



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Análisis de los cambios en la  
expresión génica inducidos por el  
tratamiento con pseudoterosina en la  
línea celular de cáncer de mama  
MDA-MB231**

**HELBERT DAVID SIABATTO FERNÁNDEZ**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencia, Departamento de Farmacia  
Bogotá, Colombia  
2015



# **Análisis de los cambios en la expresión génica inducidos por el tratamiento con pseudoterosina en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB231**

**HELBERT DAVID SIABATTO FERNÁNDEZ**

Tesis de investigación presentada como requisito para optar al título de:  
**Magister en Ciencias Farmacología**

Director:  
Ph.D., Q. F. Dr. Fabio A. Aristizábal G.

Línea de Investigación:  
Búsqueda y Caracterización de productos anticáncer  
Grupo de Investigación:  
Farmacogenética del Cáncer

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá, Colombia  
2015



*A mis padres Dora Inés Fernández Pérez y  
Jaime Siabatto S., y a mis anhelos, desde el  
corazón, para ti Sarita Valentina.*



## Agradecimientos

Este trabajo contó con la colaboración de personas e instituciones a quienes quiero hacer explícito mis más sinceros agradecimientos.

A Colciencias, a la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Departamento de Farmacia y Departamento de Química. Entidades e instituciones financiadoras del presente trabajo de investigación que hace parte del proyecto “Estudio de bioprospección del coral blando *Pseudopterogorgia elisabethae*”.

Al Dr. Fabio Aristizábal, profesor del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, por permitirme pertenecer en su grupo de investigación y brindarme su apoyo y colaboración como director en la realización de este trabajo.

A la Dra. Carmenza Duque y a su grupo de Investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia” de la Universidad Nacional de Colombia, pioneros en la investigación química y de la actividad biológica de la especie *Pseudopterogorgia elisabethae*, y a sus investigaciones “nuestro punto de partida”.

Al magister Guillermo Torres, por su amable colaboración con el manejo e interpretación de los perfiles de expresión, así como el uso de diferentes herramientas bioinformáticas empleadas en este trabajo.

Al Dr. Esteban Gómez, a la bióloga MsC. Ángela María Hernández y a la Dra. Claudia Cordero, por las correcciones del presente escrito. También agradezco los aportes de la bióloga y magister Martha Parada por el manejo de algunos datos estadísticos.

A los compañeros de Investigación del Grupo de Farmacogenética del Cáncer del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. A mis compañeros de maestría y en especial a mi amigo Pedro Rodríguez por animarme en la aventura de la farmacología.

Al Dios de la vida por nuestra existencia; a mis padres por ser en todo momento mi soporte, ejemplo y constante apoyo.

A toda mi familia, por llenarme de amor, optimismo y alegría cuando mi ánimo parece desvanecer. A mi corazón Jully, a mis hermanos y por supuesto a esas princesas hermosas que dependen de nuestro ejemplo: Sarita Valentina, Ana Sofía y Sandrita bebé.





## Resumen

De acuerdo a cifras publicadas por la Organización Mundial de la Salud, el cáncer de mama es una de las patologías con mayor porcentaje de mortalidad e incidencia en las mujeres, y en este sentido es necesario el desarrollo de nuevas alternativas para su tratamiento (Saucedo, 2013). Hoy en día están en uso clínico al menos 121 fármacos antineoplásicos que no cubren todas las necesidades de tratamiento, y es pertinente continuar investigando nuevas moléculas activas que presenten mayor efectividad y selectividad, y menor toxicidad y susceptibilidad a la generación de resistencia por parte de las células tumorales. (Gibbs, 2000; Sausville y Johnson, 2000; Newman y Cragg, 2007; Cordero, 2008; Escobar, 2011).

Para alcanzar este objetivo se deben buscar compuestos activos que presenten nuevos mecanismos de acción, ya que la mayoría de los antineoplásicos de uso clínico están diseñados para afectar la maquinaria de replicación celular, esta teoría se basa en que las células tumorales por su rápida proliferación son más sensibles a los agentes citotóxicos que las células normales. (Marchini *et al.*, 2005).

El descubrimiento de la selectividad y actividad terapéutica potencial de las moléculas *pseudopterosinas* aisladas del octocoral *Antiollogorgia elisabethae*, (Williams y Chen, 2012) y el alto grado de variación química de las especies colectadas a diferentes localizaciones de la región Caribe, han motivado a muchos autores para continuar el estudio de estos productos (Correa *et al.*, 2011); especialmente en este trabajo se estudió el compuesto *Pseudopterosina Q*, con promisoría actividad anticancerígena, contribuyendo al estudio de su mecanismo de acción *in vitro*. Utilizando un microarreglo de expresión en genes humanos, que emplea la tecnología Agilent de dos colores (Agilent SurePrint G3 Humano Gene Expression 8x60K Microarray GE V2), se generó información sobre las diferentes dianas en las que actúa este compuesto, permitiendo un

acercamiento al análisis de las posibles rutas moleculares principalmente impactadas sobre la línea celular MDA-MB231 al ser tratadas con el compuesto.

Se hibridó bajo dos condiciones: una con exposición de las células MDA-MB231 al tratamiento y otra sin exposición, empleando un chip con 8 arreglos que constan de 4 réplicas biológicas, cada una con 2 réplicas técnicas. Se utilizó la plataforma Bioconductor y el lenguaje de programación estadística R. El resultado fue de 3.400 genes impactados por la actividad citotóxica del compuesto; concluimos que todos los mecanismos de protección celular en respuesta al estrés generado por PsQ, se relacionan con supervivencia, diferenciación, crecimiento, movilidad, migración celular y represión del proceso apoptótico. No se soportan evidencias de repuesta temprana pero si evidencias de muerte celular por procesos de necrosis.

**PALABRAS CLAVE:** Pseudopterosina, microarreglo, análisis expresión diferencial, cáncer de mama, estudio *in vitro*.

## Abstract

According to published by the World Health Organization, breast cancer is one of the diseases of highest mortality and incidence in women, so it is necessary the development of new treatments research (Saucedo, 2013). Today are in clinical use at least 121 cancer drugs, that not cover all the needs of treatment, which is necessary to continue research into the development of new active molecules with greater effectiveness, lower toxicity, greater selectivity and reduced susceptibility to the generation of resistance by tumor cells. (Gibbs, 2000; Sausville y Johnson, 2000; Newman y Cragg, 2007; Cordero, 2008; Escobar, 2011).

To get this goal it should search active compounds with novel mechanisms of action, since most antineoplastic clinical use are designed to affect the cellular replication machinery, this theory is based on the tumor cells by their rapid proliferation are more sensitive to cytotoxic agents than normal cells (Marchini *et al.*, 2005).

The discovery of the selectivity and potential therapeutic activity of molecules pseudopterosins isolated from the octocoral *Antiollogorgia elisabethae*, (Williams y Chen, 2012) and the high degree of chemical variation of species collected at different locations over Caribbean region, have led many authors to continue the study of these products (Correa *et al.*, 2011). In this work, Pseudopterosin Q compound, with promising anticancer activity, contributing to the study of its mechanism of action *in vitro*. Using a human gene expression microarray employing the Agilent technology two-color (Agilent SurePrint G3 Humano Gene Expression 8x60K Microarray GE V2), generate information on different targets in which this compound acts, allowing closer analysis of possible molecular pathways impacted mainly on the cell line MDA- MB231.

The samples was hybridized under two conditions: first, with exposure of MDA-MB231 cells without treatment and another exposure using a chip with eight arrays consisting of four biological replicates, each with 2 technical replicates. The Bioconductor plataform and statistical programming language R. The result was used 3,400 genes impacted by the cytotoxic activity of the compound; conclude that all cellular protection mechanisms in response to stress generated PSQ are related to survival, differentiation, growth, motility, cell migration and suppression of apoptosis. No evidence of early response but with evidence of cell death by necrosis processes supported.

**KEYWORDS:** *Pseudopterosin, microarray, differential expression analysis, breast cancer, in vitro study.*



# Contenido

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>IX</b>
<b>CONTENIDO</b> .....	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>XV</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>XVI</b>
<b>LISTA DE GRÁFICAS</b> .....	<b>XVII</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Estado del arte</b> .....	<b>3</b>
1.1 Pseudopterosinas: compuestos de origen marino.....	3
1.2 Cáncer de mama .....	5
1.2.1 Principales mutaciones génicas relacionadas con cáncer de mama .....	7
1.2.2 Líneas celulares empleadas como modelos in-vitro en el estudio del cáncer de mama .....	8
1.3 Análisis molecular del cáncer de mama .....	9
1.4 Microarreglos de expresión génica .....	10
1.5 Ontologías génicas (GO) .....	11
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>155</b>
2.1 Objetivo general .....	15
2.2 Objetivos específicos .....	15
<b>3. Metodología</b> .....	<b>17</b>
3.1. Líneas celulares y cultivos celulares expuestos a PsQ.....	17
3.2. Ensayo de citotoxicidad .....	17
3.3. Extracción de ARN y Ensayo de expresión .....	19
3.4 Ensayos de Microarreglos y Análisis de Datos .....	21
<b>4. Resultados y discusión</b> .....	<b>24</b>
4.1 Análisis de Microarreglos de Expresión Diferencial .....	27
4.2 Implicaciones Actividad Funcional Biológica de PsQ .....	28
4.2.1 Estudio de enriquecimiento GO .....	28

---

<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>36</b>
<b>6. Bibliografía .....</b>	<b>37</b>
<b>A. ANEXO:</b> Disposición de muestras cDNA en cada uno de los 8 arreglos del slide o porta.....	45
<b>B. ANEXO:</b> Gráfica de valores de intensidad verde y roja, previo a la corrección de ruido de fondo ("background.....	46
<b>C. ANEXO:</b> Gráfica Buena calidad de los datos, reproducibilidad estadística microarreglo de expresión génica Agilent.....	48

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-1:</b> Estructura química de pseudopterosina Q (PsQ).....	3
<b>Figura 1-2:</b> Incidencia del cáncer de mama en el mundo. ....	6
<b>Figura 1-3:</b> Estimaciones de tasas de incidencia y mortalidad en cáncer de mama estandarizadas por edad; datos diferentes poblaciones en el mundo en 2008.....	7
<b>Figura 3-1:</b> Determinación de la actividad citotóxica, Concentraciones Letales CL de PsQ sobre un panel de líneas celulares.....	19
<b>Figura 3-2:</b> Diseño experimental del ensayo de expresión.....	20
<b>Figura 3-3:</b> Identificación de genes diferenciales y su implicación biológica.....	23

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 3-1.</b> Evaluación de pureza ARN arrojados por el NanoDrop.....	21
<b>Tabla 4-1:</b> Medidas de la actividad citotóxica para cada línea celular a través de la concentración letal (CL) CL30, CL50 y CL70, concentración de PsQ ( $\mu\text{M}$ ) necesaria para reducir la población celular en un 30%, 50% y 70% respecto a las células control no tratadas.....	24



## Lista de gráficas

	Pág.
<b>Gráfica 1-5.</b> Representación esquemática de dos grafos A y B.....	12
<b>Gráfica 4-1.</b> Diferencias significativas entre concentraciones CL30, CL50 y CL70.....	25
<b>Gráfica 4 - 2.</b> Diferencias entre líneas celulares para elección MDA-MB231..	26
<b>Gráfica 4 - 3.</b> Porcentaje genes impactados por el compuesto de origen marino.....	28
<b>Gráfica 4 - 4.</b> Agrupación de genes con expresión diferencialmente alta o baja con respecto al control, en función de su actividad biológica en su Ontología (GO) con un rol clave en procesos biológicos.....	29



# Introducción

Los productos naturales marinos han tenido en los últimos 40 años un papel muy importante en el descubrimiento de sustancias con nuevas estructuras químicas, la mayoría de las veces sin homóloga en organismos o individuos terrestres, las cuales se han convertido en prototipos para el desarrollo de nuevos medicamentos o son sustancias importantes para otros fines industriales (Stonik, 2009; Rastogi *et al.*, 2010; Correa *et al.*, 2012)

El descubrimiento de la selectividad y actividad terapéutica potencial de las moléculas Pseudopterosinas aisladas del octocoral *Pseudopteroorgia elisabethae* (especie inicialmente identificada por Bayer en 1961 y actualmente descrita como *Antiollogorgia elisabethae* (Williams & Chen, 2012) y el alto grado de variación química de las especies colectadas en diferentes localizaciones de la región Caribe, han motivado a continuar el estudio de estos productos. (Puyana *et al.*, 2004; Correa *et al.*, 2011)

En Colombia el grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia” de la Universidad Nacional de Colombia, ha sido el pionero en la investigación química y de la actividad biológica de la especie *Antiollogorgia elisabethae*, que crece en el archipiélago de San Andrés y Providencia. El interés de la comunidad científica en *A. elisabethae* se debe al gran número de metabolitos encontrados en esta especie con actividad biológica anticáncer, antiinflamatoria, antiplasmódica, antimicrobiana, antiviral, antimalárica, antioxidante y analgésica. (Rodríguez *et al.*, 2004; Simmons *et al.*, 2005; Stonik, 2009; Correa *et al.*, 2012; McCulloch *et al.*, 2012; Williams y Chen, 2012)

El Grupo de Farmacogenética del Cáncer (FGC) del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, en colaboración con diferentes grupos de investigación, ha desarrollado un proceso continuo de evaluación de la actividad

biológica *in vitro* de productos de origen natural, encaminada a la selección de moléculas puras de pseudopterosinas y seco- pseudopterosinas, con potencial actividad anticáncer, susceptibles de ser desarrollados como nuevos fármacos.

Las pseudopterosinas presentan características farmacológicas importantes (Rodríguez *et al.*, 2004) entre las que se cuenta significativa actividad citotóxica (Correa *et al.*, 2012), de las cuales la más interesante son aquellas clasificadas como pseudopterosina Q dado que ha presentado mayor citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano (Correa *et al.*, 2011).

A partir de estos estudios conjuntos, se ha seleccionado la pseudopterosinas Q que presenta actividad potente y selectiva sobre las líneas celulares, en consecuencia el presente estudio realizó ensayos de actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer, siendo MDA-MB231, la que presentó mayor sensibilidad a la actividad citotóxica; línea celular derivada de tumores de glándula mamaria humana.

Se calculó la actividad citotóxica, la concentración y el tiempo de exposición de la Pseudopterosina Q (PsQ). Posteriormente, con el ánimo de dilucidar los mecanismos moleculares de respuesta celular al tratamiento con PsQ, se utilizó y analizó un microarreglo de expresión el cual proporcionó la información sobre los genes expresados diferencialmente entre células tratadas y no tratadas con PsQ, considerados como los responsables presumiblemente de la respuesta inhibitoria de crecimiento e inducción de muerte celular, que son indicativos *in vitro* de actividad anticáncer en la línea celular MDA-MB231.

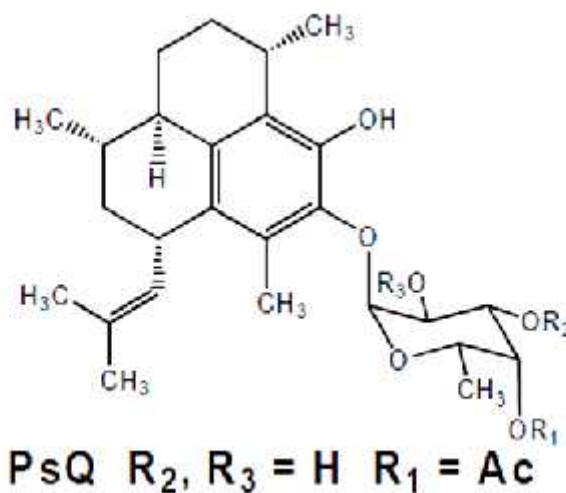
Los resultados del análisis diferencial de los perfiles de expresión molecular a nivel transcriptómico, se analizaron desde una perspectiva de biología de sistemas, lo que permitió explicar la actividad funcional génica y las principales rutas metabólicas implicadas con la actividad citotóxica de PsQ sobre las células MDA-MB231.

# 1. Estado del arte

## 1.1 Pseudopterosinas: Compuestos de origen marino

Pseudopterosinas (Ps), son una familia de estructuras químicas caracterizadas por sus diterpenos glicosidados tipo amflectano, se diferencian principalmente entre ellas en la posición de la glicosidación (C-9 ó C-10), el azúcar (generalmente con D-xilosa, D-arabinosa y L-fucosa) y en la posición del sustituyente acetilo en el azúcar, cuando este existe, así como también en la estereoquímica de la aglicona. (Pereira *et al.*, 2009) (Ver Figura 1-1).

**Figura1-1:** Estructura química de pseudopterosina Q (PsQ) Tomada de Duque *et al.*, 2004.



Look *et al.*, (1986); Roussis *et al.*, (1990); Ata *et al.*, (2003); Ata *et al.*, (2004); Duque *et al.*, (2004); Puyana *et al.*, (2004); Rodríguez *et al.*, (2004); Hoarau *et al.*, (2008) publicaron estudios sobre alrededor de 30 pseudopterosinas (PsA-Y, iso-PsE, 2-O-acetil-PsQ, 3-O-

acetil-PsQ, 2-O-acetil-PsU y 2-O-acetil-PsQ). Algunas de ellas han sido aisladas a partir de muestras recolectadas en las Bahamas, Bermudas, cayos de la Florida y en las islas colombianas de San Andrés y Providencia (Correa *et al.*, 2012).

Diferentes miembros de la familia de pseudopterosinas han sido aisladas de *A. elisabethae*, recolectada en distintas locaciones geográficas. Así, por ejemplo, las PsA-D, PsK, PsL, PsX y PsY fueron identificadas en ejemplares recolectados en las Islas Bahamas (Look *et al.*, 1986; Roussis *et al.*, 1990; Ata *et al.*, 2004), las PsE-J fueron aisladas de ejemplares recolectados en la Isla Bermuda (Roussis *et al.*, 1990) y las PsM-O aisladas de especímenes de cayos de la Florida (Ata *et al.*, 2003). Las pseudopterosinas reportadas más recientemente en la literatura, las PsP-W, y las 3'-O-acetil-PsQ, 2'-O-acetil-PsQ, 3'-O-acetil-PsU y 2'-O-acetil-PsU, fueron aisladas de especímenes de la Isla Providencia (Duque *et al.*, 2004; Puyana *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2004; Pereira, Guhl y Duque, 2009).

Ebada y Proksch (2011) reportaron que las pseudopterosinas tienen características farmacológicas importantes que constituye un recurso significativo de metabolitos secundarios farmacológicamente activos, demostradas a través de pruebas *in vitro* e *in vivo* determinando que estos compuestos son más eficaces que algunos de los fármacos antiinflamatorios comercialmente empleados.

El principal mecanismo de acción estudiado hasta el momento que sugiere la alta actividad antiinflamatoria en la mayoría de los 30 miembros que hacen parte de la familia de pseudopterosinas, se debe presumiblemente a que bloquean la liberación de eicosanoides sin interrumpir la biosíntesis (Rodríguez *et al.*, 2004); sin embargo y respecto a su actividad anticáncer, hasta el momento no se ha determinado mecanismos de acción relacionados; sin embargo se sabe que las moléculas antitumorales aisladas suelen ser productos naturales nuevos que se extienden en un amplio margen de tipos estructurales y se definen como aquellas moléculas capaces de interferir en el proceso de desarrollo de ciertos tumores malignos (cáncer) y por lo tanto presentan la posibilidad de ser administrados para combatirlo (Espinoza, 2011).

A pesar de todo el trabajo publicado, a las pseudopterosinas PsP-V PsK, descubiertas por primera vez por Duque *et al.*, (2004), no se les ha determinado su mecanismo de

---

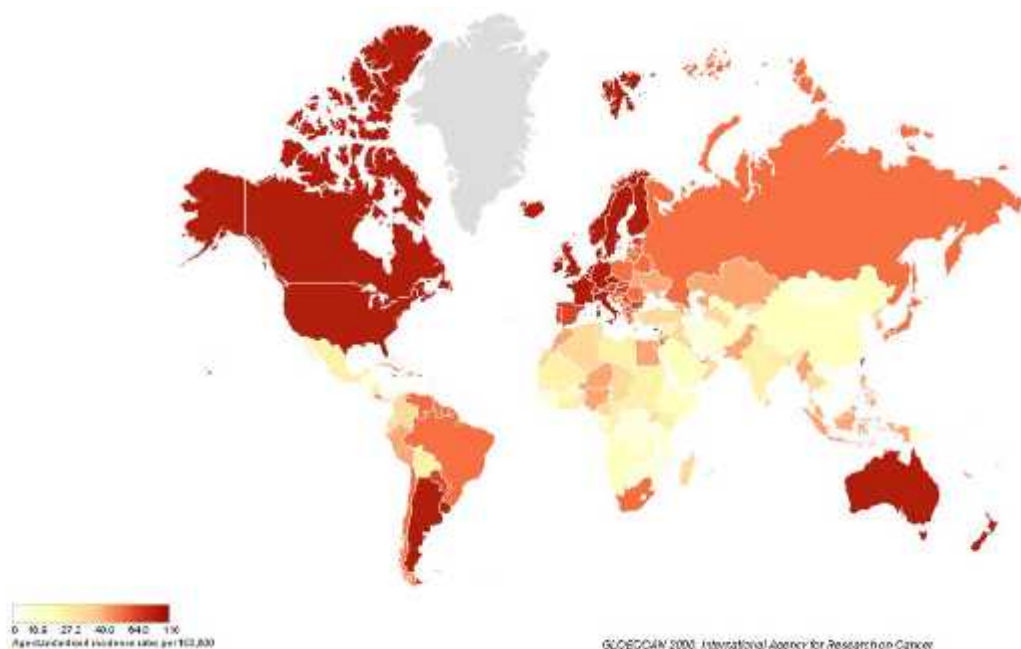
acción biológica que explique la actividad citotóxica. Correa *et al.*, (2012) demostró actividad citotóxica contra líneas celulares de humanos, entre las que se cuenta el perfil citotóxico más completo en: HeLa (cáncer cervical), PC-3 (cáncer de próstata), HCT116 (cáncer colorectal), MCF-7 y BJ (fibroblastos normales de piel) donde PsQ y PsG fueron los compuestos más activos (GI<sub>50</sub> 5.8  $\mu$ M) presentaron una citotoxicidad moderada no selectiva. Adicionalmente en trabajos realizados por GFC se determinó una mayor actividad citotóxica de PsQ en la línea de cáncer de mama MDA-MB231.

## 1.2 Cáncer de mama

Algunos autores definen el cáncer como el resultado de la proliferación de células que han adquirido capacidades de auto-suficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales de inhibición de crecimiento, evasión de apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, pérdida de comunicación intercelular y capacidad de invasión a otros tejidos ó metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011). Estos cambios en la fisiología celular resultan, en su mayoría, de la acumulación de mutaciones en genes regulatorios de proliferación celular y efectos epigenéticos que llevan a la pérdida del control normal de la expresión génica y finalmente de la función celular. (Escobar, 2011).

El cáncer de mama es una enfermedad compleja y heterogénea originada a partir de una proliferación anormal y desorganizada de las células que componen el tejido mamario. El cáncer de mama se clasifica de acuerdo al componente celular principalmente afectado. (Saucedo, 2013). Esta enfermedad ocurre casi por completo en las mujeres, pero los hombres también la pueden padecer. (Anderson *et al.*, 2004).

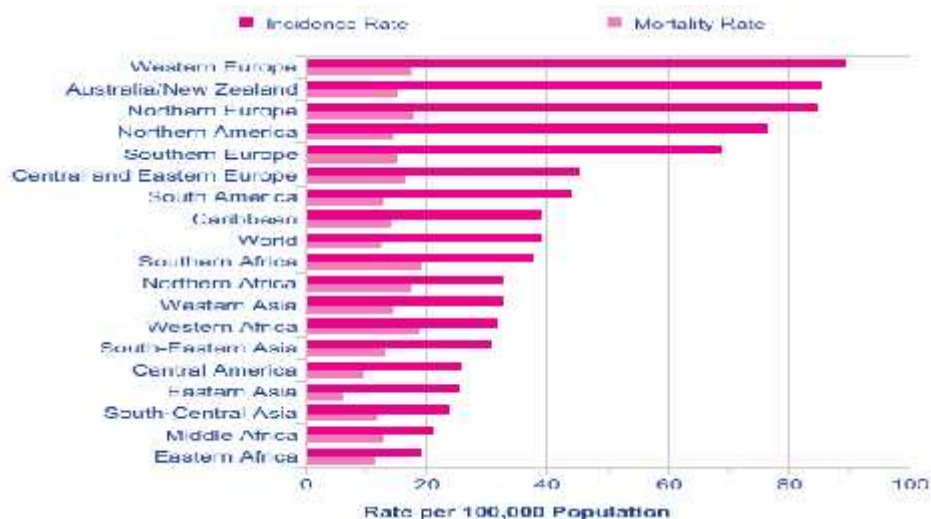
Estudios epidemiológicos muestran que éste es el más frecuente entre las mujeres. Estiman que en 2008 se diagnosticaron 1.38 millones de nuevos casos en mujeres de todo el mundo, lo que supone aproximadamente un cuarto (23%) de todos los cánceres diagnosticados en mujeres. La incidencia de cáncer de mama se ha incrementado en la mayoría de los países del mundo en las últimas décadas, denotando un rápido aumento en los países desarrollados (Saucedo, 2013). (Figura 1-2)

**Figura 1-2:** Incidencia del cáncer de mama en el mundo. Tomada de Ferlay *et al.*, 2010

Respecto a la mortalidad, el cáncer de mama es la causa de muerte más frecuente en mujeres de todo el mundo, estimándose que es la responsable de al menos 460.000 muertes en 2008. Existe variación en la mortalidad causada por cáncer de mama entre los diferentes países del mundo, principalmente debido a una mayor supervivencia en los países desarrollados (que por otro lado son los que mayor incidencia de la enfermedad presentan), con rangos que varía de los 6 casos por cada 100.000 habitantes en el oriente de Asia a los 19 por cada 100.000 en el sur y oeste de África en 2008 (Ferlay *et al.*, 2010). (Figura 1-3).



**Figura 1-3:** Estimaciones de tasas de incidencia y mortalidad en cáncer de mama estandarizadas por edad; datos diferentes poblaciones en el mundo en 2008. Tomada de Ferlay *et al.*, 2010.



### 1.2.1 Principales mutaciones génicas relacionadas con cáncer de mama

El origen del cáncer de mama se atribuye a la herencia de mutaciones en genes de susceptibilidad. Los dos genes de alta susceptibilidad al cáncer de mama identificados hasta la fecha son BRCA1 y BRCA2 que explicarían aproximadamente un 20% del cáncer familiar. (Saucedo, 2013).

El descubrimiento de estos dos genes ha permitido extender durante los últimos años el conocimiento sobre la epidemiología genética del cáncer de mama, el riesgo exacto a padecer la enfermedad, la distribución por etnias, el asesoramiento genético y las consecuencias clínicas de sus mutaciones.

Existe otro grupo de genes que confieren un riesgo moderado a padecer cáncer de mama, entre los que se encuentran CHEK2 (Meijers-Heijboer *et al.*, 2002), PALB2 (Rahman *et al.*, 2007), BRIP1. (Sharon y Shawna, 2011) o ATM (Byrd *et al.*, 2012). Este conjunto de genes explicarían alrededor de un 5% adicional del cáncer de mama hereditario.

Finalmente existen variantes frecuentes en la población que individualmente confieren bajo riesgo y que se han descrito principalmente a través de los denominados GWAS (Genome Wide Association Studies). Hasta hace unos meses se conocían 27 alelos de este tipo pero en abril de 2013 se han descrito 41 adicionales; globalmente estas variantes frecuentes de baja penetrancia explicarían hasta un 14% del riesgo familiar (Michailidou *et al.*, 2013).

El desarrollo de un cáncer *de novo* es un proceso complejo que involucra varias mutaciones y eventos epigenéticos. Hanahan y Weinberg delimitaron seis requisitos claves para el desarrollo de cáncer: "mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión del incremento de supresores, resistencia a la muerte celular, permitiendo la inmortalidad replicativa, la inducción de la angiogénesis, y la activación de la invasión y metástasis ". (Hanahan y Weinberg, 2011).

Estos atributos permiten que las células cancerosas generen sus propias señales mitogénicas, resistencia exógena e inhibición de señales de crecimiento, evasión de apoptosis, proliferación sin límites, es decir, someterse a la inmortalización, someterse a la angiogénesis y, en cánceres más avanzados, invadir y generar metástasis. (Hanahan & Weinberg, 2011).

### **1.2.2 Líneas celulares empleadas como modelos in-vitro en el estudio del cáncer de mama**

Puesto que el cáncer de mama es un conjunto heterogéneo de afecciones con diversas histopatologías, variaciones genéticas y genómicas que manifiestan diferentes resultados clínicos, el principal desafío en el avance del conocimiento de la biología del cáncer de mama es la disponibilidad de modelos experimentales que simulen los diversos aspectos de la enfermedad. Debido a esta complejidad y heterogeneidad no es esperable que un único modelo represente todas las variables de la enfermedad (Vargo-Gogola y Rosen, 2007; Rosen, Ashurst, y Chap, 2010)

Los modelos experimentales que se suelen utilizar para analizar los procesos involucrados en la iniciación y progresión del cáncer de mama incluyen las líneas celulares de mama normal y tumoral, los xenografts o xenotransplantes y los ratones modificados genéticamente (GEM). (Vargo-Gogola y Rosen, 2007).

---

Las líneas celulares de mama normal y tumoral, han sido el modelo más ampliamente usado para investigar cómo se desregulan la proliferación, la apoptosis y la migración en el desarrollo del cáncer de mama. El uso de líneas celulares proporciona gran cantidad de información sobre genes y rutas de señalización que regulan estos procesos. Esta técnica permite evaluar el efecto que las alteraciones génicas o la inhibición y/o activación de distintas rutas moleculares tienen en la capacidad tumorigénica de las células en la progresión del tumor con experimentos *in vitro* (Khan, 2013).

La línea celular de cáncer MDA-MB231 es comercializada por la American Type Culture Collection (ATCC); a partir de un adenocarcinoma de mama del que se estableció la línea celular, el subtipo de cáncer de mama del que procede esta línea celular es basal y se caracteriza por la ausencia de expresión para receptor de estrógeno, de progesterona, y la represión del receptor de crecimiento epidérmico 2 (HER2). La anterior información es extraída de las fichas técnicas de las líneas celulares disponibles en <http://www.atcc.org/> y <http://www.dsmz.de/>.

MDA MB-231 se caracteriza por no expresar receptor de estrógenos y presentar una forma mutada no funcional de p53 y p16. Posee abundantes receptores de membrana para el factor de crecimiento epidérmico (EGF), pero paradójicamente no se sobre estimula con dicho factor. Chun-Ling (*et al.*, 2003) han proporcionado evidencia *in vitro*, en células MDA-MB231, de la estrecha asociación de la exposición de la progesterona y la diferenciación de células en el cáncer de mama. Es probable que la proteína Stat 5b juegue un papel importante en la diferenciación celular inducida por progesterona en la línea celular anteriormente mencionada (Chun-Ling *et al.*, 2003; Rosen, Ashurst, y Chap, 2010).

### **1.3 Análisis molecular del cáncer de mama**

En los últimos años se han desarrollado tecnologías que permiten el análisis molecular de los tumores a nivel de genoma completo, facilitando su caracterización desde diferentes puntos de vista y con cada vez mayores niveles de resolución. Entre estas tecnologías se encuentran aquellas que analizan las aberraciones en el número de copias de DNA, las que perfilan el patrón global de expresión génica o las focalizadas en el estudio de la expresión de microRNAs (miRNA) (Pleasant *et al.*, 2010).

Hasta el momento la mayor parte de estos análisis se han realizado usando los denominados análisis de expresión diferencial que comparan tratamientos para el desarrollo clínico de terapias dirigidas para el cáncer de mama, entre las investigaciones publicadas se encuentra el realizado por Rosen, Ashurst, y Chap (2010), y otros trabajos que emplean tecnologías de hibridación como los “microarrays” o chips de ADN, aunque más recientemente están ya siendo abordados mediante la secuenciación masiva. (Goode, Pratap, y Eltom, 2014).

En el caso particular de este trabajo de investigación, centramos nuestra atención en los *microarrays* o microarreglos de expresión; su principio se basa en utilizar el cDNA a estudiar para hibridarlo sobre un cristal que contiene sondas de DNA que representan los exones de la mayoría de los genes presentes en el genoma humano, es decir, los RNA mensajeros (mRNAs) que se retrotranscriben produciendo las secuencias de cDNA a hibridar por competencia y rastreados por fluorocromos CY3 que es un componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente emitiendo un color verde y fluorocromo CY5 que emite fluorescencia roja, para luego obtener los genes expresados diferencialmente bajo dos condiciones de tratamiento, de esta manera se pueden analizar las variaciones en los niveles de expresión alta o baja de un amplio conjunto de genes.

#### **1.4 Microarreglos de expresión génica**

En este trabajo de investigación, se emplea la tecnología de expresión de Agilent, se utiliza el cDNA, de los cultivos tratados y no tratados con PsQ, para hibridar de manera simultánea sobre un cristal que contiene sondas de DNA que representan la mayoría de los exones de los genes descritos, de esta manera se pueden analizar las variaciones en los niveles de expresión de un amplio conjunto de genes expresados diferencialmente, considerados como los responsables presumiblemente de la respuesta de inhibición de crecimiento e inducción de muerte celular, que son indicativos *in vitro* de actividad anti cáncer de la pseudoterosina Q (PsQ).

La base de la tecnología de los microarreglos de expresión ADNc es la automatización y robotización de las técnicas clásicas de biología molecular Southern y Northern blotting, siendo el fundamento de la técnica la hibridación de ácidos nucleicos. La principal ventaja con respecto a las técnicas clásicas es la posibilidad de inmovilizar en la superficie del

---

chip o portaobjeto miles de sondas de ADN, permitiendo el análisis de la expresión de miles de genes, incluso de genomas completos, en un solo experimento.

El análisis de la expresión génica tiene sus desventajas, ya que los cambios en los niveles de mRNA pueden no reflejar las modulaciones de los niveles de proteína ni las modificaciones de las mismas, y por tanto podrían no mostrar relaciones con modulaciones fisiológicas. Es por esto que es necesario utilizar técnicas de análisis con indicadores como la localización de las proteínas y sus tasas de recambio, cambios estructurales y modificaciones de proteínas (López, Mallorquín, y Vega, 2002).

## 1.5 Ontologías Génicas (GO)

Para comprender la función génica hay que identificar los procesos o rutas que sigue el producto de un gen en una célula determinada. Un gen puede participar en la secreción o la síntesis de aminoácidos y clasificarse así por su función. La localización de una proteína en uno o varios compartimentos celulares aporta un criterio adicional de clasificación funcional. Puede encontrarse una proteína sólo en el núcleo o en la membrana celular. (Viera *et al.*, 2010).

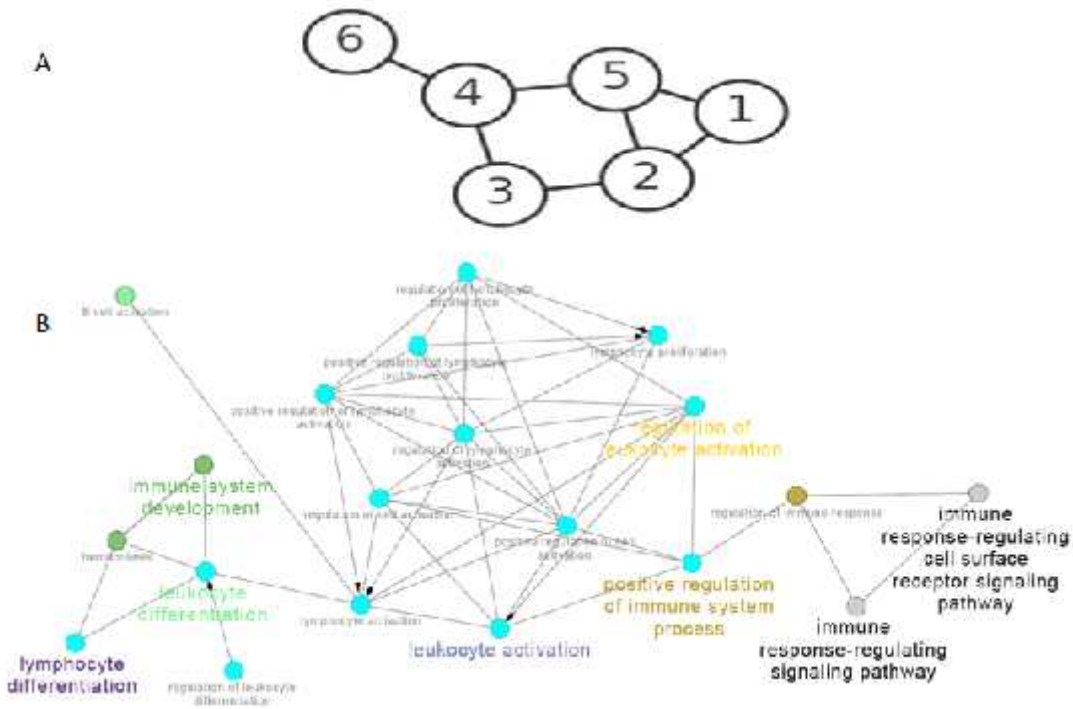
Todos los enfoques plantean un esquema de clasificación jerárquico lineal (un gen X es miembro de un grupo Y, que a su vez forma parte de la superclase Z). Debido a la complejidad de la clasificación funcional, se adaptaron y mejoraron las jerarquías para que éstas integren la información procedente de múltiples niveles funcionales.

De la secuenciación generalizada del genoma y el gran número de datos que se deriva de ella, emergió el sistema de la Ontología del Gen (GO, de "Gene Ontology") (Ashburner *et al.*, 2000). Según Seringhaus y Gerstein, (2009) este sistema GO emplea una estructura de grafos dirigida y acíclica (DAG, de "directed acyclic graph") (Gráfica 1-5)

La clasificación de los DAG y la de las jerarquías simples proceden de lo general a lo específico. No obstante, un DAG es más flexible porque puede tener múltiples progenitores para cualquier nodo. En una jerarquía simple, un gen presenta sólo un progenitor o clasificación funcional; en el DAG, en cambio, habrá múltiples. Por ejemplo: el producto de un gen puede pertenecer a un subconjunto de proteínas implicadas en el

control del ciclo celular y al tiempo, formar parte de un grupo de factores de transcripción. (Seringhaus y Gerstein, 2009)

**Gráfica 1-5. Representación esquemática de dos grafos A y B.** Un grafo es un conjunto de objetos llamados nodos unidos por enlaces llamados aristas, que permiten representar relaciones entre elementos de un conjunto. A. Grafo etiquetado con 6 nodos y 7 aristas. Tomada de Seringhaus y Gerstein, 2009. B. Grafo que representa la activación de respuesta celular a partir del estudio de enriquecimiento génico GO con un rol en los procesos biológicos.



La descripción de las entidades individuales resulta así más completa. La propuesta de los DAG tiene por defectos: la ampliación de la clasificación dependerá del grado de conocimiento disponible sobre un proceso celular concreto. No todos los aspectos de la vida subcelular se han estudiado con similar profundidad, en consecuencia, unas áreas de un DAG podrían mostrarse dotadas de mayor riqueza que otras, lo anterior debido a la complejidad biológica e intereses de la comunidad científica; mas no por errores (Seringhaus y Gerstein, 2009).

---

Por otro lado la Ontología de Genes (GO) es el fruto de una colaboración entre las bases de datos de organismos modelos para generar vocabularios estandarizados, controlados y estructurados con un amplio campo de aplicaciones que incluyen las anotaciones funcionales de genes, minería de textos, la indexación de literatura, el acceso y la gestión de la información, la realización de consultas, actualización y recuperación de información con herramientas especializadas, el intercambio de información y la interoperabilidad semántica entre sistemas y bases de datos, a fin de describir genes y los atributos del producto génico. (Ashburner *et al.*, 2000; Bindea *et al.*, 2009; Laubenbacher *et al.*, 2009).

La comunidad científica busca describir la función del gen en términos de circuitos o redes moleculares. Este modelo se centra menos en la actividad de un gen y más en los genes con los que éste se relaciona, a imagen de lo que se observa con las personas en la investigación sobre redes sociales (Laubenbacher *et al.*, 2009).

La Ontología de Genes agrupa realmente tres ontologías que se corresponden con tres aspectos diferentes de la biología celular: función molecular, proceso biológico implicado y componente o localización sub-celular. Aunque la GO incluye fundamentalmente conceptos que se refieren al nivel sub-celular y celular, abarca también niveles superiores, como los correspondientes a sistemas órganos y a organismo. (Ashburner *et al.*, 2000). En el presente trabajo de investigación centraremos nuestra atención en proceso biológico. Los Procesos Biológicos implican generalmente transformaciones químicas o físicas que ocurren por la acción de un conjunto de funciones moleculares organizadas; es decir, el objeto que va a un módulo biológico sufre transformaciones que lo convierten en algo diferente, como son por ejemplo el “crecimiento celular” o la “transducción de señales”, o un ejemplo de un nivel menor o más específico como el “metabolismo de pirimidinas”.





## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo General

Contribuir al estudio del mecanismo de acción *in vitro* de una pseudopterosina de origen marino relacionado con la actividad citotóxica, mediante el análisis de expresión diferencial con el fin de identificar posibles genes y posibles rutas moleculares impactadas por el tratamiento con el compuesto con promisorio actividad anti cáncer.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Establecer las condiciones de cultivo necesarias para realizar los estudios de expresión diferencial *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB231.
- Identificar genes expresados diferencialmente entre líneas celulares tratadas y no tratadas con una pseudopterosina de origen marino mediante un análisis bioinformático con los genes funcionales relacionados con la actividad citotóxica y expresados diferencialmente.
- Analizar por bioinformática los perfiles de expresión diferencial generados relacionados con la actividad citotóxica.
- Identificar las principales rutas relacionadas con el mecanismo de acción y asociarlas con los genes expresados diferencialmente.



## **3. Metodología**

### **3.1. Líneas celulares y cultivos celulares expuestos a PsQ**

El compuesto activo PsQ proporcionado por la doctora Carmenza Duque y su Grupo de Investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia” de la Universidad Nacional de Colombia, investigaciones, métodos de extracción de PsQ y estructuras moleculares ya publicadas. (Duque, 2010; Correa *et al.*, 2011; Correa *et al.*, 2012)

El compuesto activo PsQ se ensayó sobre 5 líneas celulares tumorales: H292 (cáncer de pulmón), MDA-MB231 (cáncer de mama), HeLa (cáncer cervical), HEP2 (cáncer de laringe), y PC-3 (cáncer de próstata) de la American Type Culture Collection (ATCC).

Las cinco líneas celulares se mantuvieron y/o sostuvieron en placas T25 con medio de cultivo RPMI-1640, medio de cultivo (Lonza®) con 1 mM de piruvato de sodio y 25 mM de HEPES a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> y humedad relativa del 100%. Todas las líneas celulares fueron suplementadas con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Lonza®).

### **3.2. Ensayo de citotoxicidad**

En el ensayo de citotoxicidad se calcularon las concentraciones letales CL30, CL50 y CL70, para cada una de las 5 líneas tumorales, con el fin de establecer qué línea celular presentaba mayor actividad citotóxica. En este sentido una vez obtenida las cajas T25 con una confluencia de 90% se pasaron a placas de 96 pozos, para cada línea celular los tratamientos se realizaron dos veces por triplicado. Las células se sembraron en placas de cultivo de seis pozos, disponiendo 1 x 96.000 células/pozo. 1.600µl de medio.

Después de permitir la adhesión de las células a las placas por 24 horas, las placas se incubaron con concentraciones de 1, 5, 10 y 20 mM de PsQ durante 6 h, a continuación, la solución de medio de cultivo se extrajo, se limpiaron las placas con 100 uL de PBS de 149,2 mM y pH 7,3. Posteriormente las células se incubaron a 37°C durante 4 h con 1.600 uL medio sin Suero Fetal Bovino (FBS) y resazurina 10% (v / v), empleando así la metodología fluorométrica fundamentada en la reducción del colorante Resazurina para la valoración de la citotoxicidad. (Escobar, Rivera y Aristizábal, 2010) (Parra y Aristizábal, 2011).

Luego se leyó por fluorometría la formación de resorufina (producto de la reducción de la resazurina por las células viables), empleando un filtro de excitación de longitud de onda de 535nm y un filtro de emisión de 595 nm en un lector de placas TECAN GENios.

Se calcularon los porcentajes de supervivencia relativa y se construyeron curvas de porcentaje de supervivencia en función del logaritmo de la concentración. Se determinaron las concentraciones letales CL30, CL50 Y CL70 para cada una de las 5 líneas celulares. (Figura 3-1).

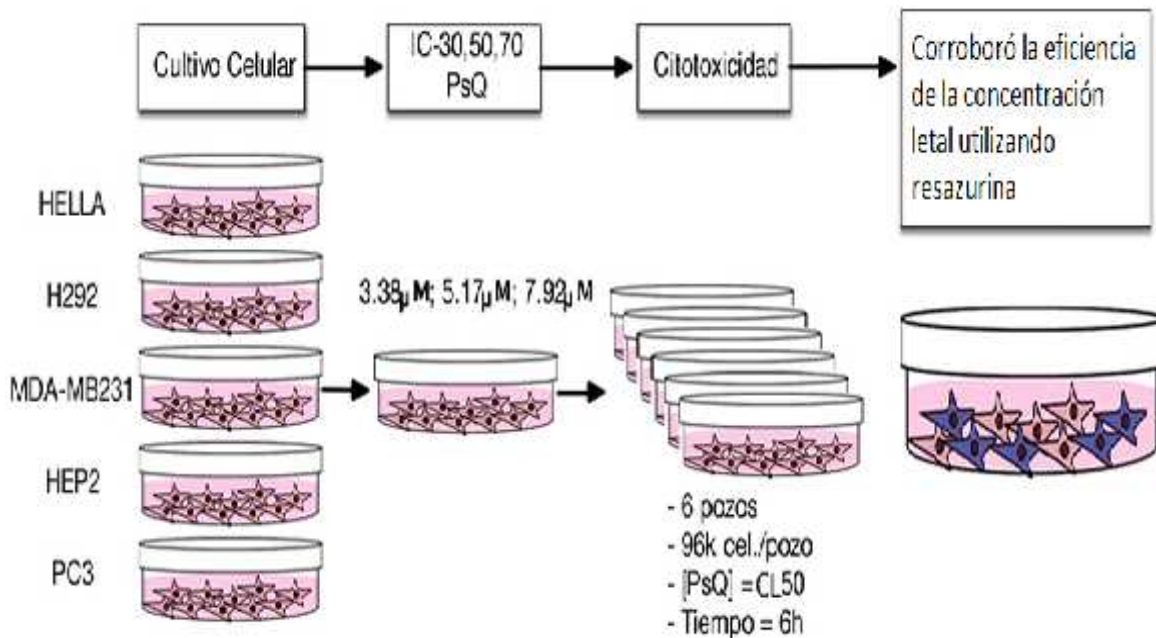
Se hizo un Análisis de Varianza (ANOVA) mediante el programa estadístico R (3.2.0, 2015) para corroborar si había diferencias significativas entre los valores de las 3 concentraciones letales (CL), en las 5 líneas celulares evaluadas.

Hipótesis nula ( $H_0$ ): los valores de las concentraciones son estadísticamente iguales en las líneas celular evaluadas.

Hipótesis alterna ( $H_1$ ): que asume diferencias estadísticas en los valores de las concentraciones en las diferentes líneas celulares tratadas con PsQ.

Al existir diferencias estadísticamente significativas, el análisis de varianza se complementó con un test estadístico de Tukey para encontrar la mejor concentración en la mejor línea celular determinándose por la mayor sensibilidad a PsQ.

**Figura 3-1.** Determinación de la actividad citotóxica concentración letal (CL) de PsQ sobre un panel de líneas celulares. 5 líneas celulares a las cuales se les calcularon la CL 30, 50, 70. La línea celular con mejor respuesta fue evaluada usando resazurina para corroborar la concentración inhibitoria.



### 3.3. Extracción de ARN y ensayo de expresión

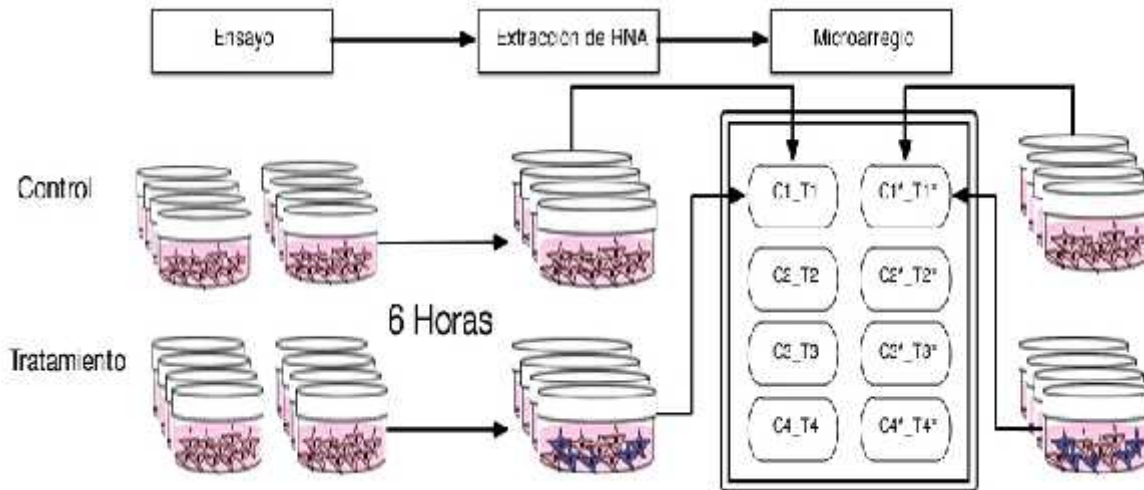
La línea celular en la cual se detectó mayor actividad citotóxica fue seleccionada para llevar a cabo los experimentos de expresión diferencial, evaluando las condiciones, tratadas con PsQ y sin tratamiento (control). Cada condición estuvo representada por 4 réplicas biológicas con 2 réplicas técnicas (Figura 3-2).

La extracción de ARN se realizó 6 horas después de cada tratamiento. La extracción se realizó usando el kit de purificación por columnas Quick-RNA MniPrep (Zymo Research, Irvine) a través de 3 etapas de acuerdo con las instrucciones del fabricante: 1) lisis de la muestra 2) limpieza de la muestra y eliminación de gDNA y 3) Purificación del ARN.

Después del procedimiento de extracción de los ácidos nucleicos obtenidos, se disolvieron en un buffer TE o tampón libre de RNasa y se cuantificaron mediante fluorimetría usando un equipo Qubit® kit de Invitrogen para tener una medida más confiable de la concentración de ARN y se evaluó la pureza de las muestras con el

espectrofotómetro NanoDrop; teniendo en cuenta que las preparaciones puras de RNA poseen una relación A260 /A280 de 2.0. (Tabla 3-1).

**Figura 3-2.** Diseño experimental del ensayo de expresión. 2 estados celulares, tratadas con PsQ y no tratadas. 1 tiempo de exposición (6h) a concentración CL50 de PsQ. Se usaron para cada estado celular 4 réplicas biológicas con su respectiva replica técnica. La expresión fue evaluada utilizando 8 arreglos contrastando tratamientos



Adicionalmente se evaluó la integridad del RNA total, procedente de los modelos celulares utilizando el Kit Bioanalyzer RNA 6000 Nano Assay y el Bioanalyzer Agilent, los cuales nos ayudaron a comprobar que las muestras son aptas para los estudios de expresión diferencial porque el análisis arrojó valores de calidad en todas las muestras en el rango de 8.4 a 10.0, teniendo presente que la escala RIN (RNA Integrity Number, por sus siglas en inglés) es de 1 a 10.

Posteriormente las muestras se enviaron al servicio de hibridación para el análisis de microarreglos. "Expresión diferencial con la tecnología Agilent".

**Tabla 3-1.** Evaluación de pureza ARN arrojados por el NanoDrop.

Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260	A280	260/280	Sample Type	Factor			
E1	Tratamiento	Fabio Aristza	24/08/2013	1l	815.7	ng/ul	20.392	9.529	2.14	RNA	40	
E1*	Control	P	Fabio Aristza	24/08/2013	1l	462.4	ng/ul	11.56	5.605	2.05	RNA	40
E1	Control	P	Fabio Aristza	24/08/2013	1l	274.9	ng/ul	6.874	3.228	2.13	RNA	40
E1*	Control	P	Fabio Aristza	24/08/2013	1l	537.4	ng/ul	13.436	6.244	2.15	RNA	40
E2	Tratamiento	Fabio Aristza	24/08/2013	1l	288.9	ng/ul	7.223	3.285	2.2	RNA	40	
E2*	Control	P	Fabio Aristza	24/08/2013	1l	296.7	ng/ul	7.416	3.505	2.12	RNA	40
E2	Control	P	Fabio Aristza	24/08/2013	1l	505.4	ng/ul	12.635	5.837	2.16	RNA	40
E2*	Control	P	Fabio Aristza	24/08/2013	1l	429.3	ng/ul	10.733	5.172	2.08	RNA	40
E3	Tratamiento	Fabio Aristza	24/08/2013	1l	341.6	ng/ul	8.541	4.003	2.13	RNA	40	
E3*	Control	P	Fabio Aristza	24/08/2013	1l	487.1	ng/ul	12.178	5.872	2.07	RNA	40
E3	Control	P	Fabio Aristza	24/08/2013	1l	349	ng/ul	8.724	4.085	2.14	RNA	40
E3*	Control	P	Fabio Aristza	24/08/2013	1l	469.3	ng/ul	11.731	5.637	2.08	RNA	40
E4	Tratamiento	Fabio Aristza	24/08/2013	1l	487.6	ng/ul	11.889	5.683	2.08	RNA	40	
E4*	Control	P	Fabio Aristza	24/08/2013	1l	296.3	ng/ul	7.407	3.395	2.18	RNA	40
E4	Control	P	Fabio Aristza	24/08/2013	1l	426.4	ng/ul	10.681	5.092	2.09	RNA	40
E4*	Control	P	Fabio Aristza	24/08/2013	1l	272.3	ng/ul	6.807	3.162	2.15	RNA	40

### 3.4 Ensayos de microarreglos y análisis de datos

Los perfiles de expresión génica se midieron utilizando Agilent SurePrint G3 Humano Microarray GE V2, las 4 repeticiones biológica con sus 2 repeticiones técnica se contrastaron en un total de 8 matrices. (Anexo A). Este experimento consiste en un diseño experimental directo con una serie de réplicas biológicas en cada arreglo, se compara la misma fuente de ARN de células MDA MB-231 tratada y no tratado como repeticiones técnicas para compensar posibles fallas de la tecnología, y por esta razón se considera un análisis estadísticamente robusto.

Los datos obtenidos del servicio de microarreglos se procesaron usando Bioconductor en el entorno R, librería Limma (Smyth, 2004). Bioconductor es una plataforma que utiliza el lenguaje de programación estadística de código abierto R, que proporciona herramientas para el análisis y comprensión de los datos genómicos de alto rendimiento. (Tomado de: <http://bioconductor.org/>). Limma es un paquete que fue desarrollado para proporcionar un flujo de trabajo (pipeline) para el análisis de datos de microarreglos de expresión génica, principalmente centrado en la plataforma de Agilent. (Tomado de: <http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/agilp.html>).

Previo al análisis de los datos se realizó pre-procesamiento de los datos con el ánimo de disminuir los errores experimentales que se pudieran tener (Anexo B), para lo cual se llevó a cabo una corrección de ruido de fondo (“background”) empleando el método Normexp (Ritchie *et al.*, 2007), luego un proceso de normalización en el arreglo utilizando el método de Loess (Smyth y Speed, 2003), seguida por un proceso de Sumarización utilizando el método de promedios (Matthew *et al.*, 2007); y con el fin de normalizar los valores para cada matriz se empleó el método Aquantile, siendo esta última una normalización entre los arreglos para garantizar que las intensidades medias de todas las matrices tuvieran las mismas distribuciones empíricas. (Anexo C) (Yang y Thome, 2003). (Figura 3-3).

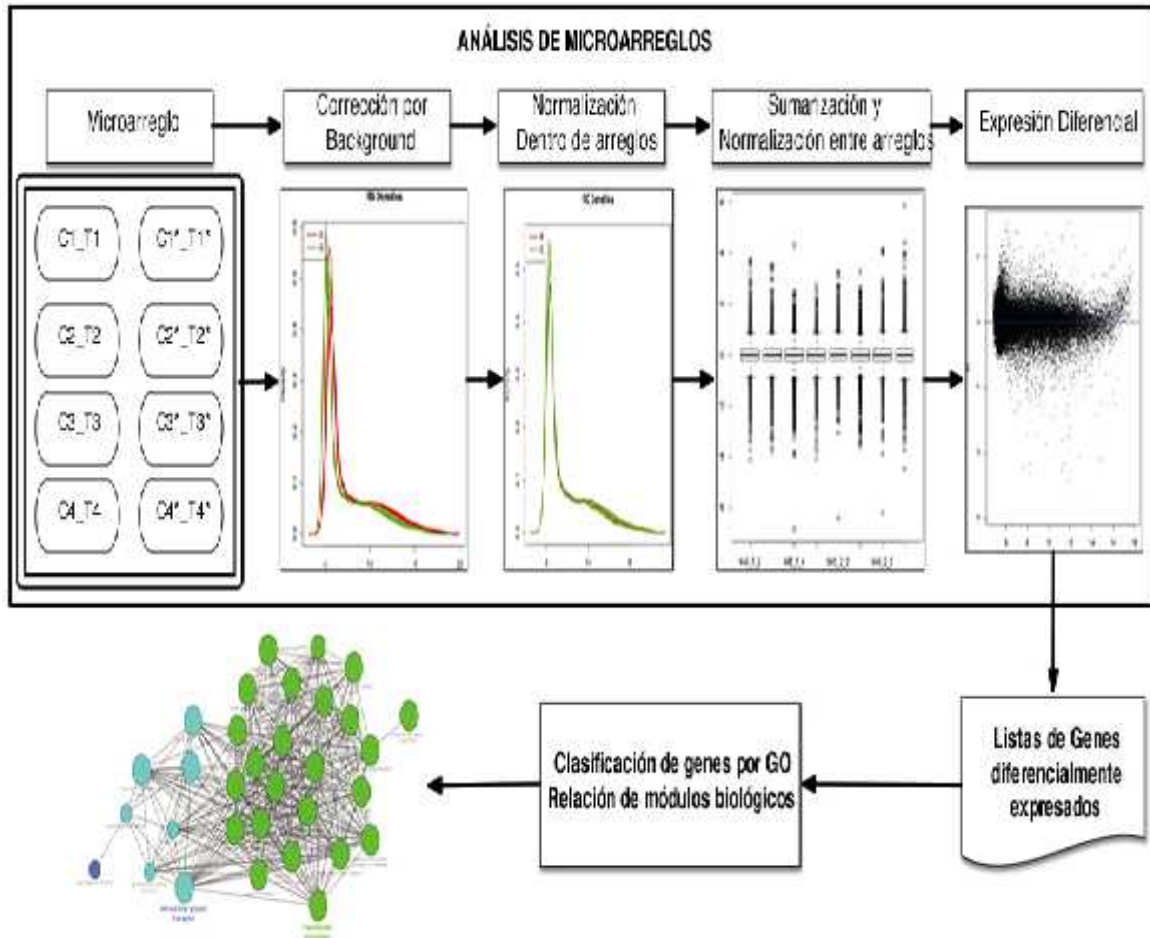
Posteriormente, a fin de identificar los genes diferencialmente expresados se utilizó un modelo lineal elaborando una matriz para experimentos de dos colores con una aproximación de correlaciones de réplicas técnicas (Smyth, Michaud, y Scott, 2005) basado en la perspectiva previa de diseño experimental.

Para evaluar las implicaciones funcionales de PsQ sobre la línea celular en prueba, se realizó un estudio de enriquecimiento utilizando las anotaciones de Ontologías Génicas (GO) de los genes diferencialmente expresados, usando un algoritmo de aglomeración que sigue una función hipergeométrica con corrección Benjamini-Hochberg sobre la matriz de las anotaciones GO. Este análisis de enriquecimiento fue hecha con ClueGo (Bindea *et al.*, 2009) un plugin de Cytoscape v. 3.1 (Saito *et al.*, 2012). (Figura 3-3).

Para ayudar en el análisis e interpretación de las implicaciones funcionales, los genes diferencialmente expresados fueron contextualizados en sus redes metabólicas usando PathVisio.



**Figura 3-3. Identificación de genes diferenciales y su implicación biológica.** Procesos de corrección, normalización y sumariación de los datos para determinar genes diferencialmente expresados del tratamiento con respecto al control. Posterior agrupación de dichos genes en función de su actividad biológica anotada en su Ontología (GO).



## 4. Resultados y discusión

Los efectos antitumorales de Pseudopterosina Q (PsQ), se evaluaron inicialmente mediante pruebas de actividad citotóxica de inhibición de crecimiento en cinco líneas celulares de cáncer: H292 (cáncer de pulmón), MDA-MB231 (cáncer de mama), HeLa (cáncer cervical), HEP2 (cáncer de laringe), y PC-3 (cáncer de próstata); empleando el método de resazurina (Escobar, Rivera y Aristizábal, 2010).

PsQ inhibió el crecimiento celular en todas las líneas celulares, es decir, produjo una detención de los procesos de división celular; sin embargo, se identificó a la línea celular de cáncer de seno o mama MDA-MB231 como aquella cuyo crecimiento fue inhibido con la menor concentración de PsQ, comprobado con los resultados arrojados por el análisis de varianza ( $F_{2,8}=8.239$ ,  $p=0.0111$ ) y el test de Tukey; lo que implica que dicha línea celular es más sensible que las otras (Tabla 4-1). Esta característica hizo que MDA MB-231 fuera elegida para el ensayo de la expresión diferencial.

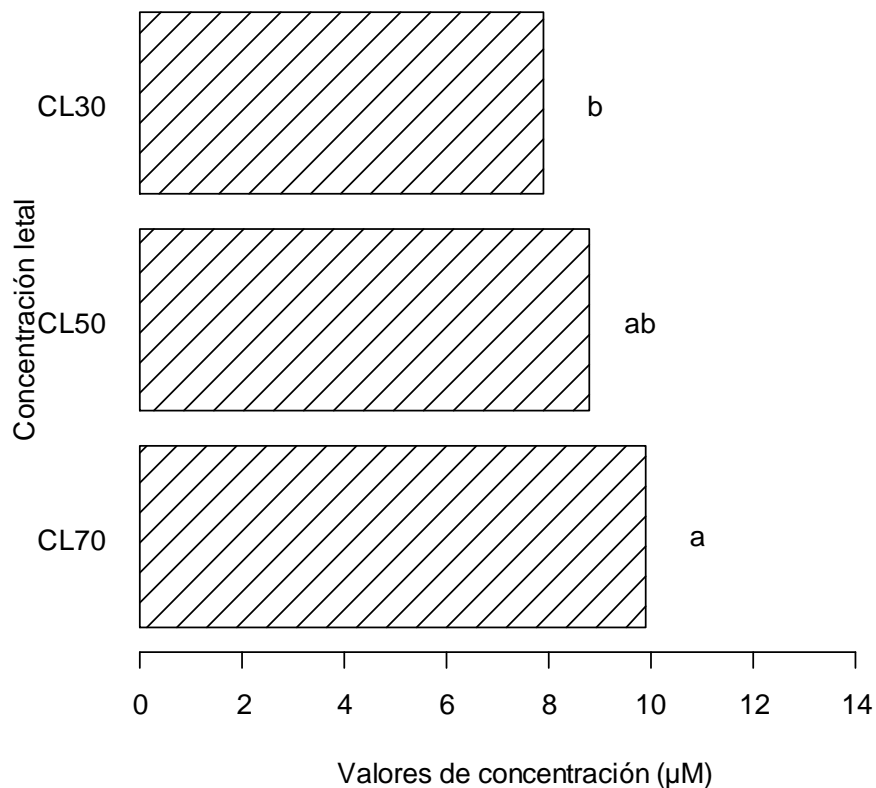
**Tabla 4-1.** Medidas de la actividad citotóxica para cada línea celular a través de la concentración letal (CL) CL30, CL50 y los valores de CL70 concentración de PsQ ( $\mu\text{M}$ ) necesaria para reducir la población celular en un 30%, 50% y 70% respecto a las células control no tratadas, respectivamente).

Líneas Celulares	CL30	CL50	CL70
MDA-MB231	3.38	5.17	7.92
H292	4.30	5.30	6.53
HeLa	7.44	8.10	8.83
HEp2	6.74	7.34	8.01
PC-3	17.66	17.94	18.23

Haciendo referencia a la Tabla 4-1, se puede apreciar que la CL50 y su elección de acuerdo con la ANOVA, comprueba que si existen diferencias entre las 3 concentraciones letales CL30, CL70 Y CL50, se obtiene un  $F=8.239$  y grados de libertad de 2,8 y un  $p = 0.0111$  que es menor a él alfa ( ) de 0.05, por eso se rechaza la hipótesis nula de igualdad y se acepta la alternativa. ( $F_{2, 8} = 8.239, p = 0.0111$ ).

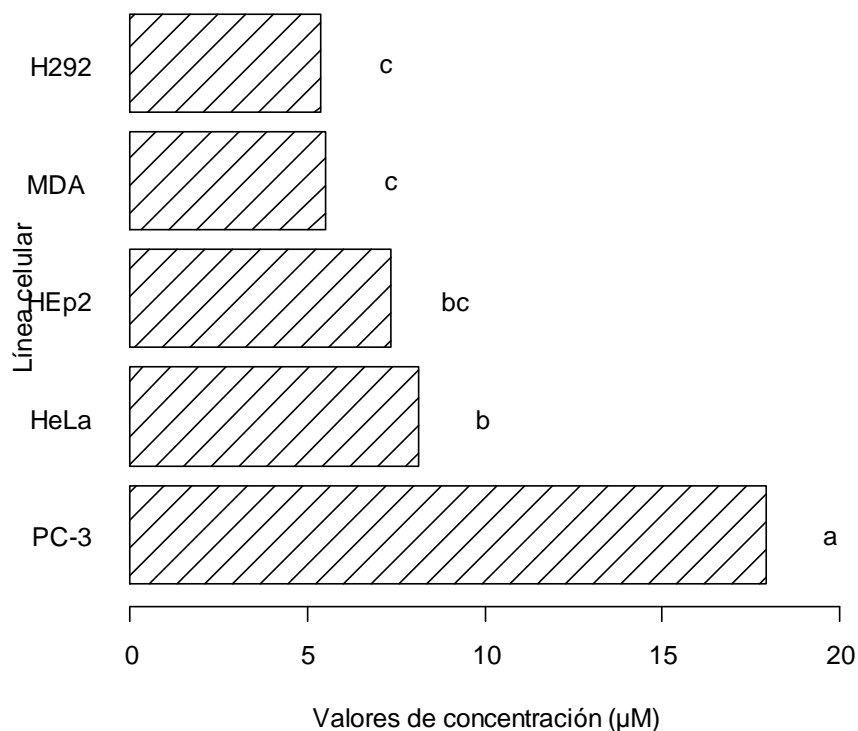
Aplicando la prueba pos hoc de Tukey para ver las diferencias específicas que existen entre las concentraciones, se observa que hay diferencias significativas en los valores de las concentraciones CL 70 y CL 30 y no existen diferencias significativas entre la CL70 Y CL 50 y entre la CL 50 Y CL30. (Gráfica 4-1).

**Gráfica 4-1.** Diferencias significativas entre concentraciones CL30, CL50 y CL70.



También existen diferencias entre las líneas celulares con un  $p=2.24e-07$  que quiere decir 0.000000224 que es menor a un alfa igual a 0.05. (Gráfica 4-2).

Gráfica 4-2. Diferencias entre líneas celulares para elección MDA-MB231 para ensayo expresión diferencial.



Las menores concentraciones fueron tanto en MDA-MB231 como en H292, siendo sus valores de la concentración estadísticamente iguales, por lo tanto se puede considerar válido emplear cualquiera de las dos líneas celulares por ser las más sensibles, así se optó de manera aleatoria por usar la línea MDA-MB231. El modelo tiene un  $R^2 = 0.9853$  cuya relación es fuerte. El modelo explica un 98.5% de las diferencias y tiene un 95% de Nivel de Confianza y un alfa de 0.05 ( $1 - \text{alfa} = 95\%$  confianza).

PsQ produce muerte celular en todas las líneas celulares, es decir, produjo una disminución de la población celular; sin embargo, se identificó a la línea celular de cáncer de seno o mama MDA-MB231 como una de las más sensibles dado que a la menor concentración de PsQ, reduce la población celular de manera significativa, comprobado con los resultados arrojados por el análisis de varianza y dada la diferencia por el test de

---

Tukey determinando a 5.17  $\mu$ M como la concentración a emplear, resultados que determinan la mejor elección para la línea celular de cáncer de mama MDA-MB231 para los estudios siguientes de expresión diferencial.

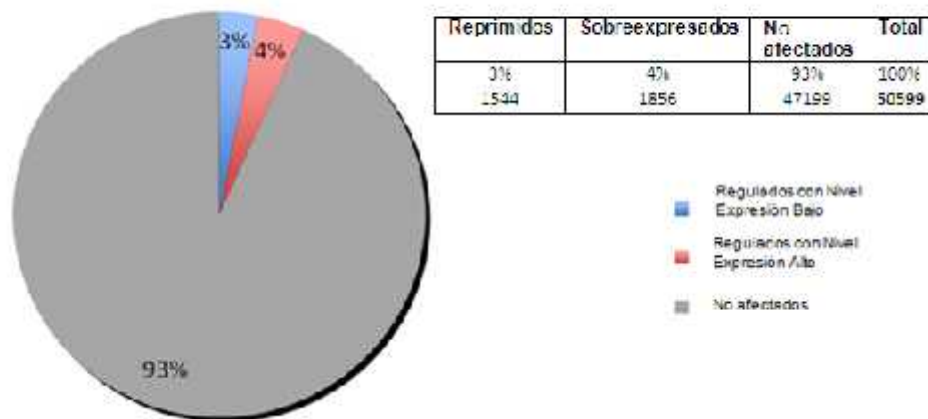
## **4.1 Análisis de microarreglos de expresión diferencial**

Mediante un microarreglo de ARN se identificaron las implicaciones funcionales y citotóxicas de PsQ sobre la línea celular MDA-MB231 a través de la comparación de los perfiles de expresión de células tratadas con PsQ (concentración letal CL50 de PsQ durante 6 h) con respecto a células sin tratamiento. Se analizaron los perfiles de expresión de 50.599 transcritos, de los cuales 3.400 genes tenían un perfil de expresión diferencial estadísticamente significativo de las células tratadas en relación con el control (células no tratadas), de estos 1.544 (3% del total de genes) mostraron un nivel de expresión menor al control (represión) y 1856 (4% del total de genes) un nivel de expresión mayor al control (sobreexpresión). (Grafica 4-3).

El microarreglo de expresión génica empleado, dio como resultado una lista de genes con expresión diferencial, esta lista permitió un análisis de la actividad funcional génica, que se explicará a continuación, y sirvió como estrategia para aproximarse al análisis de rutas metabólicas implicadas teniendo en cuenta los niveles de expresión respecto a la célula MDA-MB231 control sin tratamiento.

**Gráfica 4-3.** Porcentaje genes impactados por el compuesto de origen marino.

### Porcentaje genes impactados por la actividad citotóxica del compuesto PsQ.



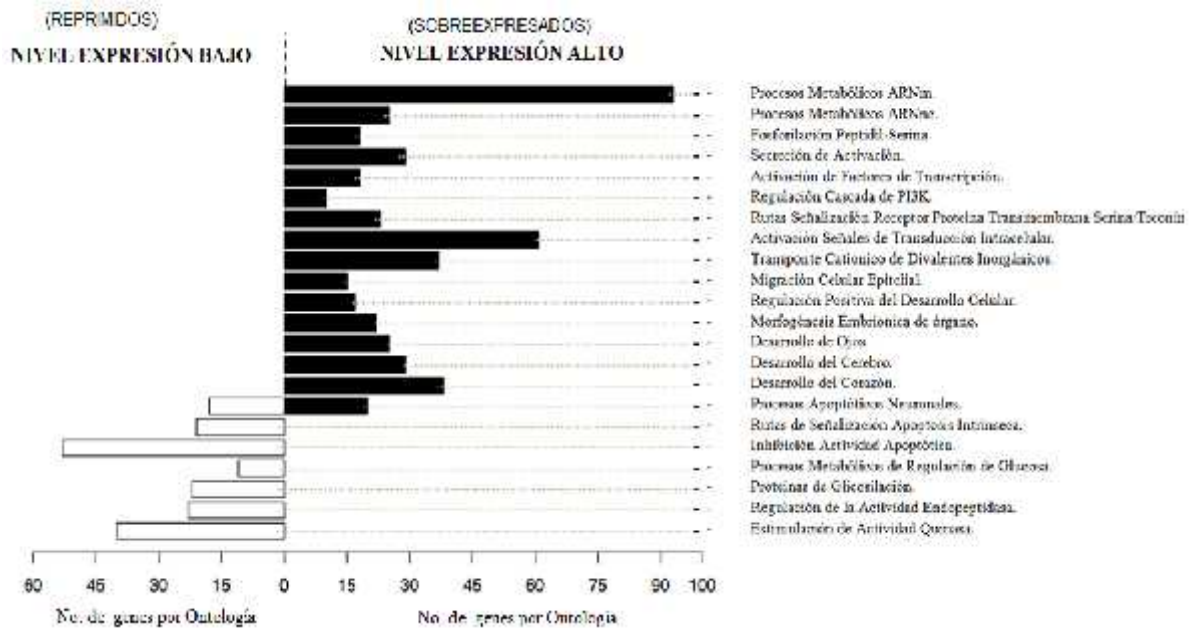
## 4.2 Implicaciones actividad funcional biológica de PsQ

### 4.2.1 Estudio de enriquecimiento GO

El análisis de enriquecimiento por GO muestra que el funcionamiento celular en respuesta al tratamiento con PsQ relaciona procesos biológicos tales como el incremento en la actividad transcripcional, síntesis de proteínas, proliferación y diferenciación celular, migración, supervivencia y procesos apoptóticos celulares (Gráfica 4-4).

De acuerdo al análisis de enriquecimiento se obtuvieron como principales grupos funcionales: actividad transcripcional y síntesis de proteínas, activación de transducción de señales intracelulares, activación de la respuesta inmune, inhibición actividad apoptótica, y represión de la actividad quinasa. Enseguida se detallaran cada una de los 5 grupos funcionales analizados.

**Gráfica 4 - 4.** Agrupación de genes con expresión diferencialmente alta o baja con respecto al control, en función de su actividad biológica en su Ontología (GO) con un rol clave en procesos biológicos.



#### ▪ Actividad transcripcional y síntesis de proteínas

Como se observa en la gráfica 4-4, hay alrededor de 100 genes sobreexpresados que se relacionan con procesamiento de mRNA lo que sugiere que el tratamiento con PsQ induce el incremento en la actividad de procesos transcripcionales y traduccionales, para soportar este hecho se destacan los genes sobreexpresados de la familia eIFs (eIF-4A1, eIF-4A2 y eIF-4E), factores de traducción identificados como activadores de los procesos de síntesis de proteínas por su participación en el reclutamiento de la subunidad 40S en el proceso de iniciación de la traducción (De Benedetti y Graff, 2004; Spriggs, Bushell y Willis *et al.*, 2010). Cambios celulares en el ARN y en la síntesis de proteínas han sido descritos como parte de una respuesta celular a señales de estrés (Spriggs, Bushell y Willis *et al.*, 2010; Fulda *et al.*, 2010; López *et al.*, 2014), evento que es claramente generado por PsQ; para una célula es vital efectuar cambios rápidos en los niveles de proteína en cualquier respuesta al estrés; los mRNAs que codifican para algunas proteínas de respuesta al estrés deben ser capaces de evadir la represión global de la traducción (Spriggs, Bushell y Willis *et al.*, 2010), proceso de evasión que se cree ocurre, al encontrar genes de la familia Receptor like Proteins (RLPs) sobreexpresados.

Los RLPs codifican proteínas ribosomales organizadas en pequeñas y grandes subunidades ribosómicas 40S - 60S y otras proteínas que se sintetizan en el núcleo y se exportan al citoplasma a través de los poros nucleares, que según Bee *et al.*, (2006) funcionan como chaperonas del ARN durante la traducción, coordinando la interacción entre los ribosomas y el ARN. López *et al.*, (2014), afirman que en efecto hay procesos de traducción activos en células MDA MB-231 expuestas al tratamiento, como respuesta al estrés celular generado por PsQ, correlacionándose en el presente estudio, con la sobreexpresión de 27 genes que hacen parte de la familia de proteínas ribosomales RLPs.

#### ▪ Activación de transducción de señales intracelulares

Se sabe que 61 genes están activando la actividad funcional de transducción de señales intracelulares (Gráfica 4-4), sin embargo se determinó que los genes con nivel de expresión alta que hacen parte de esta categoría, también están relacionados con: proliferación, diferenciación celular y citoesqueleto, supervivencia, motilidad e invasión celular; el visualizador de redes de anotación de agrupamientos funcionales Cytoscape, emplea el plugin ClueGO, herramientas bioinformáticas que descifran tales agrupamientos funcionales biológicos. La activación de transducción de señales intracelulares, generado por GO, se analizó teniendo en cuenta los genes que compartían rutas metabólicas, información proporcionada por el análisis con PathVisio. (Bindea *et al.*, 2009) (Kristensen *et al.*, 2014) (Goode *et al.*, 2014).

En los genes sobreexpresados involucrados en diferenciación celular y citoesqueleto están NRAS; FGF4; FGF17; PDGFA; PDGFB; GNA12; BCAR1; ACTB; ACTA; ACTN1; y SMAD3. De éstos, NRAS aparece vinculado según Takashima y Faller (2013), con proliferación y supervivencia y FGF4; FGF17 reportados como potentes inductores de angiogénesis (Kato, 2008). En el recambio en el nivel estructural de respuesta al citotóxico PsQ, la célula sufre procesos de transformación celular. Probablemente los altos niveles de expresión de PDGFA y PDGFB manifiestan crecimiento de células tumorales como también lo reporta Heldin, (2013); GNA12 ha sido reportado por Chia, Kumari, y Casey (2014) como factor de secreción que promueve la invasión celular.

BCAR1 y la familia actina ACTs codifican proteínas altamente conservadas que intervienen en la motilidad, estructura e integridad celular y han sido estudiados en



---

expresión diferencial de líneas celulares de cáncer de seno MDA-MB231 (Li *et al.*, 2012); el estudio de Konstantinovsky, Davidson, y Reich (2012), sugiere para BCAR1 que está involucrado en la progresión del cáncer favoreciendo la señalización para la invasión de células cancerosas; las proteínas alfa actina (codificada por ACTA) son constituyentes principales del aparato contráctil, beta actina (codificada por ACTB), está involucrada en la regulación de la motilidad celular. ACTN1 está relacionado con alta incidencia en metástasis. Guo *et al.*, (2013) y Walker *et al.*, (2010), plantean que SMAD3 codifica una proteína reguladora en la vía de señalización de factores de crecimiento beta y puede contribuir a incrementar el riesgo de cáncer de mama.

La ruta de señalización ID esta activa con altos niveles de expresión. Las proteínas Id (Id1-Id4) promueven el crecimiento o proliferación celular, inhiben la diferenciación, y juegan un papel crítico en el desarrollo del cáncer, evidencias soportadas por trabajos de Sikder, Devlin, Dunlap, Ryu, y Alani, (2003) y Perk, Iavarone, y Benezra, (2005).

De acuerdo a los genes anteriormente descritos se comprueba que al exponer células MDA-MB231 con el compuesto citotóxico PsQ durante seis horas a una concentración 5.17  $\mu\text{M}$ , bajo las condiciones *in vitro*, las células activan genes involucrados en transducción de señales intracelulares, principalmente de protección celular, relacionados a su vez con mecanismos de crecimiento celular, y también con un tipo de muerte celular que más adelante se describirá.

#### ▪ Represión de la actividad quinasa

PI3K y Akt son genes relacionados con diferenciación y supervivencia celular. PI3K está relacionado con la vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-kinasa, se sabe que resulta crucial en numerosos aspectos del crecimiento y la supervivencia celular según estudios realizados por Pinzón, Serrano, y Sanabria (2009). La Akt tiene múltiples blancos, responsables de los efectos de la activación anormal de la vía que conduce a una respuesta proliferativa y antiapoptótica que se relaciona con el desarrollo de múltiples tipos de cáncer (Pinzón, Serrano, y Sanabria 2009). De otra parte en estudios que emplearon la línea celular MDA-MB231 se determinó que Akt es importante en invasión, migración, movilidad represión del proceso apoptótico, alta expresión de genes antiapoptóticos y metástasis celular en cáncer (Jiang *et al.*, 2008). A pesar de lo anteriormente expuesto, los genes PI3K y AKT en el presente estudio, no tuvieron una

expresión diferencial. Los resultados señalan que 40 genes activadores de esta ruta metabólica tales como ARFGAP3, ASNS, ATF3, ATF4, CREB3L4 tienen niveles de expresión más bajos que el control.

#### ▪ **Activación de la respuesta Inmune**

Dentro de los 61 genes que activan la transducción de señales intracelulares (Gráfica 4-4), se encuentran los genes TLR4; TLR5, y MYD88 con alto nivel de expresión, relacionados como activadores de respuesta inmune.

Takeda y Akira (2004), señalan que los TLRs juegan un papel importante en la activación de inmunidad innata por el reconocimiento de segmentos de compuestos microbianos. McClure y Massari (2014), afirman que compuestos microbianos tales como lipopolisacáridos bacterianos (LPS) se presentan cuando se trata de un complejo con moléculas lípido proteína de unión (LBP). En este estudio se observaron altos niveles de expresión para los genes TLR5, TLR4 que median la expresión de citoquinas y quemoquinas además de factores de necrosis a través de rutas quinasas. MyD88 es esencial en la inducción de citoquinas inflamatorias disparadas por los TLRs.

Mydlarz, Jacobs, Boehnlein, y Kerr (2003) demuestran que la producción de pseudoterosina está asociada a simbiontes dinoflagelados y que este hallazgo tiene importantes implicaciones farmacológicas en la respuesta inmune a nivel celular; se sugiere que comunidades bacterianas también producen PsQ, generando reconocimiento celular de respuesta inmune debido a su exposición en células MDA-MB231. En efecto, podría haber reacción basal de inmunidad innata celular como respuesta al tratamiento y que no determinan una relación clara con lo reportado por Rodríguez (*et al.*, 2004), sobre mecanismos de acción de la actividad antiinflamatoria de las pseudoterosinas al bloquear la liberación de eicosanoides, moléculas de carácter lipídico con funciones de procesos inflamatorios y de respuesta inmune, sin interrumpir la biosíntesis.

#### ▪ **Inhibición actividad apoptótica. (Antiapoptóticos)**

Dentro de los 53 genes reprimidos (Gráfica 4-4) hacen parte c-Fos, c-Jun, IL6, MYC y EGR1; genes con bajo nivel de expresión involucrados en procesos antiapoptóticos. Bossis *et al.*, (2005) reporta que los genes c-Fos y c-Jun son componentes de una proteína activa reguladora, el complejo de transcripción AP-1 importante en procesos de

---

activación de muerte celular programada por apoptosis como respuesta a estrés en células cancerígenas, éste hecho sugiere que probablemente no hay muerte celular por apoptosis en los resultados de éste trabajo, debido a que el complejo de transcripción AP-1 está reprimido. Resultados también respaldados por el bajo nivel de expresión del gen MYC en este estudio, y al contrastarlos con estudios de amplificación de este gen en metástasis de cáncer de mama donde concluyeron que en las células en las que se activa especialmente la expresión de MYC independientemente de factores de crecimiento, no pueden entrar en Go, y si entran en Go cuando se les proporciona la proteína myc, abandonarán Go y empezarán a dividirse incluso en ausencia de factores de crecimiento, lo cual las llevará a apoptosis (Chandriani *et al.*, 2009), resultados también apoyados por Singhi *et al.*, (2012), quien resalta que no existe un consenso claro acerca de si la amplificación de MYC se asocia siempre con la sobreexpresión de su producto proteico.

En cuanto al gen EGR1 Calogero *et al.*, (2001), afirma que es un inductor muy temprano en el proceso apoptótico sin embargo, estudios previos han mostrado que EGR-1 es reprimido en varias clases de neoplasias, sugiriendo un rol como gen supresor tumoral; se ha encontrado que EGR-1 está disminuido o es indetectable en tumores de pequeñas células humanas de seno y pulmón (Calogero *et al.*, 2001), resultados que son confirmados en éste trabajo puesto que la expresión de EGR1 está disminuida en células MDA MB-231 tratadas con PsQ mientras en MDA MB231 no tratadas su expresión es alta y probablemente su muerte celular podría estar guiada por procesos apoptóticos.

Para el gen IL6, Oh *et al.*, (2011), afirma que estimula la proliferación e invasión de células cancerígenas al seno. Según Young Han Lee, (2014), los genes FOS, JUN, MYC, EGR-1 e IL6 todos ellos hacen parte de ruta metabólica de genes antiapoptóticos, son genes que se relacionan con múltiples tipos de cáncer y son factores de transcripción de respuesta temprana de células sometidas a estrés. Por lo tanto los resultados sugieren que a las 6 horas de exposición con PsQ, las células reprimen los genes de respuesta temprana luego este tiempo en la dinámica celular no es de respuesta temprana debido a que los anteriores factores de transcripción de genes proliferativos y antiapoptóticos presentan un nivel de expresión bajo. (Yung Lee, 2014).

Los niveles de expresión diferencial bajo de los genes FOS, JUN, MYC, EGR1 e IL6, por acción de la actividad citotóxica de PsQ, inhiben la maquinaria apoptótica y actuaría como estímulos que impulsa el mecanismo de muerte celular por necrosis. (Fulda *et al.*, 2010), concluyen que muchos estímulos que impulsan la necrosis pueden inhibir la maquinaria apoptótica. Otra prueba adicional que podrían indicar muerte celular programada por necrosis son los niveles de expresión altos de genes reguladores de necrosis TNFRSF10A y TNFRSF10D, como también la sobre expresión de reguladores negativos de apoptosis y proliferación TGFB1 y TGFB2. Adicionalmente los niveles de expresión del gen CASP8, que regula negativamente procesos necróticos, son más bajos que el control sin tratamiento y CASP1 no presenta expresión diferencial siendo este último relacionado con pyroptosis (Vanlangenakker, Vanden, y Vandenabeele, 2012). Se ha reportado necrosis en células cancerígenas expuestas a agentes alquilantes que dañan el ADN. (Fulda *et al.*, 2010).

El microarreglo de expresión génica empleado, dio como resultado una lista de genes con expresión diferencial, esta lista permitió un análisis de la actividad funcional génica y una estrategia que arrojó una aproximación de rutas metabólicas implicadas teniendo en cuenta los niveles de expresión respecto a la célula MDA-MB231 control sin tratamiento. Ahora bien, con el análisis de la expresión diferencial se generaron las bases para futuros estudios que empleen mayor número de tiempos de exposición de PsQ en células MDA-MB231 y los eventos moleculares que expliquen la citotoxicidad tanto en línea celular como en sus controles; por el momento, en este trabajo se ha generado una visión amplia desde la biología de sistemas de las razones que más adelante explicarán por qué MDA-MB231 requiere menor concentración de PsQ para matar mayor número de células.

A partir de los resultados obtenidos con el microarreglo se sabe que todos los mecanismos de protección celular en respuesta al estrés generado por PsQ, se relacionan con supervivencia, diferenciación, crecimiento, movilidad y migración celular y represión del proceso apoptótico. No obstante, el resultado celular final al tratamiento con PsQ es la muerte celular, los resultados mostraron que desde la perspectiva genética la célula no está presentando una respuesta temprana debido a que los niveles de expresión de genes tales como FOS, JUN, MYC, EGR1 e IL6 (genes de respuesta

---

temprana) están con nivel de expresión bajos. Adicionalmente los genes relacionados con apoptosis están reprimidos, lo que implica que no hay muerte celular por apoptosis.

De acuerdo a los resultados de ésta investigación, se presume que la muerte celular esta llevada a cabo por necrosis, evento que se soporta debido a la estimulación del crecimiento celular llevada a cabo por TLR, genes que se muestran activados, luego la actividad serina treonina quinasa esta activa, mientras que genes involucrados en procesos apoptóticos están reprimidos como caspasa (CASP10). IL1R2 es un gene regulador de IL-1 (gen de respuesta inmune); en nuestros datos IL1R2 está con un nivel de expresión alto es decir no está respondiendo a eventos inmunidad con lo que se puede inferir que la célula no está generando respuesta temprana, no se puede demostrar que la célula tenga respuesta tardía pero si afirmar que la respuesta no es temprana.

Con el presente trabajo de investigación y de acuerdo con el análisis de la expresión diferencial, se tiene en este estudio las bases para futuras investigaciones que empleen mayor número de tiempos de exposición de PsQ en células MDA-MB231 que empleen microarreglos de expresión génica con sondas específicas de genes involucrados en la actividad de respuesta a estrés celular, para explicar los eventos moleculares de citotoxicidad tanto en la línea celular de cáncer como células normales adyacentes al tumor mamario y en controles sin tratamiento; por el momento, en este trabajo se ha generado una visión amplia desde la biología de sistemas de las razones que más adelante explicarán por qué MDA-MB231 requiere menor concentración de PsQ para matar mayor número de células.

## 5. Conclusiones

- Se muestran y establecen las condiciones de cultivo necesarias empleadas en la investigación, guiada bajo metodologías descritas por otros autores, para así determinar que la línea celular de cáncer de mama MDA-MB231 es la más susceptible al citotóxico PsQ y por tanto la más adecuada para realizar los estudios de expresión diferencial in-vitro.
- El análisis diferencial de los perfiles de expresión molecular a nivel transcriptómico, en la línea celular MDA-MB231, permitió identificar 3.400 genes impactados por la actividad citotóxica del compuesto de origen marino PsQ, de estos 1.544 (3% del total de genes) mostraron un nivel de expresión menor al control sin tratamiento (represión) y 1856 (4% del total de genes) un nivel de expresión mayor al control sin tratamiento (sobreexpresión).
- El microarreglo de expresión génica empleado, dio como resultado una lista de genes con expresión diferencial, esta lista permitió un análisis de la actividad funcional génica y una estrategia que arrojó una aproximación de rutas metabólicas implicadas teniendo en cuenta los niveles de expresión respecto a la célula MDA-MB231 control sin tratamiento.
- Se concluye que todos los mecanismos de protección celular en respuesta al estrés generado por PsQ, se relacionan con supervivencia, diferenciación, crecimiento, movilidad, migración celular y represión del proceso apoptótico. No se soportan evidencias de repuesta temprana pero si evidencias de muerte celular por procesos de necrosis.

## 6. Bibliografía

- [1] Anderson, W., Althuis, M., B., Brinton, L y Devesa, S. (2004). Male breast cancer similar or different than female breast cancer?. *Breast Cancer Research and Treatment. Division of Cancer Prevention.* 8(1) 77-86.
- [2] Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., ... Sherlock, G. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genet.* 25(1), 25–29. doi:10.1038/75556.Gene
- [3] Ata, A., Kerr, R. G., Moya, C. E y Jacobs, R. S. (2003). Identification of anti-inflammatory diterpenes from the marine gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Tetrahedron.*59 (23) 4215-4222.
- [4] Ata, A., Win, H. Y., Holt, D., Holloway,P., Segstro, E. P.,y Jayatilake, G. S. (2004). New antibacterial diterpenes from *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Helvetica Chimica Acta.* 87(5)1090-1098.
- [5] Bee, A., Ke, Y., Forootan, S., Lin, K., Beesley, C., Forrest, S. E., y Foster, C. S. (2006). Ribosomal protein I19 is a prognostic marker for human prostate cancer. *Clinical Cancer Research. An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12, 2061-2065.doi: 10.1158/1078-0432. CCR-05-2445.
- [6] Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Galon, J. (2009). ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics,* 25. (8) 1091-1093. doi: 10.1093/bioinformatics/btp101.
- [7] Bossis, G., Malnou, E., Farras, R., Andermarcher, E., Hipskind, R., Rodriguez, M., ... Piechaczyk, M. (2005). Down-Regulation of c-Fos / c-Jun AP-1 Dimer Activity by Sumoylation, 25(16), 6964–6979. doi:10.1128/MCB.25.16.6964
- [8] Byrd, P., Srinivasan, V., Last, J. I., Smith, A., Biggs, P., Carney, E. F., Taylor, A.(2012) Severe reaction to radiotherapy for breast cancer as the presenting feature of ataxia telangiectasia. *British Journal of Cancer.* 106 (2), 262–8. doi:10.1038/bjc.2011.534
- [9] Calogero, A., Arcella, A., Giorgia De, G., Porcellini, A., Mercola, D., Liu, C., Lombardi, V., Zani, M., Giannini, G., Caruso, R., Gulino, A., y Frati, L. (2001) The Early Growth

Response Gene EGR-1 Behaves as a Suppressor Gene That Is Down-Regulated Independent of ARF / Mdm2 but not p53 Alterations in Fresh Human Gliomas. *Clinical Cancer Research*.7. 2788–2796.

[10] Chandriani, S., Frengen, E., Cowling, V. H., Pendergrass, S. A, Perou, C. M., Whitfield, M. L., y Cole, M. D. (2009). A core MYC gene expression signature is prominent in basal-like breast cancer but only partially overlaps the core serum response. *PLoS One*. 2009. 4(8), e6693. doi:10.1371/journal.pone.0006693

[11] Chia, C., Y., Kumari, U., y Casey, P. J. (2014). Breast cancer cell invasion mediated by G 12 signaling involves expression of interleukins-6 and -8, and matrix metalloproteinase-2. *Journal of Molecular Signaling*.9(1), 6. doi:10.1186/1750-2187-9-6.

[12] Chun-Ling, V., Jin, R.,Tan, P., Aw, S., Woon, C., y Bay, B.(2003). Progesterone Induces Cellular Differentiation in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Transfected with Progesterone Receptor Complementary DNA. *American Journal of Pathology*, 162(6), 1781–1787.

[13] Cordero, C. (2008). *Estudio de expresión diferencial por análisis de RNA mensajero, como aproximación al conocimiento de mecanismos de citotoxicidad*. (Tesis Doctoral), Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia

[14] Correa, H. (2012). Estudios de bioprospección del coral blando Pseudopterogorgia elisabethae como fuente de sustancias con actividad biológica Fase IV. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

[15] Correa, H., Aristizabal, F., Duque, C., Kerr, R. (2011). Cytotoxic and antimicrobial activity of pseudopterossins and seco-pseudopterossins isolated from the octocoral Pseudopterogorgia elisabethae of San Andrés and Providencia Islands (Southwest Caribbean Sea). *Marine Drugs*. 9(3), 334–343.

[16] Correa, H., Zorro, P., Arevalo, C., Puyana, M., Duque, C. (2012) Possible ecological role of pseudopterossins G and P-U and seco-pseudopterossins J and K from the gorgonian Pseudopterogorgia elisabethae from Providencia Island (SW Caribbean) in regulating microbial surface communities. *Journal of Chemical Ecology*. 38(9), 1190–202.

[17] De benedetti, A., y Graff, J. R. (2004). eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene*. 23(18), 3189–99. doi:10.1038/sj.onc.1207545.

[18] Duque, C., Puyana, M., Narváez, G., Osorno, O., Hara, N., y Fujimoto, Y. (2004). Pseudopterossins P–V, new compounds from the gorgonian octocoral Pseudopterogorgia elisabethae from Providencia island, Colombian Caribbean. *Tetrahedron*, 60(47), 10627–10635.

[19] Duque, C. (2010). Pseudopterogorgia elisabethae de San Andrés y Providencia , una pluma de mar con excelente potencial. *Revista Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales*, XXXIV (ISSN 0370-3908).1–15.

[20] Ebada, S. y Proksch, P. (2011) Marine Organisms and Their Prospective Use in Therapy of Human Diseases. In H. Mehlhorn (Ed.), *Parasitology Research Monographs* 1,



---

Nature Helps. (Nature Hel., pp. 153–189). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-19382-8.

[21] Escobar, L., Rivera, A., Aristizábal, F. (2010). Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 17 (1) 67-74.

[22] Escobar, L. M. (2011). *Estudio de la expresión diferencial génica sobre líneas celulares de cáncer de mama en presencia de withanolido D*. Tesis Maestría. Universidad Nacional de Colombia.

[23] Espinoza, M. (2011). Determinación del efecto de caléndula officinalis sobre los niveles de expresión de marcadores tumorales en cáncer de pulmón. Instituto Politécnico Nacional Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía sección de estudios de posgrado e investigación. Tesis doctoral. México, D.F. .

[24] Ferlay, J., Shin, H., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., y Parkin, D. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 127(12), 2893–917. doi:10.1002/ijc.25516

[25] Fulda, S., Gorman, A., Hori, O., y Samali, A. (2010) Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*, 214074. doi:10.1155/2010/214074.1-23.

[26] Gibbs, J. (2000). Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science*.( 287),1969-1973

[27] Goode, G., Pratap, S., y Eltom, S. (2014). Depletion of the aryl hydrocarbon receptor in MDA-MB-231 human breast cancer cells altered the expression of genes in key regulatory pathways of cancer. *PLoS One*. 9(6), e100103. doi:10.1371/journal.pone.0100103.

[28] Guo, C., Liu, S., Wang, J., Sun, M.-Z., y Greenaway, F. (2013) ACTB in cancer. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 417, 39–44. doi:10.1016/j.cca.2012.12.012

[29] Hanahan, D., y Weinberg, R. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5), 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

[30] Heldin, C.-H. (2013). Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Communication and Signaling* 11, 97. doi:10.1186/1478-811X-11-97.

[31] Hoarau, C., Day, D., Moya, C., Wu, G., Hackim, A., Jacobs, R. S., y Little, R. D. (2008). iso-PsE, a new pseudopterosin. *Tetrahedron Letters*, 49(31), 4604–4606. doi:10.1016/j.tetlet.2008.05.106.

[32] Jiang, P., Enomoto, A., Jijiwa, M., Kato, T., Hasegawa, T., Ishida, M., Takahashi, M. (2008). An actin-binding protein Girdin regulates the motility of breast cancer cells. *Cancer Research*. 68(5), 1310–1318. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5111.

- [33] Katoh, M. (2008). Cancer genomics and genetics of FGFR2. *International Journal of oncology*, 33, 233–237. doi:10.3892/ijo
- [34] Khan, N. J. (2013). Cell Lines: An Invitro Model To Study Breast Cancer. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*. 2 (12), 7214–7219.
- [35] Konstantinovskiy, S., Davidson, B., y Reich, R. (2012). Ezrin and BCAR1/p130Cas mediate breast cancer growth as 3-D spheroids. *Clinical & Experimental Metastasis*. 29(6), 527–40. doi:10.1007/s10585-012-9468-2.
- [36] Kristensen, V. N., Lingjærde, O. C., Russnes, H. G., Volla, H. K. M., Frigessi, A., y Børresen-dale, A.-L. (2014). Principles and methods of integrative genomic analyses in cancer. *Nature Reviews. Cancer*. 14(5), 299–313. doi:10.1038/nrc3721.
- [37] Laubenbacher, R., Hower, V., Jarrah, A., Torti, S., Mendes, P., Torti, F., y Akman, S. (2009). A Systems Biology View of Cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1796(2), 129–139.
- [39] Li, J. N., Zhao, L., Wu, J., Wu, B., Yang, H., Zhang, H. H., y Qian, J. M. (2012). Differences in gene expression profiles and carcinogenesis pathways between colon and rectal cancer. *Journal of Digestive Diseases*. 13 (1), 24–32. doi:10.1111/j.1751-2980.2011.00551.
- [40] Look, S. A., Fenical, W., Jacobs, R. S., Clardy, J. (1986). The pseudopterosins: anti-inflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 6238-6240.
- [41] López, M. Mallorquín, P. y Vega M. (2002). Microarray y Biochips de ADN. Fundación Española para el desarrollo de la investigación en Genómica y Proteómica. Recuperado de <http://www.cecalc.ula.ve/bioinformatica/BIOTUTOR/Microarrays.pdf>
- [42] López, F. J., Philippe, G., Kripa, B. S., & Jianxin., Z. (2014). Coordinate Transcriptional and Translational Repression of p53 by TGF 1 Impairs the Stress Response. *Mol Cell*. 50(4), 552–564. doi:10.1016/j.molcel.2013.04.029.Coordinate.
- [43] Marchini, S., Marrazo, E., Bonomi, R., Chiorino, G., Zaffaroni, M., Weissbach, L., Hornicek, F., Brogini, M., Fairclotc, G., D'incalci, M. (2005). Molecular characterization of two human cancer cell lines selected in vitro for their chemotherapeutic drug resistance to ET-743. *European Journal of Cancer*. 41, 323-333.
- [44] McClure, R y Massari, P. (2014). TLR-Dependent Human Mucosal Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens. *Frontiers in Immunology*. 386. doi:10.3389/fimmu.2014.00386.
- [45] Mcculloch, M. W. B., Haltli, B., Marchbank, D. H., y Kerr, R. G. (2012). Evaluation of pseudopteroxazole and pseudopterosin derivatives against *Mycobacterium tuberculosis* and other pathogens. *Marine Drugs*. 10(8), 1711–28. doi:10.3390/md10081711.
- [46] Meijers-Heijboer, H., van den Ouweland, A., Klijn, J., Wasielewski, M., de Snoo, A., Oldenburg, R., ... Stratton, M. R. (2002). Low-penetrance susceptibility to breast cancer

---

due to CHEK2(\*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nature Genetics*, 31(1), 55–59.

[47] Michailidou, K., Hall, P., Gonzalez-Neira, A., Ghoussaini, M., Milne, R., Schmidt, M., Nevanlinna, H.,...Meindl, A. (2013). Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nat Genet.* 45(4), 353–361. doi:10.1038/ng.2563.Large-scale

[48] Mydlarz, L., Jacobs, R., Boehnlein, J., y Kerr, R., (2003) Pseudopterostin Biosynthesis in *Symbiodinium* sp ., the Dinoflagellate Symbiont of *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Chemistry & Biology*. 10, 1051–1056. doi:10.1016/j.

[49] Newman, D., Cragg, G. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod.* 70(3), 461-77.

[50] Oh, K., Ko, E., Kim, H., Park, A., Moon, H., Noh, D., y Lee, D.-S. (2011). Transglutaminase 2 facilitates the distant hematogenous metastasis of breast cancer by modulating interleukin-6 in cancer cells. *Breast Cancer Research: BCR*, 13(5), R96. 1-12

[51] Parra, A. y Aristizábal, F. (2011). Evaluación in vitro de actividad antitumoral de compuestos de origen natural y sintético sobre líneas celulares neoplásicas humanas. *Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*. 1–39.

[52] Pereira, C. Guhl, F. y Duque, C. (2009). Organismos marinos: fuente asombrosa de compuestos útiles para la humanidad. In Editora Guadalupe (Ed.), tendencias y futuro de la investigación en parasitología y en productos naturales. (pp. 1–486). Bogotá, D.C., Colombia.: Memorias del Seminario Internacional ACOFACIEN-ACCEFYN.

[53] Perk, J., Iavarone, A., y Benezra, R. (2005) Id family of helix loop helix proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 5, 603-614 doi:10.1038/nrc1673.

[54] Pinzón, C., Serrano, M., y Sanabria, M. (2009). Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K / Akt ) en humanos. *Revista Ciencias de la Salud*. 7(2), 47–66.

[55] Pleasance, E., Cheetham, R., Stephens, P., McBride, D., Sean, J., Greenman, C.,... Stratton, M. (2010). A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature*. 463(7278), 191–196. doi:10.1038/nature08658., 463(7278), 191–196. doi:10.1038/nature08658.A

[56] Puyana, M., Narvaez, G., Paz, A., Osorno, O., Duque, C. (2004) Pseudopterostin content variability of the purple sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* at the islands of San Andres and Providencia (SW Caribbean). *Journal of Chemical Ecology*, 30(6), 1183–1201.

[57] Rahman, N., Seal, S., Thompson, D., Kelly, P., Renwick, A., Elliott, A., ... Stratton, M. (2007). PALB2 , which encodes a BRCA2-interacting protein , is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet*, 39(2), 165–167.

[58] Rastogi, R., Richa, R., Singh, S., Häder, D. (2013). Photoprotective compounds from marine organisms. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 37(6), 537–358.

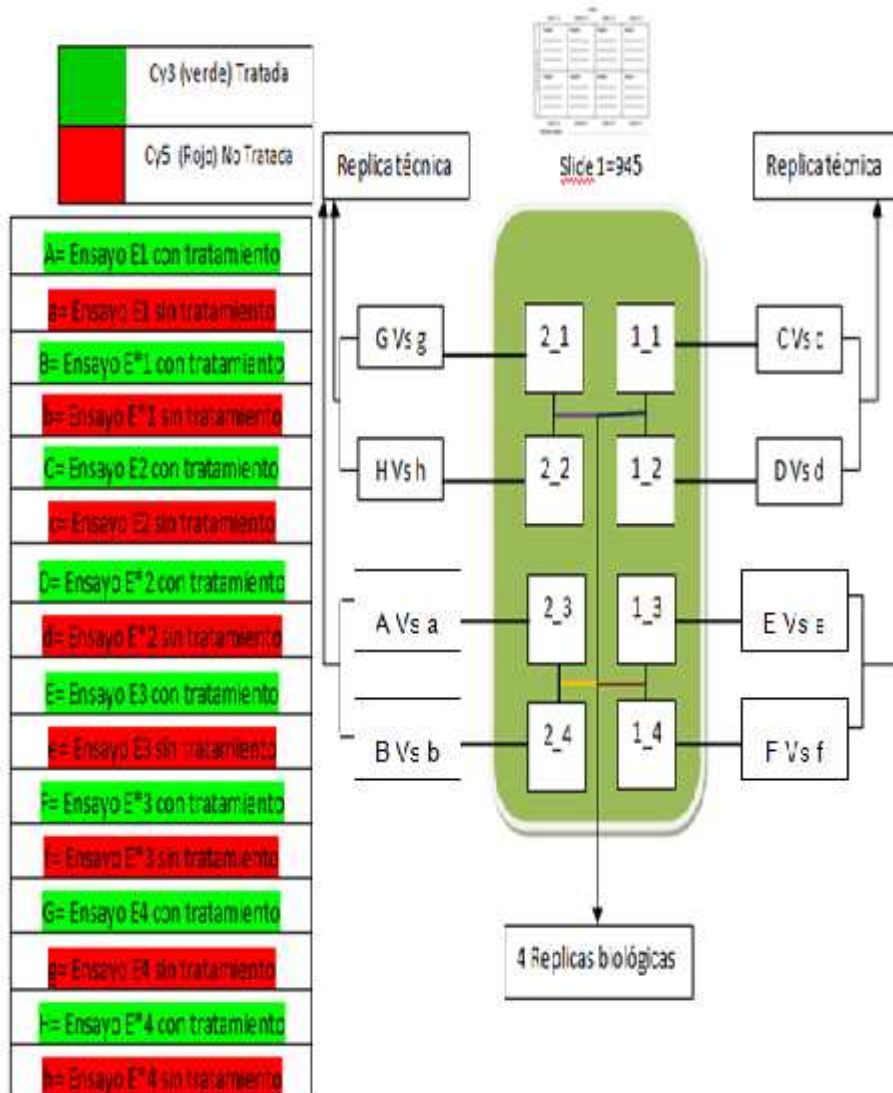
- [59] Ritchie, M., Silver, J., Oshlack, A., Holmes, M., Diyagama, D., Holloway, A.,... Smyth, G. (2007). A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics*. 23(20), 2700–2707. doi:10.1093/bioinformatics/btm412.
- [60] Rodríguez, I., Shi, Y., García, O., Rodríguez, A., Mayer, A., Sánchez, J., González, J. (2004). New pseudopterosin and seco-pseudopterosin diterpene glycosides from two Colombian isolates of *Pseudopteroorgia elisabethae* and their diverse biological activities. *Journal of Natural Products*. 67(10), 1672–1680.
- [61] Rosen, L., Ashurst, H., y Chap, L. (2010). Targeting signal transduction pathways in metastatic breast cancer: a comprehensive review. *The Oncologist*, 15(3), 216–35. doi:10.1634/theoncologist.2009-0145
- [62] Roussis, V., Wu, Z., Fenical, W., Strobel, S., Van Duyne., Clardy, J. (1990). New antiinflammatory pseudopterosins from the marine octocoral *Pseudopteroorgia elisabethae*. *Journal. Org. Chem.*, 55, 4916-4922
- [63] Saito, R., Smoot, M., Ono, K., Ruschinski, J., Wang, P., Lotia, S.,... Ideker, T. (2012). A travel guide to Cytoscape plugins. *Nature Methods*. 9(11), 1069–1076. doi:10.1038/nmeth.2212.
- [64] Saucedo cuevas, L. (2013). *Identificación de genes candidatos involucrados en la progresión y la patogénesis del cáncer de mama*. Tesis Doctorado, Universidad Autónoma de Madrid.
- [65] Sausville, E., Johnson, J. (2000). Molecules for the millennium: how will they look? New drug discovery year 2000. *British Journal of Cancer* 83 (11), 1401-1404.
- [66] Seringhaus Michael y Gerstein Mark. (2009) ¿Qué es la ontología génica?. *Investigación y Ciencia*, 390, marzo de 2009, págs. 73-81. <http://es.scribd.com/doc/184085697/Investigacion-y-ciencia-390-Marzo-2009#scribd>
- [67] Sharon Cantor y Shawna Guillemette. (2011). Hereditary breast cancer and the BRCA1-associated FANCI/ BACH1/BRIP1. *Future Oncol.* 7(2), 253–261. doi:10.2217/fon.10.191.
- [68] Sikder, H., Devlin, M., Dunlap, S., Ryu, B., y ALANi, R. (2003). Id proteins in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell* 3, 525–530.
- [69] Simmons, T., Andrianasolo, L., Mcphail, E., Flatt, P., y Gerwick, W. (2005). Marine natural products as anticancer drugs. Minireview Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4 (College of Pharmacy, Oregon). (2) 333–342.
- [70] Singhi, A., Cimino-Mathews, A., Jenkins, R., Lan, F., Fink, R., Nassar, H., ... Argani, P. (2012). *Mod Pathol*. NIH Public Access, 25(3), 378–387. doi:10.1038/modpathol.2011.171.MYC

- 
- [71] Smyth, Gordon K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*. 3(1), 1-25. doi:10.2202/1544-6115.1027.
- [72] Smyth, G., Michaud, J., y Scott, S. (2005). Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics*. 21, 2067–2075.
- [73] Smyth, G., y Speed, T. (2003). Normalization of cDNA microarray data. *Methods*. 31, 265–273. doi:10.1016/S1046-2023(03)00155-5.
- [74] Spriggs, K., Bushell, M., y Willis, A. (2010). Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Molecular Cell*. 40(2), 228–37. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.028.
- [75] Stonik, V. A. (2009). Marine natural products: a way to new drugs. *Acta Naturae*. 1(2), 15–25.
- [76] Takashima, A. y Faller, D. (2013). Targeting the RAS oncogene. *NIH Public Access. National Institute of Health*, 17(5), 507–531. doi:10.1517/14728222.2013.764990.
- [77] Takeda, K., y Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*, 16(1), 3–9.
- [78] Vanlangenakker, N., Vanden, B., y Vandenabeele, P. (2012). Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell Death and Differentiation*, 19(1), 75–86. doi:10.1038/cdd.2011.164. 2012.
- [79] Vargo-Gogola, T., y Rosen, J. (2007). Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature Reviews Cancer*, 7(9), 659–72.
- [80] Viera, I., Sauti, M., Mart, C., Hern, L. (2010). Un acercamiento a la ontología de genes y sus aplicaciones. Centro Nacional de Genética Médica *MINSAP*. 1-25.
- [81] Walker, L., Fredericksen, Z., Wang, X., Tarrell, R., Pankratz, V.,...Couch, F. (2010). Evidence for SMAD3 as a modifier of breast cancer risk in BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Research* 12(6), 2-10.
- [82] Williams, G. C., y Chen, J. (2012). Resurrection of the octocorallian genus *Antillologorgia* for Caribbean species previously assigned to *Pseudopterogorgia*, and a taxonomic assessment of the relationship of these genera with *Leptogorgia* (Cnidaria, Anthozoa, Gorgoniidae). *Zootaxa*. (3505), 39-52.
- [83] Yang, Y., y Thome, N. (2003). Normalization for Two-color cDNA Microarray Data. *Lecture Notes--Monograph Series*. 40, 403–418. doi:10.1214/lnms/1215091155.
- [84] Young Han Lee. (2014). EGR1 (Early Growth Response 1). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 18(8), 584–593. doi:10.4267/2042/54014.

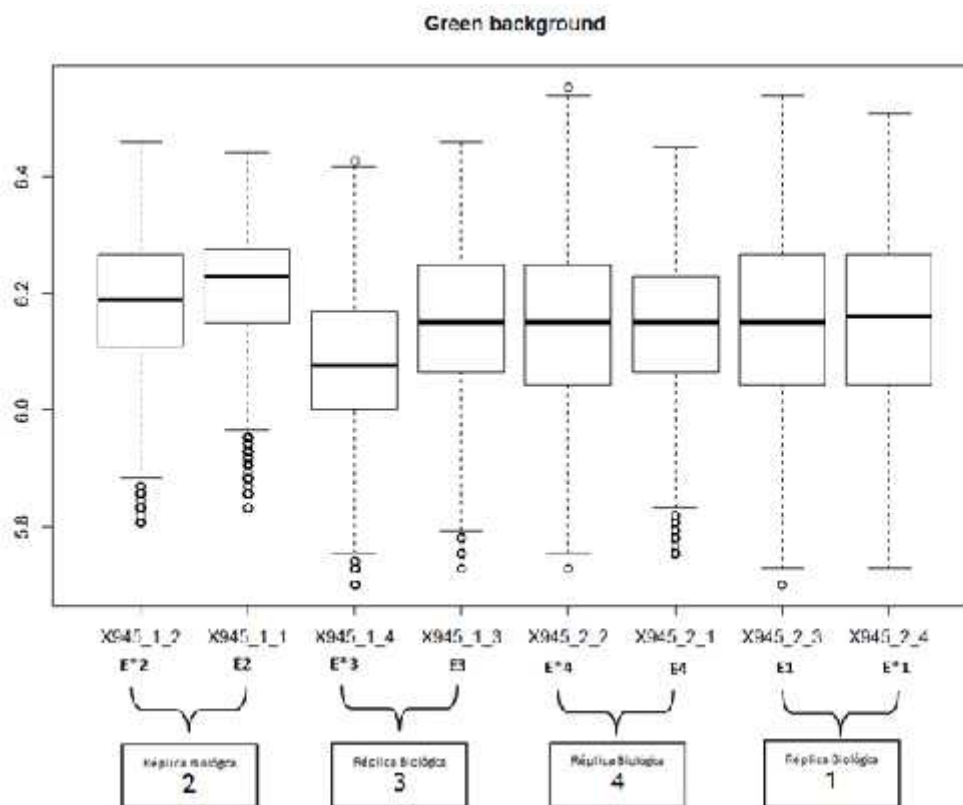


## A. ANEXO: Disposición de muestras cDNA en cada uno de los 8 arreglos del slide o porta.

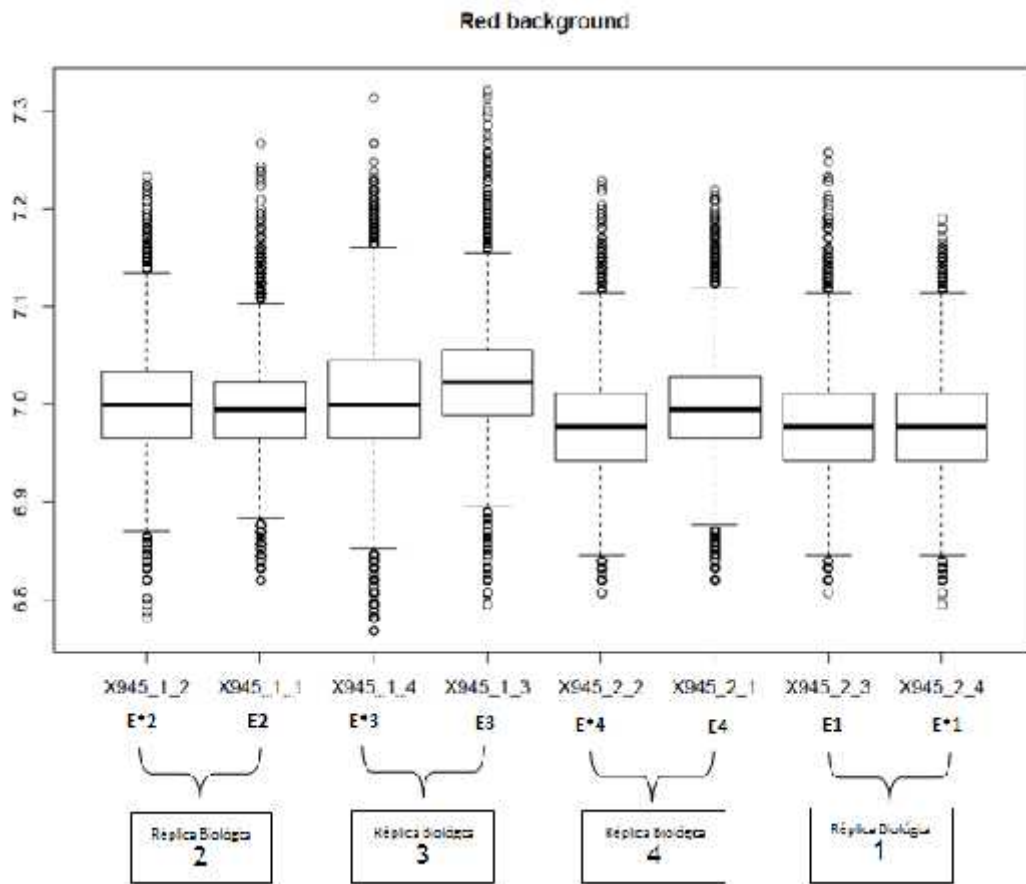
Una línea celular (MDA-MB231) por 1 concentración del compuesto PSQ, por 2 tratamientos (Células expuestas al compuesto "Tratamiento PsQ" Vs. Células No Tratadas "control"), por 2 réplicas técnicas ó duplicados (Ej. E1 y E1\*) por 4 réplicas biológicas realizadas en diferentes días (E1E1\* hasta E4E4\*).



**B. ANEXO: Gráfica de valores de intensidad verde y roja, previo a la corrección de ruido de fondo (“background”).**







## C. ANEXO: Gráfica Buena calidad de los datos, reproducibilidad estadística microarreglo de expresión génica Agilent.

Valores intensidades medias de las 8 matrices con las mismas distribuciones empíricas después del proceso de normalización en el arreglo utilizando el método de Loess, seguido por un proceso de sumarización utilizando el método de promedios y normalización entre arreglos con el método Aquantile.

