀ de 32 μ g/ml. El uso de monocapas de células Caco-2 es un modelo de células intestinales aceptado por muchos laboratorios de todo el mundo, establecido a partir de un adenocarcinoma de colon bien diferenciado obtenido de un paciente de 72 años (Fogh *et al.*, 1977). Estas células llegan a confluencia dentro de los 3-6 días de cultivo (Braun *et al.*, 2000). Por esta razón se evaluó el proceso por el cual el AC inhibió la viabilidad celular de la línea Caco-2.

Se evidenció, mediante ensayos con anticuerpos y microscopía de fluorescencia, que el AC provoca la translocación de la fosfatidilserina del interior al exterior de la membrana plasmática de las células Caco-2 (**Figura 11A**), también se observó mediante tinción con DAPI, condensación de la cromatina y pérdida de la arquitectura nuclear celular normal, procesos fisiológicos característicos de la muerte celular por apoptosis (**Figura 11B**). Más aún se determinó, mediante ensayos de citometría de flujo, que el 25% de las células tratadas con AC (32 μ g/ml) mueren por procesos tempranos de apoptosis respecto al control sin tratar (**Figura 12**). Datos que concuerdan con los obtenidos en (**Figura 11C**), donde se observa el porcentaje de células apoptóticas tratadas con AC.

De acuerdo a los estudios anteriores y resultados de este trabajo, es posible que el AC, dependiendo de la concentración, tiempo de exposición al tratamiento y tipos celulares estudiados, ejerza acciones antiproliferativas de manera multifactorial.

La invasión tumoral requiere la degradación de la MEC, que está compuesta por diferentes macromoléculas entre ellas colágeno, laminina y heparan sulfatos. Existe un gran número de enzimas proteolíticas, involucradas en los procesos de invasión y metástasis celular, entre ellas se incluye a las MMPs y serinas proteasas que están involucradas en la degradación de la MEC. En particular la actividad de las MMP-2 y MMP-9 juegan un papel fundamental en la motilidad celular puesto que son capaces de clivar el colágeno y las uroquinasas del tipo activadores de plasminógeno (uPA), las cuales aceleran la conversión del plasminógeno en plasmina en la cascada proteolítica. La plasmina puede degradar fibrina, fibronectina, proteoglicanos, laminina y colágenos (Blasi *et al.*, 1997).

Nuestros resultados indican que el AC inhibe aproximadamente el 60% de la actividad degradativa de las proteasas que degradan la MEC: uPA, MMP-9 en concentraciones de entre 8 y 16 μ g/ml (**Figura 13A-C**). También se demostró mediante Western Blot que el AC inhibió la expresión de la proteinasa MMP-9 (**Figura 13B**). Este resultado es de interés porque se sabe que en CCR dichas enzimas proteolíticas contribuyen en gran medida a los procesos invasivos (Overall *et al.*, 2002)

La migración de las células tumorales es uno de los principales procesos que desencadenan la cascada de la metástasis celular, evento en el que las células tumorales del tumor primario acceden a la circulación sanguínea. En este trabajo se observó, mediante el ensayo de cicatrización de la herida, que el AC es capaz de inhibir fuertemente la migración de las células Caco-2 de modo dosis dependiente. Los resultados evidenciaron que el 50% de la migración celular se inhibe por el tratamiento de AC aproximadamente a la mitad de su DE50, (16 µg/ml) (**Figura 14**). Mediante el ensayo de invasión utilizando una matriz de matrigel en cámara “transwell” se confirmó que el AC a su DE50 (32 µg/ml) inhibe en aproximadamente un 80% la capacidad invasiva de las células respecto de las células control sin tratamiento tratando la línea celular Caco-2 (**Figura 15**).

En el trabajo determinamos también que el AC inhibe fuertemente la adhesión de las células Caco-2 a los sustratos colágeno tipo I y fibronectina (**Figura 16A y B**). Además, documentamos por microscopía la inhibición de los movimientos de “spreading” y extensión pseudopodial de las células pre-tratadas con AC (DE50) sobre los sustratos que se analizaron (**Figura 16C**). Recientemente se ha reportado que otros compuestos del metabolismo secundario de las plantas como el licopeno, principal carotenoide del tomate, inhibe la invasión de células de CCR mediante la inhibición de la expresión de la metaloproteasa-7 (MMP-7) (Lin *et al.*, 2011).

Los claros efectos del AC obtenidos mediante técnicas bioquímicas y celulares fueron claves para empezar a comprender a nivel molecular posibles mecanismos de acción antitumoral del AC en CCR sobre un tema central que sustenta la transición de carcinoma *in situ* a cáncer invasivo, en donde las células metastásicas anulan las señales inhibitorias de sus ambientes circundantes e invaden su MEC subyacente.

En tal contexto, se sabe que la proteína FAK media los contactos focales y está involucrada en procesos de invasión, migración, adhesión y “spreading” celular (Cary *et al.*, 1999). Además, es un potencial blanco molecular de acción de moléculas antineoplásicas en CCR dado que el complejo bipartito FAK / c-Src se encuentra desregulado en células tumorales de CCR (Wang *et al.*, 2012). Otras evidencias sugieren fuertemente que la FAK es una proteína clave durante los procesos de señalización de las células en su conversión a un cáncer invasivo:

La sobreexpresión de FAK en células transformadas con v-Src aumenta su capacidad para invadir Matrigel (Hsia *et al.*, 2003). Numerosos estudios han demostrado altos niveles de FAK (tanto ARNm y proteínas) en los tumores humanos altamente invasivos con metástasis como el de colon, mama, próstata, tiroides, cabeza y cuello, hígado, esófago (Agochiya *et al.*, 1999; I-Rue *et al.*, 2010) y la elevada expresión de FAK se correlaciona con pobres tasas de sobrevivencia (Itoh *et al.*, 2004). Además, en un modelo *in vitro* de cáncer de colon humano, durante la conversión de adenoma a carcinoma se encontró que aumenta el número de copias del gen FAK (Yu *et al.*, 2006; Cance *et al.*, 2000). También

se evaluó que la FAK (constitutivamente activa) impide la apoptosis en células epiteliales no adheridas (Frisch *et al.*, 1996). Por último, cuando la actividad de FAK se examinó en tumores humanos preneoplásicos y metastásicos en pacientes individuales, se encontró en el tejido metastásico una actividad constitutiva de FAK en comparación con los tumores pre-neoplásicos (Kahana *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos en la tesis Doctoral indicaron que el AC inhibe aproximadamente entre un 30-60% los sitios de fosforilación Y397 y del Y861 de la proteína FAK, que aumentan la afinidad con otra proteína del contacto focal, p130Cas. También el AC fue capaz de inhibir el sitio de fosforilación Y410 de la proteína p130Cas y del sitio Y118 de la Paxilina (**Figura 17A y B**).

Dichos resultados sugieren que el AC sería capaz de modular la actividad de ciertas proteínas que conforman el contacto focal y principalmente del camino de transducción de señales de la FAK. Para poner a prueba dicha hipótesis, se realizaron ensayos de IFI para visualizar contactos focales mediante anticuerpo anti-Paxilina y filamentos de actina usando Faloidina acoplada a fluoróforos luego del tratamiento de células Caco-2 tratadas con AC. Los resultados mostraron que el tratamiento con AC a DE50, reorganizaron las adhesiones focales (**Figura 18**), de manera no direccionada. Este fenómeno parece ser más complejo al que inicialmente se proponía (Broussard *et al.*, 2008) puesto que la maquinaria celular de formación de filopodios, protrusiones celulares y adhesión celular estaría mediada por interacciones cruzadas entre participantes del mismo caminos de señalización de quinadas como ser Src, FAK y p130CAS. Src-p130Cas genera filopodios, y Src-FAK causa el alargamiento de adhesión. Recientemente se reportó que tanto Src-130Cas y Src-FAK producen protuberancia, pero Src-FAK produce ciclos de protrusión-retracción incesantes, mientras Src-p130Cas genera “spreading” celular (Karginov *et al.*, 2014). Además, las células tumorales poseen mecanismos que activan su supervivencia ante la exposición a ciertos fármacos, y estas formas de supervivencia son complejas y particulares del tipo celular y también del tiempo de exposición célula fármaco.

También se observó en la **Figura 18 y 19** un cambio notorio de la forma y tamaño celular, así como una clara reorganización del citoesqueleto de actina de la línea Caco-2. La desestabilización de los microfilamentos de actina y reorganización del citoesqueleto hacia los bordes celulares demuestran que el AC tiene un efecto comparable a ciertas drogas antitumorales, desestabilizadoras del citoesqueleto celular, que actúan mediante la interrupción dinámica de los microtúbulos frente a la simple reducción de la polimerización. Esta circunstancia bloquea las células en mitosis, llevando eventualmente a la apoptosis celular (Jordan *et al.*, 2004).

Se ha descripto que la actividad COX-2 se encuentra íntimamente relacionada a procesos inflamatorios (DuBois *et al.*, 1998; Coussens *et al.*, 2002; Raymond *et al.*, 2003; Grivennikov *et al.*, 2010). Aunque se ha recomendado el uso de aspirina y otros

medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), tales como ibuprofeno y naproxeno, estos pueden causar sangrado a irritación del estómago por sus efectos secundarios y no selectivos. La FDA "Food and Drug Administration" aprobó el uso de Celecoxib para reducir la formación de pólipos en personas que padecen poliposis adenomatosa familiar, aunque entre sus efectos secundarios se encontraron aumentó del riesgo de ataques cardíacos y ataques cerebrovasculares.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el AC podría también ser capaz de modular la expresión del gen COX-2, al menos en la línea Caco-2, en la cual se encuentra sobre-expresado. El AC (DE50) es capaz de inhibir la expresión de la COX-2 a nivel de ARNm y proteína mientras que la COX-1, importante para ciertos procesos fisiológicos celulares normales, parece no ser afectada significativamente por el tratamiento (**Figura 20**). Otros resultados obtenidos muestran que el AC podría estar modulado a nivel de la transcripción el gen de acuerdo a los resultados obtenidos por transfección de las células Caco-2 con un plásmido portador del promotor del gen de COX-2 (**Figura 21**). Dicha proteína es otro blanco molecular clave en CCR e implicado en una vía de señalización inflamatoria que se sabe promueve la progresión y desarrollo tumoral. La importancia clínica del efecto del AC sobre la COX-2 ofrece un beneficio terapéutico interesante en la búsqueda de drogas no esteroideas anti- inflamatorias (AINEs) (Pinheiro *et al.*, 2002).

Se han realizado estudios *in vivo* para determinar la toxicidad del ER con alto contenido en AC y también del AC puro (Figura 22, 23, 24 y 25), estos estudios se utilizaron como un precedente inicial para evaluar las dosis potencialmente no tóxicas en animales.

Los resultados *in vivo* realizados en este trabajo, demuestran que el AC administrado a una concentración de 5 mg/kg no evidenció toxicidad significativa y no produjo estado de caquexia en los animales al cabo de 15 días de tratamiento.

Recientemente en un trabajo del laboratorio se evaluó el efecto del AC sobre la viabilidad de fibroblastos murinos 3T3-L1 (Gaya *et al.*, 2013). Los resultados encontrados mediante el ensayo de viabilidad por el método de MTS o el azul Tripán muestran que el AC a la mayor concentración ensayada 20 µg/ml no presentó ningún efecto nocivo sobre la viabilidad de dichas células normales.

Finalmente, se realizaron ensayos preliminares *in vivo* en donde se evaluó el efecto antitumoral del AC sobre células HT29 en ratones. Luego del tratamiento con una concentración que no mostró toxicidad alguna en los animales, 5 mg/Kg durante 18 días, se observó una tendencia significativa del compuesto a ejercer una disminución de las velocidades de crecimiento de las células tumorales con respecto al grupo de ratones control (**Figura 26, 27 y 28**). Su eficacia antitumoral fue más evidente a los primeros días del tratamiento y se observó que disminuyó la velocidad de crecimiento tumoral cuando se

administró el AC cada tres días. Posiblemente, dosis diarias del compuesto ejercerían un mayor efecto antitumoral.

En resumen: Los resultados de la evaluación de toxicidad *in vivo* del AC, así como de su eficacia como compuesto antitumoral *in vivo* contra una línea tumoral de CCR en ratones, sugieren que el AC administrado a dosis de 5 mg/kg no ejercería efectos tóxicos en los principales órganos de ratones y podría ejercer una acción antitumoral contra CCR humano. Hemos encontrado en estudios realizados *in vitro* que el AC sería capaz de: - modular blancos moleculares claves en procesos de progresión tumoral como la fosforilación de la proteína FAK, - reorganizar filamentos de actina, - inhibir la actividad de proteasas involucradas en la degradación de la MEC y de la enzima COX-2.

Se propone finalmente un modelo de acción posible del AC en CCR (**Figura 29**).

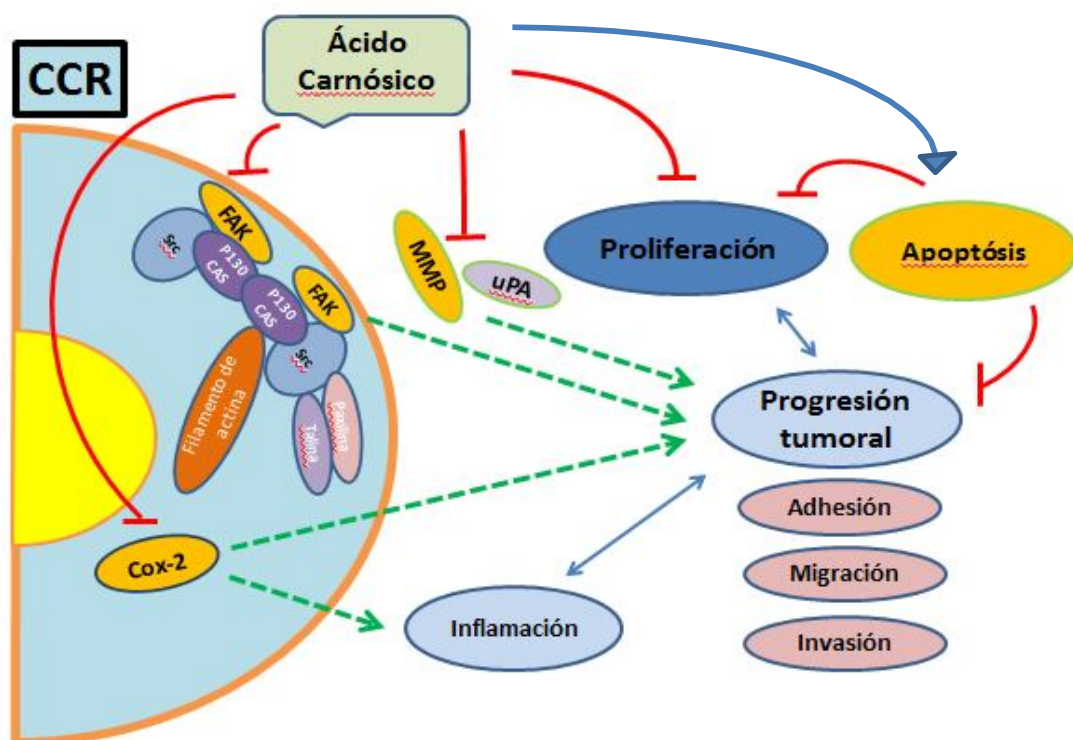


Figura 29. Modelo de acción propuesto para la acción del AC sobre CCR. El AC sería capaz de modular diversos blancos moleculares involucrados en la proliferación y progresión tumoral de CCR. El AC induciría la muerte celular por apoptosis. Además, el compuesto vegetal podría inhibir procesos de adhesión, migración e invasión celular probablemente por la modulación de moléculas que componen la estructura del contacto focal, entre ellas FAK, Paxilina y p130CAS, alterando el citoesqueleto de los filamentos de actina e inhibiendo la actividad proteolítica de moléculas secretadas a la matriz extracelular por las células, como ser: MMP-9 y uPA. El AC podría inhibir la expresión de otros intermediarios como la enzima COX-2, involucrada en procesos inflamatorios y relacionada con un aumento de la progresión tumoral en CCR.

6.2. Conclusiones

En este trabajo de Tesis Doctoral se identificó que el AC es el compuesto bioactivo del extracto de hojas de *R. officinalis*, que ejerce una acción antitumoral sobre tres líneas diferentes de CCR humano, por lo tanto se concluyó lo siguiente:

- El AC ejerce efectos de manera multifactorial sobre las células de CCR humano, como ser: acción antiproliferativa y acción inhibitoria de procesos involucrados en la progresión tumoral: invasión, migración y adhesión celular. El efecto inhibitorio del compuesto vegetal es capaz de inhibir la proliferación mediante apoptosis y reducir la adhesión, la migración, la invasión y la actividad proteolítica celular.
- El AC modularía proteínas del contacto focal, inhibiendo la fosforilación de ciertos sitios de la proteína FAK, la Paxilina y la p130Cas y razón por la cual se disminuiría la migración celular. También el AC sería capaz de modular el citoesqueleto de microfilamentos de actina en la línea celular Caco-2.
- El AC podría inhibir la expresión de la COX-2, implicada en procesos inflamatorios en general, y partícipe clave de procesos del desarrollo tumoral en CCR como ser invasión, migración y proliferación celular (Kohene *et al.*, 2004).
- En ensayos *in vivo* se demostró que AC no presentó toxicidad aguda en los animales de experimentación en las dosis ensayadas. Además, se observó actividad antitumoral del compuesto vegetal.
- De acuerdo a estos resultados parece interesante proponer al AC como un posible agente preventivo o terapéutico contra el progreso del cáncer colorrectal.

7. Perspectivas

- El AC induce la muerte celular programada en células Caco-2, restaría evaluar posibles intermediarios de dicho proceso.
- Mediante microscopía se observó que el AC altera la estructura de los filamentos de actina, se podría investigar la acción del compuesto con actina acoplada a la GFP y ver su efecto sobre fibras de estrés
- Mediante técnicas bioquímicas *in vitro* evaluar si los microfilamentos de actina en presencia del AC son capaces o no de polimerizarse.
- El AC inhibe la fosforilación de FAK, evaluar mediante la sobreexpresión de FAK, si se afecta o no la invasión celular.
- Utilizar anticuerpos fluorescentes contra Src para evaluar si el AC impide la asociación del complejo FAK-Src.
- Analizar el efecto del AC sobre otras vías de señalización celular asociadas a la proliferación como: PKC, MAPK, ERK.
- Investigar posibles proteínas blanco moleculares del AC localizados en la membrana plasmática en células CCR. Se podría analizar el perfil de proteínas biotiniladas antes y después del tratamiento con el compuesto vegetal (Radhakrishnan *et al.*, 2014).

8. Publicaciones

8.1. Publicaciones completas en revistas/libros internacionales con referato

"Carnosic acid inhibits the proliferation and migration capacity of human colorectal cancer cells." Barni MV, Carlini MJ, Cafferata EG, Puricelli L, Moreno S. *Oncology Reports* 27: 1041-1048 (2012).

"Rosemary compounds as nutraceutical health products." Moreno S, Ojeda Sana AM, Gaya M, Barni MV, Castro OA, van Baren C. Chapter 9. Food additives. Ed: El- Samragy, Y. Intech-open Science. ISBN 978-953-51-0067-6. 157-174 (2012).

"Study of the antibiotic efficacy of an ethanolic extract from *Rosmarinus officinalis* against *Staphylococcus aureus* in two skin infection models in mice". Barni, MV, Fontanals A y Moreno S. *BLACPM* 8(3), 219–223 (2009)

8.2. Presentaciones en congreso

"Antioxidant and antimicrobial activities of volatile and non-volatile fractions of Rosmary". Gaya M, Van Baren C, Elechosa M, Barni MV, Juarez M, Ojeda A, Moreno S. SAIB, Argentina, 2009.

"Regulation of inflammatory mediators by polyphenols of *Rosmarinus Officinalis* L. in human colon carcinoma cell lines". Barni MV, Iñiguez MA, S Moreno. XI Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología, SAB, Toxicología y Farmacología, 64. Resumen y exposición oral. XI Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología, SAB. 2 al 4 de Diciembre del 2009. Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBIME.

"Capacidad antitumoral de bioactivos de *Rosmarinus officinalis* L. sobre líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano". Barni MV, Carlini MJ, Cafferata EG, Puricelli L, Moreno S. XXVI Jornadas Nacionales de Oncología del instituto Ángel H. Roffo, PO-070, pág. 40. XXVI Jornadas Nacionales de Oncología del instituto Ángel H. Roffo. 31 de Agosto, 1 al 3 de Septiembre del 2010. Instituto de Oncología Ángel H. Roffo - Buenos Aires, Argentina.

"Advances on the biological functionality of non-volatile polyphenols isolated from *Rosmarinus officinalis*". Barni MV, Repetto MV, Moreno S. International Federation of Societies of Cosmetic Chemists, 361, pág. 191, resumen. PO-C05, Developments in Actives Research,

póster. 26th Congress of the International Federation of Societies of Cosmetic Chemists, IFSCC 2010. 20 al 23 de Septiembre del 2010. San Martín 1225/1275, Hotel Sheraton, Buenos Aires, Argentina.

“Estudio de la capacidad antitumoral de compuestos activos de un extracto de *Rosmarinus officinalis* L. sobre líneas de adenocarcinoma de colon humano”. Barni MV, Carlini MJ, Cafferata EG, Puricelli L, Moreno S. Medicina, Buenos Aires vol. 70 Sup. II - 2010 ISSN 0025.7680. Resumen y póster. Sociedad Argentina de Investigación Clínica, SAIC 2010. 17 al 20 de Noviembre del 2010. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

“Efecto citostático *in vitro* contra la línea LP07 de adenocarcinoma murino de pulmón y citotoxicidad *in vivo* de bioactivos aislados de *Rosmarinus Officinalis* L”. Barni MV, Carlini MJ, Diamant M, Fina BL, Porte S, Rigalli A, Puricelli L, Moreno S. XXVII Jornadas Nacionales de Oncología del instituto Ángel H. Roffo. 13 al 16 de Septiembre del 2011. Instituto de Oncología Ángel H. Roffo - Buenos Aires, Argentina. “Identificación de blancos moleculares de acción del ácido carnósico, principal diterpenos del *Rosmarinus Officinalis* L., en adenocarcinoma de colon humano”. Barni MV, Carlini MJ, Rey O, Cafferata EG, Puricelli L, Moreno S. XXVIII Jornadas Multidisciplinarias en Oncología. 14 de Septiembre del 2012. Instituto de Oncología Ángel H. Roffo - Buenos Aires, Argentina.

“El ácido carnósico, un compuesto presente en *Rosmarinus Officinalis* L., regula la formación de adhesiones focales y la organización del citoesqueleto e inhibe la capacidad invasiva de células humanas derivadas del Cancer Colorrectal”. Puricelli L, Rey O, Cafferata EG, Barni MV, Carlini MJ, Moreno S. XXIX Jornadas Multidisciplinarias en Oncología, “Nuevas tecnologías: Mitos y verdades”. 10 al 13 de Septiembre del 2013. Instituto de Oncología Ángel H. Roffo - Buenos Aires, Argentina.

9. Bibliografía

Aertgeerts K. Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol*, 160: 781-791 (2003).

Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology*, 71(10): 1397-1421 (2006).

Agochiya M, Brunton V G, Owens D W, Parkinson E K, Paraskeva C, Keith, W N, Frame M C. Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells. *Oncogene*, 18 (41): 5646-5648 (1999).

Angioni A, Barra A, Cereti E, Barile D, Coisson JD, Arlorio M. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *J Agric Food Chem*, 52(11): 3530-3535 (2004).

Alique M, Calleros L, Luengo A, Grieria M, Íñiguez MA., Punzón C, Fresno M, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D. Changes in extracellular matrix composition regulate cyclooxygenase- 2 (COX-2) expression in human mesangial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 300(4): 907-918 (2011).

Altamirano NA, Repetto MV, Vojnov AA, Cafferata EG, Piwien Pilipuk G, Moreno S. Phytophenols of Rosemary: effect on proliferation and differentiation in normal and tumoral cells. *BIOCELL* (30) SI (2006).

Avizienyte E, Wyke AW, Jones RJ, McLean GW, Westhoff MA, Brunton VG, Frame MC. Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. *Nat Cell Biol*. 4(8): 632-8 (2002).

Balkwill F, Mantovani A. Cancer and Inflammation: Implications for Pharmacology and Therapeutics Clinical, 87: 401-406 (2010).

Barni, MV, Fontanals A y Moreno S. Study of the antibiotic efficacy of an ethanolic extract from *Rosmarinus officinalis* against *Staphylococcus aureus* in two skin infection models in mice. *BLACPMA*, 8(3): 219–223 (2009).

Benito M, Díaz-Rubio E. Molecular Biology in Colorectal Cancer. *Clin Transl Oncol*, 8(6): 391-398 (2006).

Blasi F. UPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways?. *Immunology Today*, 18: 415-417 (1997).

Braun A Hammerle S, Suda K, Rothen-Rotishauser B, Günther M, Krämer S, Wuderli-Allenpach H. Cell cultures as a tool in biopharmacy. *Eur J Pharm Sci*, 11: S51-S60 (2000).

Broussard JA, Webb DJ, Kaverina I. Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells. *Curr. Opin. Cell Biol*, 20: 85-90 (2008).

Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO Journal*, 14 (17): 4240-4248 (1995).

Bruce W, Giacca A, Medline A. Possible Mechanisms Relating Diet and Risk of Colon Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 9: 1271-1279 (2000).

Cafferata EG, Macció DR, Lopez MV, Viale DL, Carbone C, Mazzolini G, Podhajcer OL. A

novel A33 promoter-based conditionally replicative adenovirus suppresses tumor growth and eradicates hepatic metastases in human colon cancer models. *Clin Cancer Res*, 15(9): 3037-3049 (2009).

Calderwood DA, Ginsberg MH. Talin forges the links between integrins and actin. *Nature Cell Biol*, 5: 694-697 (2003).

Cance WG, Harris JE, Iacocca MV, Roche E, Yang XH, Chang J, Simkins S, Xu LH. Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin. Cancer Res.*, 6: 2417-2423 (2000).

Cary LA, Guan J. Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling, *Frontiers in Bioscience*, 4: 102-113 (1999).

Cascales Angosto M, Álvarez-Gómez J A. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An R Acad Nac Farm*, 76 (1): 59-84 (2010).

Cascales E. The type VI secretion toolkit. *EMBO reports*, 9 (8): 735-741 (2008). Coskun M, Olsen AK, Bzorek M, Holck S, Engel UH, Nielsen OH, Troelsen JT. Involvement of CDX2 in the crosstalk between TNF- α and Wnt signaling pathway in the colon cancer cell line Caco-2. *Carcinogenesis.*, 2014; In Press.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*, 420: 860-867 (2002). Cheung S, Tai J. Anti-proliferative and antioxidant properties of Rosemary *Rosmarinus officinalis* *Oncol Rep*, 17(6): 1525-1531(2007).

Choi JA, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, Yoo YD, Kim TW, Lee YS, Lee SJ. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int J Oncol*, 19: 837-44 (2001).

Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268: 233-239 (1995).

Danilenko M, Wang Q, Wang X, Levy J, Sharoni Y, Studzinski GP. Carnosic Acid Potentiates the Antioxidant and Prodifferentiation Effects of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 in Leukemia Cells but Does Not Promote Elevation of Basal Levels of Intracellular Calcium. *Cancer Res*, 63: 1325-1332 (2003).

Danilenko M, Wang X, Studzinski GP. Carnosic acid and promotion of monocytic differentiation of HL60-G cell Initiated by Other Agents. *J Natl. Cancer Inst*, 93: 1224-1233 (2001).

Defilippi P, Di Stefano P, Cabodi S. p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks. *Trends Cell Biol*, 16 (5): 257-263 (2006).

DeMali K, Wennerberg AK, Burridge K. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Current Opinion Cell Biol*, 15: 572-582 (2003).

DuBois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*, 12: 1063–1073 (1998).

Duque J, Díaz-Muñoz MD, Fresno M, Iñiguez MA. Up regulation of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 β in colon carcinoma cells. *Cellular Signalling*, 18: 1262-1269 (2006).

Eaden J, Abrams K, Ekbom A, Jackson E, Mayberry J. Colorectal cancer prevention in

- ulcerative colitis: a case-control study. *Aliment Pharmacol Ther*, 14: 145-153 (2000).
- Edwin N, Frankel S, Aeschbach R, Prior E. Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion. *J Agric Food Chem.*, 44 (1): 131-135 (1996).
- Folgueras AR, Pendas AM, Sánchez LM, López-Otín C. Metalloproteinases in cancer: from new function to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol*, 48: 411-424 (2004).
- Fournier DB, Gordon GB. COX-2 and colon cancer: potential targets for chemoprevention. *J Cell Biochem Suppl*, 34: 97-102 (2000).
- Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Pharm Sci*, 59: 221-226 (1977).
- Fresco P, Borges F, Marques MP, Diniz C. The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis. *Curr Pharm Des*, 16(1): 114-34 (2010).
- Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E, Chan-Hui PY. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol.*, 134(3):793-9 (1996).
- Fu Y, Zu Y, Chen L, Shi X, Wang Z, Sun S, Efferth T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytother Res*, 21(10): 989-994(2007).
- Gabarra-Niecko V, Schaller MD, Dunty JM. FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Metastasis Review*, 22: 359-374 (2003).
- Gaya M, Repetto V, Toneatto J, Anesini C, Piwien-Pilipuk G, Moreno S. Antiadipogenic effect of carnosic acid, a natural compound present in *Rosmarinus officinalis*, is exerted through the C/EBPs and PPAR γ pathways at the onset of the differentiation program. *Biochim Biophys Acta*, 1830: 3796–3806 (2013).
- Glinghammar B, Rafter J. Carcinogenesis in the colon: interaction between luminal factors and genetic factors. *Eur J Cancer Prev*, 1: 87-94 (1999).
- Gloeckler Ries LA, Reichman ME, Lewis DR, Hankey BF, Edwards BK. Cancer survival and incidence from the Surveillance. *Oncologist*, 8(6): 541-552 (2003).
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 140 (6): 883-899 (2010).
- Golubovskaya VM, Gross S, Kaur AS, Wilson RI, Xu LH, Yang XH, Cance WG. Simultaneous inhibition of focal adhesion kinase and SRC enhances detachment and apoptosis in colon cancer cell lines. *Mol Cancer Res*, 1(10): 755-764 (2003).
- Golubovskaya VM, Figel S, Ho BT, Johnson CP, Yemma M, Huang G, Zheng M, Nyberg C, Magis A, Ostrov DA, Gelman IH, Cance WG. A small molecule focal adhesion kinase (FAK) inhibitor, targeting Y397 site: 1-(2-hydroxyethyl)-3, 5, 7- triaza-1-azoniatricyclo [3.3.1.1 (3,7)]decane; bromide effectively inhibits FAK autophosphorylation activity and decreases cancer cell viability, clonogenicity and tumor growth *in vivo*. *Carcinogenesis.*, 33(5):1004-13 (2012)
- Haglund C, Aleskog A, Nygren P, Gullbo J, Höglund M, Wickström M, Larsson R, Lindhagen E. *In vitro* evaluation of clinical activity and toxicity of anticancer drugs using tumor cells from patients and cells representing normal tissues. *Cancer Chemother Pharmacol*, 69(3): 697-707 (2012).

Han NM, Fleming RY, Curley SA, Gallick GE: Overexpression of focal adhesion kinase (p125FAK) in human colorectal carcinoma liver metastases: Independence from c-src or c-yes activation. *Ann Surg Oncol*, 4: 264–268 (1997).

Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100: 57–70 (2000). Heinrich M, Bremmer P. Ethnobotany and ethnopharmacology-their mode for anti-cancer drug development. *Curr Drug Targets*, 7: 239-245 (2006).

Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96(3): 736-49 (1989).

Hiroyuki H, Takashi S, Nobuyuki O, Akira Y. Inhibition of Lipid Peroxidation and Superoxide Generation by Diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Med*, 61(4): 333-336 (1995).

Hsia DA, Mitra SK, Hauck CR, Streblow DN, Nelson JA, Ilic D, Huang S, Li E, Nemerow GR, Leng J, Spencer KS, Cheres DA, Schlaepfer DD. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J Cell Biol*, 160(5): 753-767 (2003).

I-Rue Lai, Pei-Yu Chu, Hsiao-Sheng Lin, Jun-Yang Liou, Yee-Jee Jan, Jen-Chieh Lee, Tang-Long Shen. Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase at Tyr397 in Gastric Carcinomas and its Clinical Significance. *Am J Pathol*, 177(4): 1629–1637 (2010).

Itoh S, Maeda T, Shimada M, Aishima SI, Shirabe K, Tanaka S, Maehara Y. Role of expression of focal adhesion kinase in progression of hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res*, 10: 2812-2817 (2004).

Ji HF, Li XJ, Zhang HY. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia?. *EMBO Report* 10(3): 194-200 (2009).

Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H, Wilson L. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res*, 56: 816-825 (1996).

Karginov AV, Tsygankov D, Berginski M, Chu PH, Trudeau ED, Y JJ i, Gomez S, Elston TC, Hahn KM. Dissecting motility signaling through activation of specific Src- effector complexes. *Nature Chem Biol*, 10: 286-290 (2014).

Kahana O, Micksche M, Witz IP, Yron I. The focal adhesion kinase (P125FAK) is constitutively active in human malignant melanoma. *Oncogene*, 21(25): 3969-3977 (2002).

Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, 5: 749–759 (2005).

Kerlikowske K, Molinaro AM, Gauthier ML, Berman HK, Waldman F, Bennington J. Biomarker expression and risk of subsequent tumors after initial ductal carcinoma in situ diagnosis. *J Natl Cancer Inst*, 102: 627-637 (2010).

Kliebenstein DJ. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. *Plant Cell and Environment*, 27 (6): 675-684 (2004).

Kohene CH, Dubois RN. COX-2 inhibition and colorectal cancer. *Semin Oncol.*, 7: 12-21 (2004).

Kornberg L, Earp HS, Parsons JT, Schaller M, Juliano RL. Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *Journal*

Biology Chemistry, 267 (23): 439-442 (1992).

Kumar P. Valuation of medicinal plants for pharmaceutical uses. Curr. Science, 86(7): 930-937 (2004).

Lambert JD, Hong J, Yang G, Liao J, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. Am J Clin Nutr 81: 284-291 (2005).

Larsen M. Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration Nature Reviews Mol Cell Biol, 4: 700-711 (2003).

Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. Cell, 84: 359-369 (1996).

Lechertier T, Hodivala-Dilke K. Focal adhesion kinase and tumour angiogenesis. J Pathol, 226: 404-412 (2012)

Lemonica IP, Demasceno DC, Di-Stasi L.C. 1996. Study of the embryonic effects of an extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Braz J Med Biol Res, 29: 223-227 (1996).

Liao Z, Manson KA, Milas A. Ciclo-oxigenasa-2 and its inhibition of cancer: is there a role?. Drug, 67: 821-845 (2007).

Lin JK. Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible action mechanisms of cancer chemoprevention by Curcumin. Arch Pharm Res 27: 683-92 (2004).

Lochter A, Srebrow A, Sympton CJ, Terracio N, Werb Z, Bissell MJ. J Biol. Chem., 272: 5007-5015 (1997).

López-Otín C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. J Biol Chem, 283: 31433-31437 (2008).

López-Otín C, Matrisian L. Emerging roles of proteases in tumor progression. Nature Rev Cancer, 7: 800-808 (2007).

López Parra M. Cyclooxygenase-1 derived prostaglandins are involved in the maintenance of renal function in rats with cirrhosis and ascites. British Journal of Pharmacology, 135: 891-900 (2002).

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. Nature, 454: 436-444 (2008).

Mantovani A. Cancer: Inflaming metastasis. Nature, 457: 36-37 (2009).

Margolis RL, Wilson L. Addition of colchicine-tubulin complex to microtubule ends: the mechanism of substoichiometric colchicine poisoning. Proc Natl Acad Sci USA, 74: 3466-3470 (1977).

Mata-Greenwood E, Ito A, Westenburg H, Cui B, Mehta RG, Kinghorn AD, Pezzuto JM. Discovery of novel inducers of cellular differentiation using HL-60 promyelocytic cells. Anticancer Res 21: 1763-1770 (2001).

McCullough M L, Patel AV, Kushi LH, Patel R, Willett WC, Doyle C. Following cancer prevention guidelines reduces risk of cancer, cardiovascular disease and all-cause mortality. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention, 20(6): 1089-1097 (2011).

McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton V, Frame MC. The role of focal-adhesion kinase in cancer- a new therapeutic opportunity. *Nature Review Cancer*, 5: 505-515 (2005).

Mengoni ES, Vichera G, Rigano LA, Rodriguez Puebla ML, Galliano SR, Cafferata EE, Pivetta OH, Moreno S, Vojnov AA. Suppression of COX-2, IL-1 β and TNF- α expression and leukocyte infiltration in inflamed skin by bioactive compounds from *Rosmarinus officinalis* L. *Fitoterapia*, 8: 414-421 (2011).

Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med*, 352(5): 476-487 (2005).

Moreno S, Scheyer T, Romano C, Vojnov A. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Argentinean *Rosmarinus officinalis* L Extracts. *Free Radical Res*, 40: 223-231 (2006).

Munné-Bosch S, Alegre L. Subcellular Compartmentation of the Diterpene Carnosic Acid and Its Derivatives in the Leaves of Rosemary. *Plant Physiology*, 125(2): 1094-1102 (2001).

Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD. Herbal Medicines. A Guide For Health-Care Professionals. The Pharmaceutical Press, London (1996).

Oh J, Yu T, Choi S, Yang Y, Baek H, An S, Kwon L, Kim J, Rho H, Shin S, Choi W, Hong S, Cho J. Syk/Src Pathway-Targeted Inhibition of skin inflammatory responses by carnosic acid. *Mediators Inflamm*, 2012:781375 (2012).

Oshima M, Murai N, Kargman S. Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apcdelta716 mouse by Rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res*, 61: 1733-1740 (2001).

Overall CM, López-Otín C. Strategies for MMP inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*, 2: 657-672 (2002).

OMS (Organización Mundial de la Salud), Cáncer. Nota descriptiva N° 297 (2014). Park Y, Hunter DJ, Spiegelman D, Bergkvist L, Berrino F, Van den Brandt PA. Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: A pooled analysis of prospective cohort studies. *JAMA*, 294: 2849-2857 (2005).

Parmar J, Sharma P, Verma P, Sharma P, Goyal PK. Anti-tumor and Anti-oxidative Activity of *Rosmarinus officinalis* in 7, 12 Dimethyl Benz(a) Anthracene Induced Skin Carcinogenesis in Mice *Am. J Biomed Sci*, 3(3): 199-209 (2011).

Peng CH, Su JD, Chyau CC, Sung TY, Ho SS, Peng CC, Peng RY. Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71(9): 2223-2232 (2007).

Pesakhov S, Khanin M, Studzinski GP, Danilenko M. Distinct combinatorial effects of the plant polyphenols curcumin, carnosic acid and silibinin on proliferation and apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Nutr. Cancer*, 62: 811–824 (2010).

Pinheiro RM, Calixto JB. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. *Inflammation Research*, 51 (12): 603-610 (2002).

Poeckel D, Greiner C, Verhoff M, Rau O, Tausch L, Hörnig C, Steinhilber D, Schubert-Zsilavecz M, Werz O. Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5- lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Phar*, 76(1): 91-97 (2008).

Radhakrishnan VM, Kojs P, Young G, Ramalingam R, et al. pTyr421 Cortactin is overexpressed in Colon Cancer and is dephosphorylated by Curcumin: Involvement of non-Receptor type 1 Protein Tyrosine Phosphatase (PTPN1). PLoS ONE 9(1): e85796. doi:10.1371/journal.pone.0085796 (2014).

Raymond N, DuBoi RN. Cyclooxygenase-2 and Colorectal Cancer. Prog Exp Tum Res, 37: 124–137 (2003).

Ricchi P, Zarrilli R, Di Palma A, Acquaviva AM. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer: from prevention to therapy. Br J Cancer., 88(6): 803-807 (2003).

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. Science, 302:1704-1709 (2003).

Roycik MD, Fang X, Sang OX. A fresh prospect of extracellular matrix hydrolytic enzymes and their substrates. Current Pharmaceutical Desing, 15 (12): 1295-1308 (2009).

Russo A, Lombardo L, Troncoso N, Garbarino J, Cardile V. *Rosmarinus Officinalis* extract inhibits human melanoma cell growth. Nat Prod Commun, 4(12): 1707-1710 (2009).

Sabichi AL, Lippman SM. COX-2 inhibitors and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs in genitourinary cancer. Semin Oncol, 2 (7): 36-44 (2004).

Sastry SK, Horwitz AF. Integrin cytoplasmic domains mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. Current Opinion in Cell Biology, 5: 819-831 (1993).

Satyajit K. Mitra SK, Hanson DA., Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. Nature RevMol Cell Biol, 6: 56-68 (2005).

Siddiqui IA, Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. Prevention of prostate cancer through custom tailoring of chemopreventive regimen. Chemistry Biology Interact A, 171: 122-132 (2008).

Schaller M D. FAK and paxillin regulators of N-cadherin adhesion and inhibitors of cell migration?. The Journal of Cell Biology, 166(2): 157-159 (2004).

Schottenfeld D, Beebe-Dimmer J. Chronic Inflammation: A common and Important Factor in the Pathogenesis of Neoplasia. CA Cancer J Clin, 56: 69-83 (2006).

Sharabani H, Izumchenko E, Wang Q, Kreinin R, Steiner M, Barvish Z, Kafka M, Sharoni Y, Levy J, Uskokovic M., Studzinski G, Danilenko M. Cooperative antitumor effects of vitamin D3 derivatives and rosemary preparations in a mouse model of myeloid leukemia. Int J Cancer, 118 (12): 3012–3021 (2006).

Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. Oncology, 16(2): 217-226 (2002).

Slack-Davis JK, et al. Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor. J Biol Chem, 282: 14845–14852 (2007).

Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. Annu Rev Biochem, 69: 145-182 (2000).

Sporn M, Suh N. Chemoprevention: An essential approach to controlling cancer. Nature Reviews Cancer, 2(7): 537-543. (2002).

Steiner M, Priel I, Giat J, Levy J, Sharoni Y, Danilenko M. Carnosic acid Inhibits proliferation and augments differentiation of human leukemic cells induced by 1,25- dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Nutr Cancer*, 41: 135-144 (2001).

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 463-516 (2001).

Steven N, Vita H, Golubovskaya M. FAK as a target for cancer therapy. *Gene Ther Mol Biol*, 13: 26-35 (2009).

Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Frontiers in Bioscience*, 10: 1881-1896 (2005).

Surh Y. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature*, 3: 768-780 (2003).

Sutcliffe P, Connock M, Gurung T, Freeman K, Johnson S, Kandala NB, Grove A, Gurung B, Morrow S, Clarke A. Aspirin for prophylactic use in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: a systematic review and overview of reviews. *Health Technol Assess*, 17(43): 1-253 (2013a).

Sutcliffe P, Connock M, Gurung T, Freeman K, Johnson S, Ngianga-Bakwin K, Grove A, Gurung B, Morrow S, Stranges S, Clarke A. Aspirin in primary prevention of cardiovascular disease and cancer: a systematic review of the balance of evidence from reviews of randomized trials. *PLoS One.*, 8(12) e81970 (2013b).

Taiz L, Zeiger E. Secondary metabolites and plant defense. In *Plant Physiology*, Chapter 13 (2002).

Tanabe T, Tohnai N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 68(69): 95–114 (2002).

Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138 (6): 2101-2114 (2010).

Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, Flanders WD, Heath CW. Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res* 53: 1322–1327 (1993).

Visanji JM, Thompson DG, Padfield PJ. Induction of G2/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels. *Cancer Lett*, 237: 130-136 (2006).

Volk T, Geiger B, Raz A. Motility and adhesive properties of high- and low- metastatic murine neoplastic cells. *Cancer Res.*, 44 (2): 811-24 (1984).

Wang Y, McNiven MA. Invasive matrix degradation at focal adhesions occurs via protease recruitment by a FAK–p130Cas complex. *J Cell Biol*, 196: 375–385 (2012).
Internacional para Cáncer Digestivo: Tamizaje del cáncer colorrectal, 2007. Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis. *Cancer*, 80: 1529-1537 (1997).

Xianmin Bu, Chenghai Z, Xianwei D. Involvement of COX-2/PGE2. Pathway in the Upregulation of MMP-9 Expression in Pancreatic Cancer. *Gastroenterol Res Pract*, 2011:214269 (2011).

Xiao H, Verdier-Pinard P, Fernandez-Fuentes N, Burd B, Angeletti R, Fiser A, Horwitz SB, Orr GA. Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(27): 10166-10173 (2006).

Xiao-Ning Y. Reversion of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human leukemic cell line by carnosic acid. *Chin J of Physiology*, 51(6): 348-356 (2008).

Ya-Mei Y, Chin-Huei L, Hsu-Chin C, Hong-Der T. Carnosic acid reduces cytokine- induced adhesion molecules expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *European Journal of Nutrition*, 48(2): 101-106 (2009).

Yan C, Boyd DD. Metalloproteinase gene expression. *J. Cell Physiol*, 211: 19-26 (2007).

Ying L, Marino J, Hussain SP, Khan MA, You S, Hofseth AB. Chronic inflammation promotes retinoblastoma protein hyperphosphorylation and E2F1 activation. *Cancer Res*, 65: 9132-9136 (2005).

Yu HG, Tong SL, Ding YM, Ding J, Fang XM, Zhang XF, Liu ZJ, Zhou YH, Liu QS, Luo HS, Yu JP. Enhanced expression of cholecystokinin-2 receptor promotes the progression of colon cancer through activation of focal adhesion kinase. *Int J Cancer*, 119: 2724-2732 (2006).

Yu YM, Lin HC, Chang WC. Carnosic acid prevents the migration of human aortic smooth muscle cells by inhibiting the activation and expression of matrix metalloproteinase-9. *British J of Nut*, 100: 731-7388 (2008).

Zbinden G. Predictive value of animal studies in toxicology. *Regulat Toxicol Pharmacol*, 14: 167-177 (1991).

Zhen MC, Huang XH, Wang Q, Sun K, Liu YJ, Li W, Zhang LJ, Cao LQ, Chen XL. Green tea polyphenol epigallocatechin-3- gallate suppresses rat hepatic stellate cell invasion by inhibition of MMP-2 expression and its activation. *Acta Pharmacol Sin*, 27: 1600-1607 (2006).

10. Agradecimientos

A Silvia por darme un lugar tan grande dentro del laboratorio de Bioquímica Vegetal, porque luego de tantos años compartidos pudimos entablar esa confianza para trabajar.

A mis compañeros de laboratorio:

A Vicky por su dedicación y buena predisposición para enseñarme, y por compartir charlas rodeadas de mates y galletitas.

A Vera por sus locuras y su buena onda.

A Adri por el compañerismo y por las charlas desesperadas que compartimos. A Maurito por su genial humildad y buena onda.

Al Dr. Miguel A. Iñiguez del Centro de Biología Molecular Severo Ochea, España, por haberme cedido gentilmente los plásmidos para los ensayos de transfección de la tesis.

Al Dr. Eduardo Cafferata, por su buena predisposición y voluntad para enseñarme y ayudarme con técnicas y experimentos.

Al Dr. Osvaldo Rey, por su gran colaboración en los resultados de la tesis.

A Miriam Diamant, Directora del Bioterio del Instituto de Oncología Angel H. Roffo por su colaboración en los ensayo *in vivo*.

A Jopi y a Lydia Puricceli del Instituto de Oncología Angel H. Roffo, porque fueron muy importantes para el desarrollo de mí tesis.

A los compañeros del Leloir:

A las Natis y a Sabri, por los mates y cafés compartidos con esas charlas que no quería que se terminen.

A Gaby por compartir mates mañaneros, consejos y charlas de madre. A mi amiga Gise, por haberme bancado en las buenas y en las malas.

A mis amigas de la vida: Ceci, Lau, Mari, Bele y Pao por escucharme y quererme.

A Mabel y Jorge, mis padres, por quererme y apoyar incondicionalmente mis elecciones.

A Fede y Tincho por ser mis hermanos y amigos. A mis cuñas: Naty y Flo, por estar, a Ceci por ser mí amiga y por llevarme al Instituto, todas las mañanas, con la panzota.

A mis abuelos Héctor y Nélica y a los del cielo Tata y Doly, por cuidarme. A Lety y Carlos por estar siempre.

A mi amor, Nacho por ser mi sostén y mi compañero de la vida. Y a Jazmín, mi princesita hermosa, por darme fuerzas para hacer todo lo que hago.

Para citar este documento

María Verónica Barni. (2015). Acción antitumoral del ácido carnósico, sobre células humanas de cáncer colorrectal. (Tesis de posgrado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina: Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto. Disponible en: <http://ridaa.demo.unq.edu.ar>