



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

---

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

## **EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y EPIGENÉTICO DEL BÓRAX EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA MCF-7**

**PRESENTA**

**IBt. NURIA AHYLET MARTÍNEZ MANUEL**

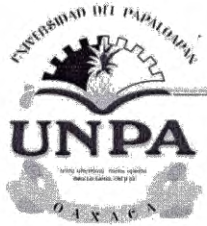
Para obtener el grado

**Maestra en Biotecnología**

**Director de Tesis  
Dr. Miguel Ángel Peña Rico**

**Co-Director de Tesis  
Dr. Adolfo López Torres**

**San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. Septiembre, 2020**



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2020/MBt/009
ASUNTO	Asignación de jurado de examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 13 de julio de 2020

**C. NURIA AHYLET MARTÍNEZ MANUEL**  
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García	Universidad del Papaloapan	Presidente
Dr. Miguel Ángel Peña Rico	Universidad del Papaloapan	Secretario
Dra. Alejandra Contreras Ramos	Hospital Infantil de México Federico Gómez	Vocal
Dra. Jacqueline Capataz Tafur	Universidad del Papaloapan	1er Suplente
Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín	Universidad del Papaloapan	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

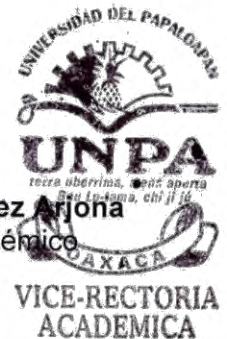
Atentamente

*terra uberrima, mens aperta*  
Bou Lo-tama, chi jí jú



**Dr. Adolfo López Torres**  
Jefe de la División de Estudios  
de Posgrado

**M. en C. Héctor López Arjona**  
Vice-rector Académico  
Vo. Bo.



C.c.p. Dr. Miguel Ángel Peña Rico – Director de tesis.  
C.c.p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares.  
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.  
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.  
Tel. 01(287)8759240

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.  
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.  
Tel. 01(281)8729230





# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2020/0187
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 7 de septiembre de 2020

M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA  
VICE-RECTOR ACADÉMICO  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Biotecnología de la **C. Nuria Ahylet Martinez Manuel**, matrícula **17140009**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título **“Evaluación del efecto citotóxico y epigenético del bórax en la línea celular de cáncer de mama MCF-7”**, para su posterior presentación y defensa por parte de la sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

*terra uberrima, mens aperta*  
Bau Lo-tama, chí jí jú



Dr. Adolfo López Torres  
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. C. Nuria Ahylet Martinez Manuel – Estudiante  
C.c.p. M.E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares  
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC  
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial,  
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.  
Tel. 01(287)8759240

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

CAMPUS LOMA BONITA  
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.  
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.  
Tel. 01(281)8729230



## RECONOCIMIENTO

Esta tesis fue realizada en los Laboratorios de Innovación Tecnológica Sustentable en Materiales y Nanotecnología (LITSUS-MN), y Análisis Instrumental de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Peña Rico y la codirección del Dr. Adolfo López Torres.

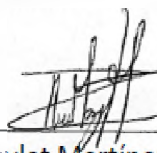
La investigación fue realizada bajo el financiamiento de la beca CONACyT con número de becario 872549, perteneciente al programa de Maestría en Biotecnología con registro PNPC 003131.

## CARTA DE RESPONSABILIDAD

Por medio de la presente hacemos constar que el trabajo de tesis "*Evaluación del efecto citotóxico y epigenético del bórax en la línea celular de cáncer de mama MCF-7*", es responsabilidad de los C. Dr. Miguel Ángel Peña Rico, Dr. Adolfo López Torres, e IBt. Nuria Ahylet Martínez Manuel, y que ni los datos experimentales ni el texto han sido aceptados o empleados para el otorgamiento de título, grado diferente o adicional al actual en el país o en el extranjero. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas y esta fue examinada por un comité tutorial, conformado por: *Dra. Jacqueline Capataz Tafur*, *Dr. Genaro Vázquez Víctorio*, y *Dr. Miguel Ángel Peña Rico*, así como un jurado de examen: *Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García*, *Dra. Alejandra Contreras Ramos*, y *Dr. Miguel Ángel Peña Rico*, de acuerdo con el Reglamento General de Posgrado vigente, con la finalidad de darle seguimiento al estudiante, así como validar que es un trabajo de investigación original e inédito.

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca a 01 de septiembre del 2020.

ATENTAMENTE,



Nuria Ahylet Martínez Manuel



Dr. Miguel Ángel Peña Rico



Dr. Adolfo López Torres

## AGRADECIMIENTOS

A mi *alma máter*, UNPA Campus Tuxtepec.

A mis asesores, Dr. Miguel Ángel Peña Rico, y Dr. Adolfo López Torres.

A mi comité revisor semestral, Dra. Jacqueline Capataz Tafur, Dr. Genaro Vázquez Victorio, y Dr. Miguel Ángel Peña Rico, por sus valiosas aportaciones en cada una de las evaluaciones del mismo.

A mi comité revisor de tesis, Dra. Alejandra Contreras Ramos, Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín, Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García, y Dr. Miguel Ángel Peña Rico, por las sugerencias al presente trabajo.

Al Laboratorio de Innovación Tecnológica Sustentable en Materiales y Nanotecnología (LITSUS-MN), y a los laboratorios de Biología Molecular, Químico Biológico, Bioprocesos, Fisicoquímica, Orgánica, Instrumental y MS.

Al Dr. Genaro Vázquez Victorio, Dra. Beatriz Díaz Bello y al Dr. Mathieu Hautefeuille, por recibirme en el LaNSBioDyT con la mejor disposición para mi capacitación en cultivo celular y otras técnicas moleculares. Asimismo, a todo su equipo de trabajo.

A la Dra. Luz del Carmen Camacho Castillo del Instituto Nacional de Pediatría (INP) por las células de cáncer donadas.

Al Dr. Julián Mario Peña Castro, por facilitarme el espectrofotómetro NanoDrop.

A Cecilia Isabel Mayo Montor (Cecy), por apoyarme en MS para la última parte experimental.

A CONACyT, por el financiamiento del proyecto mediante la beca otorgada en el posgrado 2017-2019, y por la beca mixta para movilidad nacional (01/08/2018-30/09/2018), que me permitió desarrollar la capacitación en cultivo celular en el LaNSBioDyT, Facultad de Ciencias UNAM, fundamental para este trabajo.

## DEDICATORIA

A mis padres, principalmente, por ser la base de mis logros personales y académicos, por depositar su confianza en mí y apoyarme incondicionalmente.

A Dios, porque su presencia es inmensa.

A mi hermano Jans, y a mis sobrinitos, mi Nandito y mi Ly, porque espero también tengan la dicha de crecer profesionalmente.

A mis profesores de la carrera Ingeniería en Biotecnología Generación 2012-2017, quienes me inspiraron a dedicarme a la ciencia y a su divulgación. Asimismo, a los catedráticos durante el posgrado, por seguir contribuyendo a mi formación académica, y a mis deseos de ser científica.

A mis compañeros de la Maestría en Biotecnología y Ciencias Químicas Generación 2017-2019, Alán, Sosa, MaFer, Toño, Jere, Misa, Bety, Dulce, Chivis, Thalía, Mitzzy; por la convivencia durante esta importante etapa, y a quienes deseo lo mejor. En especial, a las amistades que la maestría me permitió formar, a quienes aprecio mucho por los momentos compartidos más allá de lo académico: Toño, MaFer, Dulce, Chivis, Alán.

A ti mi Gaby (mija), por todos los ánimos que siempre me das, y que nunca faltaron durante la escritura de mi tesis. Por acompañarme a la distancia; por más años que tengamos la fortuna de seguir cultivando esta amistad, sobre todo en los peores momentos.

A ti Fany (Minie), por los buenos momentos en la UNPA y esas largas pláticas, porque a pesar del tiempo, aún conservamos la amistad.

A las amistades del grupo de trabajo, Lore, Bren, Kare, Sofi, Diego, por permitirme conocerlos un poco más, y llevarme gratas vivencias.

Finalmente, me siento dichosa de haber formado parte de la comunidad del LaNSBioDyT, haber sido recibida por todos con la mejor disposición. Fue realmente muy grato aprender sobre cultivo celular y otras técnicas en sus laboratorios.

## RESUMEN

El cáncer es un conjunto de enfermedades cuya característica principal es la proliferación celular descontrolada, y tiene la capacidad de invadir tejidos del organismo. Su clasificación depende de la localización anatómica o del órgano afectado. El cáncer de mama (BC) es la neoplasia de mayor incidencia en mujeres a nivel mundial, y en México ocupa el segundo lugar. El tratamiento depende del tipo de neoplasia, siendo mayormente eficaz en el diagnóstico oportuno. En particular, para el BC, sus alternativas terapéuticas están en función del subtipo, y comprenden desde cirugía en combinación con radioterapia para etapas tempranas, hasta quimioterapia, terapia hormonal, dirigida e inmunoterapia para etapas avanzadas. Sin embargo, debido a la heterogeneidad del BC derivada de su tumor primario, los tratamientos disponibles siguen teniendo como factor limitante la resistencia a los medicamentos y los efectos secundarios. Por tanto, la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos, y el desarrollo de estrategias más efectivas que potencialicen el efecto antineoplásico de los fármacos empleados, además de la reducción de sus efectos secundarios, es de gran interés. En este sentido, se destaca el efecto citotóxico, antiproliferativo y apoptótico de compuestos de boro (B) en cáncer. En específico se señala la actividad citotóxica y apoptótica del bórax en cáncer de hígado y en leucemia. Con base en esto, en el presente estudio se evaluó el efecto citotóxico del bórax en B.C. Los resultados demostraron la inhibición del crecimiento de MCF-7 por exposición a bórax a un  $IC_{50}$  de 9.042 mM, asociado a la inducción de apoptosis ambas vías, preferencialmente vía mitocondrial mediante la regulación positiva de caspasas 3, 8 y 9. Asimismo, su evaluación en PBMCs y HAEC no demostró efecto citotóxico. Finalmente, el análisis del grado de metilación global del ADN en MCF-7 señaló el efecto epigenético del bórax sobre BC, mediante el incremento del porcentaje de 5mdC sobre su patrón de hipometilación global del ADN, característica del cáncer. Este trabajo determinó el efecto citotóxico, apoptótico y epigenético del bórax en MCF-7.

**Palabras clave:** cáncer de mama, bórax, apoptosis, metilación del ADN, PBMCs, HAEC.

## ABSTRACT

*Background:* Cancer is a group of diseases whose main characteristic is uncontrolled cell proliferation and has the ability to invade body tissues. Its classification depends on the anatomical location or the affected organ. Breast cancer (BC) is the most frequent carcinoma in females, which could be classified into 4 subtypes and the current treatment is still far from satisfactory.

*Methods:* In this study, we explored the pathways underlying the growth inhibition induced by borax in MCF-7 cells. The effects of borax on MCF-7 cell viability were characterized using MTT. Apoptosis was also verified by RT-qPCR

*Results:* Our results demonstrated the inhibition of MCF-7 growth by exposure to borax at an IC<sub>50</sub> of 9,042 mM, associated with the induction of apoptosis in both pathways, preferentially intrinsic pathway by increasing of the expression increased of mRNA levels of caspase 3, 8 and 9. In addition, the evaluation in PBMCs and HAEC cells did not show cytotoxic effect. Also, the analysis of global DNA methylation in MCF-7 demonstrated the epigenetic effect of borax on BC, by increasing the percentage of 5mdC on its global DNA hypomethylation pattern, characteristic of cancer.

*Conclusion:* This work determined the cytotoxic, apoptotic, and epigenetic effects of borax on MCF-7.

**Keywords:** Breast cancer, borax, apoptosis, MCF-7 cells, DNA methylation, PBMCs, HAEC cells.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	VII
ABSTRACT .....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XV
LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	XVI
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEÓRICO .....	4
II.1. Generalidades del cáncer de mama .....	4
II.1.1. Clasificación .....	4
II.1.2. Factores de riesgo.....	5
II.1.3. Tratamiento .....	7
II.2. Mecanismos de muerte celular .....	10
II.2.1. Autofagia .....	10
II.2.2. Senescencia .....	12
II.2.3. Apoptosis .....	13
II.2.3.1. Vía intrínseca .....	13
II.2.3.2. Vía extrínseca .....	14
II.2.4. Necrosis .....	16
II.2.5. Otros mecanismos de muerte .....	17
II.3. Efectos biológicos de compuestos de B .....	18
II.3.1. Propiedades y fuentes de B.....	18
II.3.2. Mecanismos de acción del B .....	19
II.3.3. Importancia del B en plantas.....	20

II.3.4. Importancia del B en la salud animal y humana .....	20
II.3.4.1. Actividad hormonal .....	21
II.3.4.2. Estrés oxidativo .....	21
II.3.4.3. Actividad anti-inflamatoria.....	23
II.3.4.4. Actividad antineoplásica.....	24
II.3.5. Bórax y otros efectos biológicos.....	25
II.3.6. Compuestos borónicos.....	26
II.4. Epigenética .....	28
II.4.1. Metilación del ADN.....	30
II.4.1.1. Metilación del ADN de mantenimiento y desmetilación .....	32
II.4.1.2. Metilación del ADN de novo.....	33
II.4.1.3. Metilación global y específica del ADN .....	33
II.4.2. Modificaciones de histonas .....	40
II.4.2.1. Acetilación de histonas.....	40
II.4.2.2. Metilación de histonas .....	42
II.4.2.3. Fosforilación de histonas.....	42
II.4.3. Expresión de ncARNs .....	42
II.4.4. Moduladores epigenéticos y progresión del cáncer .....	43
III. JUSTIFICACIÓN .....	49
IV. HIPÓTESIS .....	50
V. OBJETIVOS .....	50
V.1. Objetivo general .....	50
V.2. Objetivos específicos.....	50

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
VI.1. Equipo de Laboratorio.....	52
VI.1.1. Instrumentación analítica .....	52
VI.1.2. Equipo para para el procesamiento de muestras .....	52
VI.2. Reactivos y estándares.....	53
VI.2.1. Reactivos para cultivo celular.....	53
VI.2.2. Reactivos para extracción de ácidos nucleicos .....	53
VI.2.3. Reactivos para hidrólisis de gADN, alcalinización y desfosforilación.....	53
VI.2.4. Reactivos y estándares para metilación global del ADN por UPLC-HRMS.....	53
VI.3. Métodos .....	54
VI.3.1. Condiciones de cultivo celular.....	54
VI.3.2. Cultivo de MCF-7 .....	54
VI.3.3. Ensayo de viabilidad celular MTT en MCF-7 por exposición a bórax concentración respuesta .....	55
VI.3.4. Ensayo de viabilidad celular MTT en MCF-7 por exposición a bórax curso temporal .....	55
VI.3.5. Extracción de gADN.....	56
VI.3.6. Hidrólisis enzimática, alcalinización y desfosforilación de gADN .....	57
VI.3.7. Condiciones de separación y detección de dC y 5mdC mediante UPLC-HRMS .....	57
VI.3.8. Extracción de ARN .....	59
VI.3.9. Síntesis de cADN.....	60
VI.3.10. Técnica qPCR .....	60
VI.3.11. Cultivo de PBMCs .....	62

VI.3.12. Ensayo de viabilidad celular MTT en PBMCs por exposición a bórax curso temporal .....	63
VI.3.13. Ensayo de viabilidad celular en HAEC por exposición a bórax concentración respuesta .....	63
VI.3.14. Análisis estadístico .....	64
VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	65
VII.1. Evaluación de la citotoxicidad del bórax concentración respuesta en MCF-7 .....	65
VII.1.2. Análisis morfológico de MCF-7 por exposición a bórax .....	68
VII.2. Evaluación de la citotoxicidad del bórax curso temporal en MCF-7 .....	69
VII.3. Análisis de la expresión génica asociada a apoptosis en MCF-7 .....	71
VII.4. Determinación del grado de metilación global del ADN en MCF-7 .....	76
VII.5. Evaluación de la citotoxicidad del bórax curso temporal en PBMCs .....	82
VII.5.1 Análisis de la expresión génica asociada a apoptosis en PBMCs .....	85
VII.6. Evaluación de la citotoxicidad del bórax concentración respuesta en HAEC .....	87
VIII. CONCLUSIONES .....	88
IX. PERSPECTIVAS .....	90
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estimación de nuevos casos de cáncer a nivel mundial .....	4
Figura 2. Mecanismo de autofagia .....	11
Figura 3. Senescencia celular y procesos fisiológicos involucrados .....	12
Figura 4. Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis.....	15
Figura 5. Tipos comunes de necrosis en tejidos humanos.....	16
Figura 6. Otras formas de muerte celular.. .....	17
Figura 7. Estructura química del ácido bórico y bórax. ....	18
Figura 8. Fármacos a base de B aprobados por la FDA. ....	26
Figura 9. Arquitectura de la cromatina en células eucariotas.....	28
Figura 10. Elementos modificadores reguladores de la cromatina .....	29
Figura 11. Eventos epigenéticos.....	30
Figura 12. Metilación de la citosina.....	31
Figura 13. Metilación del ADN y desmetilación del ADN .....	32
Figura 14. Espectro de masas de dC.....	34
Figura 15. Espectro de masas de 5mdC.....	35
Figura 16. Espectro de masas de 5hmdC.....	36
Figura 17. Regulaciones epigenéticas en cáncer.....	43
Figura 18. Diagrama experimental .....	51

Figura 19. Cromatogramas UPLC-MS de dC y 5mdC ..... 58

Figura 20. Dímeros iónicos de dC y 5mdC ..... 58

Figura 21. Capas de los componentes celulares de la sangre ..... 62

Figura 22. Curva concentración respuesta del efecto citotóxico del bórax en MCF-7 ..... 67

Figura 23. Evaluación de la citotoxicidad a 24 h por exposición a bórax en MCF-7. .... 67

Figura 24. Cambios morfológicos de MCF-7 por exposición a bórax ..... 69

Figura 25. Curva concentración respuesta curso temporal del efecto citotóxico del bórax en MCF-7..... 70

Figura 26. Evaluación de la citotoxicidad a 24 h, 48 h y 72 h por exposición a bórax en MCF-7..... 71

Figura 27. Niveles de expresión de caspasas 3, 8 y 9 en MCF-7. .... 75

Figura 28. Relación del porcentaje de metilación global del ADN por exposición a bórax en MCF-7..... 77

Figura 29. Cromatogramas UPLC-HRMS de dC y 5mdC. .... 81

Figura 30. Curva concentración respuesta curso temporal del efecto citotóxico del bórax en PBMCs..... 84

Figura 31. Evaluación de la citotoxicidad por exposición a bórax en PBMCs ..... 84

Figura 32. Niveles de expresión de caspasas 3, 8 y 9 en PBMCs..... 86

Figura 33. Evaluación de la citotoxicidad por exposición a bórax en HAEC..... 87

Figura 34. Mecanismo propuesto para el efecto del bórax en MCF-7..... 89

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Subtipos moleculares/intrínsecos de BC .....	5
Tabla 2. Mecanismos de los principales antineoplásicos para el BC.....	8
Tabla 3. Compuestos derivados de fuentes naturales con efecto antimetastásico en BC... .	9
Tabla 4. Compuestos usuales de B.. .....	19
Tabla 5. Porcentajes de metilación global del ADN en diferentes muestras .....	37
Tabla 6. Métodos para análisis de metilación del ADN.....	38
Tabla 7. PTMs más frecuentes, su localización y funciones.....	41
Tabla 8. Principales elementos epigenéticos y sus fases de pruebas clínicas.....	44
Tabla 9. Medicamentos epigenéticos aprobados por la FDA.....	45
Tabla 10. Inhibidores BETs.....	47
Tabla 11. Mezcla de reacción de qPCR.....	60
Tabla 12. Secuencias sentido y antisentido de iniciadores .....	61
Tabla 13. Condiciones del ciclo térmico de la qPCR.....	61
Tabla 14. Efecto del bórax sobre el porcentaje de metilación global del ADN en MCF-7....	76

**LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS****Abreviatura****Significado**

2dC	2'-desoxicitosina
5-Aza-CdR	5-aza-2'-desoxicitidina
5-Aza-CR	Azacitidina
5caC	5-carboxicitosina
5fC	5-formilcitosina
5fdC	5-fluoro-2'-desoxicitidina
5hmdC	5-hidroximetil-2'-desoxicitosina
5mC	5-metil-2'-desoxicitosina
5mdC	5-metil-2'-desoxicitidina
8-OHdG	8-hidroxi-2'desoxiguanosina
A	Adenina
a.a.	aminoácido
A2780	Línea humana de cáncer de ovario
A549	Línea humana de cáncer de pulmón
Ac-CoA	Acetil coenzima A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNasa I	Desoxirribonucleasa I
ADP	Fosfato de adenosina
AFB1	Aflatoxina B1
Akt	Proteína cinasa B
Akt1	Proteína cinasa 1 serina/treonina
AnAC	Ácido anacárdico
ANOVA	Análisis de varianza
Apaf-1	Activador apoptótico factor 1
ARNasa	Ribonucleasa
ARNs	Ácidos ribonucleicos
ATF-6	Factor de transcripción activador 6
ATM	Gen ataxia telangiectasia alterada
ATP	Adenosín trifosfato
ATT	Tetraborato de amonio
B	Boro
BAD	Agonista asociado a BCL-2
BAK	Proteínas pro-apoptótica
BALB/c	Cepa de ratón albino
Bax	Proteína pro-apoptótica 4 análoga a BCL-2
BC	Cáncer de seno/cáncer de mama
BCL-2	Familia de proteínas pro y anti-apoptóticas
BCL-W	Proteína anti-apoptótica
BCL-X <sub>L</sub>	Proteína anti-apoptótica
BER	Reparación por escisión de bases
BET	Familia de proteínas de BRD y dominio extraterminal
-BH3	Dominio BH3
BID	Agonista de muerte –BH3
BIM	Proteína 11 análoga a BCL-2



BRCA	Gen de cáncer de mama (BR, Breast; CA Cancer)
BRD	Bromodominio
BTZ	Bortezomib
C	Citosina
cADN	ADN complementario
CAT	Catalasa
CCl <sub>4</sub>	Tetracloruro de carbono
CDDP	cis-diaminodicloroplatino (II)
CDH1	Gen gástrico difuso hereditario
CF	Fructoborato de calcio
CH	Hipertrofia cardíaca
CHECK	Gen del cromosoma 22
CIAP	Fosfatasa alcalina
CID	Disociación inducida por colisión
circARNs	ARNs circulantes
CMI	Mediadores de inflamación
CRDs	Cromodominios
CS	Sedimento celular
CTCL	Linfoma cutáneo de células T
CYC	Ciclofosfamida
Cyp	Ciclofilina
Cyt	Citocromo
Cyt c	Citocromo c
dA	2'-desoxicitidina
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dC	2'-desoxicitidina
DDIT3	Factor de transcripción asociado a daño al ADN
DED	Dominio efector de muerte
dG	2'-desoxiguanosina
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNMTs	ADN metiltransferasas
DNMTs1	ADN metiltransferasas 1
DNMTs3	ADN metiltransferasas 3
DOX	Doxorrubicina
DPBA	2-aminoetil difenil borato
dsADN	ADN bicatenario
dT	2'-desoxitimidina
DU-145	Línea humana de cáncer de próstata
E2	17β-estradiol
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
EMR	Elementos modificadores reguladores
EPR	Retículo endoplásmico
ER	Receptor de estrógeno
Erk1/2	Proteína cinasa 1 y 2 regulada por señales extracelulares
ESI	Ionización por electrospray

ESR	Tasa de sedimentación eritrocítica
EtOH	Etanol/alcohol etílico
EZH2	Gen de histona-lisina metiltransferasa
FADD	Proteína adaptadora de dominio de muerte asociado a Fas
Fas	Proteína de membrana tipo II
FASN	Sintasa de ácidos grasos
FBS	Suero Fetal Bovino
FBS	Suero Fetal Bovino
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
G	Guanina
gADN	ADN genómico
GATA	Proteínas de unión a secuencia de bases G, A y T
GATA-4	Factor de transcripción GATA
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GRP78	Proteína 78 regulada por glucosa
GSH	Glutación
H	Base A, C o T
HAEC	Línea humana de células endoteliales primarias aórticas
HATs	Histonas acetiltransferasas
HDACs	Histonas deacetilasas
HDM1	Desmetilasas específicas de Lys
HDM2-7	Jumonji C desmetilasas
HDMs	Histonas desmetilasas
HepG2	Línea humana de cáncer de hígado
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2
HKs	Histonas cinasas
HL-60	Línea humana de leucemia
HMTs	Histonas metiltransferasas
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HPLC-UV	HPLC-ultravioleta
HRK	Activador de apoptosis harakiri
hsCRP	Proteína C reactiva altamente sensible
HSP $\beta$ -1	Proteína de respuesta a estrés srp-27
IAP	Proteínas de apoptosis
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media máxima
ICAM	Molécula de adhesión intracelular
IGFBP	Factor de crecimiento similar a la insulina
IL-18	Interleucina 18
IL-1 $\alpha$	Interleucina 1 alfa
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL $\beta$ -1	Interleucina 1 beta
lncARNs	ARNs largos no codificantes
ISO	Isoproterenol
LC	Cromatografía de líquidos
LDH	Lactato deshidrogenasa



LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LINE	Elementos intercalados largos
LPO	Peroxidación lipídica
LPS	Lipopolisacáridos
LSD1	Desmetilasa 1 específica de lisina
MAP2K6	MAP cinasa cinasa específica dual 1
MAPKs	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
mARNs	ARNs mensajeros
MBD	Dominio de unión a ADN metilado
MCF-7	Línea humana de cáncer de mama luminal A
MCL1	Proteína de diferenciación celular de leucemia mieloide
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MDA	Malondialdehído
MDA-MB-231	Línea de cáncer de mama triple negativo
MDS	Síndrome mielodisplásico
miARNs	ARNs pequeños
MIRA	Análisis de recuperación de islas CpG metiladas
MLK1	Proteína cinasa 1 serina treonina de MAPK
MLL	Leucemia aguda de fenotipo mixto
MM	Mieloma múltiple
MNs	Micronúcleos
MOMP	Permeabilización de la membrana externa mitocondrial
MP	Membrana plasmática
MS	Espectrometría de masas
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,3-difeniltetrazol
MYO10	Gen codificador de miosina X
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ncARNs	ARNs no codificantes
NFAT	Factor nuclear de células T
NFkB	Factor nuclear kappa B
NGS	Secuenciación de nueva generación
NK	Célula naturalmente asesina
NKx2.5	Factor de transcripción de proteína Homeótica Nkx-2.5
NO	Óxido nítrico
NOX	NADPH oxidasa
Nox1	NADPH oxidasa 1
NOXA	Proteínas pro-apoptótica análoga a BCL-2
OH	Grupo hidroxilo
Omi	Serina proteasa pro-apoptótica mitocondrial
OMS	Organización Mundial de la Salud
P/S	Penicilina/Estreptomocina
PALB2	Gen asociado a BRCA2
PARP	Poli ADP-ribosa polimerasa
PARP1	Poli ADP-ribosa polimerasa 1
pb	Pares de bases
PB	Fisalina B
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica



PBS	Solución Salina Tamponada con Fosfato
PCE	Eritrocitos policromatofílicos
PCNA	Antígeno nuclear en proliferación
PCO	Proteína óxido carbonilo
PDE-4	Fosfodiesterasa 4
PERK	Proteína cinasa del retículo endoplásmico
Phen	Fenantrolina
piARNs	ARNs asociados a Piwi
Piwi	Proteína Argonauta
PKC-δ	Proteína cinasa C delta
PLODI	Gen asociado a cifoescoliosis
PMM	Potencial de membrana mitocondrial
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Grupo fosfato
PR	Receptor de progesterona
PRMTs	Arginina metiltransferasas
PRUNE1	Gen codificador de exopolifosfatasa
PTB	Tetraborato de potasio
PTCL	Linfoma periférico de células T
PTMs	Modificaciones postraduccionales
PUMA	Modulador de apoptosis regulado positivamente por p53
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa
RG-II	Complejo ramnogalacturonano II
RIP1	Proteína cinasa 1 serina treonina de interacción con el receptor RIP1
RIP1	Proteína cinasa serina treonina
RNR	Ribonucleótido reductasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP3	Proteína cinasa 3 serina treonina
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RRBS	Secuenciación de bisulfito de representación reducida
RT-qPCR	PCR con transcriptasa inversa o reversa
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAHA	Ácido hidroxámico suberoilánilida
SAM	S-adenosilmetionina
SCEs	Intercambio de cromátides hermanas
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Sirts	HDACs Sirtuina
SMAC	Segundo activador de la caspasa
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
STK11	Gen serina/treonina cinasa 11
T	Timina
T3	Triyodotironina
Tarn	ARN de transferencia
tARNs	ARNs pequeños derivados del Tarn
TB	Azul de tripano
TDG	Timina ADN glicosilasa
TDRs	Dominios Tudor

TET	Enzimas de translocación diez-once
TG	Triglicéridos
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TNFAIP3	Factor de necrosis tumoral, proteína 3 inducida por alfa
TNFR1	Receptor 1 de TNF
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TOF	Tiempo de vuelo
TOS	Estado oxidativo total
TP53	Gen supresor proteína tumoral p53
TRADD	Proteína de dominio de muerte asociado al receptor TNF1
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis asociado a TNF
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TRX	Tiorredoxina
TX	Paclitaxel o Taxol
UHRF1	Proteína 1 de unión a ADN hemimetilado
UPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
UPLC-HRMS	UPLC acoplada a espectrometría de masas
VEGF	Factor de incremento endotelial vascular
WNT7B	Gen codificador de WNT7B
<i>xg</i>	Fuerza centrífuga
XIAP	Proteína de apoptosis X
WGBS	Secuenciación de bisulfito de todo el genoma

### Aminoácidos (a.a.)

a.a.	Código (3 letras)
Alanina	Ala
Arginina	Arg
Asparagina	Asn
Aspartato	Asp
Cisteína	Cys
Glutamina	Gln
Ácido glutámico	Glu
Glicina	Gly
Histidina	His
Isoleucina	Ile
Leucina	Leu
Lisina	Lys
Metionina	Met
Fenilalanina	Phe
Prolina	Pro
Serina	Ser
Treonina	Thr
Triptófano	Trp
Tirosina	Tyr
Valina	Val

## I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades cuya característica principal es la proliferación celular descontrolada y tiene la capacidad de invadir tejidos del organismo; su clasificación depende de la localización anatómica o del órgano afectado ([Instituto Nacional de Cáncer, 2020](#)). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), es la principal causa de muerte a nivel global ([OMS, 2018](#)). Las estimaciones de los nuevos casos para ambos sexos y todas las edades en todo el mundo y en México, posicionan en primer lugar al cáncer de pulmón y al BC. Otros tipos de neoplasias como colorrectal, próstata, estómago e hígado, ocupan un lugar importante en las estadísticas globales ([Observatorio Global de Cáncer, 2018](#)).

Existen diversos factores que median de manera conjunta la conversión de las células normales a cancerosas, como a) la predisposición genética del individuo, por afectación de la actividad de protooncogenes, genes supresores de tumores y reparadores del ácido desoxirribonucleico (ADN) ([Barzaman et al., 2020](#); [Carbone et al., 2020](#); [Dobrijević, et al., 2020](#); [Hata et al., 2020](#); [Mehnert et al., 2020](#); [Shan et al., 2020](#); [Walavalkar et al., 2020](#)); b) la desregulación de eventos epigenéticos como la metilación del ADN, expresión de Ácidos ribonucleicos (ARNs) largos no codificantes (lncARNs) y ARNs pequeños (miARNs) ([Cao et al., 2020](#)), y modificaciones de histonas ([Bhol et al., 2019](#)); c) enfermedades crónicas como la obesidad y el sobrepeso ([Sung et al., 2018](#)) y; d) el envejecimiento, que repercute en la expresión de genes de control celular ([Osako et al., 2020](#)) y en el funcionamiento adecuado del sistema inmunológico ([Hong et al., 2019](#)).

El tratamiento depende del tipo de neoplasia, siendo mayormente eficaz en el diagnóstico oportuno. En particular, para el BC, que posee características como activación de receptores hormonales de estrógeno y progesterona (ER y PR, respectivamente), mutaciones en genes de BC (BRCA1 y BRCA2), y activación del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER2); sus alternativas terapéuticas se encuentran en función del subtipo, y comprenden desde cirugía en combinación con radioterapia para fases tempranas, hasta terapia hormonal, quimioterapia, uso de inhibidores de poli ADP-ribosa

polimerasa (PARP) para las mutaciones en BRCA, e inmunoterapia para etapas avanzadas ([Colección de Biología Celular ATCC, 2020](#); [Harbeck et al., 2019](#); [Jovanovic et al., 2010](#); [Liu et al., 2018](#); [Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano NHGRI, 2020](#); [Sun et al., 2017](#)). La heterogeneidad del BC derivada de su tumor primario, da lugar a la dificultad de tratamientos efectivos, siendo la resistencia a los medicamentos y los efectos secundarios los principales desafíos ([Al-thoubaity, 2020](#); [Feng et al., 2018](#); [Shah y Osipo, 2016](#)). Es por ello que, la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos o potenciales vehículos de éstos que minimicen las repercusiones terapéuticas es de gran interés, a la par con el desarrollo de estrategias para su detección oportuna. En este sentido, diversas investigaciones destacan efectos benéficos de compuestos de boro (B), especialmente el ácido bórico y el tetraborato de sodio, mejor conocido como bórax, los cuales participan en la regulación de diversas moléculas del metabolismo celular en organismos como plantas, mamíferos y el ser humano.

El B es clasificado como un nutriente esencial, que participa en la regulación de biomarcadores de estrés oxidativo como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), malondialdehído (MDA), glutatión (GSH) y 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG) ([Başaran et al., 2020](#); [Canturk et al., 2016](#); [Hazman et al., 2018](#); [Üstündağ et al., 2014](#)). Simultáneamente, influye en el balance de mediadores de inflamación (CMI) como interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), y óxido nítrico (NO) ([Naghii et al., 2011](#); [Routray y Ali, 2016](#)). En particular, el bórax tiene interesantes efectos moduladores en diversos sistemas biológicos. Se destaca su papel como agente cardioprotector en cardiomiocitos en cultivo *in vitro*, mediante la regulación negativa de la expresión génica a hipertrofia cardíaca (CH) inducida con isoproterenol (ISO), evitando el daño celular por aumento de la tasa de proliferación e inhibición de apoptosis ([Hernández et al., 2020](#)). También, se reporta su potencial efecto epigenético sobre el grado de metilación global del ADN de tejidos de sistema nervioso central (SNC), corazón, hígado y particularmente pancreático en modelo murino BALB/c, mediante la disminución de este biomarcador epigenético global ([Martínez, 2018](#)).

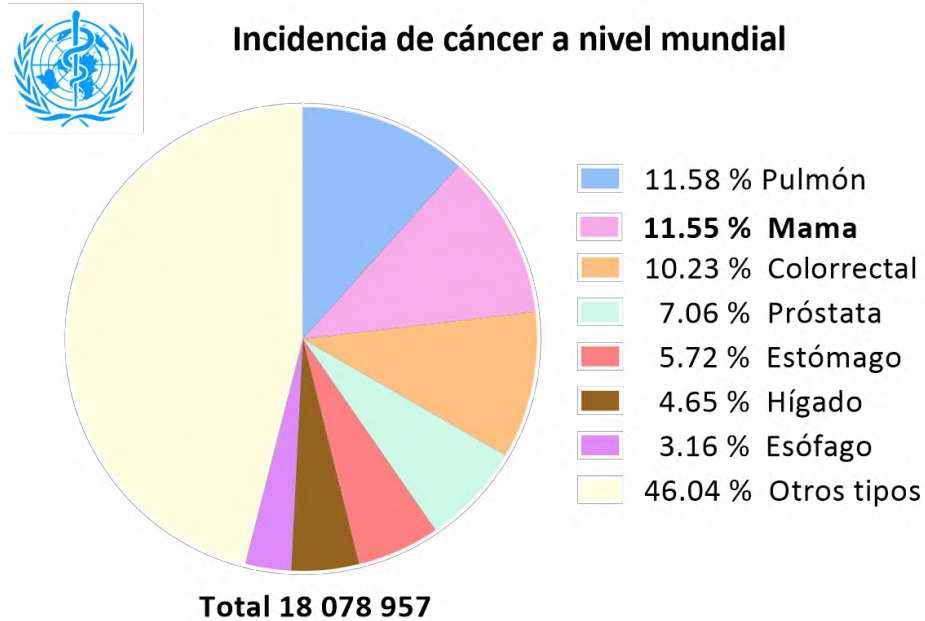
Además, se evidencia su efecto citotóxico en ciertas líneas de cáncer. Se ha demostrado el efecto antiproliferativo del bórax sobre células tumorales de hígado humanas HepG2, mediante la regulación positiva del gen supresor tumoral (TP53) y la proteína Bax, asociado a la regulación negativa de la proteína BCL-2, por apoptosis ([Wei et al., 2016](#)). En relación a HepG2, Wu *et al.*, señalan la inhibición de su crecimiento por exposición a bórax 4 mM, asociado a diversos procesos biológicos como respuesta inflamatoria, estrés oxidativo, apoptosis y transducción de señales, en función de alteraciones en la expresión de 530 genes, 146 por regulación negativa y 384 positivamente ([Wu et al., 2019](#)). Por otra parte, en la línea celular de leucemia aguda (HL-60), Canturk *et al.*, refieren un efecto citotóxico y apoptótico por exposición a bórax y ácido bórico ([Canturk et al., 2016](#)).

En relación a lo mencionado, en el presente trabajo se evaluó el efecto citotóxico del bórax, como una alternativa a los compuestos antineoplásicos para el BC positivo, en MCF-7. Además, se determinó su efecto apoptótico, y adicionalmente su relación epigenética mediante el análisis de sus patrones de metilación global del ADN.

## II. MARCO TEÓRICO

### II.1. Generalidades del cáncer de mama

El BC es la neoplasia de mayor incidencia en mujeres a nivel mundial, y en México ocupa el segundo lugar después del cáncer de pulmón ([INFOCÁNCER](#)) (Figura 1) ([Observatorio Global de Cáncer, 2018](#)).



**Figura 1.** Estimación de nuevos casos de cáncer a nivel mundial, hasta 2018. Ambos sexos y todas las edades. Obtenida y editada de ([Observatorio Global de Cáncer, 2018](#)).

#### II.1.1. Clasificación

Comprende un grupo diverso de alteraciones moleculares, que determinan su clasificación en función de su diseminación relacionada al sitio primario del tumor ([Al-thoubaity, 2020](#); [Feng et al., 2018](#); [Harbeck et al., 2019](#)). El diagnóstico temprano y la adecuada distinción del subtipo molecular conlleva una mejor selectividad y eficacia del tratamiento. En la Tabla 1 se describen los principales subtipos de BC de acuerdo a su inmunofenotipo.

**Tabla 1.** Subtipos moleculares/intrínsecos de BC. Obtenida de Feng *et al.*, 2018.

Subtipos	Marcas moleculares	Tratamiento <sup>1</sup>
Luminal A	ER+, PR±, HER2- <Ki67	Terapia hormonal Terapia dirigida
Luminal B	ER+, PR±, HER2±, >Ki67	Terapia hormonal Terapia dirigida
HER2	ER-, PR-, HER2+	Terapia dirigida
Triple negativo	ER-, PR-, HER2-	Terapia dirigida limitada
Normal	ER+, PR±, HER2- <Ki67	Terapia hormonal Terapia dirigida

<sup>1</sup>Además de tratamiento convencional quirúrgico y no quirúrgico.

### II.1.2. Factores de riesgo

Múltiples factores que actúan en conjunto son asociados con el desarrollo de las células normales de seno a cancerosas. La predisposición genética juega uno de los papeles de mayor importancia, siendo la causa más común de BC hereditario las mutaciones en genes BRCA1 y BRCA2 ([Lynch et al., 2015](#); [Azzollini et al., 2019](#); [Feng et al., 2018](#); [Hata et al., 2020](#)). Las proteínas BRCA llevan a cabo la supresión tumoral, el mantenimiento de la integridad genómica y la reparación de daño al ADN por homología inhibiendo la tumorigénesis ([Feng et al., 2018](#)). Asimismo, otras mutaciones en genes como ataxia telangiectasia alterada (ATM), TP53, gen del cromosoma 22 (CHEK2), gen gástrico difuso hereditario (CDH1), gen serina/treonina cinasa 11 (STK11) y el gen asociado a BRCA2 (PALB2) también son referidos ([Azzollini et al., 2019](#); [Behravan et al., 2020](#); [Feng et al., 2018](#); [Harbeck et al., 2019](#); [Lynch et al., 2015](#); [Rummel et al., 2017](#); [Sun et al., 2017](#)).

Por otra parte, la heterogeneidad y el progreso de la metástasis se relaciona con diversos cambios epigenéticos. La epigenética comprende los cambios heredables como metilación del ADN, acción de ncARNs, principalmente lncRNAs y miARNs, y modificaciones de histonas, que repercuten sobre la expresión génica sin cambios en la secuencia del ADN ([Bhol et al., 2019](#); [Jovanovic et al., 2010](#); [Singhal et al., 2016](#); [Villanueva et al., 2020](#)). Otros factores incluyen enfermedades como la obesidad, que provoca cambios moleculares como resistencia a la insulina, aumento de los niveles de estrógeno, citocinas proinflamatorias y de adipocinas debido a la adiposidad excesiva ([Andò et al., 2019](#)). El tejido adiposo de las personas con esta patología da lugar a altos niveles de hormonas inductoras de tumores, como la leptina y el estrógeno, y a la disminución de adiponectina, una hormona supresora ([Zimta et al., 2019](#)). Los tratamientos como la cirugía, radiación, quimioterapia y principalmente terapia hormonal son menos eficaces en pacientes con obesidad ([Lee et al., 2019](#)). Además, estilos de vida como la falta de ejercicio, mala alimentación, consumo de tabaco y alcohol contribuyen a la predisposición; la actividad física controla el peso corporal y con ello, disminuye el riesgo a comorbilidades como obesidad, sobrepeso, diabetes, hipertensión, entre otras ([Davies et al., 2011](#); [Grosso et al., 2017](#)). El ejercicio aumenta la supervivencia al cáncer, fortaleciendo el sistema inmunológico y contribuye a al correcto funcionamiento del metabolismo celular como el estrés oxidativo, la utilización de glucosa y aminoácidos, y la sensibilidad a la insulina ([Wennerberg et al., 2020](#)). Asimismo, la ingesta de alimentos con gran valor nutricional ricos en vitaminas, proteínas, grasas poliinsaturadas, antioxidantes, etc., disminuye las incidencias ([Taha y Eltom, 2018](#)).

Otro factor referido igual de significativo es la edad; el envejecimiento provoca la pérdida de actividad celular, asociada con la disminución de la expresión de genes de control celular como el gen de histona-lisina metiltransferasa (EZH2) y ER, y modificaciones epigenéticas en la histona H3 (H3K27me3) ([Osako et al., 2020](#)). De la misma forma, el funcionamiento del sistema inmune en la respuesta innata y humoral es afectado con la edad, incrementando la susceptibilidad a infecciones y enfermedades crónicas

degenerativas por la represión de mediadores como monocitos, células naturalmente asesinas (NK), células dendríticas, y generación de anticuerpos ([Hong et al., 2019](#)).

### II.1.3. Tratamiento

La clasificación molecular de los subtipos del BC y su progresión son determinantes. De primera elección implica cirugía con terapias coadyuvantes como radioterapia y quimioterapia en etapas tempranas, con la finalidad de reducir el tumor, extirpar y evitar su recurrencia (Fisusi y Akala, 2019; Harbeck *et al.*, 2019; Waks y Winer, 2019). Modalidades como terapia hormonal o endócrina e inmunoterapia también son empleadas dependiendo del progreso de la metástasis ([Fisusi y Akala, 2019](#)).

De acuerdo a los principales subtipos del BC (Consultar [Tabla 1](#)) se emplean distintas terapias coadyuvantes. Para luminal A, que representa alrededor del 40 % de las manifestaciones, hay una mejor respuesta a terapia endócrina mediante fármacos como tamoxifeno, fulvestrant e inhibidores de aromatasa; luminal B, que comprende alrededor del 20 %, quimioterapia y terapia hormonal suelen ser las de elección; HER2, del 15 al 20 % de ocurrencia, tiene mejor respuesta a terapia dirigida con medicamentos como anticuerpos monoclonales humanizados que incluyen el trastuzumab y pertuzumab, quimioterapia basada en taxanos, y lapatinib como inhibidor dual de HER2; finalmente, la combinación de cirugía, radio y quimioterapia son normalmente utilizadas para triple negativo y BC normal, que predominan del 10-15 % ([Al-thoubaity, 2020](#); [Fisusi y Akala, 2019](#); [Harbeck et al., 2019](#)). La amplia gama de antineoplásicos usados en combinación con las terapias disponibles para BC, involucran diversos mecanismos de acción, algunos descritos en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Mecanismos de los principales antineoplásicos para el BC. Obtenida de [Waks y Winer, 2019](#).

Antineoplásico/Agente	Mecanismos
<i>Terapia endócrina</i>	
Tamoxifeno	▪ Selectivo modulador de ER
Inhibidor de aromatasa (letrozole, anastrozole, exemestano)	▪ Inhibe la conversión de andrógenos a estrógeno
<i>Quimioterapia citotóxica</i>	
Docetaxel/ciclofosfamida (CYC)	▪ Docetaxel: interrumpe la mitosis por inhibición de la función de los microtúbulos
	▪ C: Agente alquilante, interrumpe la replicación del ADN
Doxorrubicina (DOX)/CYC	▪ D: Interrumpe la replicación del ADN asociado a otros mecanismos
DOX/CYC/paclitaxel (TX)	▪ T: interrumpe la mitosis por inhibición de la función de los microtúbulos
<i>Quimioterapia citotóxica/terapia dirigida HER2</i>	
DOX/CYC/TX/trastuzumab	▪ Trastuzumab: Anticuerpo dirigido a HER2
Docetaxel/carboplatino/trastuzumab	▪ Carboplatino: reticula el ADN e interrumpe su replicación

En el mismo sentido, se ha descrito el efecto antimetastásico en BC de compuestos aislados de diversas fuentes naturales, como otro foco de interés (Tabla 3).

**Tabla 3.** Compuestos derivados de fuentes naturales con efecto antimetastásico en BC.

Obtenida de [Tungsukruthai et al., 2018](#).

Compuesto	Fuente	Origen/parte usada
Taxol	<i>Taxus brevifolia</i>	Planta, corteza
Oleuropeína	<i>Olea europaea</i>	Planta, planta
Matrina	<i>Sophora flavescens</i>	Tradicional en medicina herbal China/raíz
Curcumina	<i>Curcuma longa</i>	Planta/raíz
Sinomenina	<i>Sinomenium acutum</i>	Tradicional en medicina herbal China/tallo
Codonolactona	<i>Atractylodes lancea</i>	Planta/rizoma
Resveratrol	<i>Vitis vinifera</i>	Fruta/Piel de la uva
Quercetina	<i>Vitis vinifera</i>	Fruta/Piel de la uva
Catequina	<i>Vitis vinifera</i>	Fruta/Piel de la uva

## II.2. Mecanismos de muerte celular

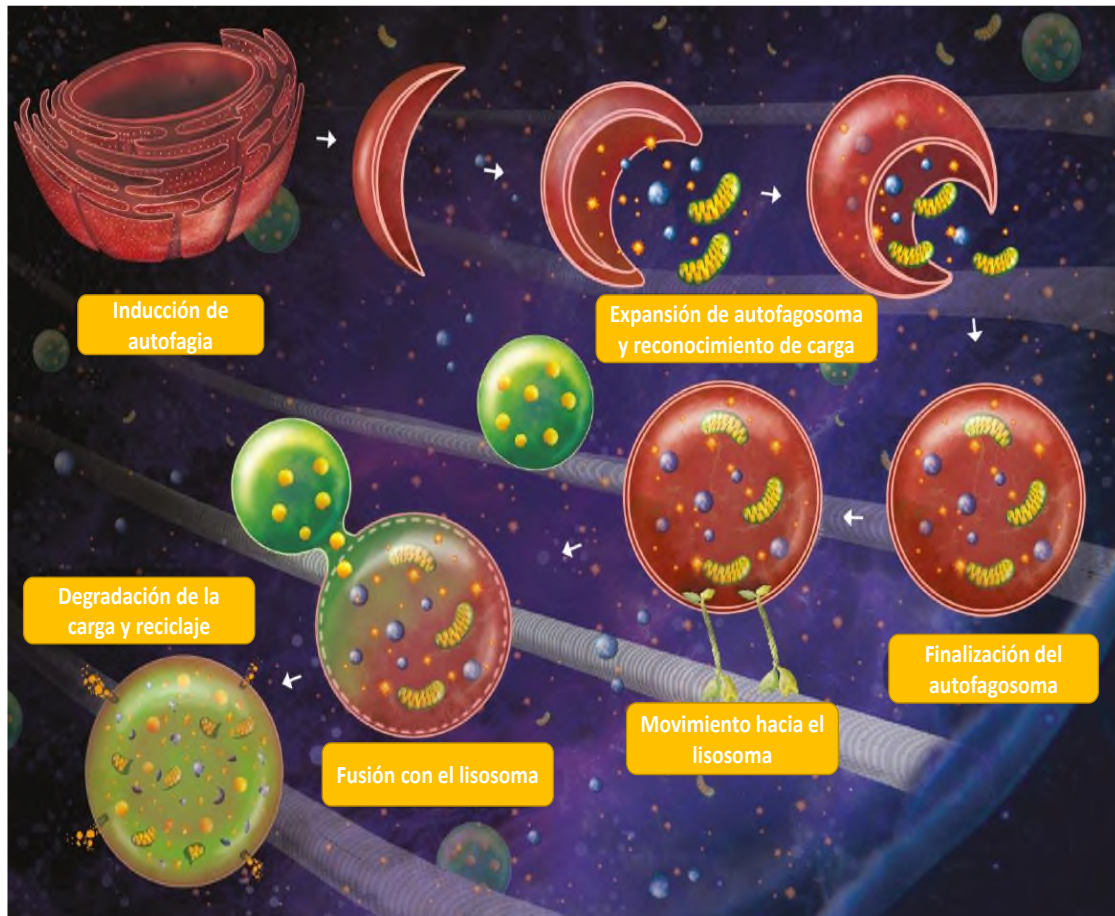
De manera característica, las células cancerosas tienen la capacidad de evadir los diferentes mecanismos de muerte celular, con la finalidad de incrementar su supervivencia, proliferación, motilidad y tumorigenicidad ([Tungsukruthai et al., 2018](#)). Es por ello, que los fármacos antineoplásicos tienen como blanco la inducción de eventos como autofagia, apoptosis, necrosis, senescencia, ferroptosis, piroptosis, entre otros ([Galluzzi et al., 2018](#)).

### II.2.1. Autofagia

La autofagia es un proceso catabólico hacia componentes del citoplasma como proteínas celulares dañadas y orgánulos, en el que su degradación ocurre a través de la formación de vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, y la acción de lisosomas formando autolisosomas ([Han et al., 2018](#); [Singh et al., 2018](#); [Wang et al., 2019](#)). Este proceso catabólico está altamente conservado para el mantenimiento y regulación de la homeostasis en respuesta al estrés celular, escasez de nutrientes, estímulos citotóxicos y daño celular ([Han et al., 2018](#); [Noguchi et al., 2020](#)). Defectos en este mecanismo son relacionados con susceptibilidad a daño genómico, estrés metabólico y tumorigénesis ([Singh et al., 2018](#)).

Para la homeostasis, la autofagia facilita la eliminación de proteínas mal plegadas, agregados de éstas y orgánulos deteriorados; la cual, en respuesta al estrés por falta de nutrientes, da lugar a la generación de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) mediante la degradación de ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y ácidos grasos; además, contrarresta el daño mitocondrial ocasionado por especies reactivas de oxígeno (ROS), mediante la regulación de los radicales libres por mitofagia ([Cheon et al., 2019](#); [Galati et al., 2019](#); [Lin et al., 2019](#)). En relación a niveles bajos de oxígeno, proceso conocido como hipoxia, la autofagia da lugar a la liberación de compartimentos dañados, promoviendo así, la supervivencia celular ([Galati et al., 2019](#)). Asimismo, en infecciones microbianas permite la fagocitación de los patógenos invasores mediante una vía selectiva llamada xenofagia, como estrategia de defensa inmune ([Chang et al., 2013](#); [Mao y Klionsky, 2017](#); [Sharma et al., 2018](#)).

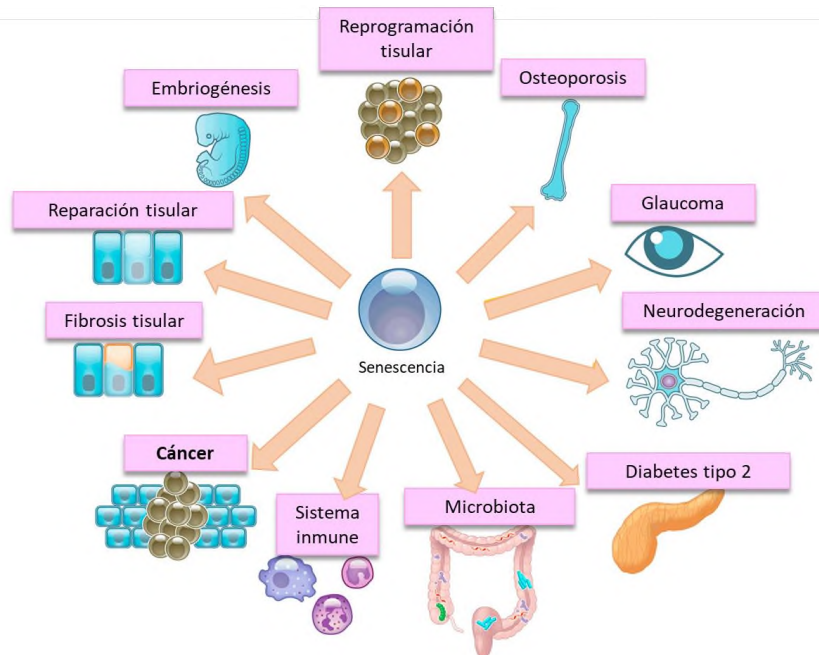
Este proceso da inicio con la expansión de la membrana de aislamiento, la cual captura la carga citosólica para posteriormente unirse a otra membrana y formar el autofagosoma, así, con ayuda de los microtúbulos se enlaza con el lisosoma originando el autolisosoma; finalmente, en los autolisosomas se lleva a cabo la degradación de las biomoléculas por acción de enzimas lisosomales, retornándolas o reciclándolas hacia el citoplasma nuevamente, como se observa en la Figura 2 ([Singh et al., 2018](#)).



**Figura 2.** Mecanismo de autofagia. Obtenida y editada de [Singh et al., 2018](#).

### II.2.2. Senescencia

Normalmente, las células envejecen hasta detener su división celular sin llegar a la muerte, perdiendo la capacidad de proliferación ([Bharadwaj y Mandal, 2020](#)). La senescencia es un periodo de detención del ciclo celular, con la finalidad de evitar la proliferación de células seniles o dañadas ([Lee y Lee, 2019](#)). Es un proceso fisiológico y patológico que contribuye a la embriogénesis, remodelación de tejidos, respuesta inmune, reparación de lesiones por envejecimiento y por diversas enfermedades manifestadas con la edad (Figura 3) ([Calcinotto et al., 2019](#); [Lee y Lee, 2019](#)). En cáncer, funciona como una barrera para prevenir la tumorigénesis, evitando la transformación de las células normales a malignas como mecanismo de supresión tumoral ([Calcinotto et al., 2019](#); [Lee y Lee, 2019](#); [Zhu et al., 2020](#)). Las células en este estado experimentan una serie de cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales característicos ([Bernadotte et al., 2016](#)). Por ello, el tratamiento con compuestos llamados senolíticos, que eliminan de manera selectiva a las células cancerosas inducidas a senescentes, es de gran interés en las terapias del cáncer.



**Figura 3.** Senescencia celular y procesos fisiológicos involucrados. Obtenida y editada de [Calcinotto et al., 2019](#).

### II.2.3. Apoptosis

La apoptosis conocida como muerte celular programada, es un mecanismo altamente conservado y ordenado, central en la homeostasis de los organismos multicelulares, a través del cual las células dañadas, no deseadas o en exceso son eliminadas ([Ichim y Tait, 2016](#); [Kalkavan y Green, 2018](#); [Poreba et al., 2019](#); [Singh et al., 2019](#)). Este proceso se caracteriza por una serie de cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares, como la manifestación de encogimiento celular, condensación y fragmentación nuclear, formación de ampollas o protuberancias en la membrana sin pérdida de su integridad, y la separación de los componentes celulares en cuerpos apoptóticos; este evento induce la activación de cisteín proteasas denominadas caspasas, las cuales escinden sus sustratos en residuos de aspartato específicos ([Galluzzi et al., 2018](#); [Poreba et al., 2019](#); [Singh et al., 2019](#)).

La apoptosis puede originarse por amplios estímulos como estrés oxidativo; agentes físicos como radiación ultravioleta; agentes químicos como fármacos antineoplásicos y; agentes biológicos como la invasión por patógenos, bacterias, virus, etc., ([Galluzzi et al., 2018](#); [Poreba et al., 2019](#)). Por ello, la inducción de apoptosis es un resultado deseado particularmente en las terapias del cáncer, siendo un relevante campo de investigación. Este proceso comprende dos vías en función de la señal de inicio que conducen a caspasas pro-apoptóticas: vía intrínseca y extrínseca.

#### II.2.3.1. Vía intrínseca

También llamada vía mitocondrial, se produce por perturbaciones como daño al ADN, privación de  $Ca^{2+}$  como factor de crecimiento, estrés del retículo endoplásmico (EPR), exceso de ROS, alteraciones microtubulares o defectos mitóticos ([Galluzzi et al., 2018](#); [Ichim y Tait, 2016](#); [Kalkavan y Green, 2018](#); [Pfeffer y Singh, 2018](#); [Poreba et al., 2019](#)).

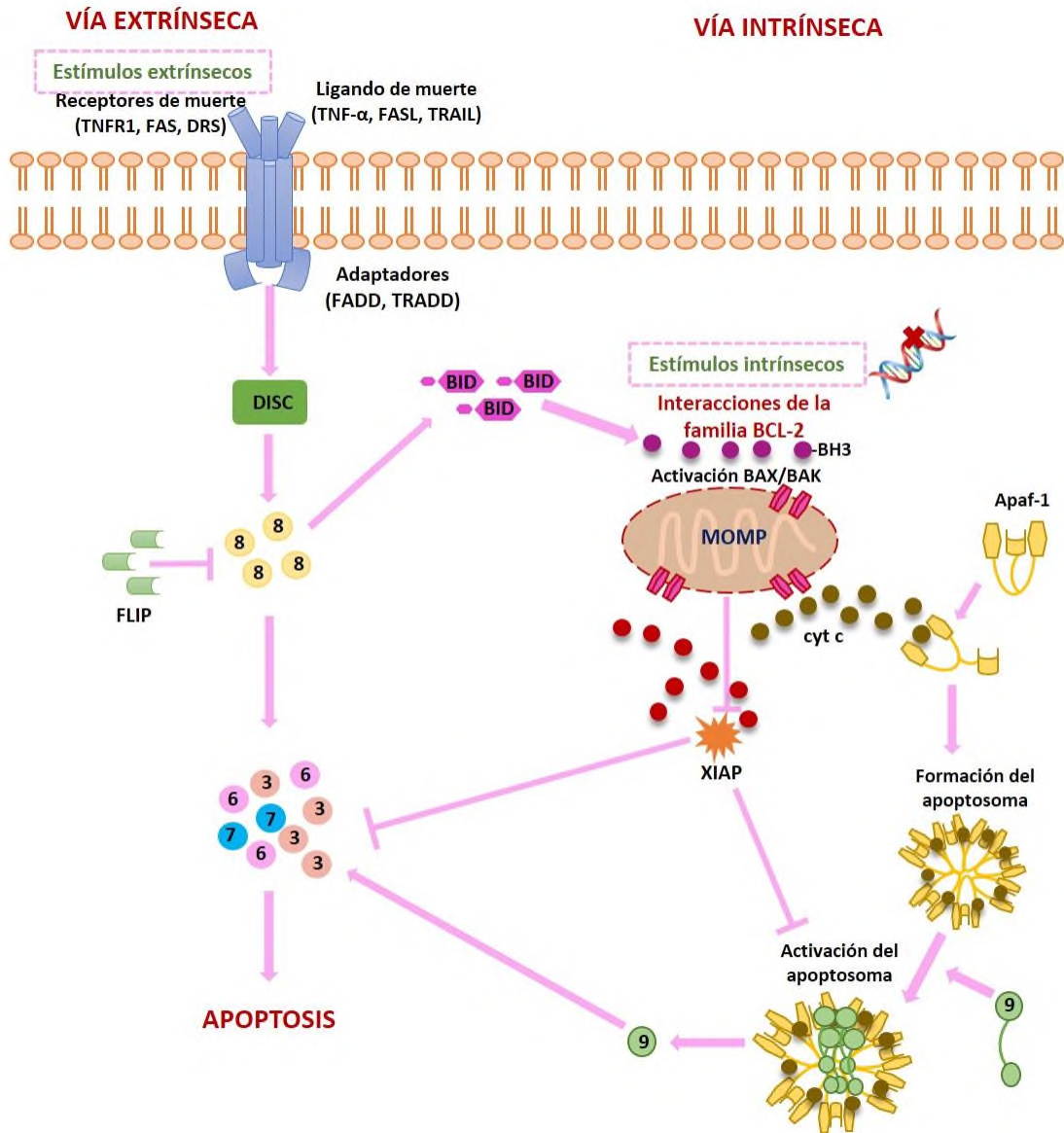
Es controlada por la familia de proteínas pro y anti-apoptóticas BCL-2 y ejecutada irreversiblemente por la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), debido a estímulos apoptóticos con regulación positiva de proteínas solo dominio BH3 (-BH3) que activan a Bax y BAK; esta última regulada por TP53.

Diferentes proteínas -BH3 se enlazan preferentemente a ciertos miembros de la familia BCL-2; con excepción de BID, BIM y PUMA, los cuales son afines a todos; BAD lo es a BCL-2, BCL-X<sub>1</sub> y BCL-W; en contraste, NOXA inhibe a la proteína de diferenciación celular de leucemia mieloide (MCL1) y el activador de apoptosis harakiri (HRK) a BCL-X<sub>1</sub> ([Galluzzi et al., 2018](#)). La permeabilización permite la liberación de proteínas intermembranales como citocromo c (cyt c), segundo activador de mitocondrias de la caspasa (SMAC) y serina proteasa pro-apoptótica mitocondrial (Omi); el apoptosoma se forma crucialmente a partir de la liberación de cyt c, activador apoptótico factor-1 de la proteasa (Apaf-1), desoxiadenosina trifosfato (dATP) y procaspasa 9; finalmente, dentro del apoptosoma la procaspasa 9 se convierte en caspasa 9 induciendo a las caspasas ejecutoras 3 y 7 para dar lugar a la muerte celular ([Ichim y Tait, 2016](#); [Kalkavan y Green, 2018](#); [Pfeffer y Singh, 2018](#)). Otros pasos que aseguran la muerte es la inhibición llevada a cabo por Omi ligado al inhibidor de la proteína de apoptosis X (XIAP), por regulación negativa de la caspasa 3; la liberación de SMAC para reprimir al inhibidor de las proteínas de apoptosis (IAP) una vez formado el apoptosoma; y la pérdida de función mitocondrial por MOMP ([Pfeffer y Singh, 2018](#)).

#### II.2.3.2. Vía extrínseca

Su inicio está mediado por señales de la unión de ligandos de muerte a sus receptores de muerte, de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) como TNFR1, ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL) (DR4 y DR5) y proteína de membrana tipo II (Fas) (Apo-1; CD95) ([Galluzzi et al., 2018](#); [Ichim y Tait, 2016](#); [Kalkavan y Green, 2018](#); [Pfeffer y Singh, 2018](#); [Poreba et al., 2019](#)). Las proteínas adaptadoras que participan incluyen el dominio de muerte asociado a Fas (FADD) y a receptor de TNF (TRADD); las proteínas adaptadoras forman el complejo de señalización inductor de muerte (DISC), por la unión de procaspasa 8 y 10 en sus dominios efectores de muerte (DED); finalmente DISC activa a las procaspasas 8 y 10, consecuentemente a las caspasas respectivas y finalmente a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 ([Galluzzi et al., 2018](#); [Ichim y Tait, 2016](#); [Pfeffer y Singh, 2018](#)). Asimismo, caspasa 3 es clave para inducción de sustratos como PARP, gelsolina (proteína actina) y proteína cinasa C delta (PKC-  $\delta$ )

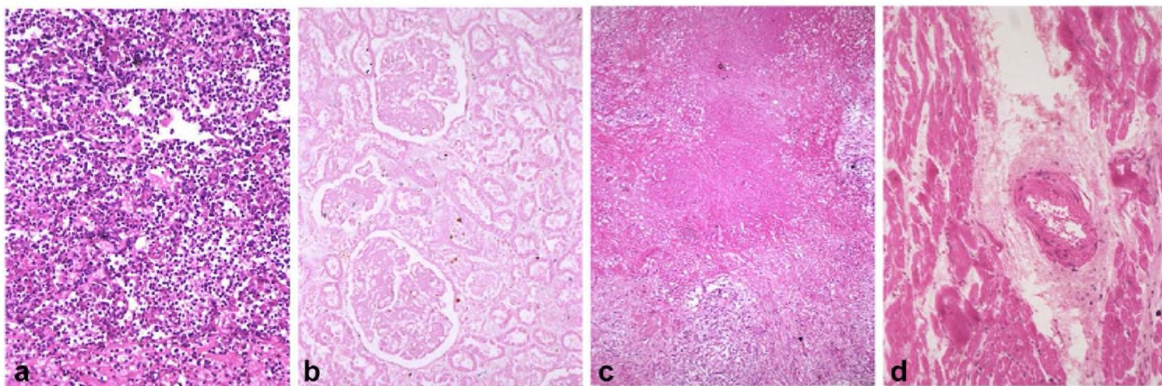
(Yuan *et al.*, 2012). Ambas rutas convergen después de la activación de caspasa 8 mediante la inducción en la vía extrínseca de proteínas -BH3, por el agonista de muerte -BH3 (BID); como se observa en la Figura 4.



**Figura 4.** Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Obtenida y editada de [Kalkavan y Green, 2018](#); [Pfeffer y Singh, 2018](#).

### II.2.4. Necrosis

La necrosis conocida como muerte celular no controlada, es un mecanismo que se caracteriza por la rápida pérdida de la integridad de la membrana plasmática (MP), morfológicamente apreciada por hinchazón celular, granulación citoplasmática y desintegración de la estructura del orgánulo sin condensación de la cromatina, como se observa en la Figura 5 ([Green y Llambi, 2015](#); [Soriano et al., 2017](#)). Este proceso ocurre por tensiones físicas o como consecuencia de algún daño extremo, por ejemplo, la exposición a altas temperaturas o lesiones celulares; en algunas células es un evento pasivo, pero en la mayoría es resultado de una cascada de señalización ([Green y Llambi, 2015](#)).



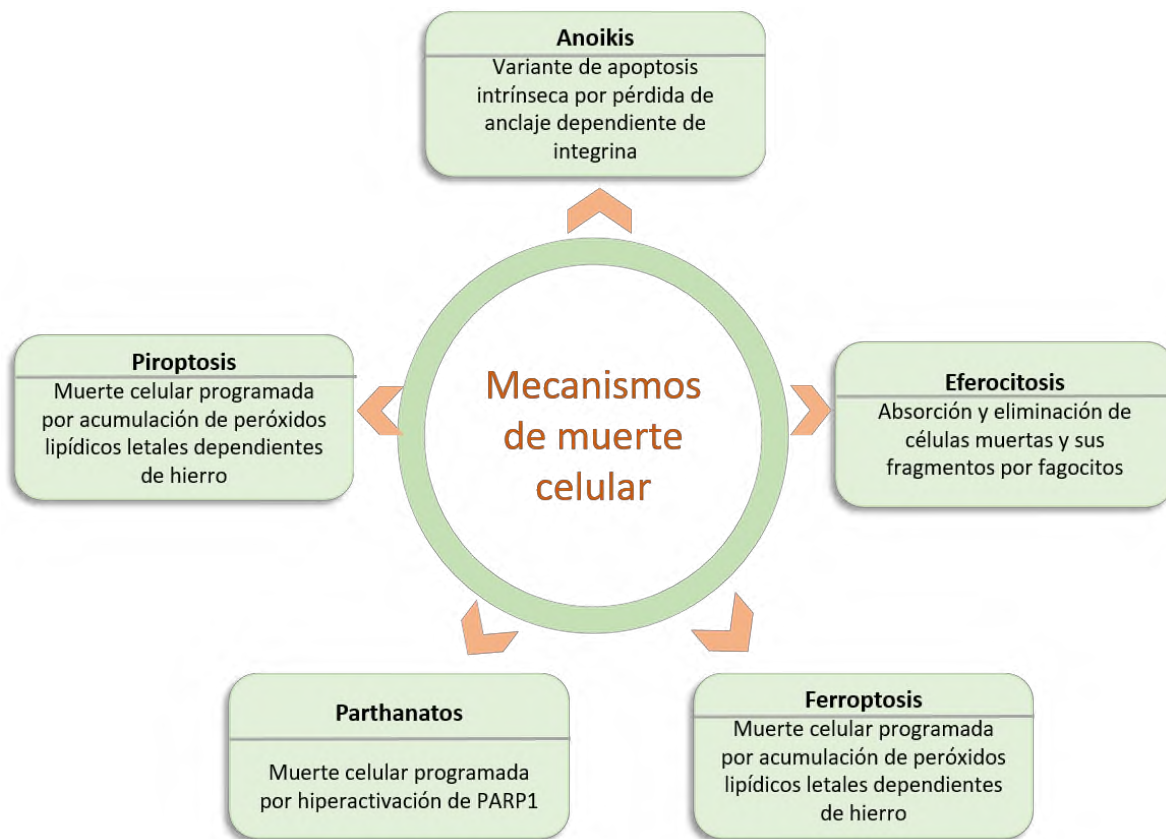
**Figura 5.** Tipos comunes de necrosis en tejidos humanos. **a)** Área de necrosis lítica de absceso pulmonar cubierto de células inflamatorias. **b)** Área de necrosis coagulativa de infarto renal con pérdida de contorno y morfología celular; histología renal intacta. **c)** Área de necrosis caseosa de ganglio linfático tuberculoso con ausencia de infiltración masiva de células inflamatorias. **d)** Área de necrosis fibrinoide de corazón con enfermedad reumática con ausencia de infiltración masiva de células inflamatorias. Obtenida y editada de [Liu et al., 2018](#).

La necroptosis es la mejor forma estudiada de necrosis programada, que involucra a proteínas cinasas, se produce río abajo de TNFR1 mediante la fosforilación de RIP3 por RIP1, para la formación del complejo llamado necrosoma, promoviendo la necrosis por la fosforilación de MLK1 debida a p-RIP3; así p-MLK1 por formación de poros desintegra la MP, liberando componentes celulares como patrones moleculares asociados a daño (DAMP); los DAMPs actúan como señales de peligro eliminadas por células

mueras e inducen una fuerte respuesta inflamatoria ([Green y Llambi, 2015](#); [Li et al., 2020](#)). Otra forma de necrosis activa relaciona a NADPH oxidasa 1 (Nox1) y puede desencadenarse por el TNF, tal como ocurre en células neuronales, en la que receptores de glutamato pueden ocasionar excitotoxicidad en condiciones patológicas ([Green y Llambi, 2015](#)).

### II.2.5. Otros mecanismos de muerte

Otros tipos de muerte celular, principalmente modalidades programadas se describen en la Figura 6.



**Figura 6.** Otras formas de muerte celular. Obtenida y editada de [Galluzzi et al., 2018](#).

### II.3. Efectos biológicos de compuestos de B

El B es un metaloide considerado un mineral esencial de origen vegetal que contribuye en procesos biológicos, metabólicos y fisiológicos en plantas, animales y el ser humano; con efectos benéficos en su desarrollo y principalmente en la salud animal y humana regulando mecanismos antioxidantes, respuesta inmune, metabolismo hormonal y mineral ([Abdelnour et al., 2018](#); [Białek et al., 2019](#); [Khaliq et al., 2018](#); [Üstündağ et al., 2014](#)).

#### II.3.1. Propiedades y fuentes de B

Es un metaloide de símbolo B ubicado en la familia 13 de la tabla periódica, número atómico 5 y masa atómica 10.811 g/mol, de isotopos  $^{10}\text{B}$  y  $^{11}\text{B}$ ; en la naturaleza no se presenta de forma aislada, lo hace en combinación con sodio u oxígeno como compuestos de organoboro de enlaces B-N o B-O (Tabla 4); el B se halla en rocas, suelo y agua; de forma fisiológica alrededor del 96 % como ácido bórico  $\text{B}(\text{OH})_3$  y el resto como anión borato  $\text{B}(\text{OH})_4^-$ ; en particular, el tetraborato de sodio mejor conocido como bórax es un compuesto importante de B y sal de ácido bórico (Figura 7), con diversos efectos benéficos en los organismos ([Abdelnour et al., 2018](#); [Khaliq et al., 2018](#); [Uluşik et al., 2018](#)). Ambos compuestos, y otros boratos se emplean como agentes bactericidas, limpiadores, antisépticos como detergentes, conservantes, fertilizantes, herbicidas e insecticidas; asimismo, el B también se utiliza para fines industriales como el aislamiento de fibra de vidrio, su producción, esmaltes de cerámica, porcelana y aleaciones metálicas ([Uluşik et al., 2018](#)).

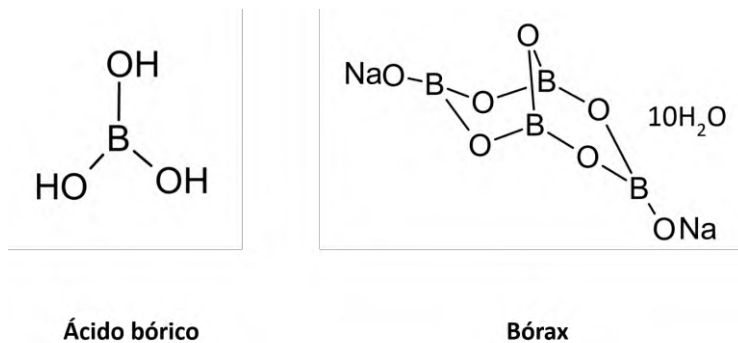


Figura 7. Estructura química del ácido bórico y bórax.

**Tabla 4.** Compuestos usuales de B. Obtenida de [Khaliq et al., 2018](#).

Compuesto	Fórmula química	Solubilidad en agua
Bórax anhidro	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	2.5556 g/100 g a 25 °C
Bórax	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	5.92 g/100 g a 25 °C
Bórax pentahidratado	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	3.6 g/100 g a 20 °C
Ácido bórico	$\text{B}(\text{OH})_3$	63.5 g/L a 30 °C
Óxido de boro	$\text{B}_2\text{O}_3$	ligera
Colemanita	$\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	ligera
Perborato de sodio mono y tetrahidratado	$\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} / \text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	15 g/L a 20 °C / 23 g/L a 20 °C
Ulexita	$\text{NaCaB}_5\text{O}_9 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	ligera

### II.3.2. Mecanismos de acción del B

Los mecanismos de acción de los compuestos de B para la diversidad de funciones biológicas se relacionan con su estructura y capacidad para formar complejos con grupos hidroxilo (OH) en posición *cis* de compuestos orgánicos. El ácido bórico y los boratos ejercen acción sobre biomoléculas precursoras o que contienen adenosina, tal como ocurre con S-adenosilmetionina (SAM) y fosfatos de adenosina, las cuales muestran mayor afinidad por compuestos de B. SAM, es uno de los principales sustratos enzimáticos, donador de grupos metilo  $\text{CH}_3$  en la metilación del ADN, para la regulación de la expresión génica en los organismos. S-adenosilhomocisteína (SAH) es producto de la metilación del ADN, el cual puede hidrolizarse a homocisteína; la disminución de SAM y SAH relacionadas con la deficiencia nutricional de B da lugar a trastornos y patologías como artritis, osteoporosis, diabetes, obesidad, cáncer, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares ([Nielsen, 2009](#); [Nielsen, 2014](#)). Por otra parte, el nucleótido nicotinamida adenina dinucleótido oxidado ( $\text{NAD}^+$ ) se enlaza fuertemente a compuestos de B, esto se

puede vincular con sus efectos bioquímicos, ya que  $\text{NAD}^+$  es esencial para el mantenimiento de la homeostasis redox celular mediante el control de ROS, y su participación en rutas metabólicas como glicólisis, fosforilación oxidativa mitocondrial, biosíntesis de ácidos grasos y ácidos nucleicos ([Xiao y Loscalzo, 2020](#)); además, la ADP ribosa cíclica se produce a partir de  $\text{NAD}^+$ , la cual es liberada por vía intracelular y se une al receptor rianodina, originando canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que el B puede acoplarse en la unión  $\text{NAD}^+$ -ADP ribosa cíclica y modular su liberación; el  $\text{Ca}^{2+}$  es un ión señal asociado con la liberación de insulina, formación de sistema óseo, respuesta inmune y función cerebral ([Nielsen, 2014](#)).

### II.3.3. Importancia del B en plantas

En las plantas, el B en su forma disponible como ácido bórico, relativamente soluble y lixiviable mediante la lluvia, como función primaria da lugar a la reticulación de pectina para la estabilidad de la pared y adhesión celular, mediante la formación del complejo ramnogalacturonano II (RG-II); además, contribuye al metabolismo de ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas y fenoles, síntesis de la pared celular, formación del citoesqueleto, expansión de órganos, integridad y permeabilidad de la membrana y desarrollo de flores y frutos ([Uluisek et al., 2018](#); [Yoshinari y Takano, 2017](#)).

### II.3.4. Importancia del B en la salud animal y humana

En los procesos biológicos en animales y el ser humano, el ácido bórico y los boratos participan mediante interacciones con componentes orgánicos como adenosina monofosfato, piridoxina, nucleótidos pirimidinas, ácido ascórbico y moléculas como ribosa, apiosa y polisacáridos ([Uluisek et al., 2018](#)). Fosfatos de adenosina (ADP) y SAM son moléculas con mayor relación a compuestos de B; el ADP es un indicador nucleótido en la respuesta neuronal de los tejidos del cuerpo y células animales, y SAM el principal sustrato enzimático en diversos tejidos del cuerpo ([Abdelnour et al., 2018](#); [Clare et al., 2019](#)). En la salud humana, los padecimientos crónicos como artritis, osteoporosis, urolitiasis y diabetes se han asociado a la disminución de SAM por deficiencia de B ([Pizzorno, 2015](#)). Se ha descrito que las dietas ricas en B en mamíferos benefician la calcificación y el mantenimiento de los huesos, la integridad y el correcto funcionamiento

de las membranas celulares y SNC, la estimulación del metabolismo de la glucosa y el control de la lipólisis ([Białek et al., 2019](#); [Hakki et al., 2013](#)).

#### II.3.4.1. Actividad hormonal

Diversos estudios refieren los efectos benéficos de compuestos de B sobre la actividad de hormonas como vitamina D, estrógeno, hormona tiroidea, insulina y progesterona ([Nielsen, 2014](#)). El ácido bórico y el bórax participan en la regulación hormonal y actividad metabólica en modelos murinos; la suplementación de una dieta estándar de B con ambos compuestos (100 mg B/kg) incide en la disminución de los niveles de leptina, insulina y glucosa, con aumento de los niveles de triyodotironina (T3) y carnitina; en particular el bórax tiene un mejor efecto y ambos contribuyen a la liberación moderada de insulina, para el mantenimiento de la glucosa en plasma y el control de leptina en sangre ([Kucukkurt et al., 2015](#)).

Por otra parte, el B incrementa los niveles de estrógeno en mujeres en estado menopáusico, con relación al nivel de  $17\beta$ -estradiol (E2), disminuyendo los efectos colaterales del climaterio como los estados sofocantes, alteraciones del sueño, calor excesivo, y cambios emocionales, asimismo, mejora el crecimiento óseo mediante la absorción de calcio y magnesio ([Khaliq et al., 2018](#); [Nielsen, 2014](#)).

#### II.3.4.2. Estrés oxidativo

Con respecto a la actividad antioxidante, se ha descrito el papel protector del tetraborato de potasio (PTB) en células sanguíneas humanas cultivadas *in vitro*, indicando que el PTB no es genotóxico y da lugar al aumento de la capacidad antioxidante en linfocitos de sangre periférica con valores de estado oxidativo total (TOS) estables ([Celikezen et al., 2014](#)). Además, [Çelikezen et al.](#), señalan el papel antioxidante del tetraborato de amonio (ATT), por su contribución en la disminución de la concentración de TOS en células sanguíneas humanas cultivadas, sin efecto mutagénico ([Celikezen et al., 2015](#)).

En modelos murinos, parámetros bioquímicos y antioxidantes como actividad GPx, GR, lactato deshidrogenasa (LDH), alanina aminotransferasa (ALT) en plasma, triglicéridos, proteínas totales, albúmina, peroxidación lipídica (LPO) y SOD, tienen relación con la suplementación de B en la dieta; en particular, la deficiencia de B (15 mg/L) incrementa la

producción de estos biomarcadores de estrés oxidativo ([Kurtoglu et al., 2018](#)). En este contexto, se ha señalado el efecto protector del ácido bórico ante el estrés oxidativo inducido por CYC en ratas Wistar; mediante la disminución del daño histológico ocasionado por CYC y la regeneración mejorada post daño tisular, control de LPO y prevención de genotoxicidad por CYC en los tejidos; por ello, el ácido bórico se describe como potenciador de la defensa antioxidante y reparación del daño al ADN ([Ince et al., 2014](#)). Asociado a este efecto, la administración de B revierte el estrés oxidativo inducido por malatión y LPO, modulando la actividad enzimática antioxidante; el B mejora la defensa antioxidante por acción protectora contra cambios histopatológicos ocasionados por malatión y da lugar a la regeneración tisular ([Coban et al., 2015](#)). Otras investigaciones sobre su papel antioxidante indican efecto protector del ácido bórico en hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>), mediante la mejora de la actividad catalítica del citocromo P450 2E1; de igual manera, destaca su acción protectora contra cambios histopatológicos inducidos por CCl<sub>4</sub> y el fortalecimiento de la defensa antioxidante inhibiendo la LPO ([Ince et al., 2012](#)). Además, se atribuye el efecto protector del bórax sobre hepato y genotoxicidad inducida por cromo; su administración disminuye la actividad de enzimas del metabolismo del hígado, número de eritrocitos policromatofílicos (PCE) y da lugar a la inhibición de LPO; se relaciona su papel hepatoprotector y antimutagénico en el daño hepático por cromo por la estabilización de la estructura membranal de hepatocitos e inhibición de efectos citogénéticos ([Maratovich et al., 2017](#)). Asimismo, se ha descrito el papel neuroprotector del bórax en intoxicación inducida por cromo debido a la modulación de los parámetros de estrés oxidativo como MDA, GSH y reducción de LPO cerebral inducida por este elemento y su rol en el aumento de la actividad de enzimas SOD y CAT ([Iztleuov et al., 2018](#)).

En relación a los efectos secundarios de fármacos antineoplásicos, el cis-diaminodicloroplatino (II) mejor conocido como cisplatino (CDDP), es uno de los medicamentos más utilizados y efectivos en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, sin embargo, sus efectos secundarios nefrotóxicos y ototóxicos son los principales factores limitantes, es por esta razón que la búsqueda de compuestos que minimicen tales efectos

es de relevancia ([Volarevic et al., 2019](#)); en este aspecto, se señala el papel del ácido bórico (mejor actividad (200 mg/kg) sobre el bórax) y el bórax en la reducción de la nefrotoxicidad inducida por CDDP, como potenciales reductores de marcadores de estrés oxidativo (GSH, MDA, PCO, GPx, 8-OHdG), inflamación (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, MCP-1, ICAM, TGF- $\beta$ ), apoptosis (TP53; caspasa 1, 3, 8, 12; BCL-2, BCL-X<sub>L</sub>, NFkB) y daño tisular en riñón asociado a EPR (GRP78, ATF-6, PERK); aludiendo a su uso como soluciones amortiguadoras para la administración de CDDP ([Hazman et al., 2018](#)).

#### II.3.4.3. Actividad anti-inflamatoria

La suplementación con B favorece el desarrollo del timo en modelos murinos, el cual media la inmunidad celular y la maduración de linfocitos T; además, el B da lugar a la secreción de IL-6, receptores Fc de macrófagos y aumento de NK ([Khaliq et al., 2018](#)). El bórax tiene un papel importante sobre los mediadores de inflamación (CMI) en BALB/c; incrementa la proliferación de linfocitos y la secreción de CMI TNF-  $\alpha$ , IL-6, IL1 $\beta$  y NO, relacionados con el aumento de células B y T de C19 y CD4, respectivamente; se enfatiza el papel regulador del bórax en BALB/c sobre CMI secretados por monocitos y macrófagos estimulados con lipopolisacáridos (LPS), como una importante respuesta a la infección y enfermedades como el cáncer; la actividad del bórax se asocia con la interacción de grupos OH o N en ligandos específicos como nucleótidos flavín/pirimidina y serina proteasas, mediante a) el resto ribosil del nucleótido a través de cis-OH, o b) en el caso de serina proteasas el involucramiento del grupo imidazol de la His vía N o grupo OH sobre Ser; contribuyendo a la modulación de la actividad enzimática mediante el control de funciones relevantes como el estallido respiratorio, esencial para la defensa contra infecciones; asimismo, se deduce por el efecto del bortezomib (BTZ), un compuesto a base de B que da lugar a la inhibición del proteosoma 26S necesario para la proliferación celular, que el bórax podría ayudar a la estabilización del complejo antígeno-receptor (Señalización Wnt) en la superficie de los linfocitos y por tanto, a su proliferación ([Routray y Ali, 2016](#)).

En humanos, el papel del bórax está relacionado la disminución de biomarcadores proinflamatorios como la concentración de TNF- $\alpha$ , proteína C reactiva altamente sensible (hsCRP) y IL-6 en plasma; un aumento en los niveles de testosterona y disminución de estradiol después de su administración ([Naghii et al., 2011](#)).

#### II.3.4.4. Actividad antineoplásica

Diversas investigaciones demuestran el efecto citotóxico de compuestos de B en ciertas líneas de cáncer. En relación a HepG2, se evidencia el efecto antiproliferativo y apoptótico del bórax dosis-tiempo-dependiente, a una concentración inhibitoria media máxima (IC<sub>50</sub>) de 4 m; la inhibición del crecimiento es asociada a apoptosis vía mitocondrial fase temprana por regulación positiva de TP53 y niveles de transcrito Bax, y regulación negativa de transcrito BCL-2; la activación de TP53 da lugar a la despolarización del potencial de membrana mitocondrial (PMM) y con ello a la muerte celular ([Wei et al., 2016](#)). Otro estudio demuestra el efecto antiproliferativo del bórax 4 mM sobre HepG2, asociado a procesos biológicos como respuesta inflamatoria, estrés oxidativo, apoptosis y transducción de señales, en función de alteraciones en la expresión de 530 genes, 146 por regulación negativa y 384 por regulación positiva; regulación negativa de MYO10, y PRUNE1, DDIT3, HSP $\beta$ -1 relacionados a metástasis, miR-4521 a transducción de señales, PLODI y BID asociados a apoptosis; regulación positiva de TNFAIP3, caspasa 6, Bax, IL-6, IL18, MAP2K6 vinculados con inflamación, estrés y apoptosis ([Wu et al., 2019](#)). Recientes estudios demuestran el efecto cito y genotóxico del ácido bórico sobre HepG2, dosis-dependiente a una IC<sub>50</sub> de 24 mM; el daño genómico es ligado a cambios importantes en el perfil transcriptómico, específicamente la regulación negativa de transcripciones del ciclo celular, reparación del ADN, organización cromosómica, y la regulación positiva de transcripciones apoptóticas; las características morfológicas del daño indican muerte por senescencia como arresto del ciclo celular en el crecimiento de HepG2 y fase temprana de apoptosis ([Tombuloglu et al., 2020](#)).

Por otra parte, en la línea humana de cáncer de próstata DU-145, el ácido bórico ejerce efecto citotóxico dosis dependiente a una IC<sub>50</sub> de 10.77 mM; la inhibición del crecimiento es asociada a apoptosis, estrés oxidativo y alteraciones morfológicas como encogimiento,

disminución celular y condensación nuclear ([Hacioglu et al., 2020](#)). Cabe mencionar que en la línea humana de leucemia HL-60, se describe el efecto citotóxico del bórax y el ácido bórico dosis dependiente a una  $IC_{50}$  de 500  $\mu$ M, la inhibición del crecimiento es asociada a apoptosis; el ácido bórico muestra un mejor efecto ([Canturk et al., 2016](#)).

### II.3.5. Bórax y otros efectos biológicos

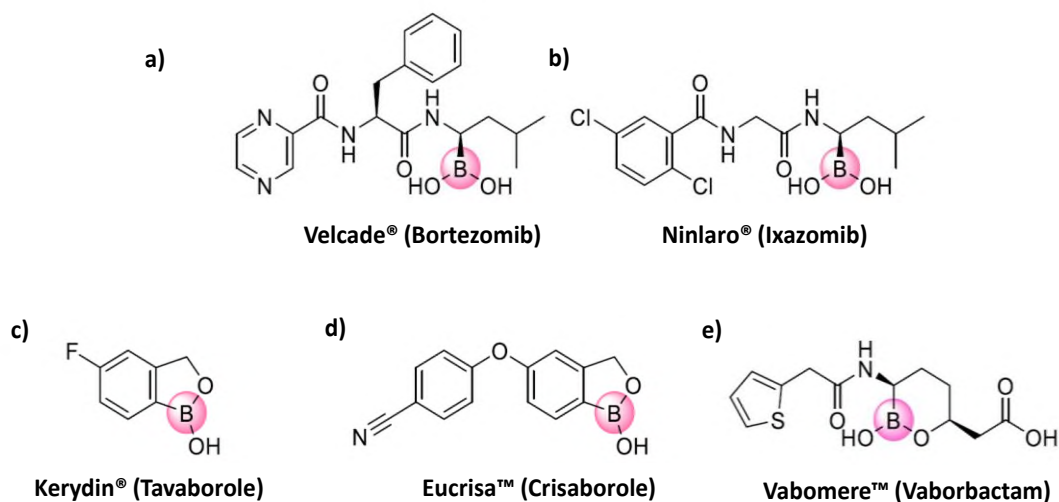
El bórax actúa como agente protector de cardiomiocitos en cultivo *in vitro* de modelo murino, mediante la regulación negativa de la expresión génica a CH inducida con ISO, por estimulación de la tasa de proliferación e inhibición de la apoptosis; el pretratamiento de bórax 13  $\mu$ M inhibe el efecto hipertrófico por reducción de receptores adrenérgicos  $\alpha$ 1AR y  $\beta$ 1AR, proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) particularmente Erk1/2, expresión tardía de *c-jun*, *c-fos* y *c-myc*, y disminución de factores de transcripción GATA-4, NFAT, NKx2.5 y miogenina. Su administración simultánea con ISO 10  $\mu$ M provoca la inhibición parcial de Akt1 y Erk1/2, disminución de NFAT y pérdida de actividad de *c-myc* y *c-jun* ([Hernández et al., 2020](#)).

Por otra parte, se reporta su potencial efecto epigenético sobre el grado de metilación global del ADN en tejidos de SNC, corazón, hígado y páncreas de modelo BALB/c, mediante la disminución de los patrones de metilación global por suplementación de B (1mg/d) en la dieta estándar; particularmente el bórax ejerce mejor efecto epigenético en tejido pancreático ([Martínez, 2018](#)).

En relación a su efecto quimioprotector, se ha descrito que el bórax es antígenotóxico para la acción de aflatoxina B1 (AFB1) en linfocitos humanos; AFB1 es una toxina producida por *Aspergillus flavus* contaminante de alimentos, considerada carcinógena y mutagénica en animales y humanos, es por ello que la búsqueda de agentes eliminadores de radicales libres es de interés, en este contexto, se ha demostrado que el bórax inhibe perfiles citogenéticos como la tasa de formación de micronúcleos (MNs) y el intercambio de cromátides hermanas (SCEs) inducidos por AFB1 ([Turkez et al., 2012](#)).

### II.3.6. Compuestos borónicos

Con respecto a fármacos a base de B, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ha aprobado cinco medicamentos de ácido borónico (Figura 8), los cuales tienen potencial en diversos padecimientos y actividad antineoplásica; a) BTZ es descrito como el primer fármaco aprobado para el tratamiento de mieloma múltiple (MM), cuyo mecanismo de acción es la inhibición del proteosoma mediante ubiquitinación selectiva, bloqueando la degradación de proteínas apoptóticas en células tumorales; b) ixazomib, análogo de BTZ fue aprobado también para tratamiento de MM con mismo mecanismo de acción; c) tavaborole se utiliza para el tratamiento de onicomicosis, cuya acción es la inhibición de ARNt sintetasa fúngicos para prevenir su síntesis proteica; d) crisaborole es empleado para tratar la dermatitis atópica, mejor conocida como eccema, actuando como inhibidor de la fosfodiesterasa 4 (PDE-4) y liberador de citocinas proinflamatorias; y e) vaborbactam es utilizado para infecciones bacterianas mediante la inhibición de  $\beta$ -lactamasa ([Plescia y Moitessier, 2020](#)). Otros compuestos análogos para padecimientos como diabetes mellitus, tripanosomiasis, eccema, hepatitis C, vaginosis bacteriana, cáncer e infecciones de tuberculosis están bajo investigación.



**Figura 8.** Fármacos a base de B aprobados por la FDA. Obtenida de [Plescia y Moitessier, 2020](#).

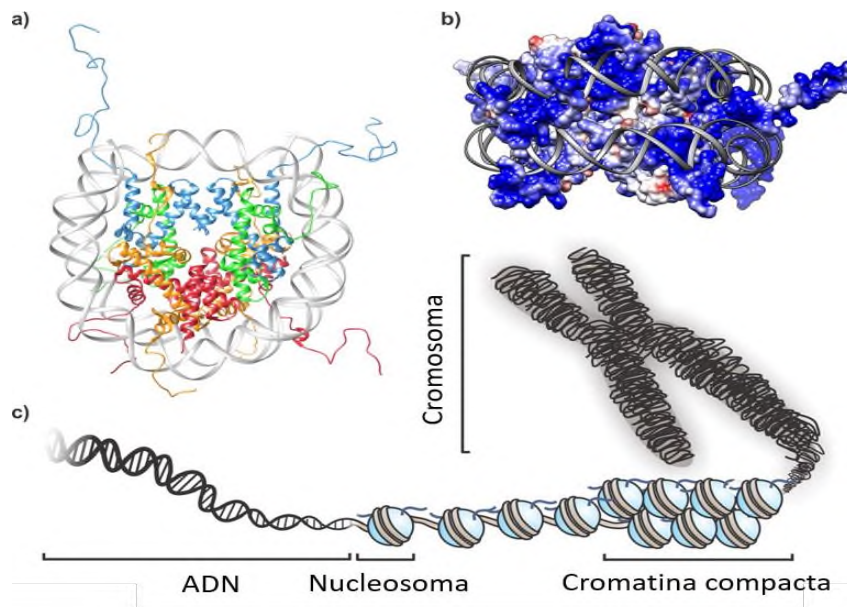
Asociado al efecto de compuestos borónicos, se ha demostrado que la combinación de curcumina con 2-aminoetil difenil borato (DPBA) y BTZ, da lugar a la inhibición del crecimiento en MCF-7 y la línea humana de cáncer de pulmón (A549), potenciando su efecto antioxidante y antiproliferativo a una  $IC_{50}$  de 19.5 mM y 32.3 mM, respectivamente ([Kim et al., 2018](#)).

Por otra parte, el fructoborato de calcio (CF) comercialmente FruiteX-B<sup>®</sup>, es un complejo de fructosa con ácidos borónicos (intracelular) o ésteres (extracelular), vendido como suplemento por su contribución en el mantenimiento óseo y la salud cardiovascular ([Marone et al., 2016](#); [Mogoşanu et al., 2016](#)), así como otros beneficios en la salud humana relacionados a osteoporosis, artritis, inflamación y dolor ([Scorei y Scorei, 2013](#); [Scorei et al., 2009](#); [Scorei y Rotaru, 2011](#)); su mecanismo de acción está asociado a la inhibición de citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-1 $\beta$  ([Scorei y Rotaru, 2011](#)). En pacientes con artritis reumatoide activa (AR) se ha demostrado la disminución de CMI, que incluyen tasa de sedimentación eritrocítica (ESR), hsCRP, IL-1 $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , en tratamientos con CF y bórax como coadyuvantes con etanercept; CF muestra mejor efecto antiinflamatorio sobre AR ([Hussain et al., 2017](#)). Asimismo, la mejora en la salud cardiovascular está relacionada con la disminución de lipoproteínas de baja densidad (LDL), triglicéridos (TG), IL-6 y IL-1 $\beta$  ([Rogoveanu et al., 2015](#)).

En células de BC MDA-MB-231, se ha demostrado el efecto cito y apoptótico del CF dosis dependiente a una  $IC_{50}$  de 2.25 mM, mediante apoptosis independiente de TP53 regulado negativamente y de transcrito BCL-2, y regulación positiva de procaspasa 3, caspasa 3 y cyt c citosólico ([Scorei et al., 2008](#)). Otro estudio en MDA-MB-231 corrobora el efecto citotóxico del CF dosis dependiente a una  $IC_{50}$  de 50  $\mu$ M, por inhibición de la proliferación celular y actividad antimetastásica mediante apoptosis por regulación positiva de caspasa 3 y negativa de factor de incremento endotelial vascular (VEGF) ([Tepedelen et al., 2017](#)).

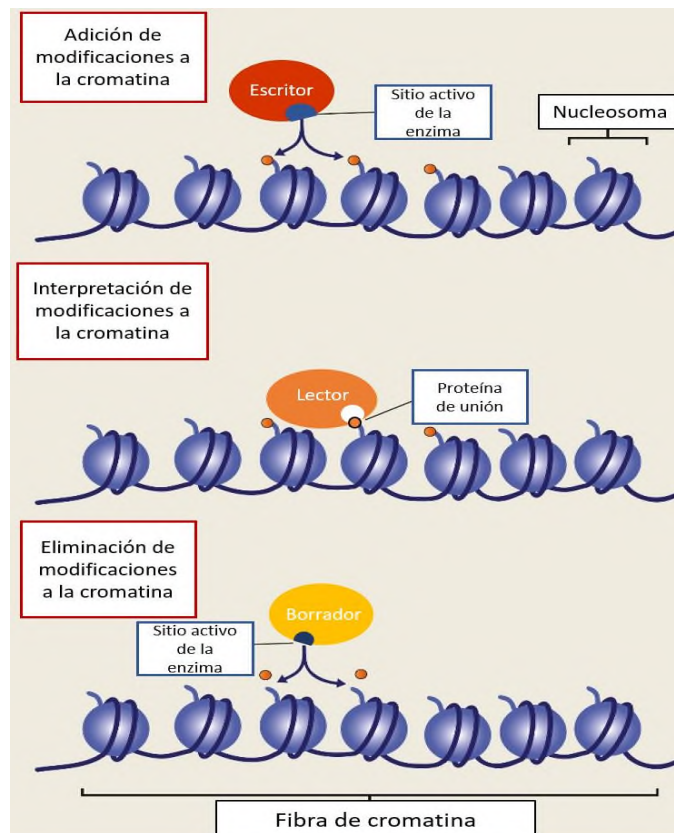
## II.4. Epigenética

El material genético se encuentra empaquetado como cromatina en las células, en unidades fundamentales de repetición denominados nucleosomas, con dos copias de histonas principales H2A, H2B, H3 y H4 que forman un octámero rodeadas por un segmento de ADN de 147 pares de bases (pb); los nucleosomas están separados por ADN de 10 a 60 pb (Figura 9) ([Cheng et al., 2019](#)). El fenotipo de las células fue explicado durante mucho tiempo por las bases genéticas a raíz del descubrimiento de la estructura del ADN, sin embargo, la diversidad de fenotipos en los organismos que compartían el mismo genoma, no podía ser solamente explicada por alteraciones en las secuencias del ADN, es así como surge una nueva área llamada epigenética ([Cheng et al., 2019](#)). El término fue introducido por el embriólogo Conrad Waddington en 1942 como “epigénesis”, en definición a múltiples procesos de desarrollo entre el genotipo y el fenotipo; posteriormente hasta el siglo XXI se conceptualizó como la investigación sobre las alteraciones de la cromatina por modificaciones químicas del ADN o de las proteínas histonas, sin cambios en la secuencia nucleotídica ([Deichmann, 2016](#)).



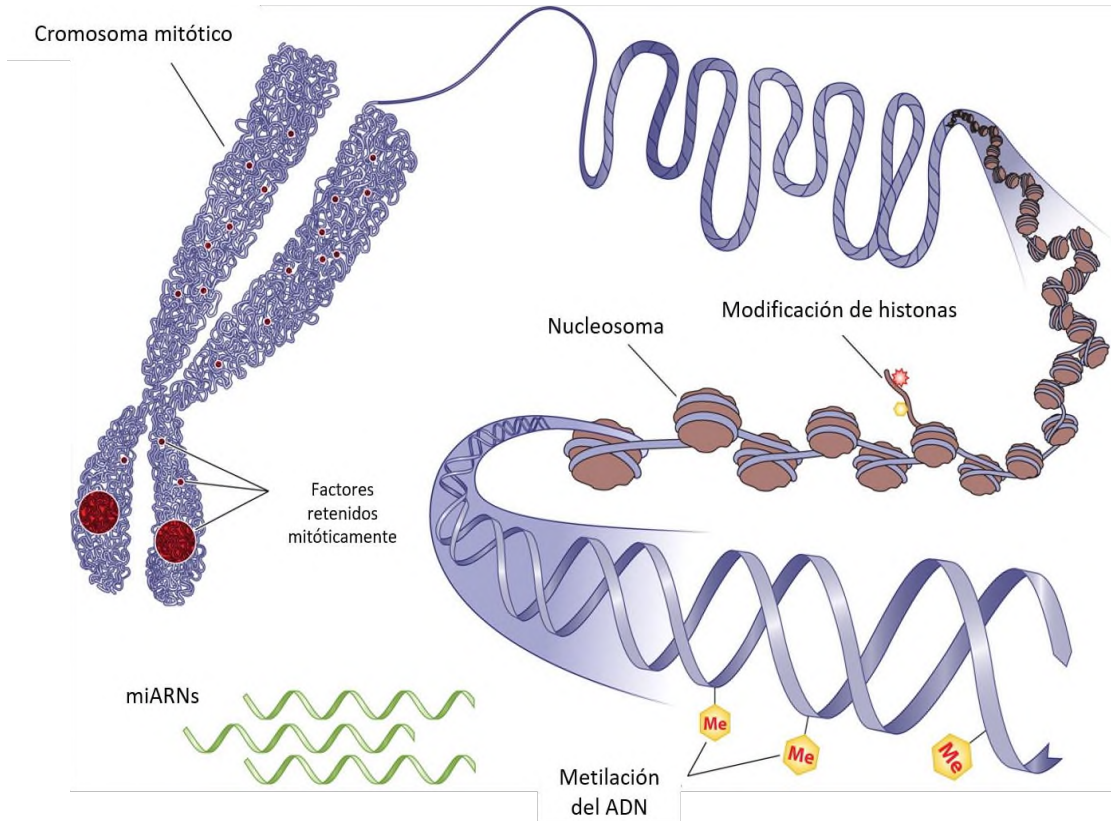
**Figura 9.** Arquitectura de la cromatina en células eucariotas. a) Estructura de un mononucleosoma. El ADN (gris) se envuelve alrededor de dos copias de H2A (naranja), H2B (rojo), H3 (azul) y H4 (verde). b) Octámero de histonas. c) Representación esquemática de la arquitectura del genoma. Obtenida y editada de [Müller y Muir, 2015](#).

La epigenética es un mecanismo genómico que influye de manera reversible en la expresión génica, mediada por factores intracelulares como las modificaciones químicas al ADN e histonas, y extracelulares como los factores ambientales que incluyen componentes nutricionales y dietéticos, el estilo de vida, el ejercicio, las toxinas, entre otros, estímulos que en conjunto dan lugar a la remodelación del genoma constructiva o perjudicialmente ([Abdul et al., 2017](#); [Cheng et al., 2019](#)). Estos cambios contribuyen a procesos biológicos como el crecimiento celular, la diferenciación, y también al desarrollo de enfermedades ([Cheng et al., 2019](#)). Los elementos modificadores reguladores (EMR) se dividen de acuerdo a sus papeles como “escritor”, “lector” y “borrador”; los escritores y borradores son las enzimas que transfieren o eliminan grupos químicos hacia el ADN e histonas; por otra parte, los lectores son proteínas que tienen la capacidad de reconocer el ADN o las histonas modificadas (Figura 10) ([Cheng et al., 2019](#)).



**Figura 10.** Elementos modificadores reguladores de la cromatina, escritores, lectores y borradores. Obtenida y editada de [Brien et al., 2016](#).

Los eventos epigenéticos actúan en sinergia e incluyen metilación del ADN, modificaciones de histonas y acción de ncARNs, principalmente lncARNs y miARNs (Figura 11) ([Bhol et al., 2019](#); [Singhal et al., 2016](#); [Villanueva et al., 2020](#)).



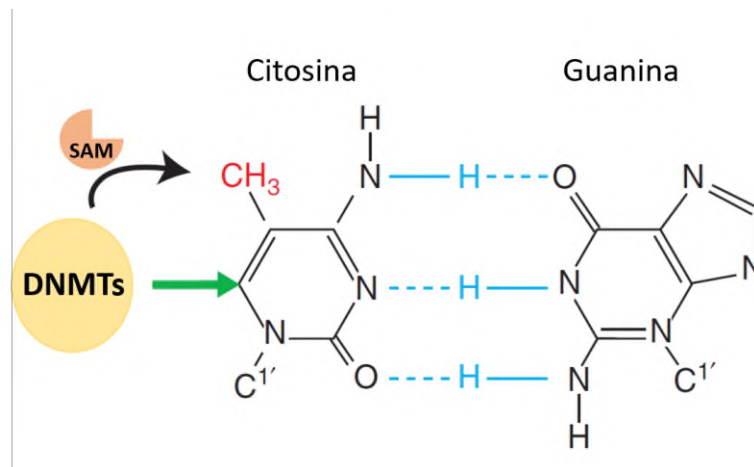
**Figura 11.** Eventos epigenéticos. Metilación de ADN, modificación de histonas, modulación de la expresión génica mediada por ARNs no codificantes. Obtenida y editada de [Zaidi et al., 2010](#).

#### II.4.1. Metilación del ADN

La metilación del ADN es una de las modificaciones epigenéticas mejor caracterizadas, estudiadas y diversas entre las especies, ocurre en los contextos CG, CHG y CHH, donde H puede ser A, C o T; es una marca epigenética estable que da lugar a la regulación de la expresión génica y juega un papel importante en el crecimiento y desarrollo de plantas y mamíferos, conservada en el contexto CG mejor conocido como “sitios CpG” ([Bartels et al., 2018](#)).

En particular, en mamíferos es introducida de novo por ADN metiltransferasas 3 (DNMTs3) durante el desarrollo temprano en las células germinales y para su mantenimiento en las células somáticas por ADN metiltransferasas 1 (DNMTs1) ([Bartels et al., 2018](#); [Jeltsch y Jurkowska, 2014](#)). La metilación del ADN es relevante para la estructura de la cromatina y participa en procesos biológicos como el mantenimiento celular, el silenciamiento de elementos transponibles, la regulación de la expresión génica, la inactivación del cromosoma X y la impronta genómica ([Li y Zhang, 2014](#); [Zeng y Chen, 2019](#)).

Esta modificación ocurre en dinucleótidos CpG por la adición de un grupo metilo (CH<sub>3</sub>) en la posición 5 de la pirimidina en la 2'-desoxicitosina (2dC) para formar 5-metil-2'-desoxicitosina (5mC); reacción catalizada por DNMTs y SAM donador de grupos CH<sub>3</sub> (Figura 12) ([Abdul et al., 2017](#); [Bartels et al., 2018](#); [Grazioli et al., 2017](#); [Singhal et al., 2016](#); [Villanueva et al., 2020](#)).

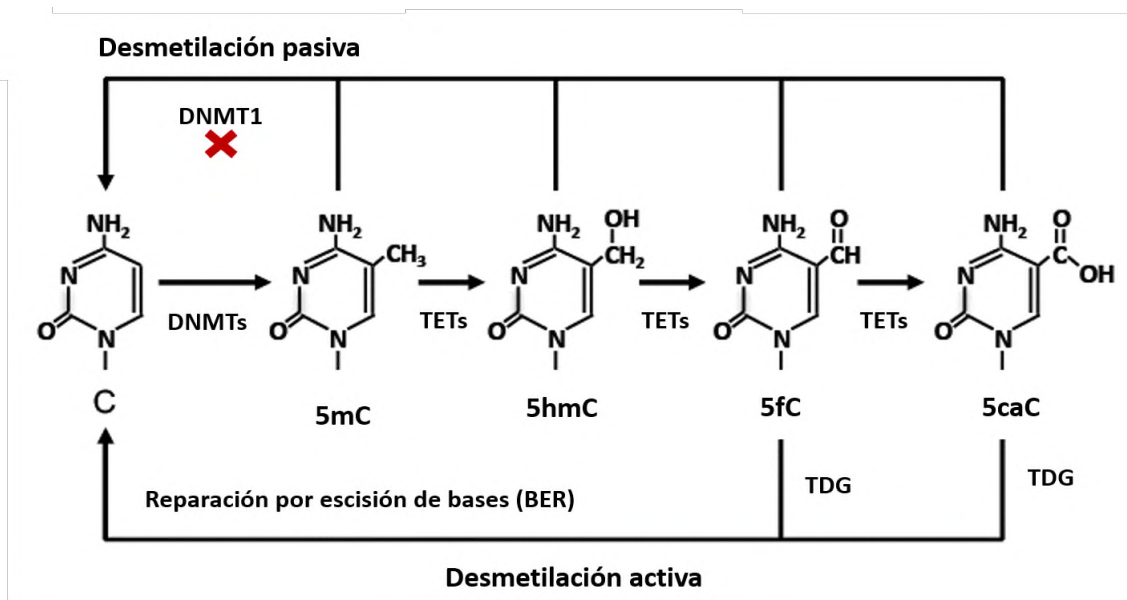


**Figura 12.** Metilación de la citosina. Adición de un grupo metilo (rojo) en la posición 5 del anillo de la pirimidina por acción de SAM y asociación covalente de DNMTs con la posición del carbono 6 (flecha verde); se muestra el emparejamiento de bases CG (líneas azules). Obtenida y editada de [Li y Zhang, 2014](#).

### II.4.1.1. Metilación del ADN de mantenimiento y desmetilación

Los patrones de metilación del ADN son transmitidos de manera estable en células somáticas, durante la replicación del ADN por acción de DNMT1 con gran afinidad hacia el ADN hemimetilado; de manera general, DNMT1 es reclutada directamente por el antígeno nuclear en proliferación (PCNA), y la proteína 1 de unión a ADN hemimetilado (UHRF1); de este modo, DNMT1 es regulada por enzimas asociadas a la cromatina como la desmetilasa 1 específica de lisina (LSD1) mediante modificaciones postraduccionales (PTMs) (Kim y Costello, 2017).

La eliminación de la metilación del ADN puede darse mediante mecanismos pasivos y activos; la desmetilación pasiva del ADN ocurre por la pérdida de la maquinaria de metilación durante las subsecuentes etapas de replicación, mientras que, la desmetilación activa del ADN se produce por un proceso enzimático que elimina o modifica grupos CH<sub>3</sub>, por enzimas de la familia de translocación diez-once (TET), las cuales oxidan 5mdC a 5-hidroximetil-2'-desoxicitosina (5hmdC); 5hmdC puede oxidarse adicionalmente a 5-formilcitosina (5fC) y/o 5-carboxicitosina (5caC) (Figura 13) (Gujar *et al.*, 2019; Kim y Costello, 2017; Lio *et al.*, 2020).



**Figura 13.** Metilación del ADN y desmetilación del ADN; desmetilación pasiva y activa. Obtenida y editada de Zeng y Chen, 2019.

#### II.4.1.2. Metilación del ADN de novo

La metilación del ADN de novo es un proceso dinámico en etapas de desarrollo temprano en células germinales, ocurre durante la gametogénesis y embriogénesis después de la fertilización, mediante la acción de DNMT3L, homólogo de DNMT3 que interactúa con la histona H3 lisina K4 (H3K4) no metilada, para el reclutamiento de DNMT3A y DNMT3B; ambas enzimas interaccionan con desacetilasas, metiltransferasas H3K9 y factores de transcripción represivos, que en conjunto con otros componentes inducen la remodelación de la cromatina por modificaciones de las histonas H3K4me ([Gujar et al., 2019](#); [Kim y Costello, 2017](#)).

#### II.4.1.3. Metilación global y específica del ADN

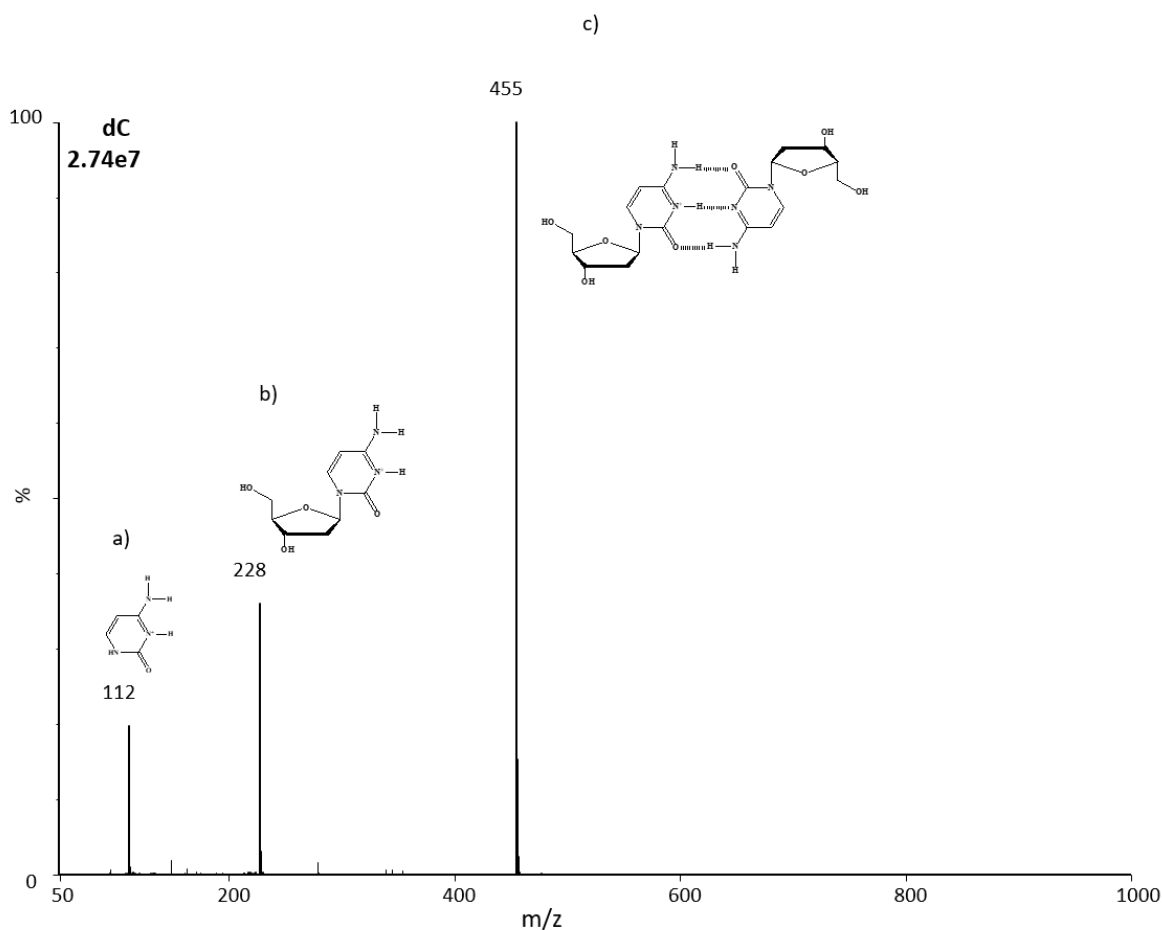
El grado de metilación global hace referencia al contenido total de 5mdC en el genoma; en mamíferos, alrededor del 70 % al 90 % de los sitios CpG se encuentran metilados sin uniformidad en su distribución, y están ubicados en secuencias intergénicas, secuencias de ADN repetitivas y exones; es un bioindicador de eventos epigenéticos a gran escala, en el que la hipermetilación global denota la ganancia de metilación en sitios particulares que no lo están en condiciones normales, mientras que, la pérdida de ésta se relaciona con tasas elevadas de mutación, activación de elementos transponibles, fragmentación del cromosoma y otros fenómenos de inestabilidad genómica global ([Dabrowski y Wojtas, 2019](#); [Singhal et al., 2016](#)).

Generalmente, se emplean procedimientos analíticos para la determinación de metilación global (Tabla 6), calculada como el porcentaje molar de citosinas metiladas con respecto a las citosinas totales ([Alcazar et al., 2016](#); [Chen et al., 2013](#); [Lopez et al., 2011](#); [Rastegar et al., 2018](#)), descrita en la siguiente ecuación:

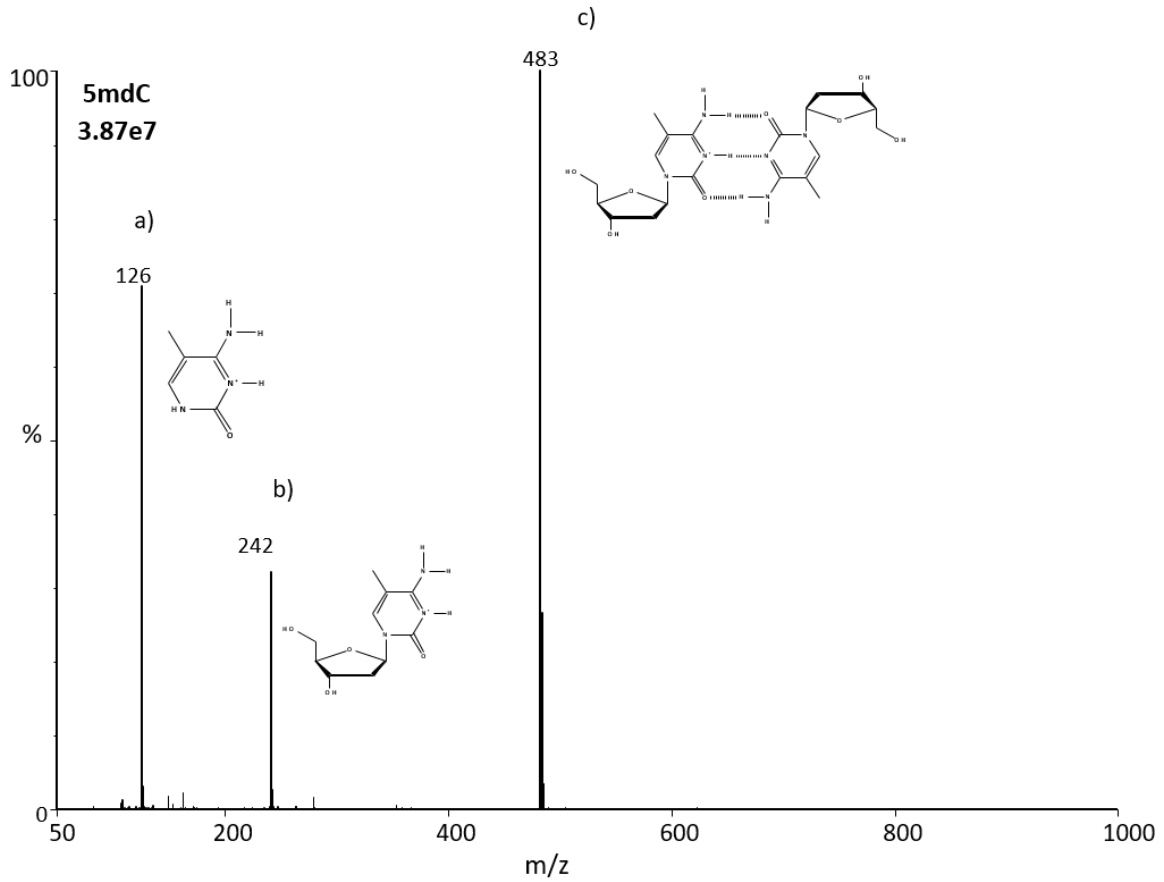
$$\%5mdC = \frac{5mdC}{5mdC + 5dC}$$

**Fórmula de metilación global del ADN**

Procedimientos de HPLC, y acoplados a espectrometría de masas (MS) debido a su sensibilidad, reproducibilidad, y confiabilidad de los resultados son los de elección, los cuales, permiten evaluar la metilación en las nucleobases del ADN o ARN mediante el seguimiento de los nucleósidos y sus modificaciones ([Gawade et al., 2016](#); [Huang et al., 2016](#); [Lai et al., 2019](#); [Lan et al., 2019](#); [Liang et al., 2016](#); [Liao et al., 2019](#); [Qi et al., 2019](#); [You et al., 2019](#)). En MS los espectros de los nucleósidos de interés correspondientes a su ion molecular protonado  $[M+H]^+$ , ion molecular fragmentado  $[M\text{-desoxirribosa}]^+$  y su dímero iónico  $[2M+H]^+$  son monitoreados. Espectros de masas correspondientes a dC, 5mdC y 5hmdC se muestran en las Figuras 14, 15 y 16.



**Figura 14.** Espectro de masas de dC, a) ion molecular protonado  $[M+H]^+$ , b) ion molecular fragmentado  $[M\text{-desoxirribosa}]^+$  y c) dímero iónico  $[2M+H]^+$ . Obtenida de [Martínez, 2018](#).



**Figura 15.** Espectro de masas de 5mdC, a) ion molecular protonado  $[M+H]^+$ , b) ion molecular fragmentado  $[M\text{-desoxirribosa}]^+$  y c) dímero iónico  $[2M+H]^+$ . Obtenida de [Martínez, 2018](#).



En seguimiento a la metilación global del ADN, en particular para MCF-7 (Subtipo Luminal A; consultar [Tabla 1](#)) que es positiva para el receptor de estrógeno, proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP): BP-2, BP-4 y BP-5, y expresión del oncogén WNT7B, y cuyo crecimiento es inhibido por el TNF- $\alpha$  ([Colección de Biología Celular ATCC, 2020](#)); su perfil de metilación global del ADN como en otras líneas de cáncer (A549 y A2780) se caracteriza por hipometilación 5mdC $\approx$ 3.1 %, en comparación con el patrón global en otros organismos (Tabla 5).

**Tabla 5.** Porcentajes de metilación global del ADN en diferentes muestras, incluyendo plantas, animales, bacterias y células de cáncer MCF-7, A549, A270<sup>a</sup>.

Muestra	% 5mdC	Referencia
Plantas	11.34	(Choi <i>et al.</i> , 2009)
Animales	6.08	
Bacterias	6.31	
Leucocitos de pacientes con BC	3.98	
MCF-7	$\approx$ 3.4	(Bachman <i>et al.</i> , 2014; Lewinska <i>et al.</i> , 2017; Lewinska <i>et al.</i> , 2017)
A549	1.9	(Iglesias <i>et al.</i> , 2015)
A2780	2.3	

<sup>a</sup>A2780, línea humana de cáncer de ovario.

Por otra parte, el grado de metilación específica es asociado con la represión transcripcional o el silenciamiento de los genes, que normalmente implica hipometilación de promotores constitutivos llamados “housekeeping”, y genes supresores de tumores; su análisis permite comprender la regulación en estas secuencias particulares, proporcionando información sobre la proliferación celular y patrones inusuales o

conocidos como “aberrantes” en dichas regiones, debido al bloqueo de factores de transcripción y moléculas asociadas ([Singhal et al., 2016](#); [Urbano et al., 2019](#)).

Las células cancerosas presentan hipometilación global del ADN e hipermetilación en regiones promotoras de genes de supresión tumoral, característicamente para cada tipo de neoplasia ([Grazioli et al., 2017](#); [Kim y Costello, 2017](#); [Locke et al., 2019](#); [Zeng y Chen, 2019](#)). Por lo regular, para su determinación se emplean técnicas de biología molecular ([Pérez et al., 2019](#); [Šestáková et al., 2019](#)) (Tabla 6).

**Tabla 6.** Métodos para análisis de metilación del ADN. Consultar tabla completa de [Kurdyukov Y Bullock, 2016](#).

Método	Cantidad de gADN	Referencia
Métodos de metilación global del ADN		
LC-MS/MS	100 ng-1 µg	( <a href="#">Le et al., 2011</a> ; <a href="#">Quinlivan y Gregory, 2008</a> ; <a href="#">Liu et al., 2008</a> ; <a href="#">Song et al., 2005</a> )
Ensayo luminométrico de metilación (LUMA)	250-500 ng	( <a href="#">Karimi et al., 2006</a> ; <a href="#">Karimi et al., 2006</a> )
Pirosecuenciación LINE-1	50 ng	( <a href="#">Estécio et al., 2007</a> )
HPLC-UV	3-10 µg	( <a href="#">C.Kuo et al., 1980</a> )
Métodos para identificación de regiones diferencialmente metiladas		
Enriquecimiento de regiones 5mdC por pull-down con proteína MBD (seguimiento por NGS o microarreglos)	Kit MethylCap (Diagenode) 200 ng- 1.2 µg	(De Meyer et al., 2013; <a href="#">Hsu et al., 2014</a> )
	Kit de enriquecimiento ADN metilado MethylMiner™ 5 ng-1 µg	



Métodos para identificación de regiones diferencialmente metiladas		
Enriquecimiento para regiones 5mdC por proteínas pull-down MBD2b/MBD3L1 (basado en MIRA) (seguimiento por NGS o microarreglos)	1 ng-1 µg	( <a href="#">De Meyer et al., 2013</a> ; <a href="#">Tompkins et al., 2012</a> )
HumanMethylation450 Matriz BeadChip Illumina	0.5 ng-1 µg	( <a href="#">Marabita et al., 2013</a> )
WGBS Illumina	50-100 ng	( <a href="#">Johnson et al., 2012</a> ; <a href="#">Ziller et al., 2015</a> )
RRBS Illumina	1 µg	( <a href="#">Lee, 2014</a> ; <a href="#">Meissner et al., 2005</a> )
Meti-MiniSeq (RRBS mejorado)	100 ng-5 µg	( <a href="#">Götze et al., 2015</a> ; <a href="#">Meissner et al., 2005</a> )
Basado en PCR (digestión seguida por PCR)	One Step Kit qMethyl™ (Zymo Research) ≥20 ng	(Al-Moghrabi et al., 2014; <a href="#">Rao et al., 2012</a> )
	Kit EpiTect II metilación del ADN (Qiagen) 1-4 µg	

## II.4.2. Modificaciones de histonas

Las histonas son proteínas alcalinas altamente conservadas en células eucariotas, compuestas de aminoácidos básicos (generalmente Lys y Arg), encargadas de empaquetar y ordenar el ADN en compartimentos especializados llamados nucleosomas, los cuales son unidades repetidas de cromatina formados de un octámero de cuatro histonas: H2A, H2B, H3 y H4 (Figura 8) ([Abdul et al., 2017](#); [Grazioli et al., 2017](#); [Müller y Muir, 2015](#)). Las histonas juegan un papel importante en los cambios de estado activo e inactivo de la cromatina, regulando la expresión génica por la modulación de su conformación y accesibilidad ([Abdul et al., 2017](#); [Villanueva et al., 2020](#)). Las alteraciones de histonas son PTMs que comúnmente incluyen acetilación (Lys), metilación (Lys, Arg y Gln) y fosforilación (Ser y Thr) de regiones de histonas específicas, especialmente H3 y H4 ([Grazioli et al., 2017](#); [Müller y Muir, 2015](#); [Villanueva et al., 2020](#)). Otras PTMs son la O-GlucosilAcetilación, amidación, hidroxilación, ubiquitinación, ácido piroglutámico, sulfatación, ADP-ribosilación, desaminación e isomerización de prolina (Tabla 7) ([Villanueva et al., 2020](#)).

### II.4.2.1. Acetilación de histonas

Fue una de las primeras PTMs identificadas, que consiste en la adición o eliminación de un grupo acetilo ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ) en residuos de Lys extremo N-terminal ([Abdul et al., 2017](#); [Villanueva et al., 2020](#)). Estas reacciones son catalizadas por enzimas histonas acetiltransferasas (HATs) que añaden grupos  $\text{CH}_3\text{CO}$ , e histonas deacetilasas (HDACs) que los eliminan; la acetilación remueve la carga positiva de las histonas disminuyendo la interacción con la carga negativa del grupo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) del ADN y, por lo tanto, es asociada con la activación de la transcripción al favorecer el relajamiento de la cromatina; las HDACs pueden revertir este proceso, el cual es relacionado con la reducción de la actividad transcripcional ([Grazioli et al., 2017](#); [Villanueva et al., 2020](#)).

**Tabla 7.** PTMs más frecuentes, su localización y funciones. Obtenida y editada de [Virág et al., 2020](#). Consultar [lista de aminoácidos](#).

PTM	Localización	Funciones primordiales
Acetilación	Lys N-terminal	Localización subcelular, estabilidad proteica, regulación de interacciones ADN-proteínas
Metilación	Lys, Arg	Regulación de interacciones proteína-proteína
Fosforilación	Ser, Thr, Tyr	Regulación de actividad enzimática
O-GlucosilNAcetilación	Ser, Thr/Asn	Estabilidad de plegamiento proteico
Amidación	C-terminal	Transducción de señales, reconocimiento de receptores
Hidroxilación	Pro, Lys	Estabilidad de colágeno
Ubiquitinación	Lys, Cys, Ser, Thr N-terminal	Degradación proteosomal
Ácido piroglutámico	Glu, Gln	Estabilidad proteica
Sulfatación	Tyr	Fortalecimiento de interacciones proteína-proteína
ADP-ribosilación	Lys, Arg, Asn, Glu	Señalización celular, reparación del ADN
Desaminación	Glu	Obtención de energía, detoxificación celular
Isomerización de prolina	Pro	Producción de colágeno, mantenimiento óseo

#### II.4.2.2. Metilación de histonas

Consiste en la adición de grupos  $\text{CH}_3$  a residuos de Lys y/o Arg catalizada por enzimas histonas metiltransferasas (HMTs), y en su eliminación por histonas desmetilasas (HDMs) ([Abdul et al., 2017](#); [Villanueva et al., 2020](#)). En función del residuo modificado y el grado de metilación (residuos “K” mono, di o **trimetilados**) la PTM da lugar a la activación de la transcripción o a su represión; PTMs como **H3K4me3**, **H3K36me3** o **H3K79me3** se llevan mayormente en regiones de genes activadas, mientras que, **H4K9me3**, **H3K20me3** o **H4K27me3** son asociadas con silenciamiento génico ([Abdul et al., 2017](#); [Villanueva et al., 2020](#)).

#### II.4.2.3. Fosforilación de histonas

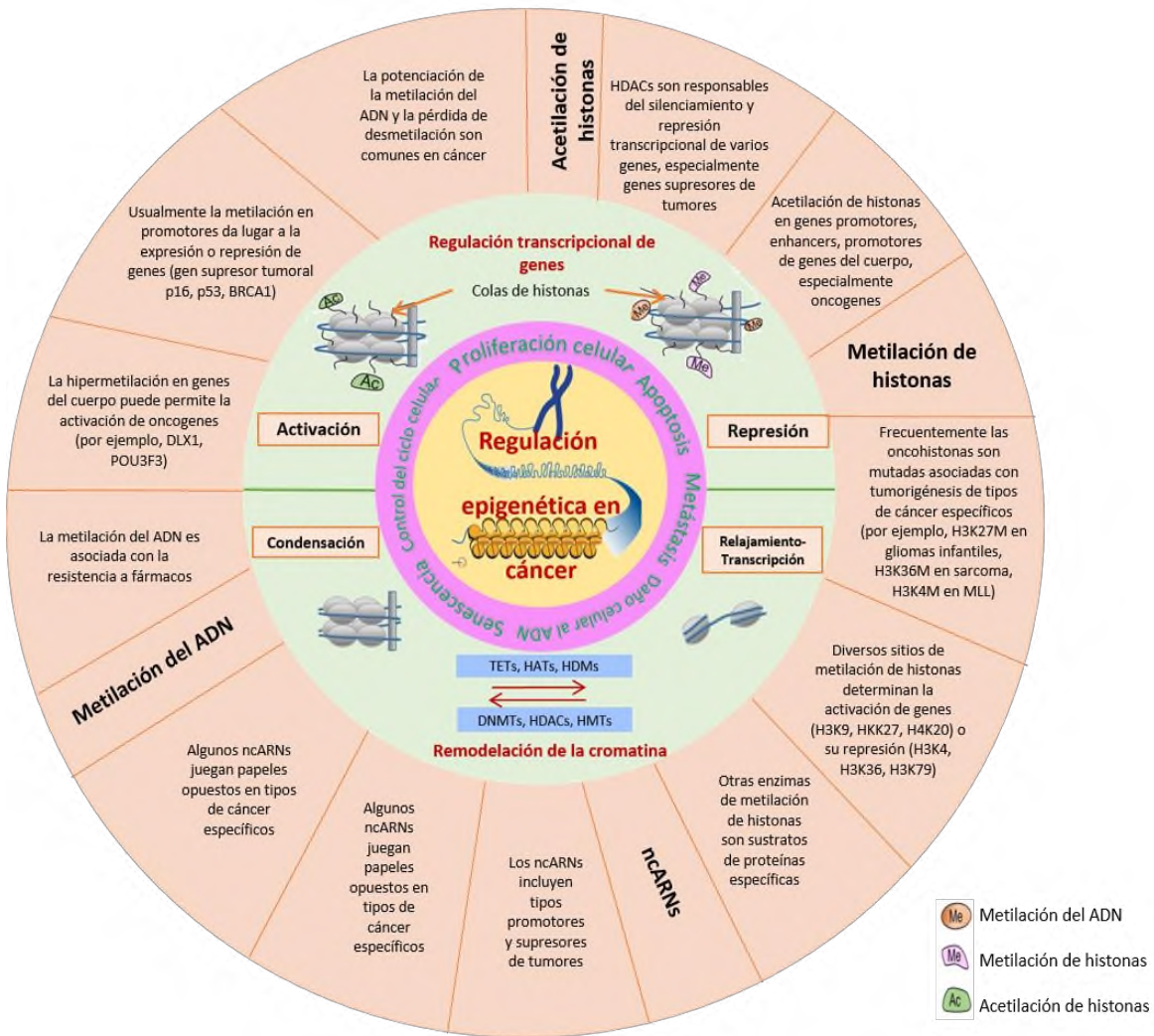
Consiste en la adición de grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  en residuos de Ser, Thr y/o Tyr catalizada por enzimas histona cinasas (HKs); es asociada con la activación de la transcripción por su papel positivo en la señalización celular, y en la conformación accesible de la cromatina, siendo la regulación de su estructura por fosforilación de histonas particularmente crucial durante la progresión del ciclo celular ([Müller y Muir, 2015](#); [Villanueva et al., 2020](#)).

#### II.4.3. Expresión de ncARNs

Los ncARNs representan alrededor del 90 % del genoma humano e incluyen diferentes tipos en función de su tamaño ([Villanueva et al., 2020](#)). Entre los ncARNs >200 pb se encuentran los lncARNs, pseudogenes y ARNs circulares (circARNs), mientras que, miARNs, ARNs pequeños derivados del tARN (tARNs), y ARNs asociados a Piwi (piARNs) abarcan los ncARNs <200 pb ([Cheng et al., 2019](#); [Villanueva et al., 2020](#)). Estas moléculas de ARN juegan un relevante papel en la modulación de la expresión génica, cuya desregulación es asociada con la patogénesis de diversas enfermedades, incluyendo el cáncer ([Villanueva et al., 2020](#)). Los miARNs son los ncARNs más estudiados, encargados de la represión de ARNs mensajeros (mARNs), por la unión a secuencias específicas en regiones 3' no traducidas; asimismo, los circARNs han generado gran atención por su papel clave en la mediación de la diafonía biológica célula-célula/tejido-tejido ([Grazioli et al., 2017](#)).

### II.4.4. Moduladores epigenéticos y progresión del cáncer

La heterogeneidad del cáncer involucra factores hereditarios y ambientales, por ello, la comprensión de los procesos epigenéticos normales e inusuales brinda potencial para el desarrollo de tratamientos más eficaces y con menores efectos secundarios (Figura 17).



**Figura 17.** Regulaciones epigenéticas en cáncer. A través de la metilación del ADN, modificaciones de histonas, remodelación de la cromatina y regulación de ncARNs la epigenética representa un papel importante en la tumorigénesis. Estos cambios principales presentan efectos reversibles sobre la activación y silenciamiento génico a través de enzimas epigenéticas y asociación de proteínas. Participación de enzimas: DNMTs, TET, HATs, HDACs, HMTs, HDMs. MLL, Leucemia aguda de fenotipo mixto. Obtenida y editada de [Cheng et al., 2019](#).

Gracias a las investigaciones en relación a los EMR de la epigenética que se dividen en “*escritores*”, “*lectores*” y “*borradores*”, se ha logrado dirigir fármacos bajo su modulación, actualmente, en diferentes fases de pruebas clínicas (Tabla 8).

**Tabla 8.** Principales elementos epigenéticos y sus fases de pruebas clínicas. Obtenida de [Ganesan, 2018](#).

Elementos epigenéticos	Fase de prueba clínica
<i>Escritores</i>	
DNMTs	Aprobado para síndrome mielodisplásico, leucemia mielomonocítica crónica y mieloides aguda
HMTs	Ensayos clínico
Arginina metiltransferasas (PRMTs)	Ensayos clínico
HATs	Preclínico
<i>Borradores</i>	
Histonas desmetilasas TET	Descubrimiento
Desmetilasas específicas de Lys (HDM1)	Ensayos clínico
Jumonji C desmetilasas (HDM2-7)	Preclínico
HDACs Zn-dependiente	Aprobado para linfoma de células T (Hodgking)
HDACs Sirtuina (Sirts)	Preclínico
<i>Lectores</i>	
Bromodominios (BRDs)	Ensayo clínico
Cromodominios (CRDs)	Preclínico
Dominios Tudor (TDRs)	Preclínico

La regulación de un gen implica la modulación de más de un evento epigenético, hasta el momento, la FDA ha aprobado seis fármacos epigenéticos para su uso clínico en el tratamiento del cáncer (Tabla 9) ([Cheng et al., 2019](#)).

**Tabla 9.** Medicamentos epigenéticos aprobados por la FDA. Obtenida de [Cheng et al., 2019](#). MDS, Síndrome mielodisplásico; CTCL, Linfoma cutáneo de células T; PTCL, Linfoma periférico de células T.

Compuesto	Sinónimo	Nombre clínico	Condición	Año de aprobación
Azacitidina	5-Azacitidina, 5-Aza-CR	Vidaza	MDS	2004/FDA USA
5-aza-2'-desoxicitidina	5-Aza-CdR, decitabina	Dacogen	MDS	2006/FDA USA
Ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA)	Vorinostat	Zolinza	CTLC	2006/FDA USA
Romidepsina	Depsipéptido, FK-229, FR901228	Istodax	CTCL	2009/FDA USA
Belisnotat	PXD101	Beleodaq	PTCL	2014/FDA USA
Pabinostat	LBH589	Farydak	Mieloma múltiple	2015/FDA USA
Chidamida	Tucidinostat, HBI-8000	Epidaza	PTCL	2015/FDA China

Dentro de los medicamentos de desmetilación del ADN se encuentran la 5-Aza-CR mejor conocida como azacitidina, y la 5-Aza-CdR como decitabina; azacitidina es un análogo de la citidina, utilizado en el tratamiento de los CTLCs, induciendo la proliferación celular y la reexpresión de genes inactivados, sin embargo, anomalías fetales y pérdida de fertilidad masculina son efectos secundarios; decitabina y otro análogo de tipo nucleósido 5-fluoro-2'-desoxicitidina (5fdC), inhiben la metilación dosis dependiente, reactivando genes en dosis bajas, pero, dan lugar a citotoxicidad en células somáticas con dosis altas y mielosupresión como efecto negativo ([Cheng et al., 2019](#)).

Por otra parte, en relación a la inhibición de HDACs se han identificado diversos compuestos, clasificados en cinco grupos: ácidos grasos de cadena corta, ácidos hidroxámicos, benzamidas, péptidos cíclicos y moléculas híbridas; en particular, los ácidos hidroxámicos han cobrado relevancia por su homología con HDACs, los cuales imitan a los sustratos de Lys y quelan el zinc bidentado; igualmente, otros inhibidores de HDACs son la romidepsina, belinostat, panobinostat y la chidamida ([Cheng et al., 2019](#)). Además, lectores BRDs son EMR que han cobrado relevancia, siendo blanco de diversos compuestos antineoplásicos (inhibidores de la familia de proteínas de BDRs y dominio extraterminal (BETs)) para la inhibición de sus sustratos enzimáticos (Tabla 10). De acuerdo a estos avances hacia EMR, la terapia epigenética dirigida tiene gran potencial en el tratamiento de diversos tipos de neoplasias sobre su compleja heterogeneidad; aunque hasta ahora se han descrito mejores efectos en tumores hematológicos, siendo prometedora para el desarrollo de combinaciones eficaces en tipos de cáncer específicos, por lo que es necesaria la comprensión de los mecanismos del epigenoma en los tumores sólidos, en especial, en aquellos quimiorresistentes como el BC ([Das et al., 2019](#); [Nan et al., 2019](#)).

**Tabla 10.** Inhibidores BETs. Consultar tabla completa de [Pérez y Esteller, 2017](#); CTI de [ClinicalTrials.gov/NIH USA](http://ClinicalTrials.gov/NIH USA)

Compuesto	Tipo de tumor	Etapas clínicas	Referencia/Identificación de ensayos clínicos (CTI)
(+)JQ1	Neoplasias hematológicas	Preclínico	( <a href="#">Chapuy et al., 2013</a> ; <a href="#">Mertz et al., 2011</a> ; <a href="#">Ott et al., 2012</a> ; <a href="#">Soodgupta et al., 2015</a> ; <a href="#">Zuber et al., 2011</a> )
	Cáncer de pulmón		( <a href="#">Lenhart et al., 2015</a> ; <a href="#">Lockwood et al., 2012</a> ; <a href="#">Peifer et al., 2012</a> ; <a href="#">Shimamura et al., 2013</a> ; <a href="#">Tsai et al., 2015</a> )
	BC		( <a href="#">Shu et al., 2017</a> ; <a href="#">Bihani et al., 2015</a> ; <a href="#">Borbely et al., 2015</a> ; <a href="#">Clarke et al., 2003</a> ; <a href="#">Motta et al., 2017</a> ; <a href="#">Feng et al., 2014</a> ; <a href="#">Pérez et al., 2016</a> ; <a href="#">Sengupta et al., 2015</a> )
	Cáncer de próstata		( <a href="#">Asangani et al., 2014</a> ; <a href="#">Blee et al., 2016</a> ; <a href="#">Chan et al., 2015</a> ; <a href="#">Klocker et al., 1994</a> )
	Cáncer pancreático		( <a href="#">Garcia et al., 2016</a> ; <a href="#">Kumar et al., 2015</a> ; <a href="#">Mazur et al., 2015</a> )
	Cáncer de colon		( <a href="#">McClelland et al., 2016</a> ; <a href="#">Zhang et al., 2015</a> )
	Cáncer de hígado		( <a href="#">Hong et al., 2016</a> ; <a href="#">Li et al., 2016</a> )
	Glioblastoma		( <a href="#">Cheng et al., 2013</a> ; <a href="#">Liu et al., 2015</a> )
	Meduloblastoma		( <a href="#">Bandopadhyay et al., 2014</a> ; <a href="#">Henssen et al., 2013</a> ; <a href="#">Venkataraman et al., 2014</a> )

Compuesto	Tipo de tumor	Etapa clínica	Referencia/CTI
I-BET762 (GSK525762)	Neoplasias hematológicas	Ensayos clínicos	NCT01943851
	Carcinoma de línea media NUT		NCT01587703
	Cáncer de pulmón de células pequeñas		
	Cáncer de pulmón de células no pequeñas		
	Cáncer de colon		
	Neuroblastoma		
	Cáncer de próstata resistente a la castración		
	<b>BC triple negativo</b>		
	<b>BC ER (+)</b>		
	Sujetos con tumores sólidos impulsados por MYCN		
	Mujeres sanas en combinación con itraconazol y rifampicina	NCT02706535	
MM	Preclínico	<a href="#">(Chaidos et al., 2014)</a>	
Cáncer de próstata		<a href="#">(Wyce et al., 2013)</a>	
BMS-986158	Tumores sólidos avanzados	Ensayos clínicos	NCT02419417
ABBV-075	Cáncer avanzado		NCT02391480
	<b>BC</b>		
	Cáncer de pulmón de células pequeñas		
	MLL		
MM			
GS-5829	Cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (y en combinación con enzalutamida)	NCT02607228	
	Tumores sólidos y linfomas (en combinación con exemestano)	NCT02392611	
	<b>BC ER (+) (en combinación con fulvestrant)</b>		

### III. JUSTIFICACIÓN

Diversas investigaciones señalan los múltiples efectos benéficos de compuestos de B, en particular, el bórax contribuye importantemente en una gama de procesos biológicos ya descritos. En relación a su actividad antineoplásica se ha indicado su papel citotóxico, antiproliferativo y apoptótico, principalmente en HepG2, y otras líneas como DU-145 y HL-60.

Por otra parte, bioindicadores como la metilación global del ADN, proporcionan información para la comprensión de la modulación epigenética en la progresión del cáncer, en especial en la heterogeneidad del BC.

Por ello, en este trabajo se evaluó el papel del bórax sobre MCF-7, y su relación con la metilación global del ADN, ya que hasta el momento solo se han referido efectos relevantes de terapia epigenética en tumores hematológicos, siendo prometedor conocer el papel del bórax sobre la regulación de este bioindicador para el desarrollo de tratamientos coadyuvantes más eficaces y con menores efectos secundarios.

En este sentido, se recurrió a un procedimiento de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (UPLC-HRMS), debido a su sensibilidad, reproducibilidad, y confiabilidad de los resultados; para la determinación del porcentaje de nucleósidos dC y 5mdC.

#### IV. HIPÓTESIS

Planteada: “El bórax tendrá un efecto citotóxico en MCF-7 y conducirá a cambios en los patrones de metilación global del ADN”.

Afirmaciones:

- 1) El bórax tiene un efecto citotóxico, apoptótico y epigenético en MCF-7.
- 2) El bórax no tiene un efecto citotóxico importante y apoptótico en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).
- 3) El bórax no tiene un efecto citotóxico en HAEC.

#### V. OBJETIVOS

##### V.1. Objetivo general

Evaluar el efecto citotóxico del bórax en MCF-7, y participación en el grado de metilación global del ADN.

##### V.2. Objetivos específicos

- V.2.1. Evaluar el efecto citotóxico del bórax en MCF-7.
- V.2.2. Evaluar el efecto citotóxico del bórax en PBMCs.
- V.2.3. Evaluar el efecto citotóxico del bórax en la línea humana de células endoteliales primarias aórticas (HAEC).
- V.2.4. Determinar el tipo de muerte celular en MCF-7.
- V.2.5. Determinar el grado de metilación global del ADN en MCF-7.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

La Figura 15 muestra la estrategia experimental llevada a cabo para la evaluación del efecto citotóxico del bórax en MCF-7.

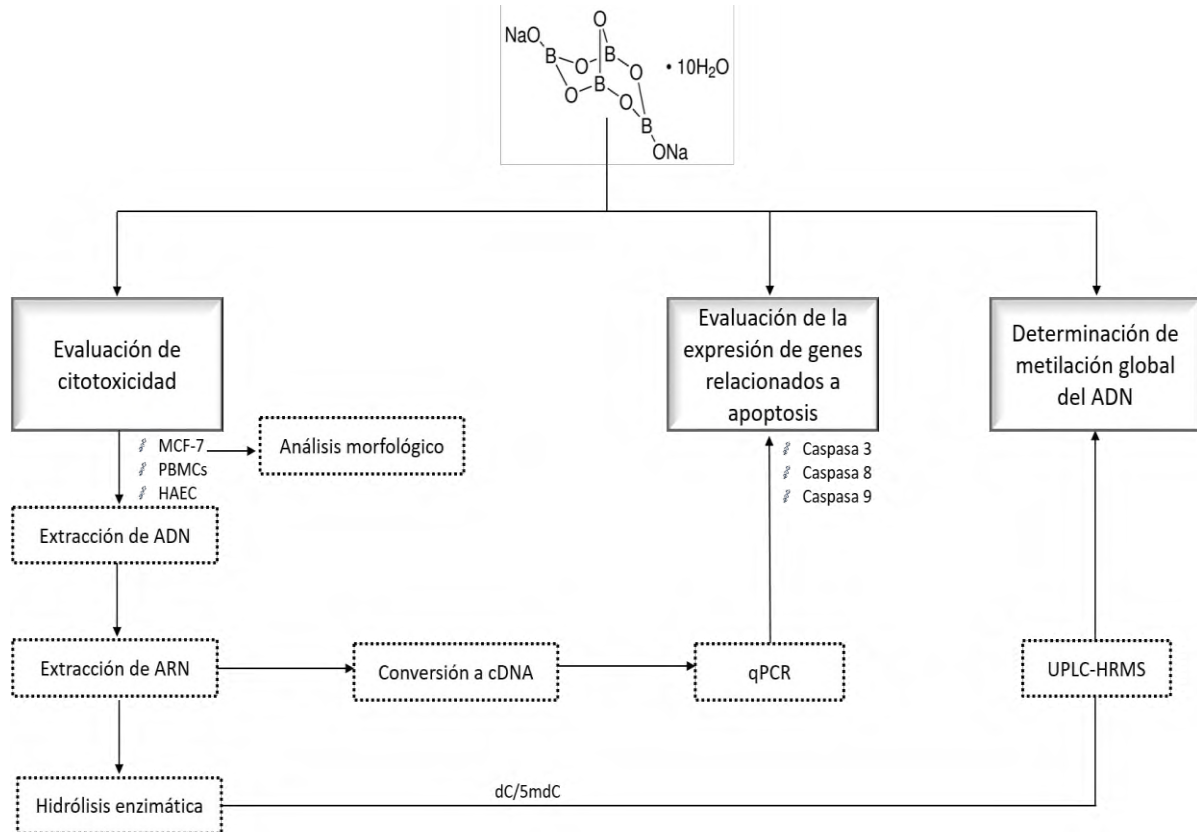


Figura 18. Diagrama experimental

## VI.1. Equipo de Laboratorio

### VI.1.1. Instrumentación analítica

- Cromatógrafo de líquidos (Acquity I-Class, Waters Corp) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución equipado con filtro de masas de cuadrupolo, celda de fragmentación molecular por colisiones CID, sistema de movilidad iónica y analizador de masas de tiempo de vuelo (Synapt G2-Si, Waters Corp).
- Columna cromatográfica UPLC Luna® Omega C18 1.6 µm (150 x 2.1 mm, Phenomenex).

### VI.1.2. Equipo para para el procesamiento de muestras

- Centrífuga Thermo Fisher Scientific™
- Vórtex Thermo Fisher Scientific™
- Balanza analítica Mettler Toledo
- Incubadora Metrix®
- Micropipetas de 20, 100 y 200 µL Mettler Toledo
- Potenciómetro Thermo Fisher Scientific™
- Lector de absorbancias de microplacas Bio-Rad iMark™
- Campana de flujo laminar BIOBASE Clase II (BSC-1300IIA2-X)
- Incubadora con CO<sub>2</sub> BIOBASE (BJPX-C80)
- Baño María Thermo Fisher Scientific™
- Termobloque/Baño de secado Thermo Fisher Scientific™
- Microscopio Motic® Moticom 5+ 5.0MP USB 3.0
- Termociclador Real Time PCR System Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific™

## VI.2. Reactivos y estándares

### VI.2.1. Reactivos para cultivo celular

Tetraborato de sodio decahidratado (1303-96-4), Inhibidor de tripsina o tripsina (T6414) y Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,3-difeniltetrazol (MTT) (M2128), Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI), Histopaque® (10771) y dimetilsulfóxido (DMSO) (D8418) obtenidos de Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Estados Unidos. Suero Fetal Bovino (FBS), Penicilina/Estreptomina (P/S) y Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS) obtenidos de Biowest®, Estados Unidos. Piruvato de sodio 100 mM (11360-070) obtenido de Gibco™, Estados Unidos.

### VI.2.2. Reactivos para extracción de ácidos nucleicos

Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) (T1503), Ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA) (E9844), Dodecil sulfato de sodio (SDS) (L3771), Proteinasa K (PK) (P2308), Isopropanol (IPA) (I9516), Etanol (EtOH) (E7023), Cloruro de sodio (NaCl), cloroformo (C2432) obtenidos de Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Estados Unidos.

### VI.2.3. Reactivos para hidrólisis de gADN, alcalinización y desfosforilación

Ácido acético (HAc) grado HLPC (45754), Gly (G7126), Cloruro de magnesio hexahidratado ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) (M2670), Acetato de zinc dihidratado (Z0625), Cloruro de calcio ( $CaCl_2$ ) (C1016), Cloruro de zinc ( $ZnCl_2$ ) (208086), Hidróxido de sodio (NaOH) (S8045), desoxirribonucleasa I (ADNasa I) (D4527), Glicerol (G9012), Nucleasa P1 (N8630), (Fosfatasa alcalina (CIAP) y Tampón CIAP) (P4978) obtenidos de Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Estados Unidos.

### VI.2.4. Reactivos y estándares para metilación global del ADN por UPLC-HRMS

Estándares de desoxirribonucleósidos 2'-desoxicidina (dC) (D8006), 5-metil-2'-desoxicidina (5mdC) (M3155), 2'-desoxiguanosina (dG) (D7145), 2'-desoxiadenosina (dA) (D7400), 2'-desoxitimidina (dT) (T9250); solventes grado UPLC Metanol (646377), y Formiato de amonio (714690) obtenidos de Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Estados Unidos.

### VI.3. Métodos

#### VI.3.1. Condiciones de cultivo celular

Las líneas MCF-7 y HAEC obtenidas del LaNSBioDyT e INP, fueron cultivadas en DMEM suplementado con 1% de L-glutamina, 10 % de FBS y 1 % de P/S, y mantenidas en incubación a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> y humedad al 95 %. Las PBMCs fueron tratadas con heparina y cultivados en RMPI suplementado con 1 % de L-glutamina, 10 % de FBS y 1 % de P/S y mantenidos en incubación a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> y humedad al 95 %.

#### VI.3.2. Cultivo de MCF-7

Las células MCF-7 fueron cultivadas de acuerdo al método de cultivo de la ATCC con ligeras modificaciones ([Colección de Biología Celular ATCC, 2020](#)), descrito a continuación. Primeramente, se retiró el medio de cultivo a las células MCF-7 y se realizó dos lavados con PBS para eliminar restos de FBS. Para su disgregación se adicionó 1 mL de tripsina 0.25 % (tripsina-EDTA) y se incubó a 37 °C durante 2 min. Una vez dispersas las células se agregó 3 mL de DMEM suplementado y se homogenizó suavemente. La suspensión de células se transfirió a un tubo de 15 mL y se centrifugó a 125 xg durante 5 min a 25 °C para obtener el sedimento celular (CS). Posteriormente, se desechó el sobrenadante y el CS se resuspendió en 1 mL de DMEM suplementado. Para el conteo celular, en un microtubo de 1.5 mL se hizo una dilución (D) 1:20 de la suspensión celular, agregando 50 µL de ésta y 950 µL de medio de cultivo. El conteo de células se realizó en cámara de Neubauer por el método de conteo en cuatro cuadrantes. Se sembró en placas de pocillos una densidad de 5x10<sup>4</sup> células/pozo con el volumen (V) obtenido de la relación expresada en la siguiente ecuación:



#### Fórmula de conteo celular

Se agregó 200 µL de V final a cada pozo (V de densidad celular requerida y medio de cultivo) y finalmente se homogenizó suavemente e incubó a 37°C durante 24 h para el tratamiento con bórax.

### **VI.3.3. Ensayo de viabilidad celular MTT en MCF-7 por exposición a bórax concentración respuesta**

Primeramente, las células MCF-7 fueron tratadas con diversas concentraciones de bórax de acuerdo a lo descrito por Wei *et al.*, referido para HepG2, con la finalidad de determinar la IC<sub>50</sub> para MCF-7 por el intervalo de concentraciones empleadas, eligiéndose como base debido a no contar con trabajo previo de evaluación del efecto del bórax en MCF-7, y ser ampliamente citado en otras líneas (consultar sección [II.3.4.4. Actividad antineoplásica](#)) (Wei *et al.*, 2016). Las células fueron tratadas con 200 µL/pozo de concentraciones crecientes de bórax (mM) (0, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16) durante 24 h para el ensayo MTT.

La evaluación de la viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo MTT de acuerdo al método descrito por Merloo *et al.*, con ligeras modificaciones (Meerloo *et al.*, 2011), descrito a continuación. Se retiró el tratamiento a la placa y se agregó 200 µL de una D 1:20 (10 µL de solución stock de MTT 5 mg/mL y 190 µL de DMEM) a cada pozo. La placa se llevó a incubación a 37°C por 4 h. Posteriormente, se retiró el MTT mediante decantación y los cristales de formazán fueron disueltos con 100 µL de DMSO/pozo. La lectura de la densidad óptica (OD) de cada uno de los tratamientos se realizó en un espectrofotómetro a 595 nm como OD estandarizada.

### **VI.3.4. Ensayo de viabilidad celular MTT en MCF-7 por exposición a bórax curso temporal**

La evaluación de la viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo MTT de acuerdo al método descrito por Merloo *et al.*, con ligeras modificaciones (Meerloo *et al.*, 2011), referido previamente, después del tratamiento estandarizado con 200 µL/pozo de bórax 8 mM para los tiempos de exposición de 24, 48 y 72 h, respectivamente. La lectura de la OD de cada uno de los tratamientos se realizó en un espectrofotómetro a 595 nm.

### VI.3.5. Extracción de gADN

La extracción de gADN de MCF-7 se realizó utilizando el protocolo por precipitación de sales establecido por Aljanabi, con ligeras modificaciones ([Aljanabi, 1997](#)), descrito a continuación. Las células tratadas con bórax (0, 1 y 10 mM, respectivamente) durante 24 h fueron disgregadas. Se adicionó 50  $\mu\text{L}$  de tripsina a cada pozo y se incubó a 37°C. Una vez dispersas, se agregó 100  $\mu\text{L}$  de DMEM suplementado y se homogenizó suavemente con ayuda de una micropipeta. Se recolectó el contenido celular de cuatro pozos en un microtubo para el gADN requerido para el procedimiento de UPLC-HRMS (5x10<sup>4</sup> células/pozo; total 2x10<sup>5</sup> células). Cada microtubo se centrifugó a 125  $xg$  durante 1 min para obtener el CS. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y el CS se lavó con PBS tres veces. A cada CS se añadió 400  $\mu\text{L}$  de amortiguador de homogenización (NaCl 0.4 M, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA pH 8), 40  $\mu\text{L}$  de SDS 20 % y 4  $\mu\text{L}$  de PK (20 mg/mL). Se mezcló y se incubó a 60 °C durante 1 hora. Después se agregó 300  $\mu\text{L}$  de NaCl 6 M y se centrifugó a 10000  $xg$  por 30 min. El sobrenadante se recuperó y se le adicionó 500  $\mu\text{L}$  de IPA y se incubó a -20 °C por 1 h. Las muestras fueron centrifugadas a 10000  $xg$  por 20 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el CS se lavó con 500  $\mu\text{L}$  de EtOH 70 %, se secó y resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de ADNAsas. Finalmente, la concentración de gADN se determinó por espectrofotometría de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (A<sub>260</sub>). La pureza del gADN se evaluó mediante la relación del cociente entre las absorbancias (ADN; ARN/Proteínas) A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> nm, respectivamente, de 1.8 a 2. El ADN se conservó a -20 °C hasta la hidrólisis enzimática. Se siguió el mismo procedimiento para obtener el gADN de PBMCs (2x10<sup>6</sup> células/pozo)

**Factor de conversión:** A=1 a 260 nm corresponde a una concentración de 50 ng/ $\mu\text{L}$  (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de dsADN puro ([Koetsier y Cantor, 2019](#)).

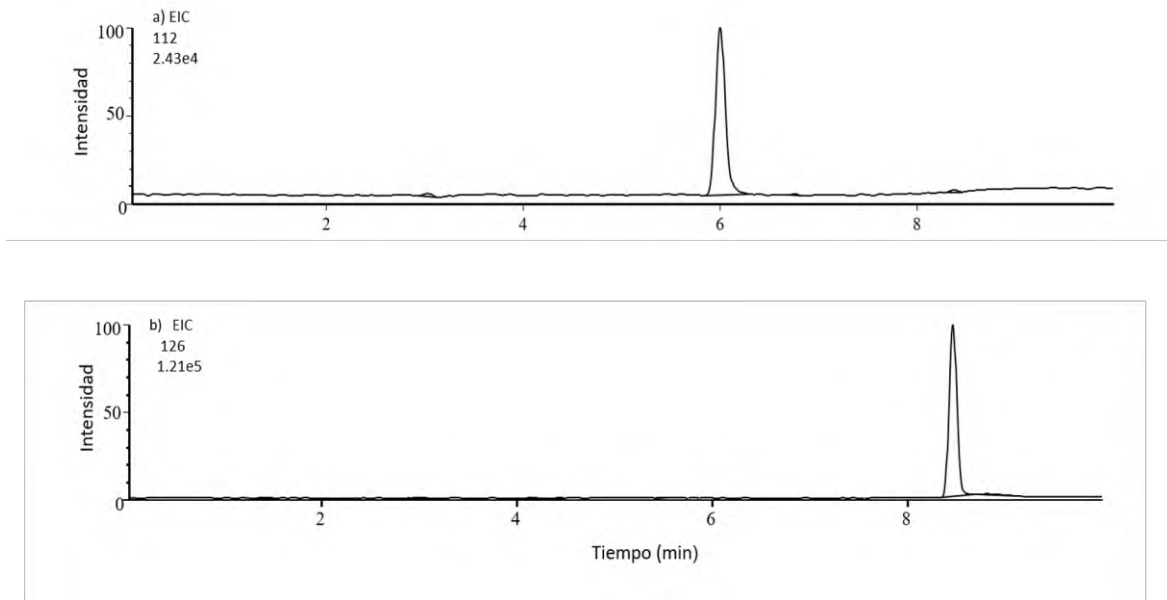
### VI.3.6. Hidrólisis enzimática, alcalinización y desfosforilación de gADN

La hidrólisis enzimática de gADN hasta nucleósidos, alcalinización, y desfosforilación se realizó mediante el procedimiento descrito por Rozhon *et al.*, con ligeras modificaciones ([Rozhon \*et al.\*, 2008](#)), como se describe a continuación. A cada muestra se agregó 5  $\mu\text{L}$  de amortiguador de hidrólisis (HAc 200 mM, Gly 200 mM,  $\text{MgCl}_2$  50 mM,  $\text{ZnCl}_2$  5 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM pH 5.3) y 10  $\mu\text{L}$  de nucleasa Mix (Nucleasa P1 (0.25 U/ $\mu\text{L}$ ) y DNAsa I (10 U/ $\mu\text{L}$ ) relación 1:1 con las muestras;  $\text{H}_2\text{O}$ ). Se mezcló, centrifugó a 10000  $xg$  por 10 s, e incubó a 37 °C durante 14 h. Posteriormente, se realizó la alcalinización y desfosforilación agregando 5  $\mu\text{L}$  de NaOH 100 mM y 10  $\mu\text{L}$  de CIAP 1 U/ $\mu\text{L}$  (con tampón CIAP). Se mezcló, centrifugó a 10000  $xg$  por 10 s y se incubó a 37 °C durante 2 h. Finalmente, las muestras se conservaron a  $-20$  °C hasta su análisis por UPLC-HRMS.

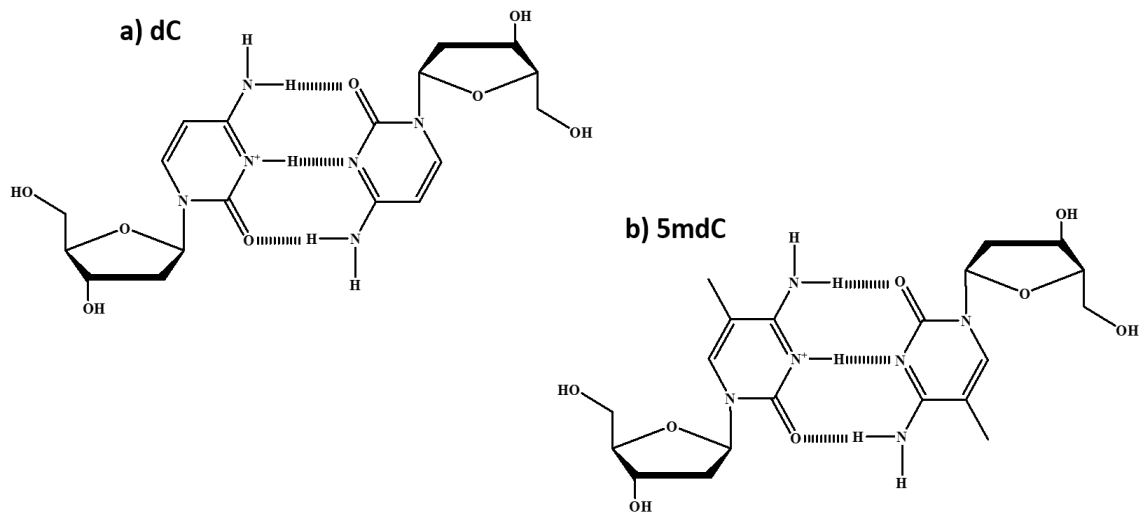
### VI.3.7. Condiciones de separación y detección de dC y 5mdC mediante UPLC-HRMS

Inicialmente, se utilizaron los estándares de desoxirribonucleósidos con la finalidad de simular la composición de muestras hidrolizadas reales monitoreando los iones propuestos por Alcazar *et al.*, ([Alcazar \*et al.\*, 2016](#)). Las condiciones cromatográficas establecidas para evaluar los parámetros de detección fueron las siguientes: la separación se llevó a cabo a 40 °C, con un flujo de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ , utilizando la columna cromatográfica UPLC Luna® Omega C18 100 Å, 1.6  $\mu\text{m}$  (150 x 2.1 mm, Phenomenex), empleando formiato de amonio 10 mM pH 4 (A) y metanol (B) como fase móvil, con el siguiente gradiente de elución: 0 a 3 min 5 % B, 3 a 7.5 min 20 % B y 7.5 a 10 min 5 % B, en un tiempo de separación de 10 min. Con estas condiciones de separación se obtuvieron los tiempos de retención de 6 min y 8.4 min para los nucleósidos de interés dC y 5mdC, respectivamente (Figura 19).

Con respecto a los espectros de masas correspondientes a dC y 5mdC, el ion de mayor intensidad correspondió a su dímero iónico  $[2M+H]^+$  (Figura 20), por lo que fue utilizado para desarrollar los experimentos de HRMS.



**Figura 19.** Cromatogramas UPLC-MS correspondientes a 1 pmol/ $\mu\text{L}$  de los nucleósidos de interés inyectado al sistema y separados con las condiciones cromatográficas establecidas: a) dC y b) 5mdC con los tiempos 6.0 min y 8.4 min, respectivamente. Obtenida de [Martínez, 2018](#).



**Figura 20.** Dímeros iónicos  $[2\text{M}+\text{H}]^+$  correspondientes a los nucleósidos de interés. a) dC y b) 5mdC. Obtenida de [Martínez, 2018](#).

Las muestras de gADN de MCF-7 expuestas a bórax durante 24 h fueron hidrolizadas, alcalinizadas, desfosforiladas y diluidas en 100  $\mu$ L de tampón de formiato de amonio. 10  $\mu$ L de cada una de las muestras fue inyectado al sistema cromatográfico utilizando las condiciones descritas previamente para UPLC-HRMS. Se siguió el mismo procedimiento para PBMCs.

#### **VI.3.8. Extracción de ARN**

La extracción de ARN de MCF-7 se llevó a cabo empleando el reactivo NZyol ©Nzytech genes & enzymes (MB18501), de acuerdo a sus especificaciones, como se describe a continuación. Primeramente, se disgregaron las células ( $2 \times 10^5$ ) con tripsina y se suspendieron en DMEM. Se mezcló y centrifugó a 125  $xg$  por 1 min para obtener el CS. A cada muestra se agregó 300  $\mu$ L de NZyol, se dejó 5 min a temperatura ambiente y se homogeneizó. Posteriormente, se adicionó 200  $\mu$ L de cloroformo, se dejó 5 min a temperatura ambiente y se homogeneizó. Después, se centrifugó a 12000  $xg$  por 15 min a 4°C, y con mucho cuidado se recuperó la fase traslúcida.

Consecutivamente, se agregó por goteo 500  $\mu$ L de IPA, se mezcló y se llevó a -20 °C durante 10 min. Se centrifugó a 12000  $xg$  por 10 min a 4 °C. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se agregó 500  $\mu$ L de EtOH al 70 % al CS. El CS se secó y resuspendió en 50  $\mu$ L de agua libre de ARNasas. Finalmente, la concentración de ARN se determinó por espectrofotometría de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm ( $A_{260}$ ). La pureza del ARN se evaluó mediante la relación del cociente entre las absorbancias (ADN; ARN/Proteínas)  $A_{260}/A_{280}$  nm, respectivamente, de 2. La integridad del material genético fue verificada mediante gel de agarosa 1 %. El ARN se conservó a -70 °C hasta la síntesis de ADN complementario (cADN) para realizar la reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa o reversa (RT-qPCR). Se siguió el mismo procedimiento para PBMCs.

### VI.3.9. Síntesis de cADN

La obtención de cADN de ARN de MCF-7 se realizó mediante el kit Thermo Scientific™ de síntesis de la primera cadena de cADN RevertAid™ Premium (K1622), de acuerdo a sus especificaciones, como se describe a continuación. Se empleó 5 µg de ARN total en un V total de 20 µL de componentes de reacción por muestra. A cada muestra se le añadió los componentes de la reacción, se incubó a 25 °C durante 10 min, seguido de 42 °C por 60 min y para terminar la retrotranscripción se llevó a 70 °C durante 10 min. Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta la qPCR. Se siguió el mismo procedimiento para PBMCs.

### VI.3.10. Técnica qPCR

La determinación de la expresión de genes relacionados a apoptosis se llevó a cabo empleando la mezcla de reacción NZY qPCR Green Master Mix (2x) ©Nzytech (MB22103), de acuerdo a sus especificaciones, cuya composición se denota en la Tabla 11. Se utilizó 100 ng de cDNA (Templado) para la reacción.

**Tabla 11.** Componentes de la mezcla de reacción

Componentes	V (µL)	Concentración
Mezcla NZY qPCR Green Master Mix (2x)	10	1 x
10 µM Secuencia sentido	1	400 nM
10 µM Secuencia antisentido	1	400 nM
Templado	1.2	
Agua libre de nucleasas	6.8	

Los niveles de expresión relativa de los genes caspasa 3, caspasa 8 y caspasa 9 fueron determinados, utilizando el gen ciclofilina como “housekeeping” para la normalización de los valores de Ct.

La expresión relativa se calculó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  establecido por Livak y Schmittgen ([Livak y Schmittgen, 2001](#)). Los perfiles de expresión fueron determinados mediante SYBR® Green. Las secuencias iniciadoras se describen en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Secuencias sentido y antisentido de iniciadores

Iniciadores	Sentido	Antisentido
Ciclofilina	CCC ACC GTG TTC TTC GAC	ATC TTC TGC TGG TCT TGC C
Caspasa 3	CTC GGT CTG GTA CAG ATG TCG A	CAT GGC TCA GAA GCA CAC AAA C
Caspasa 8	GGT CAC TTG AAC CTT GGG AA	AGG CCA GAT CTT CAC TGT CC
Caspasa 9	GTG GAC ATT GGT TCT GGA GGA T	CGC AAC TTC TCA CAG TCG ATG

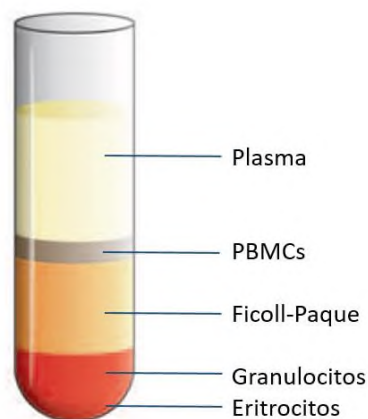
Las condiciones del termociclador se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Condiciones del ciclo térmico de la qPCR

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Etapas
1	95	10 min	Activación de la polimerasa
40	95	15 s	Desnaturalización
	60	30 s-1 min	Alineamiento/Extensión (Al paso final)

### VI.3.11. Cultivo de PBMCs

Las PBMCs fueron aisladas mediante centrifugación gradiente de densidad por el método Ficoll-Paque establecido por Bøyum ([Bøyum, 1977](#)), empleando Histopaque® (Ficoll-400 y medio de contraste radiopaco) y el procedimiento referido por Ge Healthcare con ligeras modificaciones ([Ge Healthcare, 2014](#)), descrito a continuación. Primeramente, 5 mL de sangre periférica fue extraída con jeringa con anticoagulante heparina (0.3 mL a 10000 U). Se agregó 5 mL de Histopaque® a un tubo de centrifuga de 15 mL, y cuidadosamente se colocó la sangre sobre el Ficoll-Paque (relación 1:1). El tubo se centrifugó a 400  $xg$  durante 30 min a 20 °C, para la formación de las capas de los diferentes tipos celulares de la sangre (Figura 21). Con precaución y ayuda de una pipeta Pasteur se recuperó el anillo de PBMCs de la interface transfiriéndolo a otro tubo. Consecuentemente, se agregó 10 mL de PBS y se realizó un lavado mezclando con la pipeta. Se centrifugó a 100  $xg$  durante 20 min a 20 °C. Se removió el sobrenadante y las PBMCs se suspendieron en 1 mL de RPMI suplementado, para el conteo. El conteo de células se realizó en cámara de Neubauer con colorante azul de tripano (TB) dilución 1:1 (50  $\mu$ L de suspensión de PBMCs y 50  $\mu$ L de TB). Finalmente, se sembró en placas de pocillos una densidad de  $2 \times 10^5$  PBMCs/pozo a un V final de 100  $\mu$ L e incubó a 37 °C durante 24 h para el tratamiento con bórax a los tiempos de exposición de 24, 48 y 72 h, respectivamente



**Figura 21.** Capas de los componentes celulares de la sangre obtenidos por gradiente de densidad por el método de Ficoll-Paque. Obtenida y editada de [Ge Healthcare, 2014](#).

### **VI.3.12. Ensayo de viabilidad celular MTT en PBMCs por exposición a bórax curso temporal**

La evaluación de la viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo MTT de acuerdo al método descrito por Merloo *et al.*, con ligeras modificaciones ([Meerloo et al., 2011](#)), referido previamente, después del tratamiento con 100  $\mu$ L de bórax (0, 1, 2, 4, 8 y 16 mM) para los tiempos de exposición de 24, 48 y 72 h, respectivamente. Correspondientemente para cada tratamiento a su tiempo de evaluación, se agregó directamente 10  $\mu$ L de la solución stock de MTT 5 mg/mL a cada pozo y la placa de cultivo se llevó a incubación a 37°C por 4 h. Posteriormente, se retiró el MTT con ayuda de una micropipeta, y los cristales de formazán fueron disueltos con 100  $\mu$ L de DMSO/pozo. La lectura de la OD de cada uno de los tratamientos se realizó en un espectrofotómetro a 595 nm.

### **VI.3.13. Ensayo de viabilidad celular en HAEC por exposición a bórax concentración respuesta**

Las células fueron cultivadas en DMEM como se describió para MCF-7. Una densidad de  $20 \times 10^4$  células/pozo se sembró e incubó para el tratamiento con bórax. Las células HAEC fueron tratadas con 200  $\mu$ L de bórax (0, 1 y 8 mM, respectivamente) durante 24 h para el ensayo MTT; las concentraciones del tratamiento fueron acotadas después del análisis del efecto del bórax en MCF-7 y como control positivo se empleó 10  $\mu$ L/pozo de DOX (10 mM/mL). La evaluación de la viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo MTT de acuerdo al método descrito por Merloo *et al.*, con ligeras modificaciones ([Meerloo et al., 2011](#)), referido previamente.

#### VI.3.14. Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como la media  $\pm$ SD correspondiente a tres réplicas de experimentos independientes en cada una de las determinaciones. Se utilizó el software estadístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, California, Estados Unidos). La significancia de las diferencias entre los grupos fue analizada por Análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías, para evaluación concentración respuesta y curso temporal, respectivamente. Asimismo, análisis post hoc Dunnet y Tukey, respectivamente. \* $p < 0.05$  indicó presencia de una diferencia estadística significativa, y \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.001$  considerablemente significativas.



## VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

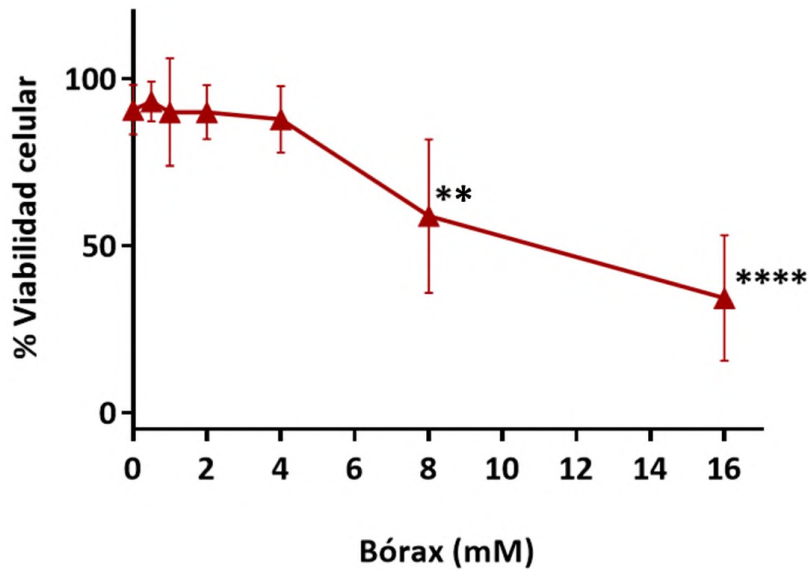
### VII.1. Evaluación de la citotoxicidad del bórax concentración respuesta en MCF-7

La viabilidad celular de MCF-7 después de la exposición a bórax a diferentes concentraciones (0, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 mM) durante 24 h, se determinó mediante el método MTT; este ensayo se basa en la relación de la actividad mitocondrial con el número de células viables, que convierten el MTT en cristales de formazán, por lo tanto, la concentración de formazán disuelto en una solución homogénea es proporcional al número de células viables ([Meerlo \*et al.\*, 2011](#)). Los resultados demostraron que el bórax disminuye la viabilidad celular de MCF-7 concentración dependiente, cuya inhibición del crecimiento celular en comparación con el grupo control (solo medio de cultivo), fue significativa (\*\*  $p < 0.01$ ) a partir de bórax 8 mM, y considerablemente significativa a 16 mM (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) (Figuras 22 y 23). El valor de la  $IC_{50}$  obtenida de estos tratamientos con bórax en MCF-7 fue de 9.042 mM, que en contraste con la  $IC_{50}$  para HepG2 descrita por [Wei \*et al.\*](#), y [Wu \*et al.\*](#), fue mayor (9.042 mM vs 4 mM) ([Wei \*et al.\*, 2016](#); [Wu \*et al.\*, 2019](#)). La menor sensibilidad de MCF-7 a bórax en comparación con HepG2, puede deberse a las características propias de cada línea celular, como el procesamiento metabólico y la capacidad de asimilación de las células hepáticas, a diferencia de las células de BC, que muestran mayor resistencia al compuesto ([Colección de Biología Celular de la ATCC, 2020](#)). La quimiorresistencia es limitante en el tratamiento del BC, debido a su heterogeneidad ([Ji \*et al.\*, 2019](#)). Asociado a la evidencia en MCF-7, se sugiere que el daño del bórax podría estar sujeto al tipo de tejido de origen de las células, es decir, un efecto dependiente del tipo celular, atribuido al metabolismo particular, y a la expresión génica específica en cada línea de cáncer ([Boehning \*et al.\*, 2018](#); [Velardi \*et al.\*, 1991](#)). En este contexto, en referencia a la DOX (comercialmente adriamicina), uno de los principales fármacos para el tratamiento del BC, leucemias, linfomas y sarcomas, se alude a la capacidad óxido/reducción de la célula, la cual es necesaria para su función citotóxica, capacidad dirigida por una red enzimática (SOD, GPx, NADPH oxidasa (NOX) y tiorredoxina (TRX)) y variable en cada tipo de cáncer ([Finn \*et al.\*, 2011](#)).

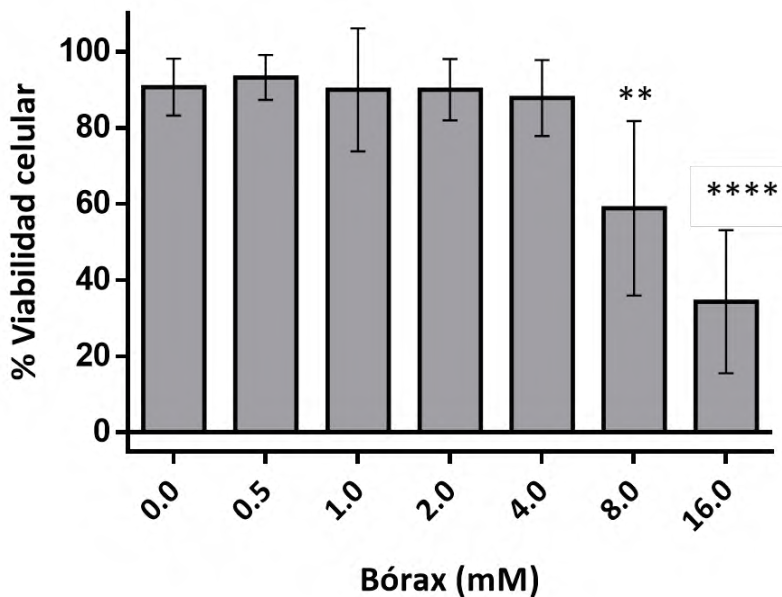


Recientes estudios mencionan que el mecanismo de esta antraciclina consiste en el intercalamiento en el ADN, que conduce a roturas en el material genético interfiriendo en la replicación del ADN; en particular en células MCF-7 resistentes a DOX, enzimas como hidroxilasas e hidroximetilasas están relacionadas al proceso metabólico, mediado además, por el cyt P450 ([Wang et al., 2019](#)). En relación al efecto del bórax, si bien su mecanismo en MCF-7 es desconocido, estos hallazgos y su similitud con los mecanismos en HepG2 y la función citotóxica de DOX, se propone que el bórax actúa a través de la alteración de la función mitocondrial y la activación de componentes de apoptosis.

En relación al efecto de otros compuestos de B, el bórax muestra mayor potencial en MCF-7 a diferencia del ácido bórico, teniendo en cuenta que la citotoxicidad del ácido bórico en HepG2 es considerablemente mucho menor, como lo indica Tombuloglu *et al.*, ([Tombuloglu et al., 2020](#)) con una  $IC_{50}$  de 24 mM (4 mM vs 24 mM); siendo necesaria la evaluación de este otro importante compuesto de B en MCF-7, como se ha descrito para HepG2, y para DU-145 por Hacıoglu *et al.*, ( $IC_{50}$  de 24 mM y 10.77 mM, respectivamente) ([Hacıoglu et al., 2020](#)). Además, en relación al efecto antiproliferativo de compuestos borónicos en MCF-7, el bórax muestra mejor citotoxicidad en comparación con la administración de la combinación de DPBA y BTZ durante 24 h (9.042 mM vs 19.5 mM) ([Kim et al., 2018](#)).



**Figura 22.** Curva concentración respuesta del efecto citotóxico del bórax en MCF-7, durante 24 h de exposición.  $IC_{50}=9.042$  mM. Los resultados se presentan como el promedio de tres réplicas  $\pm$ SD del experimento. Comparación de medias mediante prueba Dunnet (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).



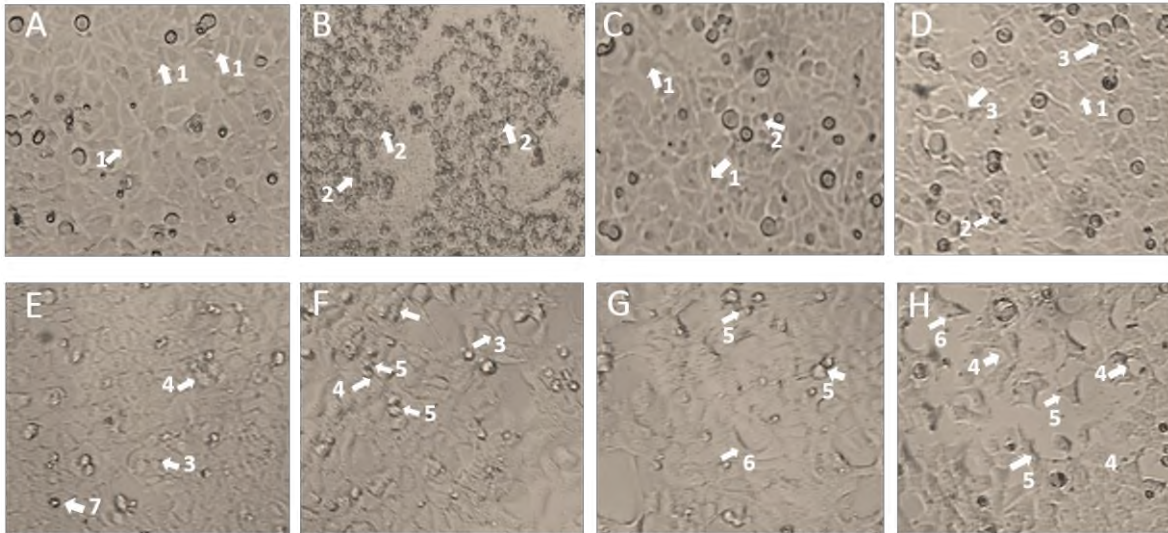
**Figura 23.** Evaluación de la citotoxicidad a 24 h de exposición a bórax en MCF-7. Los resultados se presentan como el promedio de tres réplicas  $\pm$ SD del experimento. Comparación de medias Dunnet (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).



### VII.1.2. Análisis morfológico de MCF-7 por exposición a bórax

El seguimiento microscópico del ensayo concentración respuesta a bórax durante 24 h en MCF-7 evidenció cambios morfológicos asociados a apoptosis. El análisis se realizó por microscopia de contraste de fase a 100 aumentos reales (Magnificación 10x). Los resultados mostraron cambios morfológicos en MCF-7, acentuados a medida que se incrementó la concentración de bórax, notorios a partir de 1 mM y drásticos a 16 mM (Figura 24). Las micrografías señalaron la pérdida de la agrupación característica en esta línea celular ([Colección de Biología Celular ATCC, 2020](#)), manifestada por encogimiento celular. Asimismo, se observó la formación de protuberancias en la membrana, espigas o picos equinoideos, cuerpos apoptóticos (tratamiento con DOX), y condensación de los núcleos, que son cambios distintivos de apoptosis ([Galluzzi et al., 2018](#); [Poreba et al., 2019](#); [Singh et al., 2019](#)). Además, las células perdieron su capacidad de adhesión a la placa de cultivo, dando lugar a la aparición de gran cantidad de células flotando en el medio de cultivo.

Este desprendimiento o pérdida de adhesión celular, además de los cambios morfológicos son características inherentes de apoptosis de las células formadoras de monocapa ([Chen et al., 2018](#); [Dar et al., 2019](#); [Mohammadizadeh et al., 2018](#); [Syed Abdul Rahman et al., 2013](#); [Zhong et al., 2019](#)). Por ello, para monitorear el potencial efecto citotóxico del bórax en MCF-7, se evaluó su respuesta en función del tiempo de exposición.



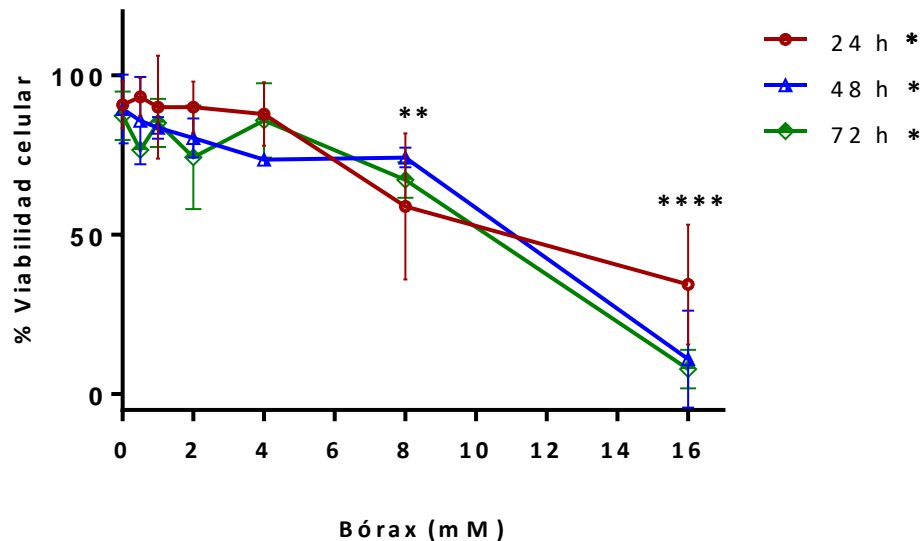
**Figura 24.** Cambios morfológicos de MCF-7 por exposición a bórax durante 24 h. A) Control, B) DOX, C) 0.5 mM, D) 1 mM, E) 2 mM, F) 4 mM, G) 8 mM, y H) 16 mM. Las flechas indican 1) células control, 2) cuerpos apoptóticos, 3) células contraídas, 4) protuberancias irregulares en la membrana, 5) núcleos condensados, 6) espigas o picos equinoideos, y 7) burbujas celulares. Magnificación 10x.

### VII.2. Evaluación de la citotoxicidad del bórax curso temporal en MCF-7

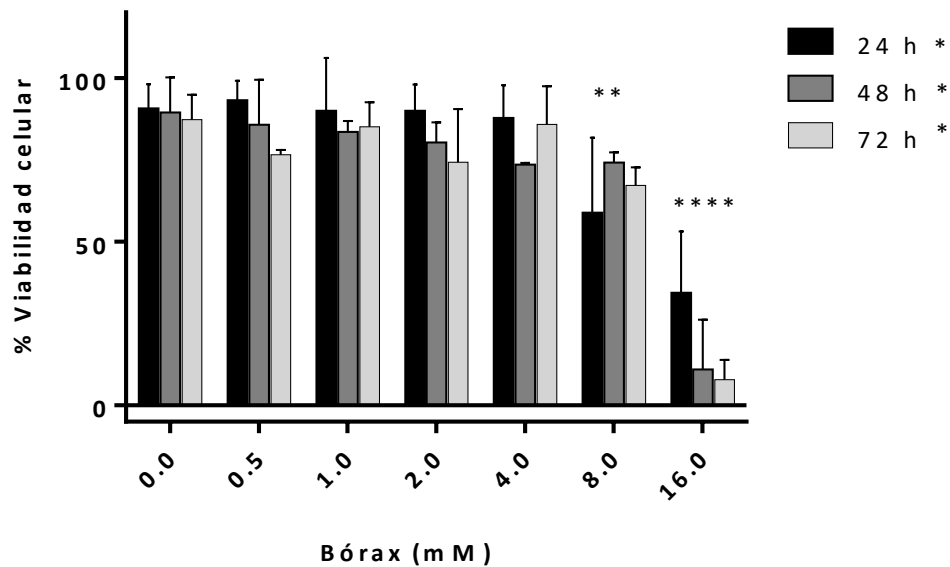
La inhibición del crecimiento en MCF-7 por efecto del bórax (0, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 mM) se monitoreó a tiempos de exposición de 24, 48 y 72 h, respectivamente, mediante el método MTT. Los resultados demostraron que el bórax disminuye la viabilidad celular de MCF-7 concentración-tiempo dependiente, de manera significativa (\*  $p < 0.05$ ) a cada tiempo de exposición (Figuras 25 y 26), similar al comportamiento descrito para HepG2 ([Wei et al., 2016](#); [Wu et al., 2019](#)). Como lo sugiere Wei et al., la exposición a concentraciones bajas de bórax (mM) por largos tiempos de exposición, podría ser equiparable a la citotoxicidad con altas concentraciones de este compuesto a tiempos de exposición cortos ([Wei et al., 2016](#)), debido al mantenimiento del efecto inhibitorio del bórax tiempo dependiente también para MCF-7. Las  $IC_{50}$  calculadas fueron de 8.441 mM, y 9.110 mM a 48 h y 72 h, respectivamente.



Con base en lo anterior, y la  $IC_{50}$  de 9.042 mM calculada a 24 h, con la finalidad de esclarecer el mecanismo de muerte por efecto del bórax se determinó la expresión de genes asociados a apoptosis, por exposición a bórax 1 mM y 10 mM a tiempos de 24, 48, y 72 h, respectivamente, en esta línea de BC.



**Figura 25.** Curva concentración respuesta curso temporal del efecto citotóxico del bórax en MCF-7, a 24, 48 y 72h, respectivamente. Los resultados se presentan como el promedio de tres réplicas  $\pm$ SD del experimento. Comparación de medias Tukey (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).



**Figura 26.** Evaluación de la citotoxicidad por exposición a bórax en MCF-7. 24, 48 y 72 h, respectivamente. Los resultados se presentan como el promedio de tres réplicas  $\pm$ SD del experimento. ANOVA de dos vías. Comparación de medias Tukey ( $*p < 0.05$   $**p < 0.01$ ;  $****p < 0.0001$ ).

### VII.3. Análisis de la expresión génica asociada a apoptosis en MCF-7

De acuerdo con los resultados de la citotoxicidad del bórax en MCF-7 y con la finalidad de esclarecer su mecanismo molecular, se analizó la expresión relativa de genes caspasas, ya que sus activaciones están asociadas a la inducción de apoptosis ([Galluzzi et al., 2018](#); [Poreba et al., 2019](#); [Singh et al., 2019](#)). Como se describió en la [sección II. 2. 3. Apoptosis](#), las caspasas se clasifican en a) iniciadoras (caspasas 8 y 9), y b) efectoras (caspasas 3, 6 y 7), cuya vía determina su activación; caspasa 8 activada en la vía extrínseca y caspasa 9 en la vía intrínseca o mitocondrial. Empleando lo referido, niveles de transcritos de caspasas 3, 8 y 9 fueron evaluados mediante la técnica RT-qPCR por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , basado en la comparación de los valores de Ct ([Livak y Schmittgen, 2001](#)); el gen ciclofilina fue utilizado como gen de referencia.



El análisis de la expresión relativa de caspasas 3, 8 y 9 por exposición a bórax 1 mM y 10 mM, respectivamente, en comparación con el control (solo medio de cultivo), mostró un incremento considerablemente significativo de los niveles de caspasa 3 y 9 (Figura 27, incisos A y C) a 48 h y 72 h, mientras que la expresión de los niveles de caspasa 8 fue considerablemente significativa solo a 48 h (Figura 27, inciso B). Estos resultados manifiestan el efecto apoptótico del bórax en MCF-7, similar al efecto de DOX ([Sharifi et al., 2015](#)) a 24 h de exposición en la misma línea; el umbral de su expresión a 48 h y 72 h (por la dosis empleada mM vs  $\mu$ M) no permitió correlacionar su efecto con los niveles de transcrito por exposición a bórax. En este contexto, Sharifi *et al.*, refieren la inducción de apoptosis vía mitocondrial en MCF-7 por DOX, mediante la regulación positiva de la expresión de Bax y caspasa 9, y la regulación negativa de BCL-X<sub>L</sub> y caspasa 8 ([Sharifi et al., 2015](#)). En comparación con la expresión de los transcritos por efecto del bórax y por DOX, sus perfiles de expresión muestran similitud, siendo caspasa 8 independiente del tiempo y la concentración, y el incremento considerablemente significativo a 48 h y 72 h de la expresión de caspasa 9. En cuanto a caspasa efectora 3, se refiere su papel en la disminución de la quimiorresistencia del BC ([Nan et al., 2019](#)); además de ser clave en la inducción de sustratos como PAPR, gelsolina y PKC- $\delta$  ([Yuan et al., 2012](#)).

Por otra parte, en lo descrito para HepG2, Wei *et al.*, señalan apoptosis vía mitocondrial como mecanismo de muerte inducido por efecto del bórax, por regulación positiva de TP53 y Bax, y regulación negativa de BCL-2; cuya modulación es crucial en su citotoxicidad ([Wei et al., 2016](#)). Además, Wu *et al.*, a través de un análisis masivo de expresión de genes refieren la regulación positiva de TNFAIP3, caspasa 6, Bax, IL-6, IL18, MAP2K6, relevantemente, entre otros, vinculados con inflamación, estrés y apoptosis; en el que su estudio muestra a gran escala los procesos biológicos implicados en la citotoxicidad del bórax en HepG2, que pueden equipararse a MCF-7. En relación al mecanismo de muerte del ácido bórico en HepG2, Tombuloglu *et al.*, indican que su efecto cito y genotóxico está ligado a la regulación positiva de transcripciones apoptóticas, con la inducción de senescencia y fase temprana de apoptosis ([Tombuloglu et al., 2020](#)).



Asimismo, para DU-145 y HL-60 se ha señalado la inducción de apoptosis por citotoxicidad del ácido bórico ([Canturk et al., 2016](#); [Hacioglu et al., 2020](#)). Con respecto a lo descrito sobre los hallazgos de este trabajo, sumado a las evidencias correspondientes al mecanismo de muerte por DOX en MCF-7, por bórax en HepG2 y HL-60, y por efecto del ácido bórico en HepG2, DU-145 y HL-60, se argumenta que la inhibición del crecimiento en MCF-7 por exposición a bórax da lugar a la inducción de apoptosis ambas vías, preferencialmente vía intrínseca o mitocondrial.

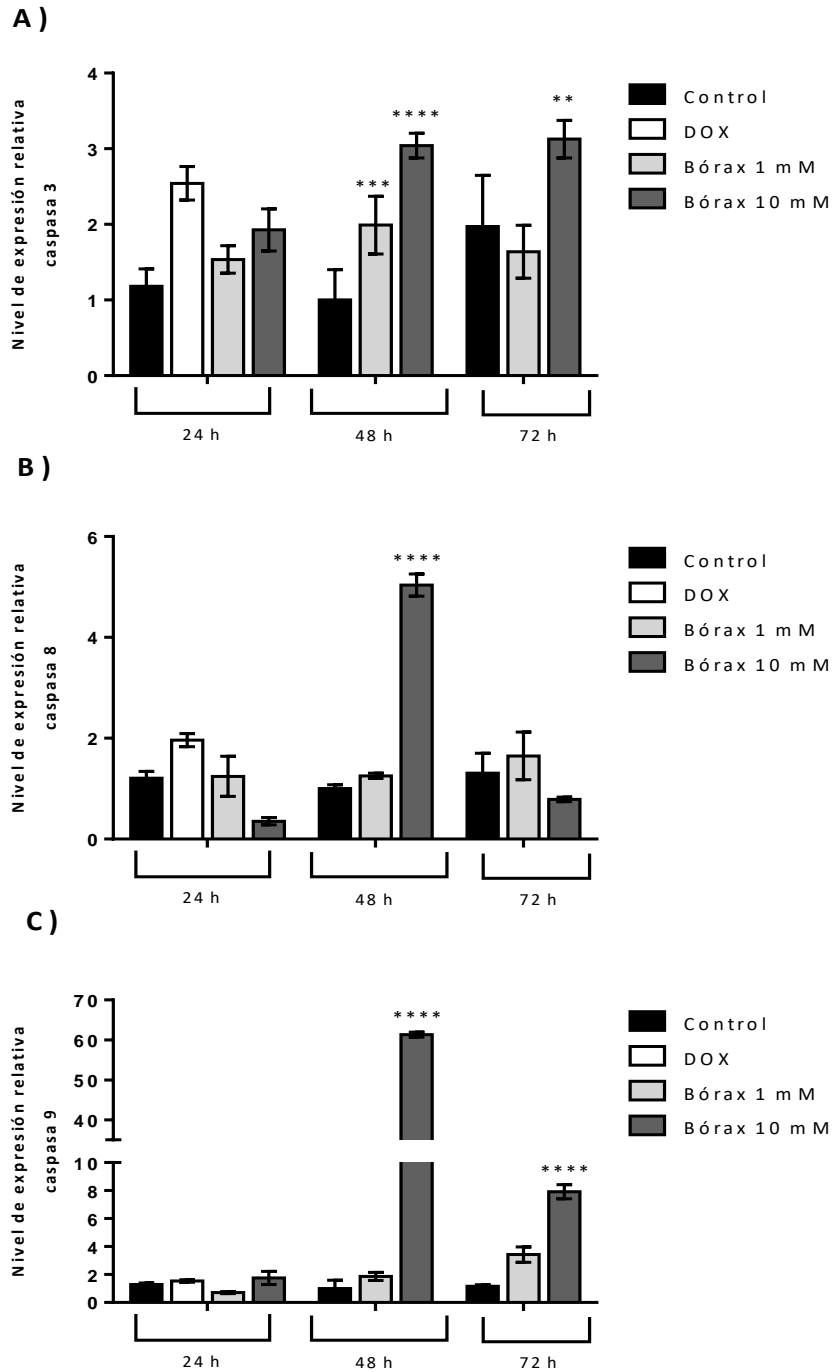
En tal sentido, como expresan He *et al.*, la inducción de apoptosis es una de las principales estrategias en el tratamiento del cáncer, cuya modulación puede cambiar la sensibilidad o resistencia a los agentes anticancerígenos ([He et al., 2015](#)), en especial en el BC. De acuerdo con lo descrito por He *et al.*, en relación al tamoxifeno, un fármaco utilizado universalmente para el tratamiento de BC ER (+), su administración en células MCF-7 se asocia a quimiorresistencia ([Das et al., 2019](#); [Li et al., 2019](#)), por ello, se ratifica la necesaria búsqueda de nuevas dianas terapéuticas; en este contexto, por la inducción de apoptosis vinculada a la citotoxicidad del bórax, se enfatiza su potencial como coadyuvante en el tratamiento de BC positivo.

Teniendo en cuenta lo anterior, la evaluación de otros compuestos para el tratamiento del BC asocian como blanco la inducción de apoptosis vía mitocondrial. Como señala Wang *et al.*, el efecto citotóxico de un complejo de Mn denominado PdpaMn sobre MCF-7, da lugar al incremento de la apoptosis vía intrínseca relacionada con la supresión de la expresión de la sintasa de ácidos grasos (FASN), la cual es una enzima promotora del crecimiento celular en BC; además de la liberación del cyt c y la activación de caspasa 9, enfatizando que la modulación del metabolismo energético como la inhibición de marcadores como FASN y la estimulación de la pérdida de actividad mitocondrial, puede ser aprovechado como diana terapéutica en el BC ([Wang et al., 2017](#)). Por otra parte Wang *et al.*, refieren que el mecanismo molecular del efecto antiproliferativo de la fisalina B (PB), un compuesto tipo esteroideo evaluado en MCF-7, está implicado en diversas rutas que incluyen la inhibición del proteosoma por ubiquitinación, la inducción de autofagia, apoptosis por estimulación de PARP, caspasa 3, 7 y 9, y TP53, e inhibición de Akt;



y la regulación negativa de receptor de andrógenos (inhibición independiente de ER, PR y HER2) ([Wang et al., 2018](#)).

En otro estudio, citando a Mohammadizahed *et al.*, se alude al uso de un complejo de Cu denominado [Cu(L)Phen] por su efecto citotóxico en MCF-7, como un potencial coadyuvante en el tratamiento del BC; este complejo da lugar a la inducción de apoptosis mediante el incremento de los niveles de expresión de Bax, caspasa 8 y TP53; previamente, descrito este mecanismo en sinergia con procesos necróticos, por el mismo grupo de trabajo ([Mohammadizadeh et al., 2018](#), [2019](#)). Adicionalmente a la susceptibilidad de MCF-7 principalmente a apoptosis, blanco de potenciales compuestos antineoplásicos antes mencionados, se ha asociado su modulación por agentes epigenéticos, tal como lo indica Putnik *et al.* En esta investigación el papel del medicamento epigenético 5-Aza-CdR y la señalización por E2, contribuyen a la expresión de alrededor de 140 genes vinculados con procesos biológicos como cascadas de señalización celular, regulación de proliferación celular y apoptosis; sugiriéndose como una combinación potencial de estrategia terapéutica del BC, mediante el uso de un agente desmetilante que previene la metilación del ADN en islas CpG (múltiples sitios CpG, regiones promotoras de genes) por su incorporación al ADN ([Putnik et al., 2012](#)). Con base en estos trabajos y los resultados en relación al efecto citotóxico del bórax en MCF-7, se argumenta que su mecanismo molecular se asocia a la inducción de apoptosis ambas vías, preferencialmente vía mitocondrial, mediante la regulación positiva de caspasas 3, 8 y 9. Asimismo, en relación a su posible efecto epigenético, se llevó a cabo la determinación de la metilación global del ADN con la finalidad de esclarecer su mecanismo molecular.



**Figura 27.** Niveles de expresión de caspasas: A) caspasa 3, B) caspasa 8 y C) caspasa 9 en MCF-7 después de exposición a bórax 1 mM y 10 mM, durante 24, 48 y 72 h, respectivamente. Gen ciclofilina como control interno. Los resultados se presentan como el promedio de tres réplicas  $\pm$ SD del experimento. ANOVA de dos vías. Comparación de medias Tukey (\* $p < 0.05$ \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).



#### VII.4. Determinación del grado de metilación global del ADN en MCF-7

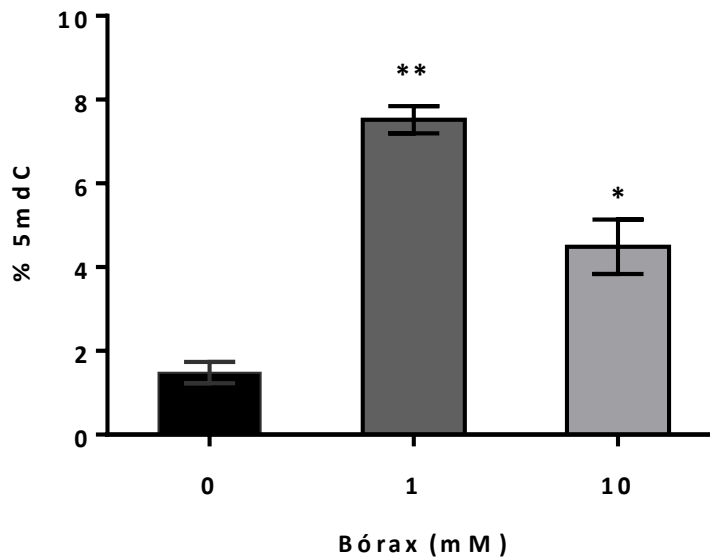
Las muestras de gADN de MCF-7 fueron hidrolizadas, alcalinizadas, desfosforiladas (2.5 µg en un V final de 80 µL), y diluidas en 100 µL de tampón de formiato de amonio. Los volúmenes de inyección de 10 µL permitieron cuantificar 5mdC en muestras de MCF-7 expuestas a bórax 1 mM y 10 mM a 24 h. Los cromatogramas UPLC-HRMS representativos de ion específico 455.189 y 483.220 m/z, correspondiente a los dímeros iónicos de los nucleósidos dC y 5mdC, respectivamente, se muestran en la Figura 29.

Los datos de las cuantificaciones del porcentaje molar de 5mdC indicados en la Tabla 14, señalaron el incremento de la metilación global del ADN en esta línea, por efecto del bórax. De acuerdo con esta tendencia se manifiesta que el efecto citotóxico y apoptótico de este compuesto está asociado con la inducción de la metilación a gran escala de los sitios CpG en BC positivo.

**Tabla 14.** Efecto del bórax sobre el porcentaje de metilación global del ADN en MCF-7. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$ SD

Muestra	% 5mdC $\pm$ SD
Control	1.48 $\pm$ 0.25
Bórax 1 mM	7.52 $\pm$ 0.33
Bórax 10 mM	4.49 $\pm$ 0.65

El análisis estadístico y post hoc permitió establecer la existencia de una diferencia significativa (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ) sobre el porcentaje de 5mdC, asociado al efecto del bórax con respecto al control (solo medio de cultivo) en MCF-7 (Figura 28).



**Figura 28.** Relación del porcentaje de metilación global del ADN en MCF-7 expuestas a bórax 1 mM y 10 mM. Los resultados se muestran como el promedio de tres réplicas  $\pm$ SD del experimento. Comparación de medias mediante prueba de Dunnet ( $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ).

Con base en esta determinación se denota que el bórax ejerce un papel relevante en la modulación de la metilación global del ADN en BC, como se reflejó con bórax 1 mM en una magnitud de 4 sobre su porcentaje de metilación característica. Asimismo, se observó un efecto similar con bórax a 10 mM, en menor magnitud (3), pérdida de actividad que podría explicarse por la posible quimiorresistencia característica del BC ([Das et al., 2019](#); [Nan et al., 2019](#)), principal desafío de las dianas terapéuticas. En este sentido, como se refirió en la sección [II. 4. Epigenética](#), los eventos epigenéticos son modificaciones reversibles, potenciales para la diagnosis y prognosis del cáncer; cuya reversibilidad en estos procesos permiten su modulación, como se ha descrito para el blanco de los fármacos antineoplásicos. En este sentido, se han señalado diversos medicamentos que tienen como diana terapéutica la metilación del ADN, la inhibición de elementos de PTMs (principalmente dirigidas a HATs y HDACs), y la combinación de ellas.



Sobre los inhibidores de la metilación del ADN, citando a [Cheng et al.](#), estos se dividen en a) análogos de nucleósidos y b) no análogos; la modificación en la citosina les permite incorporarse a los ácidos nucleicos recién sintetizados, mediante su transformación a nucleótidos, cuya inhibición de la metilación del ADN está asociada a la unión con las DNMTs. Azacitidina y decitabina son los agentes desmetilantes mejor estudiados, medicamentos aprobados por la FDA para su uso en el MDS ([Anders et al., 2016](#); [Imanishi et al., 2018](#); [Seelan et al., 2018](#)); su actividad precisa de transportadores de nucleósidos para la obtención de energía, de una red enzimática que metabolice ácidos nucleicos a 5-Aza-CdR trifosfato, y de su incorporación al gADN ([Hubeek et al., 2005](#); [Stresemann y Lyko, 2008](#)). Azacitidina, zebularina y otros análogos ribonucleósidos se incorporan al ARN mediante su fosforilación, y al ADN vía ribonucleótido reductasa (RNR); decitabina y 5fdC, análogos deoxirribonucleósidos ingresan al ADN por fosforilación ([Cheng et al., 2019](#)). Estos medicamentos tienen potencial en la modulación de la metilación específica del ADN, sin embargo, su citotoxicidad en células somáticas sigue siendo una limitante, siendo moderada su administración en los MDS (Consultar [Tabla 9](#)). Por otra parte, se alude a los análogos no nucleósidos, que tienen como blanco la reducción de la hipermetilación específica en cáncer. Estos compuestos son pequeños modulares moleculares que a diferencia de los análogos de nucleósidos, se dirigen a sitios catalíticos para desmetilar ([Cheng et al., 2019](#)). La procainamida y su análogo procaína; RG108, MG98, PRIMA-1, y SG-1027; y compuestos naturales como flavonoides, psammaplin A, y curcumina, han sido descritos como inhibidores de DNMTs e HDACs, en relación a su efecto citotóxico en diversos tipos de cáncer ([Brevini et al., 2016](#)).

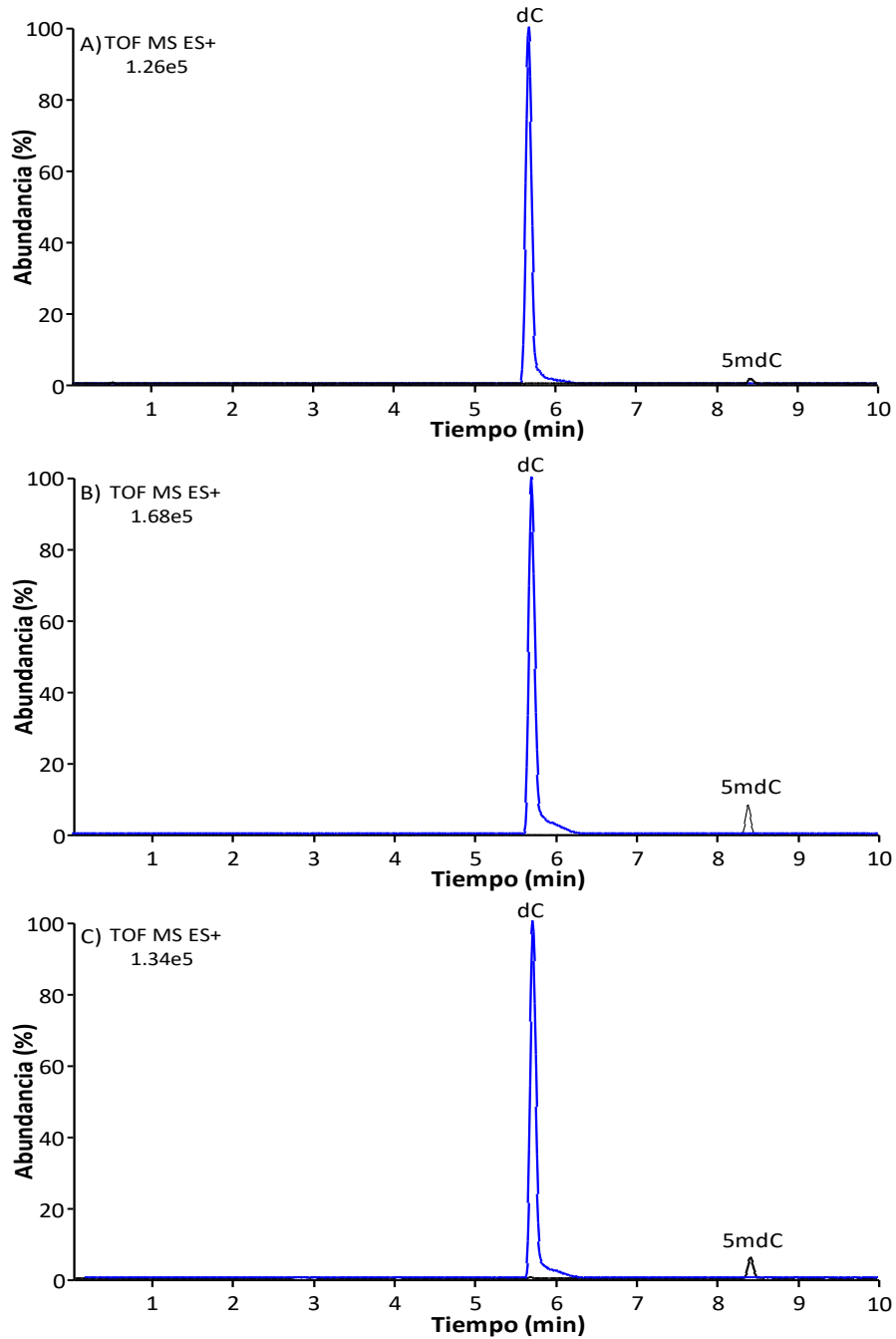
Con respecto a inhibidores de enzimas y sustratos de PTMs, se alude a aquellos dirigidos principalmente a HATs, y a BETs. En relación a compuestos que involucran la inhibición de HATs, dirigidos hacia secuencias HAT1, Gen5/PCAF, MYST (MOZ, Ybf2, Sas2 y Tip60), p300/CBP y Rtt109 ([Friedmann y Marmorstein, 2013](#)) son descritos como inhibidores de bisustratos: cofactor acetil coenzima A (Ac-CoA) y un péptido análogo al sustrato de Lys ([Yang et al., 2014](#)).



Dentro de estos compuestos, la curcumina, el garcinol y el ácido anacárdico (AnAC) (en relación en MCF-7) han sido mejor estudiados ([Schultz et al., 2017](#); [Sunagawa et al., 2018](#); [Wang et al., 2019](#)). En cuanto a los compuestos inhibidores de BETs (Consultar [Tabla 10](#)), aunque sus mecanismos aún son desconocidos, dirigirse a EMR como los lectores BRDs que se enlacen a Lys acetiladas de las colas de histonas, es de gran interés para combatir el cáncer; en este contexto, (+)-JQ1 (tieno-triazolo-1,4-diazepina), reportado por primera vez con esta actividad, ha sido evaluado en diversos tipos de cáncer, el cual da lugar a la regulación negativa de genes como MYC, E2F1, POU2AF1 en MDS, CTCL y PTCL; y en tumores sólidos a la inducción de arresto celular en G1, y apoptosis. En particular para el BC positivo, blanco de estudio del presente trabajo, se destaca el papel de (+)-JQ1 en la disminución de la resistencia adquirida al tamoxifeno. Su mecanismo molecular implica la supresión de la señalización ER (+) mediante el bloqueo de la interacción de WHSC1 con el gen ER- $\alpha$  y los BRDs 3 y 4 (BRD3/4); WHSC1 (HMTs H3K36) es un regulador positivo de la señalización ER (+) ([Feng et al., 2014](#)). Asimismo, se ha descrito su efecto citotóxico sobre subtipos triple negativo y ER (+), en combinación con inhibidores de HDACs ([Borbely et al., 2015](#)).

Estos estudios manifiestan el potencial de la comprensión de los EMR (escritores, lectores, borradores), que son elementos epigenéticos moduladores, cuya investigación de sus mecanismos moleculares brinda potencial para el desarrollo de tratamientos más eficaces en diversos tipos de cáncer, en sinergia con la acción de otros compuestos con actividad anticancerígena. En particular para el BC, cuya limitante sigue siendo la resistencia adquirida por estas células hacia los fármacos antineoplásicos, la combinación de inhibidores de sustratos y enzimas mediadores de eventos epigenéticos, brinda opciones para dianas terapéuticas más eficaces en el combate del cáncer. En este contexto, se destacan los resultados obtenidos por efecto del bórax sobre los perfiles de metilación global del ADN en MCF-7, que ratifica, en adición a su efecto citotóxico y apoptótico, su potencial en la modulación de este bioindicador, ampliando el conocimiento de su mecanismo molecular asociado a sus efectos benéficos y anticancerígenos.

Estos hallazgos argumentan su postulan al bórax como un posible coadyuvante para el BC positivo, ya que como se refirió en la [Tabla 14](#), la concentración de 1 mM es suficiente para aumentar considerablemente la hipometilación global del ADN en MCF-7, señalando que su evaluación con concentraciones bajas (< mM) a tiempos de exposición prolongados, podría equipararse al efecto de medicamentos universales para el BC, aludido adicionalmente a su efecto citotóxico y apoptótico. La evaluación epigenética del bórax, sumado a su evaluación inhibitoria en MCF-7, una de las principales líneas de BC del subtipo luminal A, permitió ampliar el panorama de su actividad antiproliferativa descrita en otras líneas de cáncer, y asociar en el presente trabajo este efecto por primera vez en BC. Sin duda, estos resultados son prometedores, junto a las diversas opciones de compuestos bajo investigación contra el cáncer, particularmente en BC positivo.



**Figura 29.** Cromatogramas UPLC-HRMS representativos de ion específico 455.189 y 483.220 m/z, correspondientes a los dímeros iónicos de los nucleósidos dC (azul) y 5mdC (negro), respectivamente. Obtenidos de hidrolizados de gADN de MCF-7: A) De referencia, B) expuestas a bórax 1 mM, y C) expuestas a bórax 10 mM; 24 h.



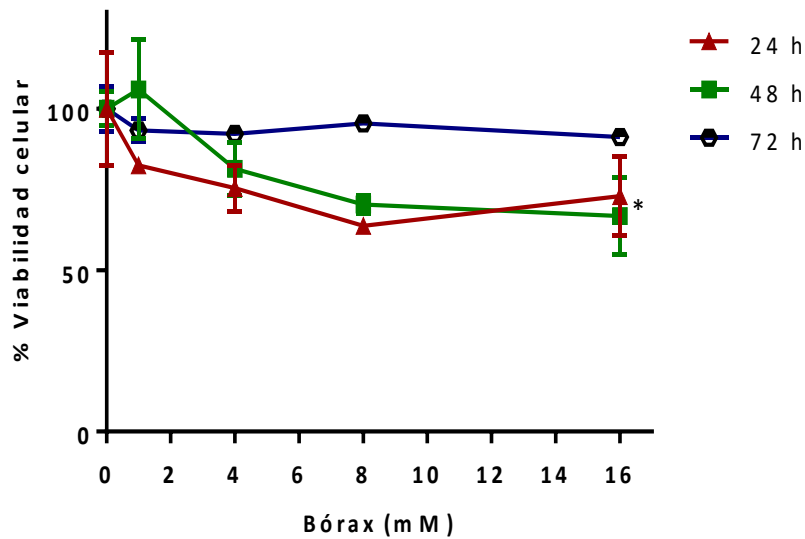
### VII.5. Evaluación de la citotoxicidad del bórax curso temporal en PBMCs

La viabilidad celular de las PBMCs después de la exposición a bórax a diferentes concentraciones (0, 1, 4, 8 y 16 mM) durante 24, 48 y 72 h, respectivamente, se determinó mediante el método MTT. Los resultados evidenciaron que el bórax no da lugar a un efecto citotóxico considerablemente significativo en PBMCs (Figura 30), sin embargo, a 24 h de exposición, se observó un efecto significativo, aunque su crecimiento no bajó del umbral del 50 % de viabilidad. Pese a ello, este efecto inhibitorio es revertido como se denota ligeramente a 48 h y evidentemente a 72 h, cuestión que pone de manifiesto que la acción que el bórax ejerce no es superior a su capacidad de crecimiento y adaptación. Como se apreció en su efecto sobre la viabilidad celular (Figura 31), las PBMCs revierten el efecto de estrés que genera la adición del compuesto a su medio de cultivo; en este sentido, la concentración de 8 mM cercana a la  $IC_{50}=9.042$  mM descrita para MCF-7, al tiempo de exposición de 72 h no disminuye ni cerca del 10 % de la viabilidad celular de las PBMCs, asimismo, como con 16 mM. En adición, en comparación con el control (solo medio de cultivo), la viabilidad celular de las PBMCs tratadas con bórax, no disminuyó drásticamente con respecto a este, como se evidenció en MCF-7, en la que su curva mostró la tendencia de un efecto inhibitorio progresivo al tiempo y concentración en BC, en contraste con esta curva; cuyo efecto inhibitorio significativo a 24 h y ligeramente observable a 48 h en PBMCs puede ser revertido como no ocurre en MCF-7. Teniendo en cuenta esto, se ratifica que la exposición a concentraciones menores de bórax a tiempos prolongados puede ser equiparable con las dosis administradas de fármacos usados universalmente para el BC, ya que como se manifiesta mejor en la Figura 31, la viabilidad del control (solo medio de cultivo) de las PBMCs no es afectada con el tiempo.

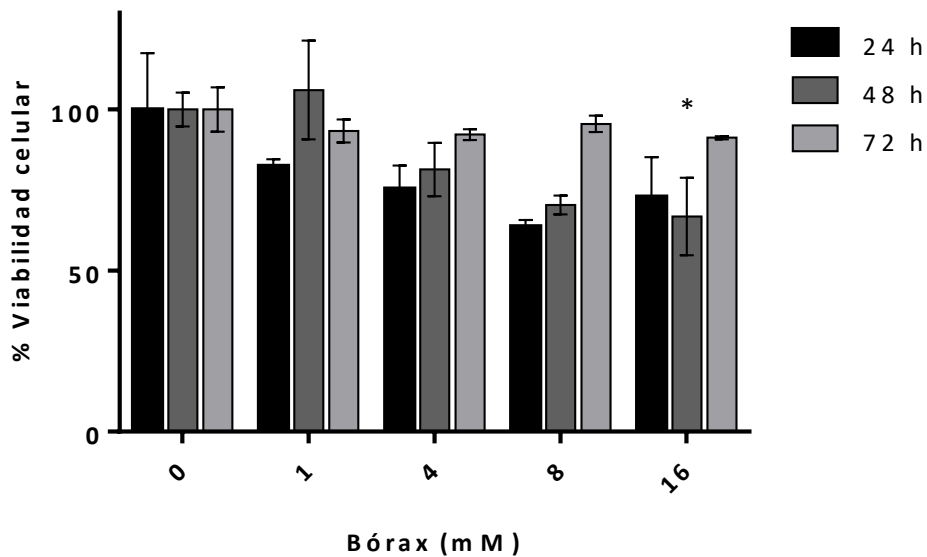
Las PBMCs, llamadas así por su único núcleo, incluyen linfocitos y monocitos, que en conjunto con otras moléculas como los CMI, forman la base del sistema inmunitario innato ([Eppendorf AG, 2016](#)). Como se describió sobre la actividad anti-inflamatoria de compuestos de B (sección [II.3.4.3. Actividad anti-inflamatoria](#)), citando a Khaliq *et al.*, en modelos murinos el bórax ejerce un efecto regulador sobre los CMI de monocitos y macrófagos, mediante el incremento de mediadores como el TNF-  $\alpha$ , IL-6, IL1 $\beta$  y NO, que



se asocian al aumento de células B y T de C19 y CD4, y, por tanto, una mayor respuesta a infecciones y enfermedades ([Khalig et al., 2018](#)). Asimismo, Routray y Ali, hacen mención del papel regulador del bórax sobre CMI que inducen la proliferación de linfocitos, especialmente macrófagos M1 estimulados con LPS, sugiriendo que el bórax puede modular la actividad de enzimas que requieren flavín/piridín nucleótidos por interacción con grupos *cis*-OH en serina proteasas ([Routray y Ali, 2016](#)); lo que de acuerdo a todas las propiedades descritas para el bórax y nuestros hallazgos de su actividad citotóxica, apoptótica y epigenética en MCF-7, su mecanismo molecular involucra, sin duda, la unión a complejos proteicos mediante su unión específica por grupos OH o N, como se apreció en la modulación de caspasas (cisteín proteasas similar a serina proteasas). Citando a Naghii et al., ([Naghii et al., 2011](#)) en el ser humano el bórax también disminuye los CMI, además de modulación hormonal, lo que puede ayudar a comprender el efecto en MCF-7, sobre su señalización ER (+). Estas evidencias permiten ampliar el panorama del efecto citotóxico considerable en MCF-7 y no en PBMCs, cuya capacidad de proliferación está mediada por la regulación de este compuesto de B, que, a pesar de ser un estrés en adición a su medio de crecimiento, estas células son capaces de adaptarse a ello, y metabolizarlo para seguir proliferando (puntualmente, es necesario ensayos de proliferación para corroborar), suponiendo con base en estos estudios, dichas interacciones químicas, punto clave que también es necesario esclarecer en el mecanismo molecular del bórax. Sumado a su efecto modulador, también se ha descrito que el bórax da lugar a la estimulación de la proliferación de cardiomiocitos de modelo murino, inducidos a CH con ISO por inhibición de la apoptosis. Y en este contexto, la reversibilidad de su inhibición puede sugerirse relacionada por la inhibición de este tipo de muerte celular, en contraste con MCF-7 que son susceptibles a apoptosis. Sin embargo, más estudios moleculares como ensayos de proliferación que demuestren detenimiento en alguna fase del ciclo celular por efecto del bórax (arresto celular); evaluación de CMI, ROS, EMR, moléculas de señalización (ER, PR); análisis de expresión global de genes relacionados a otros tipos de muerte celular o la sinergia; entre otros por inferir, son necesarios.



**Figura 30.** Curva concentración respuesta curso temporal del efecto citotóxico del bórax en PBMCs, a 24, 48 y 72 h, respectivamente. Los resultados se presentan como el promedio de tres réplicas  $\pm$ SD del experimento. Comparación de medias Tukey ( $*p < 0.05$ ; 16 mM a 24 h).

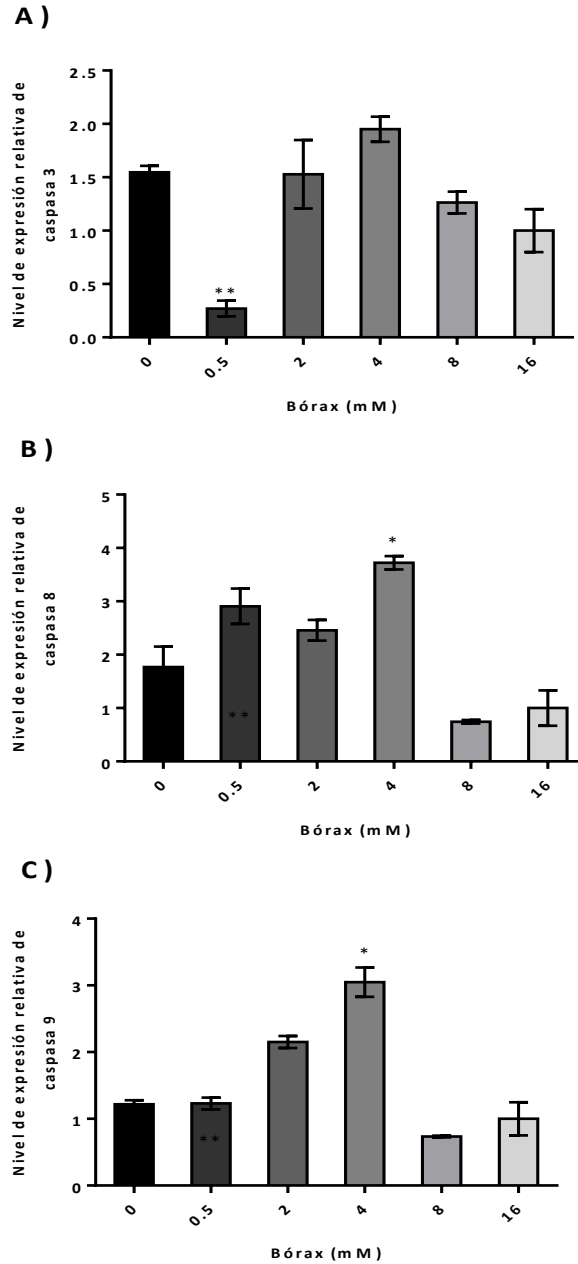


**Figura 31.** Evaluación de la citotoxicidad por exposición a bórax en PBMCs. 24, 48 y 72 h, respectivamente. Los resultados se presentan como el promedio de tres réplicas  $\pm$ SD del experimento. ANOVA de dos vías. Comparación de medias Tukey ( $*p < 0.05$ ).



### VII.5.1 Análisis de la expresión génica asociada a apoptosis en PBMCs

El análisis de la expresión relativa de caspasas 3, 8 y 9, en PBMCs por exposición a bórax (0.5, 2, 4, 8 y 16 mM) a 72 h, respectivamente (en relación a su evaluación citotóxica) mostró valores similares de expresión con respecto al control (solo medio de cultivo) (Figura 32, incisos A, B y C). Los resultados evidenciaron la regulación negativa de las caspasas a 72 h, lo que confirma la reversibilidad del efecto inhibitorio significativo a 24 h por efecto del bórax sobre PBMCs. Los valores relativos de expresión, en cada una de las concentraciones empleadas (inclusive al ampliar la curva) para las tres caspasas, no incrementaron significativamente con respecto al control, a excepción de la concentración 4 mM, sin embargo, este incremento solo fue significativo y no considerablemente, en comparación con la expresión relativa de caspasas en MCF-7. Estos resultados afines a la curva de la viabilidad celular de PBMCs, indican que el bórax ejerce estrés, pero, las células tienen la capacidad de adaptarse, bloqueando a moléculas inductoras de muerte. Con respecto a los CMI y a los niveles de expresión de caspasa 8 (Figura 32, inciso B), en comparación con el perfil de caspasa 3 y 9 (Figura 32, incisos A y C), su incremento es ligeramente mayor, por lo que el mecanismo de muerte en PBMCs podría inducirse principalmente por la vía extrínseca a diferencia de MCF-7, con base a la activación de caspasas selectivas a la vía apoptótica (caspasa 8 vía extrínseca, y caspasa 9 vía mitocondrial), lo que se fundamenta con los estudios descritos para CMI, que implican receptores de muerte y moléculas de señalización de la respuesta inmune. Con respecto a lo mencionado y a estos resultados se demuestra que las PBMCs son capaces de evadir la muerte ante el estrés ocasionado por el bórax, adaptarse y contrarrestar el efecto citotóxico de este compuesto a tiempos de exposición cortos, lo que alude el uso del bórax a tiempos de exposición más largos.

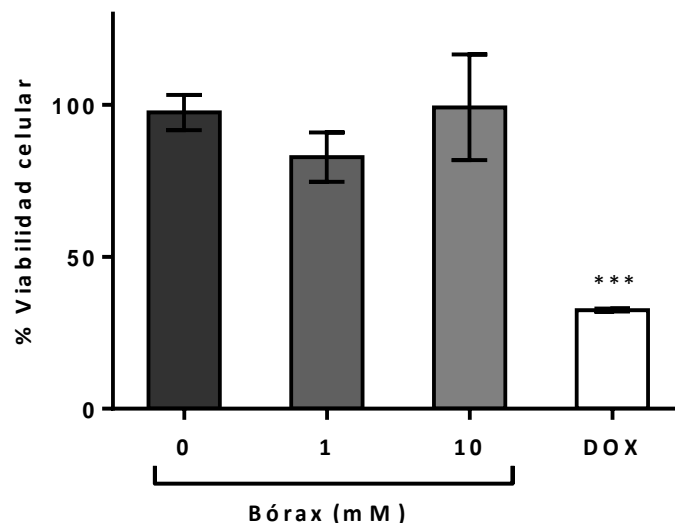


**Figura 32.** Niveles de expresión de caspasas: A) caspasa 3, B) caspasa 8 y C) caspasa 9 en PBMCs después de exposición a bórax (0, 0.5, 2, 4, 8 y 16 mM) durante 72 h, respectivamente. Gen ciclofilina como control interno. Los resultados se presentan como el promedio de tres réplicas  $\pm$ SD del experimento. ANOVA de dos vías. Comparación de medias Tukey (\* $p < 0.05$ \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).



### VII.6. Evaluación de la citotoxicidad del bórax concentración respuesta en HAEC

Finalmente, se evaluó la viabilidad celular en HAEC, después de la exposición a bórax 1 mM y 10 mM, a 24 h de exposición, como otra opción de seguimiento en células normales. Los resultados no mostraron efecto citotóxico en esta línea (Figura 33), como se apreció con el control negativo DOX, cuya disminución de la viabilidad celular fue considerablemente significativa, con respecto a las medias de cada tratamiento. La evaluación del efecto del bórax, demostró que este compuesto actúa selectivamente hacia BC, y en relación a HAEC, promovió con bórax 10 mM ligeramente el crecimiento, sin embargo, es necesario ampliar la curva para un mejor seguimiento a tiempos de exposición mayores. Este resultado fue prometedor, seleccionándose 10 mM como límite de la curva para HAEC por la cercanía de la  $IC_{50}$  de MCF-7, sin embargo, se plantea necesario la extensión de esta curva. Cabe mencionar que la evaluación en HAEC ratifica la idea del uso de concentraciones menores en MCF-7 a tiempos de exposición más largos, ya que ni el límite de concentración (mM) de la curva usada para los experimentos descritos podría causar citotoxicidad en células normales; pese a ello, se necesita la exploración en sistemas *in vivo* o *in silico*, por la variabilidad de los sistemas biológicos.



**Figura 33.** Evaluación de la citotoxicidad a 24 h de exposición a bórax en HAEC. Los resultados se presentan como el promedio de tres réplicas  $\pm$ SD del experimento. Comparación de medias Dunnet (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

## VIII. CONCLUSIONES

Se reporta por primera vez el efecto citotóxico, apoptótico y epigenético del bórax en MCF-7. Con respecto a su efecto citotóxico en esta línea de BC positivo, la inhibición del crecimiento es dependiente de la concentración y el tiempo de exposición a bórax. La viabilidad celular en MCF-7 por efecto de este compuesto, alcanzó su inhibición media máxima a 9.042 mM a 24 h. En relación a la evaluación de esta actividad del bórax en PBMCs se observó citotoxicidad a 24 h, sin embargo, las células tuvieron la capacidad de contrarrestar la inhibición de su crecimiento a mayor tiempo de exposición. Esto evidencia la suficiencia de las PBMCs para adaptarse al estrés ejercido por el compuesto y conservar la capacidad de proliferación celular. Además, la evaluación del efecto del bórax en HAEC, mostró que no ejerce actividad citotóxica en esta línea. Por tanto, se ratifica el daño selectivo del bórax en cáncer, sumado a las determinaciones citotóxicas y ensayos de proliferación celular de este compuesto en HepG2 y HL-60. Aunado a su citotoxicidad en MCF-7, se demostró que esta actividad está asociada a la inducción de apoptosis, ambas vías, preferencialmente vía intrínseca o mitocondrial, mediante la regulación positiva de caspasas 3, 8 y 9. En PBMCs la inhibición de su crecimiento celular por efecto del bórax está asociado a apoptosis, mecanismo que es reversible a mayor tiempo de exposición con el compuesto. Asimismo, su actividad citotóxica y apoptótica están relacionadas a la modulación epigenética, mediante el incremento de la metilación global del ADN en MCF-7. El aumento del porcentaje de 5mdC en los patrones de hipometilación global característicos del cáncer, evidencia el papel modulador del bórax en la metilación de los sitios CpG, similar a los compuestos bajo investigación y aprobados para terapia epigenética, además, se refiere la utilidad de determinaciones epigenéticas como bioindicadores para enfermedades como el cáncer. De acuerdo a estos hallazgos, se argumenta el potencial del bórax como una opción para el tratamiento del BC, cuya quimiorresistencia sigue siendo el factor limitante de los fármacos antineoplásicos. El mecanismo putativo del bórax en MCF-7 se refiere en la Figura 34, manifestando necesarios estudios de biología molecular y otras ciencias que permitan esclarecer su mecanismo molecular.

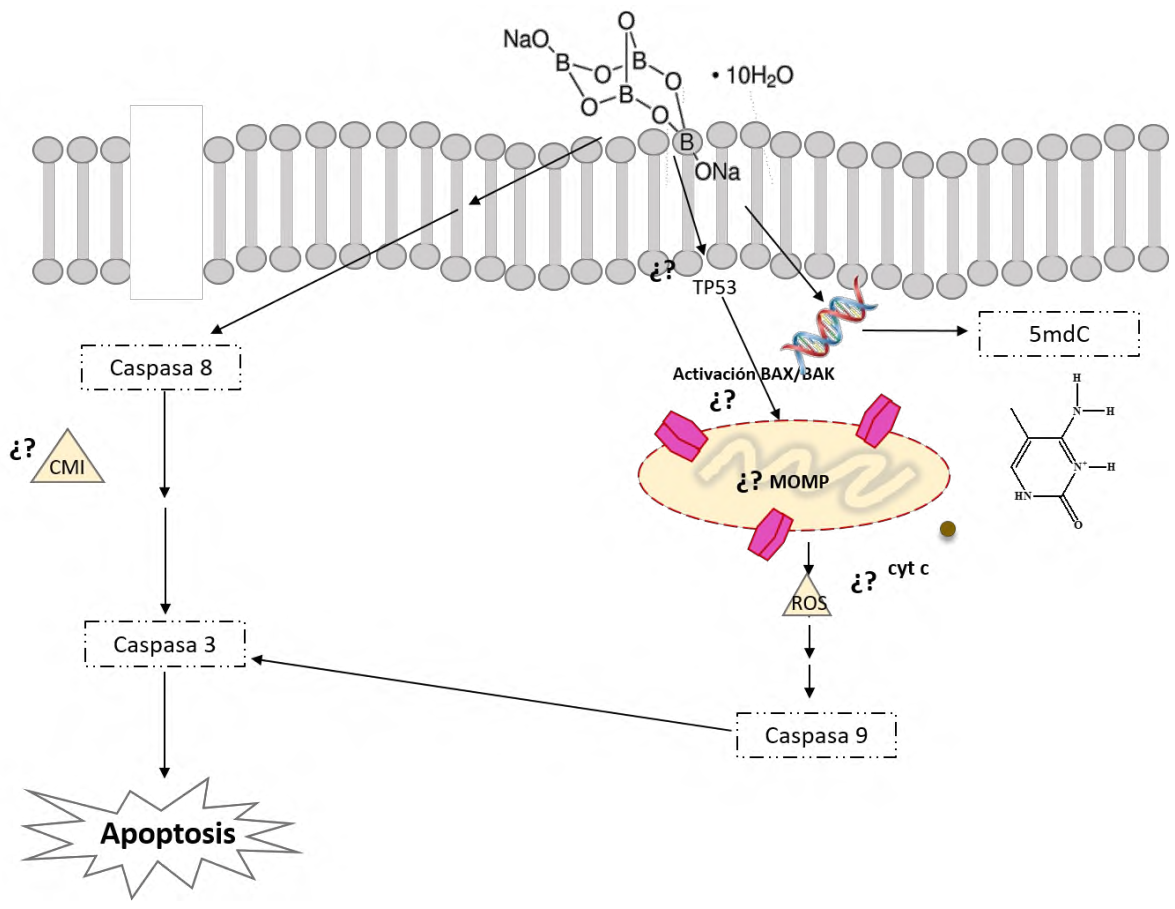


Figura 34. Mecanismo del bórax en MCF-7

## IX. PERSPECTIVAS

- 1) Evaluar el efecto citotóxico del bórax en MCF-7 con concentraciones menores (< mM) a tiempos de exposición más largos (> 72 h).
- 2) Evaluar la viabilidad y muerte celular por calceína AM y yoduro de propidio, aprovechando la relación de estos dos marcadores fluorescentes en un solo ensayo, que proporcionaría mayor información sobre su efecto citotóxico al conocer el número de células vivas con respecto a las muertas (análisis cuantitativo).
- 3) Realizar ensayos de proliferación celular en MCF-7 por exposición a bórax, como un factor pronóstico, ejemplos de estas técnicas que se basan en el análisis del contenido de ADN o de marcadores del metabolismo celular, podrían ser el ensayo de BrdU, o arresto celular mediante la evaluación de Ki-67 (en particular, sería muy útil en BC por la asociación a esta proteína, [Tabla 1](#)).
- 4) De acuerdo a los resultados de la expresión relativa de genes caspasas 3, 8 y 9 en MCF-7 por efecto del bórax, se sugiere el uso de otras técnicas que ratifiquen el mecanismo de muerte por efecto de este compuesto. Los ensayos de citometría de flujo son más específicos para evaluar apoptosis, basados en la determinación de las moléculas de sus cascadas, que como se ha descrito, son altamente dinámicas y convergentes. Permitiría inferir mejor el mecanismo de muerte por el análisis de células necróticas, la actividad de otras caspasas, actividad mitocondrial (PMM, ROS, Ca<sup>2+</sup>), así como los cambios morfológicos nucleares (ensayo TUNEL).
- 5) Realizar un análisis global de genes en MCF-7 por exposición a bórax como se ha realizado para HepG2, permitiría ampliar el panorama de su mecanismo molecular, mediante la asociación de la expresión o represión de genes de procesos biológicos, como respuesta inflamatoria, estrés oxidativo, transducción de señales, entre otros.
- 6) Determinar el efecto citotóxico del bórax en otra línea de BC para su comparación, podría evaluarse en MDA-MB-231, ya que es una línea triple negativo en contraste con MCF-7 que es clasificada como Luminal A ([Tabla 1](#)).

Sería interesante determinar si su actividad es selectiva en función del receptor, como podría ser su evaluación en un tipo de BC más resistente.

- 7) Determinar la relación de bórax en MCF-7 con marcadores de estrés oxidativo como GSH, MDA, PCO, GPx, GR, SOD, CAT, SAM, TG, cyt C, entre otros.
- 8) Evaluar el bórax *in silico*, e *in vivo* en algún modelo murino, por ejemplo, en ratones BALB/c.
- 9) En relación al efecto epigenético en MCF-7, evaluar la modulación de este compuesto en los patrones de metilación global del ADN, a tiempos de exposición más largos con concentraciones más bajas (< 1 mM).
- 10) Finalmente, con respecto a otros compuestos de B, evaluar el efecto del ácido bórico en MCF-7, ya que, a pesar de las evidencias de que ejerce un efecto menor al bórax en tumores sólidos en comparación con neoplasias hematológicas (HL-60), no se ha determinado su actividad en esta línea de BC.

**X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abdelnour, S. A., Abd El-Hack, M. E., Swelum, A. A., Perillo, A., y Losacco, C. (2018). The vital roles of boron in animal health and production: A comprehensive review. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *50* (2018), 296–304. DOI: 10.1016/j.jtemb.2018.07.018
- Abdul, Q. A., Yu, B. P., Chung, H. Y., Jung, H. A., y Choi, J. S. (2017). Epigenetic modifications of gene expression by lifestyle and environment. *Archives of Pharmacal Research*, *40* (11), 1219–1237. DOI: 10.1007/s12272-017-0973-3
- Alcazar, A., Wrobel, K., Corrales, A. R., y Wrobel, K. (2016). Application of liquid chromatography/electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry for the evaluation of global nucleic acids: Methylation in garden cress under exposure to CuO nanoparticles. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *30*(1), 209–220. DOI: 10.1002/rcm.7440
- Al-Moghrabi, N., Nofel, A., Al-Yousef, N., Madkhali, S., Bim Amer S.M., Alaiya, A., Shinwari, Z., Al-Tweigeri, T., Karakas, B., Tulbah, A., y Aboussekhra A. (2014). The molecular significance of methylated BRCA1 promoter in white blood cells of cancer-free females. *BMC Cancer*, *14* (1), 1–12. DOI: 10.1186/1471-2407-14-830
- Al-thoubaity, F. K. (2020). Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. *Annals of Medicine and Surgery*, *49*, 44–48. DOI: 10.1016/j.amsu.2019.11.021
- Aljanabi, S. M. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research*, *25* (22), 4692–4693. DOI: 10.1093/nar/25.22.4692
- Anders, N. M., Liu, J., Wanjiku, T., Giovinazzo, H., Zhou, J., Vaghasia, A., Nelson, W. G., Yegnasubramanian, S., Rudek, M. A. (2016). Simultaneous quantitative determination of 5-aza-2'-deoxycytidine genomic incorporation and DNA demethylation by liquid chromatography tandem mass spectrometry as exposure-response measures of nucleoside analog DNA methyltransferase inhibitors. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *1022*, 38–45. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.03.029
- Andò, S., Gelsomino, L., Panza, S., Giordano, C., Bonofiglio, D., Barone, I., y Catalano, S. (2019). Obesity, leptin and breast cancer: Epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Cancers*, *11* (1), 1–27. DOI: 10.3390/cancers11010062



- Asangani, I. A., Dommeti, V. L., Wang, X., Malik, R., Cieslik, M., Yang, R., Escara-Wilke, J., Wilder-Romans, K., Dhanireddy, S., Engelke, C., Iyer, M. K., Jing, X., Wu, Y. M., Cao, X., Qin, Z. S., Wang, S., Feng, F. Y., y Chinnaiyan, A. M. (2014). Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castration-resistant prostate cancer. *Nature*, *510* (7504), 278–282. DOI: 10.1038/nature13229
- Azzollini, J., Pesenti, C., Pizzamiglio, S., Fontana, L., Guarino, C., Peissel, B., Plebani, M., Tabano, S., Sirchia, S. M., Colaprieto, P., Villa, R., Paolini, B., Verderio, P., Miozzo, M., y Manoukian, S. (2019). Constitutive BRCA1 promoter hypermethylation can be a predisposing event in isolated early-onset breast cancer. *Cancers*, *11* (1), 1–15. DOI: 10.3390/cancers11010058
- Bachman, M., Uribe-Lewis, S., Yang, X., Williams, M., Murrell, A., y Balasubramanian, S. (2014). 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification. *Nature Chemistry*, *6*(12), 1049–1055. DOI: 10.1038/nchem.2064
- Bandopadhyay, P., Bergthold, G., Nguyen, B., Schubert, S., Gholamin, S., Tang, Y., Bolin, S., Schumacher, S. E., Zeid, R., Masoud, S., Yu, F., Vue, N., Gibson, W. J., Paoletta, B. R., Mitra, S. S., Cheshier, S. H., Qi, J., Liu, K. W., Wechsler-Reya, R., Weiss, W. A., Swartling, F. J., Kieran, M. W., Bradner, J. E., Beroukhim, R., y Cho, Y. J. (2014). BET bromodomain inhibition of MYC-amplified medulloblastoma. *Clinical Cancer Research*, *20*(4), 912–925. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2281
- Bartels, A., Han, Q., Nair, P., Stacey, L., Gaynier, H., Mosley, M., Huang, Q. Q., Pearson, J. K., Hsieh, T. F., Charles An, Y. Q., y Xiao, W. (2018). Dynamic DNA methylation in plant growth and development. *International Journal of Molecular Sciences*, *19* (7), 2144. DOI: 10.3390/ijms19072144
- Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S., Safari, E., y Farahmand, L. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology*, *84*. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106535
- Başaran, N., Duydu, Y., Bacanlı, M., Gül Anlar, H., DİLSİZ, S. A., Üstündağ, A., Yalçın C. O., Schwerdtle, T., y Bolt, H. M. (2020). Evaluation of oxidative stress and immune parameters of boron exposed males and females. *Food and Chemical Toxicology*, *142*. DOI: 10.1016/j.fct.2020.111488



- Behravan, H., Hartikainen, J. M., Tengström, M., Kosma, V. M, y Mannermaa, A. (2020). Predicting breast cancer risk using interacting genetic and demographic factors and machine learning. *Scientific Reports*, 10(1), 1–16. DOI: 10.1038/s41598-020-66907-9
- Bernadotte, A., Mikhelson, V. M., y Spivak, I. M. (2016). Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging*, 8(1), 3–11. DOI: 10.18632/aging.100871
- Bharadwaj, D., y Mandal, M. (2020). Senescence in polyploid giant cancer cells: A road that leads to chemoresistance. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 52, 68–75. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2019.11.002
- Bhol, C. S., Panigrahi, D. P., Praharaj, P. P., Mahapatra, K. K., Patra, S., Mishra, S. R., Behera, B. P., y Bhutia, S. K. (2019). Epigenetic modifications of autophagy in cancer and cancer therapeutics. *Seminars in Cancer Biology*, (February), 1–12. DOI: 10.1016/j.semcan.2019.05.020
- Białek, M., Czauderna, M., Krajewska, K., y Przybylski, W. (2019). Selected physiological effects of boron compounds for animals and humans. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 28(4), 307–320. DOI: 10.22358/jafs/114546/2019
- Bihani, T., Ezell, S. A., Ladd, B., Grosskurth, S. E., Mazzola, A. M., Pietras, M., Reimer, C., Zinda, M., Fawell, S., y D’Cruz, C. M. (2015). Resistance to everolimus driven by epigenetic regulation of MYC in ER+ breast cancers. *Oncotarget*, 6(4), 2407–2420. DOI: 10.18632/oncotarget.2964
- Blee, A. M., Liu, S., Wang, L., y Huang, H. (2016). BET bromodomain-mediated interaction between ERG and BRD4 promotes prostate cancer cell invasion. *Oncotarget*, 7(25), 38319–38332. DOI: 10.18632/oncotarget.9513
- Boehning, A. L., Essien, S. A., Underwood, E. L., Dash, P. K., y Boehning, D. (2018). Cell type-dependent effects of ellagic acid on cellular metabolism. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 106, 411–418. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.06.142
- Borbely, G., Haldosen, L.-A., Dahlman-Wright, K., y Zhao, C. (2015). Induction of USP17 by combining BET and HDAC inhibitors in breast cancer cells. *Oncotarget*, 6(32). DOI: 10.18632/oncotarget.5601
- Bøyum. (1977). Separation of Lymphocytes, Lymphocyte Subgroups and Monocytes: A Review. *Lymphology* 10, 71-76.



- Brevini, T. A. L., Pennarossa, G., Manzoni, E. F. M., Gandolfi, C. E., Zenobi, A., y Gandolfi, F. (2016). The quest for an effective and safe personalized cell therapy using epigenetic tools. *Clinical Epigenetics*, 8(1), 1–9. DOI: 10.1186/s13148-016-0283-5
- Brien, G. L., Valerio, D. G., y Armstrong, S. A. (2016). Exploiting the Epigenome to Control Cancer-Promoting Gene-Expression Programs. *Cancer Cell*, 29(4), 464–476. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.03.007
- Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M., y Alimonti, A. (2019). Cellular senescence: Aging, cancer, and injury. *Physiological Reviews*, 99(2), 1047–1078. DOI: 10.1152/physrev.00020.2018
- Canturk, Z., Tunali, Y., Korkmaz, S., y Gulbaş, Z. (2016). Cytotoxic and apoptotic effects of boron compounds on leukemia cell line. *Cytotechnology*, 68(1), 87–93. DOI: 10.1007/s10616-014-9755-7
- Cao, W., Lee, H., Wu, W., Zaman, A., Mccorkle, S., Yan, M., Chen, J., Xing, Q., Sinnott-Armstrong, N., Xu, H., Sailani, M. R., Tang, W., Ciu, Y., Iiu, J., Guan, H., Lv, P., Sun, X., Sun, L., Han, P., Lou, Y., Chang, J., Wang, J., Gao, Y., Guo, J., Schenk, G., Shain, A. H., Biddle, F. G., Collison, E., Snyder, M., y Bivona, T. G. (2020). Multi-faceted epigenetic dysregulation of gene expression promotes esophageal squamous cell carcinoma. *Nature Communications*, 11, 3675. DOI: 10.1038/s41467-020-17227-z
- Carbone, M., Arron, S. T., Beutler, B., Bononi, A., Cavenee, W., Cleaver, J. E., Croce, C. M., D'Andrea, A., Foulkes, W. D., Gaudino, G., Groden, J. L., Henske, E. P., Hickson, I. D., Hwang, P. M., Kolodner, R. D., Mak, T. W., Malkin, D., Monnat Jr, R. J., Novelli, F., Pass, H. I., Petrini, J. H., Schmidt, L. S., y Yang, H. (2020). Tumour predisposition and cancer syndromes as models to study gene–environment interactions. *Nature Reviews Cancer*. DOI: 10.1038/s41568-020-0265-y
- Celikezen, F. C., Turkez, H., Aydin, E., Izgi, M. S., y Celikezen, B. (2015). Potent antioxidant and genotoxic effects of ammonium tetraborate in vitro. *Natural Science and Discovery*, 1(2), 45. DOI: 10.20863/nsd.06412
- Çelikezen, F. Ç., Turkez, H., Togar, B., y Izgi, M. S. (2014). DNA damaging and biochemical effects of potassium tetraborate. *EXCLI Journal*, 13, 446–450. DOI: 10.17877/DE290R-15704



- Chaidos, A., Caputo, V., Gouvedenou, K., Liu, B., Marigo, I., Chaudhry, M. S., Rotolo, A., Tough, D. F., Smithers, N. N., Bassil, A. K., Chapman, T. D., Harker, N. R., Barbash, O., Tummino, P., Al-Mahdi, N., Haynes, A. C., Cutler, L., Le, B., Rahemtulla, A., Roberts, I., Kleijnen, M., Witherington, J. J., Parr, N. J., Prinjha, R. K., y Karadimitris, A. (2014). Potent antimyeloma activity of the novel bromodomain inhibitors I-BET151 and I-BET762. *Blood*, *123*(5), 697–706. DOI: 10.1182/blood-2013-01-478420
- Chan, S. C., Selth, L. A., Li, Y., Nyquist, M. D., Miao, L., Bradner, J. E., Raj, G. V., Tilley, W. D., y Dehm, S. M. (2015). Targeting chromatin binding regulation of constitutively active AR variants to overcome prostate cancer resistance to endocrine-based therapies. *Nucleic Acids Research*, *43*(12), 5880–5897. DOI: 10.1093/nar/gkv262
- Chang, S. Y., Lee, S. N., Yang, J. Y., Kim, D. W., Yoon, J. H., Ko, H. J., Ogawa, M., Sasakawa, C., y Kweon, M. N. (2013). Autophagy controls an intrinsic host defense to bacteria by promoting epithelial cell survival: A murine model. *PLoS ONE*, *8*(11), 1–12. DOI: 10.1371/journal.pone.0081095
- Chapuy, B., McKeown, M. R., Lin, C. Y., Monti, S., Roemer, M. G. M., Qi, J., Rahl, P. B., Sun, H. H., Yeda, K. T., Doench, J. G., Reichert, E., Kung, A. L., Roding, S. J., Young, R. A., Shipp, M. A., y Bradner, J. E. (2013). Discovery and Characterization of Super-Enhancer-Associated Dependencies in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell*, *24*(6), 777–790. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.11.003
- Chen, M. L., Shen, F., Huang, W., Qi, J. H., Wang, Y., Feng, Y. Q., ... Yuan, B. F. (2013). Quantification of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA from hepatocellular carcinoma tissues by capillary hydrophilic-interaction liquid chromatography/quadrupole TOF mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, *59*(5), 824–832. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.193938>
- Chen, M., Zhang, H., Zhang, G., Zhong, A., Ma, Q., Kai, J., Tong, Y., Xie, G., Wang, Y., Zheng, H., Guo, L., y Lu, R. (2018). Targeting TPX2 suppresses proliferation and promotes apoptosis via repression of the PI3k/AKT/P21 signaling pathway and activation of p53 pathway in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *507*(1–4), 74–82. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.10.164
- Cheng, Y., He, C., Wang, M., Ma, X., Mo, F., Yang, S., Han, J., y Wei, X. (2019). Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: Mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *4*(1), 4-62. DOI: 10.1038/s41392-019-0095-0



- Cheng, Z., Gong, Y., Ma, Y., Lu, K., Lu, X., Pierce, L. A., Thompson, R.C., Muller, S., Knapp, S., y Wang, J. (2013). Inhibition of BET bromodomain targets genetically diverse glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, 19(7), 1748–1759. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3066
- Cheon, S. Y., Kim, H., Rubinsztein, D. C., y Lee, J. E. (2019). Autophagy, cellular aging and age-related human diseases. *Experimental Neurobiology*, 28(6), 643–657. DOI: 10.5607/en.2019.28.6.643
- Choi, J., James, S. R., Link, P. A., Mccann, E., Hong, C., Davis, W., K.Nesline, M., B.Ambrosone, C., R.Karpf, A. (2009). Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of breast cancer. 30(11), 1889–1897. DOI: 10.1093/carcin/bgp143
- C.Kuo, K., A.McCune, R., y W.Gehrke, C. (1980). Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxvribonucleosides in DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(20). DOI: 10.1093/nar/8.20.4763
- Clare, C. E., Brassington, A. H., Kwong, W. Y., y Sinclair, K. D. (2019). One-Carbon Metabolism: Linking Nutritional Biochemistry to Epigenetic Programming of Long-Term Development. *Annual Review of Animal Biosciences*, 7, 263–287. DOI: 10.1146/annurev-animal-020518-115206
- Clarke, R., Liu, M. C., Bouker, K. B., Gu, Z., Lee, R. Y., Zhu, Y., Skarr, T. C., Gomez, B., O’Brien, K., Wang, Y., y Hilakivi-Clarke, L. A. (2003). Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene*, 22(47), 7316–7339. DOI: 10.1038/sj.onc.1206937
- Coban, F. K., Ince, S., Kucukkurt, I., Demirel, H. H., y Hazman, O. (2015). Boron attenuates malathion-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 38(4), 391–399. DOI: 10.3109/01480545.2014.974109
- Colección de Biología Celular de la ATCC. (2020). Recuperado desde [ATCC](#)
- Da Motta, L., Ledaki, I., Purshouse, K., Haider, S., De Bastiani, M. A., Baban, D., Morotti, M., Steers, G., Wigfield, S., Li, J. L., Knapp, S., Ebner, D., Klamt, F., Harris, A y McIntyre, A. (2017). The BET inhibitor JQ1 selectively impairs tumour response to hypoxia and downregulates CA9 and angiogenesis in triple negative breast cancer. *Oncogene*, 36(1), 122–132. DOI: 10.1038/onc.2016.184
- Dabrowski, M. J., y Wojtas, B. (2019). Global DNA methylation patterns in human gliomas and their interplay with other epigenetic modifications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14). DOI: 10.3390/ijms20143478



- Dar, P. A., Mir, S. A., Bhat, J. A., Hamid, A., Singh, L. R., Malik, F., y Dar, T. A. (2019). An anti-cancerous protein fraction from *Withania somnifera* induces ROS-dependent mitochondria-mediated apoptosis in human MDA-MB-231 breast cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 77–87. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.120
- Das, C. K., Parekh, A., Parida, P. K., Bhutia, S. K., y Mandal, M. (2019). Lactate dehydrogenase A regulates autophagy and tamoxifen resistance in breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1866(6), 1004–1018. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2019.03.004
- Davies, N. J., Batehup, L., y Thomas, R. (2011). The role of diet and physical activity in breast, colorectal, and prostate cancer survivorship: A review of the literature. *British Journal of Cancer*, 105(SUPPL. 1), S52–S72. DOI: 10.1038/bjc.2011.423
- De Meyer, T., Mampaey, E., Vlemmix, M., Denil, S., Trooskens, G., Renard, J. P., De Keulenaer, S., Dehan, P., Menschaert, G., y Van Criekinge, W. (2013). Quality Evaluation of Methyl Binding Domain Based Kits for Enrichment DNA-Methylation Sequencing. *PLoS ONE*, 8(3). DOI: 10.1371/journal.pone.0059068
- Deichmann, U. (2016). Epigenetics: The origins and evolution of a fashionable topic. *Developmental Biology*, 416(1), 249–254. DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.06.005
- Dobrijević, Z., Matijašević, S., Savić-Pavićević, D., y Brajušković, G. (2020). Association between genetic variants in genes encoding Argonaute proteins and cancer risk: A meta-analysis. *Pathology Research and Practice*, 216(5). DOI: 10.1016/j.prp.2020.152906
- Eppendorf AG. (2016). *Faster Isolation of PBMC Using Ficoll-Paque*. (372), 3–8.
- Estéicio, M. R. H., Gharibyan, V., Shen, L., Ibrahim, A. E. K., Doshi, K., He, R., Jelinek, J., Yang, A. S., Yan, P. S., Huang, T. H. M., Tajara, E. H., y Issa, J. P. J. (2007). LINE-1 hypomethylation in cancer is highly variable and inversely correlated with microsatellite instability. *PLoS ONE*, 2(5). DOI: 10.1371/journal.pone.0000399
- Feng, Q., Zhang, Z., Shea, M. J., Creighton, C. J., Coarfa, C., Hilsenbeck, S. G., Lanz, R., He, B., Wang, L., Fu, X., Nardone, A., Song, Y., Bradner, J., Mitsiades, C. S., Osborne, C. K., Schiff, R., y O'Malley, B. W. (2014). An epigenomic approach to therapy for tamoxifen-resistant breast cancer. *Cell Research*, 24(7), 809–819. DOI: 10.1038/cr.2014.71



- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppalapatti, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C., y Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes and Diseases*, 5(2), 77–106. DOI: 10.1016/j.gendis.2018.05.001
- Finn, N. A., Findley, H. W., y Kemp, M. L. (2011). A switching mechanism in doxorubicin bioactivation can be exploited to control doxorubicin toxicity. *PLoS Comput Biol*, 7(9), e1002151. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002151
- Fisusi, F. A., y Akala, E. O. (2019). Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 7(1), 3–23. DOI: 10.2174/2211738507666190122111224
- Friedmann, D. R., y Marmorstein, R. (2013). Structure and mechanism of non-histone protein acetyltransferase enzymes. *FEBS Journal*, 280(22), 5570–5581. DOI: 10.1111/febs.12373
- Galati, S., Boni, C., Gerra, M. C., Lazzaretti, M., y Buschini, A. (2019). Autophagy: A Player in response to Oxidative Stress and DNA Damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 5692958. DOI: 10.1155/2019/5692958
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486–541. DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4
- Ganesan, A. (2018). Epigenetic drug discovery: A success story for cofactor interference. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1748). DOI: 10.1098/rstb.2017.0069
- Garcia, P. L., Miller, A. L., Kreitzburg, K. M., Council, L. N., Gamblin, T. L., Christein, J. D., Heslin, M. J., Arnoletti, J. P., Richardson, J. H., Chen, D., Hanna, C. A., Cramer, S. L., Yang, E. S., Qi, J., Bradner, J. E., y Yoon, K. J. (2016). The BET bromodomain inhibitor JQ1 suppresses growth of pancreatic ductal adenocarcinoma in patient-derived xenograft models. *Oncogene*, 35(7), 833–845. DOI: 10.1038/onc.2015.126
- Gawade, R. L., Chakravarty, D. K., Debgupta, J., Sangtani, E., Narwade, S., Gonnade, R. G., Puranik, V. G., y Deobagkar, D. D. (2016). Comparative study of dG affinity vs. DNA methylation modulating properties of side chain derivatives of procainamide: Insight into its DNA hypomethylating effect. *RSC Advances*, 6(7), 5350–5358. DOI: 10.1039/c5ra20012a



- Ge, H. (2014). Isolation of mononuclear cells. Methodology and applications. *Methods*, 1–20. DOI: 10.1002/9780470151808.sc02a00s2
- Götze, S., Schumacher, E. C., Kordes, C., y Häussinger, D. (2015). Epigenetic changes during hepatic stellate cell activation. *PLoS ONE*, 10(6), 1–18. DOI: 10.1371/journal.pone.0128745
- Grazioli, E., Dimauro, I., Mercatelli, N., Wang, G., Pitsiladis, Y., Di Luigi, L., y Caporossi, D. (2017). Physical activity in the prevention of human diseases: Role of epigenetic modifications. *BMC Genomics*, 18(Suppl 8). DOI: 10.1186/s12864-017-4193-5
- Green, D. R., y Llambi, F. (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12). DOI: 10.1101/cshperspect.a006080
- Grosso, G., Bella, F., Godos, J., Sciacca, S., Del Rio, D., Ray, S., Galvano, F., y Giovannucci, E. L. (2017). Possible role of diet in cancer: Systematic review and multiple meta-analyses of dietary patterns, lifestyle factors, and cancer risk. *Nutrition Reviews*, 75(6), 405–419. DOI: 10.1093/nutrit/nux012
- Gujar, H., Weisenberger, D. J., y Liang, G. (2019). The roles of human DNA methyltransferases and their isoforms in shaping the epigenome. *Genes*, 10(2). DOI: 10.3390/genes10020172
- Hacioglu, C., Kar, F., Kacar, S., Sahinturk, V., y Kanbak, G. (2020). High Concentrations of Boric Acid Trigger Concentration-Dependent Oxidative Stress, Apoptotic Pathways and Morphological Alterations in DU-145 Human Prostate Cancer Cell Line. *Biological Trace Element Research*, 193(2), 400–409. DOI: 10.1007/s12011-019-01739-x
- Hakki, S. S., Dundar, N., Kayis, S. A., Hakki, E. E., Hamurcu, M., Kerimoglu, U., Baspinar, N., Basoglu, A., y Nielsen, F. H. (2013). Boron enhances strength and alters mineral composition of bone in rabbits fed a high energy diet. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 27(2), 148–153. DOI: 10.1016/j.jtemb.2012.07.001
- Han, Y., Fan, S., Qin, T., Yang, J., Sun, Y., Lu, Y., Mao, J., y Li, L. (2018). Role of autophagy in breast cancer and breast cancer stem cells (Review). *International Journal of Oncology*, 52(4), 1057–1070. DOI: 10.3892/ijo.2018.4270
- Hsu, H. K., Weng, Y. I., Hsu, P. Y., Huang, T. H. M., y Huang, Y. W. (2014). The molecular significance of methylated brca1 promoter in white blood cells of cancer-free females. *BMC Cancer* 2014, 14,. *Molecular Toxicology Protocols, Methods in Molecular Biology*, 1105(2), 345–363. DOI: 10.1007/978-1-62703-739-6



- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., y Cardoso, F. (2019). Breast cancer. In *Nature Reviews Disease Primers*, 5, 5-66. DOI: 10.1038/s41572-019-0111-2
- Hata, C., Nakaoka, H., Xiang, Y., Wang, D., Yang, A., Liu, D., Liu, F., Zou, Q., Wei, L., Zheng, K., Inoue, I., y You, H. (2020). Germline mutations of multiple breast cancer-related genes are differentially associated with triple-negative breast cancers and prognostic factors. *Journal of Human Genetics*, 65(7), 577–587. DOI: 10.1038/s10038-020-0729-7
- Hazman, Ö., Bozkurt, M. F., Fidan, A. F., Uysal, F. E., y Çelik, S. (2018). The Effect of Boric Acid and Borax on Oxidative Stress, Inflammation, ER Stress and Apoptosis in Cisplatin Toxication and Nephrotoxicity Developing as a Result of Toxication. *Inflammation*, 41(3), 1032–1048. DOI: 10.1007/s10753-018-0756-0
- He, W., Liu, R., Yang, S. H., y Yuan, F. (2015). Chemotherapeutic effect of tamoxifen on temozolomide-resistant gliomas. *Anti-Cancer Drugs*, 26(3), 293–300. DOI: 10.1097/CAD.000000000000197
- Henssen, A., Thor, T., Odersky, A., Heukamp, L., El-Hindy, N., Beckers, A., Speleman, F., Althoff, K., Schäfers, S., Schramm, A., Sure, U., Fleischhack, G., Eggert, A., y Schulte, J. H. (2013). BET bromodomain protein inhibition is a therapeutic option for medulloblastoma. *Oncotarget*, 4(11), 2080–2095. DOI: 10.18632/oncotarget.1534
- Hernández, S., Roque, J. L., López, A., Díaz, G., García, A. J., y Contreras, A. (2020). Role of sodium tetraborate as a cardioprotective or competitive agent: Modulation of hypertrophic intracellular signals. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 62, 126569. DOI: 10.1016/j.jtemb.2020.126569
- Hong, H., Wang, Q., Li, J., Liu, H., Meng, X., y Zhang, H. (2019). Aging, cancer and immunity. *Journal of Cancer*, 10(13), 3021–3027. DOI: 10.7150/jca.30723
- Hong, S. H., Eun, J. W., Choi, S. K., Shen, Q., Choi, W. S., Han, J. W., Nam, S. W., y You, J. S. (2016). Epigenetic reader BRD4 inhibition as a therapeutic strategy to suppress E2F2-cell cycle regulation circuit in liver cancer. *Oncotarget*, 7(22), 32628–32640. DOI: 10.18632/oncotarget.8701
- Huang, W., Qi, C. B., Lv, S. W., Xie, M., Feng, Y. Q., Huang, W. H., y Yuan, B. F. (2016). Determination of DNA and RNA Methylation in Circulating Tumor Cells by Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 88(2), 1378–1384. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b03962



- Hubeek, I., Stam, R. W., Peters, G. J., Broekhuizen, R., Meijerink, J. P. P., Van Wering, E. R., Gibson, B. E. S., Creutzling, U., Zwaan, C. M., Cloos, J., Kuik, D. J., Pieters, R., y Kaspers, G. J. L. (2005). The human equilibrative nucleoside transporter I mediates in vitro cytarabine sensitivity in childhood acute myeloid leukaemia. *British Journal of Cancer*, 93(12), 1388–1394. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602881
- Hussain, S. A., Abood, S. J., y Gorial, F. I. (2017). The adjuvant use of calcium fructoborate and borax with etanercept in patients with rheumatoid arthritis: Pilot study. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 6(1), 58–64. DOI: 10.5455/jice.20161204021549
- Ichim, G., y Tait, S. W. G. (2016). A fate worse than death: Apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer*, 16(8), 539–548. DOI: 10.1038/nrc.2016.58
- Iglesias, T., Espina, M., Montes-Bayón, M., Sierra, L. M., y Blanco-González, E. (2015). Anion exchange chromatography for the determination of 5-methyl-2'-deoxycytidine: application to cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant ovarian cancer cell lines. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(9), 2423–2431. DOI: 10.1007/s00216-014-8070-7
- Imanishi, S., Umezu, T., Kobayashi, C., Ohta, T., Ohyashiki, K., y Ohyashiki, J. H. (2018). Chromatin regulation by HP1 $\gamma$  contributes to survival of 5-azacytidine-resistant cells. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1–7. DOI: 10.3389/fphar.2018.01166
- Ince, S., Keles, H., Erdogan, M., Hazman, O., y Kucukkurt, I. (2012). Protective effect of boric acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Drug and Chemical Toxicology*, 35(3), 285–292. DOI: 10.3109/01480545.2011.607825
- Ince, S., Kucukkurt, I., Demirel, H. H., Acaroz, D. A., Akbel, E., y Cigerci, I. H. (2014). Protective effects of boron on cyclophosphamide induced lipid peroxidation and genotoxicity in rats. *Chemosphere*, 108, 197–204. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.01.038
- Instituto Nacional de Cáncer. (2020). Recuperado desde [NIH](#)
- Iztleuov, Y., Abilov, T., Zhanabayeva, G., Ismailova, I., y Iztleuov, M. (2018). Protective effect of sodium tetraborate on chromium-induced brain damage in rats. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 11(1), 227–236. DOI: 10.13005/bpj/1367
- Jeltsch, A., y Jurkowska, R. Z. (2014). New concepts in DNA methylation. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(7), 310–318. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.05.002
- Ji, X., Lu, Y., Tian, H., Meng, X., Wei, M., y Cho, W. C. (2019). Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 114, 108800. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108800



- Johnson, M. D., Mueller, M., Game, L., y Aitman, T. J. (2012). Single nucleotide analysis of cytosine methylation by whole-genome shotgun bisulfite sequencing. *Current Protocols in Molecular Biology*, 1(SUPPL.99), 1–28. DOI: 10.1002/0471142727.mb2123s99
- Jovanovic, J., Rønneberg, J. A., Tost, J., y Kristensen, V. (2010). The epigenetics of breast cancer. *Molecular Oncology*, 4(3), 242–254. DOI: 10.1016/j.molonc.2010.04.002
- Kalkavan, H., y Green, D. R. (2018). MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death and Differentiation*, 25(1), 46–55. DOI: 10.1038/cdd.2017.179
- Karimi, M., Johansson, S., y Ekström, T. J. (2006). Using LUMA: A luminometric-based assay for global DNA-methylation. *Epigenetics*, 1(1), 45–48. DOI: 10.4161/epi.1.1.2587
- Karimi, M., Johansson, S., Stach, D., Corcoran, M., Grandér, D., Schalling, M., Bakalkin, G., Lyko, F., Larsson, C., y Ekström, T. J. (2006). LUMA (LUminometric Methylation Assay)-A high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation. *Experimental Cell Research*, 312(11), 1989–1995. DOI: 10.1016/j.yexcr.2006.03.006
- Khaliq, H., Juming, Z., y Ke-Mei, P. (2018). The Physiological Role of Boron on Health. *Biological Trace Element Research*, 186(1), 31–51. DOI: 10.1007/s12011-018-1284-3
- Kim, J. Y., Kang, Y. Y., Kim, E. J., Ahn, J. H., y Mok, H. (2018). Effects of curcumin-/boron-based compound complexation on antioxidant and antiproliferation activity. *Applied Biological Chemistry*, 61(4), 403–408. DOI: 10.1007/s13765-018-0374-4
- Kim, M., y Costello, J. (2017). DNA methylation: An epigenetic mark of cellular memory. *Experimental and Molecular Medicine*, 49(4). DOI: 10.1038/emm.2017.10
- Klocker, H., Culig, Z., Kaspar, F., Hobisch, A., Eberle, J., Reissigl, A., y Bartsch, G. (1994). Androgen signal transduction and prostatic carcinoma. *World Journal of Urology*, 12(2), 99–103. DOI: 10.1007/BF00184245
- Koetsier, G., y Cantor, E. (2019). A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. *New England Biolabs*, 1(1), 1–8. Recuperado desde [New England Biolabs](#)
- Kucukkurt, I., Akbel, E., Karabag, F., y Ince, S. (2015). The effects of dietary boron compounds in supplemented diet on hormonal activity and some biochemical parameters in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 31(3), 255–260. DOI: 10.1177/0748233712469648
- Kumar, K., Raza, S. S., Knab, L. M., Chow, C. R., Kwok, B., Bentrem, D. J., Popovic, R., Ebine, K., Licht, J. D., y Munshi, H. G. (2015). GLI2-dependent c-MYC upregulation mediates resistance of pancreatic cancer cells to the BET bromodomain inhibitor JQ1. *Scientific Reports*, 5, 1–9.

DOI: 10.1038/srep09489

- Kurdyukov, S., y Bullock, M. (2016). DNA methylation analysis: Choosing the right method. *Biology*, 5(1), 1–21. DOI: 10.3390/biology5010003
- Kurtoglu, V., Kurtoglu, F., y Akalin, P. P. (2018). The effects of various levels of boron supplementation on live weight, plasma lipid peroxidation, several biochemical and tissue antioxidant parameters of male mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 49, 146–150. DOI: 10.1016/j.jtemb.2018.05.013
- Lai, W., Mo, J., Yin, J., Lyu, C., y Wang, H. (2019). Profiling of epigenetic DNA modifications by advanced liquid chromatography-mass spectrometry technologies. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 110, 173–182. DOI: 10.1016/j.trac.2018.10.031
- Lan, M. D., Yuan, B. F., y Feng, Y. Q. (2019). Deciphering nucleic acid modifications by chemical derivatization-mass spectrometry analysis. *Chinese Chemical Letters*, 30(1), 1–6. DOI: 10.1016/j.cclet.2018.04.021
- Le, T., Kim, K. P., Fan, G., y Faull, K. F. (2011). A sensitive mass spectrometry method for simultaneous quantification of DNA methylation and hydroxymethylation levels in biological samples. *Analytical Biochemistry*, 412(2), 203–209. DOI: 10.1016/j.ab.2011.01.026
- Lee, K., Kruper, L., Dieli-Conwright, C. M., y Mortimer, J. E. (2019). The Impact of Obesity on Breast Cancer Diagnosis and Treatment. *Current Oncology Reports*, 6(7), 75. DOI: 10.1007/s11912-019-0787-1
- Lee, Y. K., Jin, S., Duan, S., Lim, Y. C., Ng, D. P. Y., Lin, X. M., Yeo, G. S. H., y Ding, C. (2014). Improved reduce representation bisulfite sequencing for epigenomic profiling of clinical samples. *Biological Procedures Online*, 16(1). DOI: 10.1186/1480-9222-16-1
- Lee, S., y Lee, J. S. (2019). Cellular senescence: A promising strategy for cancer therapy. *BMB Reports*, 52(1), 35–41. DOI: 10.5483/BMBRep.2019.52.1.294
- Lenhart, R., Kirov, S., Desilva, H., Cao, J., Lei, M., Johnston, K., Peterson, R., Schweizer, L., Purandare, A., Ross-Macdonald, P., Fairchild, C., Wong, T., y Wee, S. (2015). Sensitivity of small cell lung cancer to BET inhibition is mediated by regulation of ASCL1 gene expression. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(10), 2167–2174. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0037



- Lewinska, A., Adamczyk-Grochala, J., Deregowska, A., y Wnuk, M. (2017). Sulforaphane-induced cell cycle arrest and senescence are accompanied by DNA hypomethylation and changes in microRNA profile in breast cancer cells. *Theranostics*, 7(14), 3461–3477. DOI: 10.7150/thno.20657
- Lewinska, A., Adamczyk-Grochala, J., Kwasniewicz, E., Deregowska, A., y Wnuk, M. (2017). Diosmin-induced senescence, apoptosis and autophagy in breast cancer cells of different p53 status and ERK activity. *Toxicology Letters*, 265, 117–130. DOI: 10.1016/j.toxlet.2016.11.018
- Li, E., y Zhang, Y. (2014). DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(5). DOI: 10.1101/cshperspect.a019133
- Li, F., Miao, L., Xue, T., Qin, H., Mondal, S., Thompson, P. R., Coonrod, S. A., Liu, X., y Zhang, X. (2019). Inhibiting PAD2 enhances the anti-tumor effect of docetaxel in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1), 1–15. DOI: 10.1186/s13046-019-1404-8
- Li, G. Q., Guo, W. Z., Zhang, Y., Seng, J. J., Zhang, H. P., Ma, X. X., Zhang, G., Li, J., Yan, B., Tang, H. W., Li, S. S., Wang, L. D., y Zhang, S. J. (2016). Suppression of BRD4 inhibits human hepatocellular carcinoma by repressing MYC and enhancing BIM expression. *Oncotarget*, 7(3), 2462–2474. DOI: 10.18632/oncotarget.6275
- Li, J., Huang, S., Zeng, L., Li, K., Yang, L., Gao, S., Guan, C., Zhang, S., Lao, X., Liao, G., y Liang, Y. (2020). Necroptosis in head and neck squamous cell carcinoma: characterization of clinicopathological relevance and in vitro cell model. *Cell Death and Disease*, 11(5). DOI: 10.1038/s41419-020-2538-5
- Liang, D., Wang, H., Song, W., Xiong, X., Zhang, X., Hu, Z., Guo, H., Yang, Z., Zhai, S., Zhang, L. H., Ye, Min., y Du, Q. (2016). The decreased N6-methyladenine DNA modification in cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 480(1), 120–125. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.136
- Liao, H., Zang, Q., Lv, Q., Gao, Y., Zhao, Z., He, J., Zhang, R., Song, Y., Chen, Y., y Abliz, Z. (2019). Development of methionine methylation profiling and relative quantification in human breast cancer cells based on metabolic stable isotope labeling. *Analyst*, 144(13), 3988–3998. DOI: 10.1039/c9an00545e
- Lin, Y., Jiang, M., Chen, W., Zhao, T., y Wei, Y. (2019). Cancer and ER stress: Mutual crosstalk between autophagy, oxidative stress and inflammatory response. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 118. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109249



- Lio, C. W. J., Yue, X., López-Moyado, I. F., Tahiliani, M., Aravind, L., y Rao, A. (2020). TET methylcytosine oxidases: new insights from a decade of research. *Journal of Biosciences*, 45(1). DOI: 10.1007/s12038-019-9973-4
- Liu, C., Sun, L., Yang, J., Liu, T., Yang, Y., Kim, S.-M., ... Guo, Q. (2018). FSIP1 regulates autophagy in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(51), 13075–13080. DOI: 10.1073/pnas.1809681115
- Liu, F., Hon, G. C., Villa, G. R., Turner, K. M., Ikegami, S., Yang, H., ... Mischel, P. S. (2015). EGFR Mutation Promotes Glioblastoma through Epigenome and Transcription Factor Network Remodeling. *Molecular Cell*, 60(2), 307–318. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.09.002
- Liu, X., Yang, W., Guan, Z., Yu, W., Fan, B., Xu, N., y Liao, D. J. (2018). There are only four basic modes of cell death, although there are many ad-hoc variants adapted to different situations. *Cell and Bioscience*, 8(1), 1–12. DOI: 10.1186/s13578-018-0206-6
- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4), 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
- Locke, W. J., Guanzon, D., Ma, C., Liew, Y. J., Duesing, K. R., Fung, K. Y. C., y Ross, J. P. (2019). DNA Methylation Cancer Biomarkers: Translation to the Clinic. *Frontiers in Genetics*, 10, 1–22. DOI: 10.3389/fgene.2019.01150
- Lockwood, W. W., Zejnullahu, K., Bradner, J. E., y Varmus, H. (2012). Sensitivity of human lung adenocarcinoma cell lines to targeted inhibition of BET epigenetic signaling proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(47), 19408–19413. DOI: 10.1073/pnas.1216363109
- López, A., Yanez, E., Wrobel, K., Wrobel K. (2011). Selective derivatization of cytosine and methylcytosine moieties with 2-bromoacetophenone for submicrogram DNA methylation analysis by reversed phase HPLC with spectrofluorimetric detection. *Analytical Chemistry*, 83(20), 7999–8005. DOI: 10.1021/ac2020799
- Lynch, H., Synder, C., y Wang, S. M. (2015). Considerations for comprehensive assessment of genetic predisposition in familial breast cancer. *Breast Journal*, 21(1), 67–75. DOI: doi.org/10.1111/tbj.12358
- Mao, K., y Klionsky, D. J. (2017). Xenophagy: A battlefield between host and microbe, and a possible avenue for cancer treatment. *Autophagy*, 13(2), 223–224. DOI: 10.1080/15548627.2016.1267075



- Marabita, F., Almgren, M., Lindholm, M. E., Ruhrmann, S., Fagerström-Billai, F., Jagodic, M., Sundberg, C. J., Ekström, T. J., Teschendorff, A. E., Tegnér, J., y Gomez-Cabrero, D. (2013). An evaluation of analysis pipelines for DNA methylation profiling using the illumina humanmethylation450 BeadChip platform. *Epigenetics*, 8(3), 333–346. DOI: 10.4161/epi.24008
- Maratovich, I. Y., Narimanovna, K. N., Vladimirovna, I. I., y Kapenovich, I. M. (2017). Protective action of sodium tetraborate on chrom-induced hepato- and genotoxicity in rats. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 10(3), 1239–1247. DOI: 10.13005/bpj/1226
- Marone, P. A., Heimbach, J. T., Nemzer, B., y Hunter, J. M. (2016). Subchronic and genetic safety evaluation of a calcium fructoborate in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 95, 75–88. DOI: 10.1016/j.fct.2016.06.021
- Martínez, N. A. (2018). Aplicaciones de espectrometría de masas en epigenética: estudio analítico del impacto del bórax en mamíferos (tesis de pregrado). Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Oaxaca.
- Mazur, P. K., Herner, A., Mello, S. S., Wirth, M., Hausmann, S., Sánchez-Rivera, F. J., ... Siveke, J. T. (2015). Combined inhibition of BET family proteins and histone deacetylases as a potential epigenetics-based therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Medicine*, 21(10), 1163–1171. DOI: 10.1038/nm.3952
- McClelland, M. L., Mesh, K., Lorenzana, E., Chopra, V. S., Segal, E., Watanabe, C., ... Firestein, R. (2016). CCAT1 is an enhancer-templated RNA that predicts BET sensitivity in colorectal cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 126(2), 639–652. DOI: 10.1172/JCI83265
- Mehnert, M., Ciuffa, R., Frommelt, F., Uliana, F., van Drogen, A., Ruminski, K., ... Aebersold, R. (2020). Multi-layered proteomic analyses decode compositional and functional effects of cancer mutations on kinase complexes. *Nature Communications*, 11(1). DOI: 10.1038/s41467-020-17387-y
- Meissner, A., Gnirke, A., Bell, G. W., Ramsahoye, B., Lander, E. S., y Jaenisch, R. (2005). Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Research*, 33(18), 5868–5877. DOI: 10.1093/nar/gki901
- Mertz, J. A., Conery, A. R., Bryant, B. M., Sandy, P., Balasubramanian, S., Mele, D. A., ... Sims, R. J. (2011). Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(40), 16669–16674. DOI: 10.1073/pnas.1108190108



- Mogoșanu, G. D., Biță, A., Bejenaru, L. E., Bejenaru, C., Croitoru, O., Rău, G., ... Scorei, R. I. (2016). Calcium Fructoborate for Bone and Cardiovascular Health. *Biological Trace Element Research*, 172(2), 277–281. DOI: 10.1007/s12011-015-0590-2
- Mohammadizadeh, F., Falahati-Pour, S. K., Rezaei, A., Mohamadi, M., Hajizadeh, M. R., Mirzaei, M. R., ... Mahmoodi, M. (2018). The cytotoxicity effects of a novel Cu complex on MCF-7 human breast cancerous cells. *BioMetals*, 31(2), 233–242. DOI: 10.1007/s10534-018-0079-5
- Mohammadizadeh, F., Mahmoodi, M., Rezaei, A., Mohamadi, M., Hajizadeh, M. R., Mirzaei, M. R., y Falahati-pour, S. K. (2019). A new copper complex enhanced apoptosis in human breast cancerous cells without considerable effects on normal cells. *Gene Reports*, 17, 100475. DOI: 10.1016/j.genrep.2019.100475
- Müller, M. M., y Muir, T. W. (2015). Histones: At the crossroads of peptide and protein chemistry. *Chemical Reviews*, 115(6), 2296–2349. DOI: 10.1021/cr5003529
- Naghii, M. R., Mofid, M., Asgari, A. R., Hedayati, M., y Daneshpour, M. S. (2011). Comparative effects of daily and weekly boron supplementation on plasma steroid hormones and proinflammatory cytokines. *Physiology and Pharmacology*, 15(3), 403–414. DOI: 10.1016/j.jtemb.2010.10.001
- Nan, M. L., Wang, X., Li, H. J., Yu, D. H., Sun, W. Y., Xu, H. M., ... Zhao, Q. C. (2019). Rotundic acid induces Cas3-MCF-7 cell apoptosis through the p53 pathway. *Oncology Letters*, 17(1), 630–637. DOI: 10.3892/ol.2018.9616
- Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano (2020). Recuperado desde [NHGRI](#)
- Nielsen, Forrest H. (2014). Update on human health effects of boron. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(4), 383–387. DOI: 10.1016/j.jtemb.2014.06.023
- Nielsen, F. H. (2009). Boron deprivation decreases liver S-adenosylmethionine and spermidine and increases plasma homocysteine and cysteine in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 23(3), 204–213. DOI: 10.1016/j.jtemb.2009.03.001
- Noguchi, M., Hirata, N., Tanaka, T., Suizu, F., Nakajima, H., y Chiorini, J. A. (2020). Autophagy as a modulator of cell death machinery. *Cell Death and Disease*, 11(7). DOI: 10.1038/s41419-020-2724-5
- Observatorio Global de Cáncer. (2018). Recuperado desde [GLOBOCAN](#)
- Organización Mundial de Salud. (2020). Recuperado desde [OMS](#)



- Osako, T., Lee, H., Turashvili, G., Chiu, D., McKinney, S., Joosten, S. E. P., Wilkinson, D., Nielsen, T. O., Zwart, W., Emerman, J. T., Eaves, C. J., Caldas, C., y Aparicio, S. (2020). Age-correlated protein and transcript expression in breast cancer and normal breast tissues is dominated by host endocrine effects. *Nature Cancer*, 1(5), 518–532. DOI: 10.1038/s43018-020-0060-4
- Ott, C. J., Kopp, N., Bird, L., Paranal, R. M., Qi, J., Bowman, T., Roding, S., Kung, A. L., Bradner, J. E., y Weinstock, D. M. (2012). BET bromodomain inhibition targets both c-Myc and IL7R in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 120(14), 2843–2852. DOI: 10.1182/blood-2012-02-413021
- Peifer, M., Fernández-Cuesta, L., Sos, M. L., George, J., Seidel, D., Kasper, L. H., ... Thomas, R. K. (2012). Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nature Genetics*, 44(10), 1104–1110. DOI: 10.1038/ng.2396
- Pérez-Peña, J., Serrano-Heras, G., Montero, J. C., Corrales-Sánchez, V., Pandiella, A., y Ocaña, A. (2016). *In silico* analysis guides selection of BET Inhibitors for triple-negative breast cancer treatment. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(8), 1823–1833. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0004
- Pérez-Salvia, M., y Esteller, M. (2017). Bromodomain inhibitors and cancer therapy: From structures to applications. *Epigenetics*, 12(5), 323–339. DOI: 10.1080/15592294.2016.1265710
- Pérez, R. F., Santamarina, P., Tejedor, J. R., Urdinguio, R. G., Álvarez-Pitti, J., Redon, P., ... Lurbe, E. (2019). Longitudinal genome-wide DNA methylation analysis uncovers persistent early-life DNA methylation changes. *Journal of Translational Medicine*, 17(1), 1–16. DOI: 10.1186/s12967-018-1751-9
- Pfeffer, C. M., y Singh, A. T. K. (2018). Apoptosis: A target for anticancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2). DOI: 10.3390/ijms19020448
- Pizzorno, L. (2015). Nothing Boring about this Borylation. *Synfacts*, 11(03), 0266–0266. DOI: 10.1055/s-0034-1380103
- Plescia, J., y Moitessier, N. (2020). Design and discovery of boronic acid drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 195, 112270. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112270
- Poreba, M., Groborz, K., Navarro, M., Snipas, S. J., Drag, M., y Salvesen, G. S. (2019). Caspase selective reagents for diagnosing apoptotic mechanisms. *Cell Death and Differentiation*, 26(2), 229–244. DOI: 10.1038/s41418-018-0110-y



- Putnik, M., Zhao, C., Gustafsson, J. Å., y Dahlman-Wright, K. (2012). Global identification of genes regulated by estrogen signaling and demethylation in MCF-7 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 426(1), 26–32. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.08.007
- Qi, C., Ding, J., Yuan, B., y Feng, Y. (2019). Analytical methods for locating modifications in nucleic acids. *Chinese Chemical Letters*, 30(9), 1618–1626. DOI: 10.1016/j.ccllet.2019.02.005
- Quinlivan, E. P., y Gregory, J. F. (2008). DNA methylation determination by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using novel biosynthetic [U-15N]deoxycytidine and [U-15N]methyldeoxycytidine internal standards. *Nucleic Acids Research*, 36(18), 1–7. DOI: 10.1093/nar/gkn534
- Rao, J. S., Keleshian, V. L., Klein, S., y Rapoport, S. I. (2012). Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients. *Translational Psychiatry*, 2(May), 1–7. DOI: 10.1038/tp.2012.55
- Rastegar, L., Mighani, H., y Ghassempour, A. (2018). A comparison and column selection of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography and Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography for detection of DNA methylation. *Analytical Biochemistry*, 557, 123–130. DOI: 10.1016/j.ab.2018.07.013
- Liu, Z., Wu, J., Xie, Z., Liu, S., Fan-Harvard, P., Huang, T. H. M., Plass, C., Marcucci, G., y Chan, K. K. (2008). Quantification of Regional DNA Methylation by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *Anal Biochem*, 391(2), 106-113. DOI: 10.1016/j.ab.2009.05.012
- Rogoveanu, O. C., Mogoşanu, G. D., Bejenaru, C., Bejenaru, L. E., Croitoru, O., Neamţu, J., ... Scorei, R. I. (2015). Effects of Calcium Fructoborate on Levels of C-Reactive Protein, Total Cholesterol, Low-Density Lipoprotein, Triglycerides, IL-1 $\beta$ , IL-6, and MCP-1: a Double-blind, Placebo-controlled Clinical Study. *Biological Trace Element Research*, 163(1–2), 124–131. DOI: 10.1007/s12011-014-0155-9
- Routray, I., y Ali, S. (2016). Boron induces lymphocyte proliferation and modulates the priming effects of lipopolysaccharide on macrophages. *PLoS ONE*, 11(3), 1–17. DOI: 10.1371/journal.pone.0150607
- Rozhon, W., Baubec, T., Mayerhofer, J., Scheid, O. M., y Jonak, C. (2008). Rapid quantification of global DNA methylation by isocratic cation exchange high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 375(2), 354–360. DOI: 10.1016/j.ab.2008.01.001



- Rummel, S. K., Lovejoy, L., Shriver, C. D., y Ellsworth, R. E. (2017). Contribution of germline mutations in cancer predisposition genes to tumor etiology in young women diagnosed with invasive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 164(3), 593–601. DOI: 10.1007/s10549-017-4291-8
- Shaokun S., Lin, C. Y., He, H. H., Witwicki, R. M., Tabassum, D. P., Roberts, J. M., Janiszewska, M., Huh, S. H., Yiang, Y., Ryan, Y., Doherty, E., Mohammed, H., Guo, H., Stover, D. G., Ekram, M. B., Brown, J., D'Santos, C., Krop, I. E., Dillon, D., McKeown, M., Ott, C., Qi, J., Ni, M., Rao, P. K., Duarte, M., Wu, S. Y., Chiang, C. M., Anders, L., Young, R. A., Winer, E., Letai, A., Barry, W. T., Carroll, J. S., Long, H., Brown, M., Shirley, L., Meyer, C. A., Bradner, J. E., y Polyak, K. (2017). Response and resistance to BET bromodomain inhibitors in triple negative breast cancer. *Physiology and Behavior*, 176(1), 139–148. DOI: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040
- Schultz, D. J., Muluhngwi, P., Alizadeh-Rad, N., Green, M. A., Rouchka, E. C., Waigel, S. J., y Klinge, C. M. (2017). Genome-wide miRNA response to anacardic acid in breast cancer cells. *PLoS ONE*, 12(9), 1–29. DOI: 10.1371/journal.pone.0184471
- Scorei, I. D., y Scorei, R. I. (2013). Calcium fructoborate helps control inflammation associated with diminished bone health. *Biological Trace Element Research*, 155(3), 315–321. DOI: 10.1007/s12011-013-9800-y
- Scorei, R., Ciubar, R., Ciofrangeanu, C. M., Mitran, V., Cimpean, A., y Iordachescu, D. (2008). Comparative effects of boric acid and calcium fructoborate on breast cancer cells. *Biological Trace Element Research*, 122(3), 197–205. DOI: 10.1007/s12011-007-8081-8
- Scorei, R. I., Miljkovic, D., Cimpoiașu, V. M., y Scorei, I. D. (2009). Calcium fructoborate: Plant-based dietary boron for human nutrition. *Journal of Dietary Supplements*, 6(3), 211–226. DOI: 10.1080/19390210903070772
- Scorei, R. I., y Rotaru, P. (2011). Calcium fructoborate-potential anti-inflammatory agent. *Biological Trace Element Research*, 143(3), 1223–1238. DOI: 10.1007/s12011-011-8972-6
- Seelan, R. S., Mukhopadhyay, P., Pisano, M. M., y Greene, R. M. (2018). Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) on gene expression. *Drug Metabolism Reviews*, 50(2), 193–207. DOI: 10.1080/03602532.2018.1437446
- Sengupta, S., Biarnes, M. C., Clarke, R., y Jordan, V. C. (2015). Inhibition of BET proteins impairs estrogen-mediated growth and transcription in breast cancers by pausing RNA polymerase advancement. *Breast Cancer Research and Treatment*, 150(2), 265–278. DOI: 10.1007/s10549-015-3319-1



- Šestáková, Š., Šálek, C., y Remešová, H. (2019). DNA Methylation Validation Methods: A Coherent Review with Practical Comparison. *Biological Procedures Online*, 21(1), 1–11. DOI: 10.1186/s12575-019-0107-z
- Shah, D., y Osipo, C. (2016). Cancer stem cells and HER2 positive breast cancer: The story so far. *Genes and Diseases*, 3(2), 114–123. DOI: 10.1016/j.gendis.2016.02.002
- Shan, L., Yu, J., He, Z., Chen, S., Liu, M., y Ding, H. (2020). Defining relative mutational difficulty to understand cancer formation. *Cell Discovery*. DOI: 10.1038/s41421-020-0177-8
- Sharifi, S., Barar, J., Hejazi, M. S., y Samadi, N. (2015). Doxorubicin changes Bax /Bcl-xL ratio, caspase-8 and 9 in breast cancer cells. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(3), 351–359. DOI: 10.15171/apb.2015.049
- Sharma, V., Verma, S., Seranova, E., Sarkar, S., y Kumar, D. (2018). Selective autophagy and xenophagy in infection and disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 1–17. DOI: 10.3389/fcell.2018.00147
- Shimamura, T., Chen, Z., Soucheray, M., Carretero, J., Kikuchi, E., Tchaicha, J. H., ... Wong, K. K. (2013). Efficacy of BET bromodomain inhibition in KRAS-mutant non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 19(22), 6183–6192. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3904
- Shu, S., Lin, C. Y., He, H. .H., Witwicki R. M., Tabasusum, D. P., Roberts, J. M., Janiszewska, M., Huh, S. J., Liang, Y., Ryan, J., ... Response and resistance to BET bromodomain inhibitors in triple-negative breast cancer. *Nature* 2016; 529(7586). DOI: 10.1038/nature16508
- Sigma-Aldrich México. (2020). Recuperado desde [Sigma-Aldrich](#)
- Singh, R., Letai, A., y Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 175–193. DOI: 10.1038/s41580-018-0089-8
- Singh, S. S., Vats, S., Chia, A. Y. Q., Tan, T. Z., Deng, S., Ong, M. S., ... Kumar, A. P. (2018). Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene*, 37(9), 1142–1158. DOI: 10.1038/s41388-017-0046-6
- Singhal, S. K., Usmani, N., Michiels, S., Metzger-Filho, O., Saini, K. S., Kovalchuk, O., y Parliament, M. (2016). Towards understanding the breast cancer epigenome: A comparison of genome-wide DNA methylation and gene expression data. *Oncotarget*, 7(3), 3002–3017. DOI: 10.18632/oncotarget.6503



- Song, L., James, S. R., Kazim, L., y Karpf, A. R. (2005). Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 77(2), 504–510. DOI: 10.1021/ac0489420
- Soodgupta, D., Pan, D., Cui, G., Senpan, A., Yang, X., Lu, L., ... Tomasson, M. H. (2015). Small molecule MYC inhibitor conjugated to integrin-targeted nanoparticles extends survival in a mouse model of disseminated multiple myeloma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(6), 1286–1294. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0774-T
- Soriano, J., Mora-Espí, I., Alea-Reyes, M. E., Pérez-García, L., Barrios, L., Ibáñez, E., y Nogués, C. (2017). Cell death mechanisms in Tumoral and Non-Tumoral human cell lines triggered by photodynamic treatments: Apoptosis, necrosis and parthanatos. *Scientific Reports*, 7, 1–13. DOI: 10.1038/srep41340
- Stresemann, C., y Lyko, F. (2008). Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *International Journal of Cancer*, 123(1), 8–13. DOI: 10.1002/ijc.23607
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., ... Zhu, H. P. (2017). Risk factors and preventions of breast cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(11), 1387–1397. DOI: 10.7150/ijbs.21635
- Sunagawa, Y., Funamoto, M., Sono, S., Shimizu, K., Shimizu, S., Genpei, M., ... Morimoto, T. (2018). Curcumin and its demethoxy derivatives possess p300 HAT inhibitory activity and suppress hypertrophic responses in cardiomyocytes. *Journal of Pharmacological Sciences*, 136(4), 212–217. DOI: 10.1016/j.jphs.2017.12.013
- Sung, H., Siegel, R. L., Torre, L. A., Pearson-Stuttard, J., Islami, F., Fedewa, S. A., ... Jemal, A. (2018). Global patterns in excess body weight and the associated cancer burden. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 88–112. DOI: 10.3322/caac.21499
- Syed Abdul Rahman, S. N., Abdul Wahab, N., y Abd Malek, S. N. (2013). In vitro morphological assessment of apoptosis induced by antiproliferative constituents from the rhizomes of curcuma zedoaria. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. DOI: 10.1155/2013/257108
- Taha, Z., y Eltom, S. E. (2018). The role of diet and lifestyle in women with breast cancer: An update review of related research in the Middle East. *BioResearch Open Access*, 7(1), 73–80. DOI: 10.1089/biores.2018.0004



- Tepedelen, B. E., Korkmaz, M., Tatlisumak, E., Uluer, E. T., Ölmez, E., Değerli, İ., ... İnan, S. (2017). A Study on the Anticarcinogenic Effects of Calcium Fructoborate. *Biological Trace Element Research*, 178(2), 210–217. DOI: 10.1007/s12011-016-0918-6
- Tombuloglu, A., Copoglu, H., Aydin-Son, Y., y Guray, N. T. (2020). In vitro effects of boric acid on human liver hepatoma cell line (HepG2) at the half-maximal inhibitory concentration. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 62(1), 126573. DOI: 10.1016/j.jtemb.2020.126573
- Tompkins, J. D., Hall, C., Chen, V. C. Y., Li, A. X., Wu, X., Hsu, D., ... Riggs, A. D. (2012). Epigenetic stability, adaptability, and reversibility in human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), 12544–12549. DOI: 10.1073/pnas.1209620109
- Tsai, L. H., Wu, J. Y., Cheng, Y. W., Chen, C. Y., Sheu, G. T., Wu, T. C., y Lee, H. (2015). The MZF1/c-MYC axis mediates lung adenocarcinoma progression caused by wild-type lkb1 loss. *Oncogene*, 34(13), 1641–1649. DOI: 10.1038/onc.2014.118
- Tungskruthai, S., Petpiroon, N., y Chanvorachote, P. (2018). Molecular mechanisms of breast cancer metastasis and potential anti-metastatic compounds. *Anticancer Research*, 38(5), 2607–2618. DOI: 10.21873/anticancer.12502
- Turkez, H., Geyikoğlu, F., Dirican, E., y Tatar, A. (2012). In vitro studies on chemoprotective effect of borax against aflatoxin B1-induced genetic damage in human lymphocytes. *Cytotechnology*, 64(6), 607–612. DOI: 10.1007/s10616-012-9454-1
- Uluşik, I., Karakaya, H. C., y Koc, A. (2018). The importance of boron in biological systems. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 45(October 2017), 156–162. DOI: 10.1016/j.jtemb.2017.10.008
- Urbano, A., Smith, J., Weeks, R. J., y Chatterjee, A. (2019). Gene-specific targeting of DNA methylation in the mammalian genome. *Cancers*, 11(10), 7–9. DOI: 10.3390/cancers11101515
- Üstündağ, A., Behm, C., Föllmann, W., Duydu, Y., y Degen, G. H. (2014). Protective effect of boric acid on lead- and cadmium-induced genotoxicity in V79 cells. *Archives of Toxicology*, 88(6), 1281–1289. DOI: 10.1007/s00204-014-1235-5
- Van Meerloo, J., Kaspers, G. J., y Cloos, J. (2011). Cancer Cell Culture, MTT assay. *Methods Mol Biol*, 731(1), 79–91. DOI: 10.1007/978-1-61779-080-5



- Velardi, A. L. M., Groen, A. K., Oude Elferink, R. P. J., Van Der Meer, R., Palasciano, G., y Tytgat, G. N. J. (1991). Cell type-dependent effect of phospholipid and cholesterol on bile salt cytotoxicity. *Gastroenterology*, *101*(2), 457–464. DOI: 10.1016/0016-5085(91)90025-G
- Venkataraman, S., Alimova, I., Balakrishnan, I., Harris, P., Birks, D. K., Griesinger, A., ... Vibhakar, R. (2014). Inhibition of BRD4 attenuates tumor cell self-renewal and suppresses stem cell signaling in MYC driven medulloblastoma. *Oncotarget*. *5*(9), 2355-2371. DOI: 10.18632/oncotarget.1659
- Villanueva, L., Álvarez-Errico, D., y Esteller, M. (2020). The Contribution of Epigenetics to Cancer Immunotherapy. *Trends in Immunology*, 1–16. DOI: 10.1016/j.it.2020.06.002
- Virág, D., Dalmadi-Kiss, B., Vékey, K., Drahos, L., Klebovich, I., Antal, I., y Ludányi, K. (2020). Current Trends in the Analysis of Post-translational Modifications. *Chromatographia*, *83*(1). DOI: 10.1007/s10337-019-03796-9
- Volarevic, V., Djokovic, B., Jankovic, M. G., Harrell, C. R., Fellabaum, C., Djonov, V., y Arsenijevic, N. (2019). Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity: a balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity. *Journal of Biomedical Science*, *26*, 1–14. DOI: 10.1186/s12929-019-0518-9
- Waks, A. G., y Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *321*(3), 288–300. DOI: 10.1001/jama.2018.19323
- Walavalkar, K., Saravanan, B., Singh, A. K., Jayani, R. S., Nair, A., Farooq, U., ... Notani, D. (2020). A rare variant of African ancestry activates 8q24 lncRNA hub by modulating cancer associated enhancer. *Nature Communications*, *11*(1), 1–14. DOI: 10.1038/s41467-020-17325-y
- Wang, A., Wang, S., Zhou, F., Li, P., Wang, Y., Gan, L., y Lin, L. (2018). Physalin B induces cell cycle arrest and triggers apoptosis in breast cancer cells through modulating p53-dependent apoptotic pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *101*(October 2017), 334–341. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.02.094
- Wang, L., Wang, M., Guo, H., y Zhao, H. (2019). Emerging Role of Garcinol in Targeting Cancer Stem Cells of Non-small Cell Lung Cancer. *Current Pharmacology Reports*, *5*(1), 14–19. DOI: 10.1007/s40495-019-00169-6
- Wang, P., Du, Y., y Wang, J. (2019). Identification of breast cancer subtypes sensitive to HCQ-induced autophagy inhibition. *Pathology Research and Practice*, *215*(10), 152609. DOI: 10.1016/j.prp.2019.152609



- Wang, Q., Du, X., Zhou, B., Li, J., Lu, W., Chen, Q., y Gao, J. (2017). Mitochondrial dysfunction is responsible for fatty acid synthase inhibition-induced apoptosis in breast cancer cells by PdpaMn. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 96(October), 396–403. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.008
- Wang, X., Hui, R., Chen, Y., Wang, W., Chen, Y., Gong, X., y Jin, J. (2019). Discovery of novel doxorubicin metabolites in MCF7 doxorubicin-resistant cells. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1–7. DOI: 10.3389/fphar.2019.01434
- Wei, Y., Yuan, F. J., Zhou, W. B., Wu, L., Chen, L., Wang, J. J., y Zhang, Y. S. (2016). Borax-induced apoptosis in HepG2 cells involves p53, Bcl-2, and Bax. *Genetics and Molecular Research*, 15(2), 1–10. DOI: 10.4238/gmr.15028300
- Wennerberg, E., Lhuillier, C., Rybstein, M. D., Dannenberg, K., Rudqvist, N. P., Koelwyn, G. J., ... Demaria, S. (2020). Exercise reduces immune suppression and breast cancer progression in a preclinical model. *Oncotarget*, 11(4), 452–461. DOI: 10.18632/oncotarget.27464
- Wu, L., Wei, Y., Zhou, W. B., Zhang, Y. S., Chen, Q. H., Liu, M. X., ... Tang, Z. G. (2019). Gene expression alterations of human liver cancer cells following borax exposure. *Oncology Reports*, 42(1), 115–130. DOI: 10.3892/or.2019.7169
- Wyce, A., Degenhardt, Y., Bai, Y., Le, B. C., Korenchuk, S., Crouthamel, M. C., ... Barbash, O. (2013). Inhibition of BET bromodomain proteins as a therapeutic approach in prostate cancer. *Oncotarget*, 4(12), 2419–2429. DOI: 10.18632/oncotarget.1572
- Xiao, W., y Loscalzo, J. (2020). Metabolic Responses to Reductive Stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, 32(18), 1330–1347. DOI: 10.1089/ars.2019.7803
- Yang, C., Ngo, L., y Zheng, Y. G. (2014). Rational design of substrate-based multivalent inhibitors of the histone acetyltransferase Tip60. *ChemMedChem*, 9(3), 537–541. DOI: 10.1002/cmdc.201300478
- Yoshinari, A., y Takano, J. (2017). Insights into the mechanisms underlying boron homeostasis in plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–8. DOI: 10.3389/fpls.2017.01951
- You, X.-J., Liu, T., Ma, C.-J., Qi, C.-B., Tong, Y., Zhao, X., ... Feng, Y.-Q. (2019). Determination of RNA Hydroxymethylation in Mammals by Mass Spectrometry Analysis [Research-article]. *Analytical Chemistry*, 91(16), 10477–10483. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b01318
- Yuan, C. H., Filippova, M., y Duerksen-Hughes, P. (2012). Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): Mechanisms and implications for therapy. *Viruses*, 4(12), 3831–3850. DOI: 10.3390/v4123831



- Zaidi, S. K., Young, D. W., Montecino, M., Lian, J. B., Stein, J. L., van Wijnen, A. J., y Stein, G. S. (2010). Architectural Epigenetics: Mitotic Retention of Mammalian Transcriptional Regulatory Information. *Molecular and Cellular Biology*, 30(20), 4758–4766. DOI: 10.1128/mcb.00646-10
- Zeng, Y., y Chen, T. (2019). DNA methylation reprogramming during mammalian development. *Genes*, 10(4). DOI: 10.3390/genes10040257
- Zhang, L., Tong, Y., Zhang, X., Pan, M., y Chen, S. (2015). Arsenic sulfide combined with JQ1, chemotherapy agents, or celecoxib inhibit gastric and colon cancer cell growth. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 5851–5862. DOI: 10.2147/DDDT.S92943
- Zhong, C., Mai, Y., Gao, H., Zhou, W., y Zhou, D. (2019). Mitochondrial targeting of TR3 is involved in TPA induced apoptosis in breast cancer cells. *Gene*, 693(January), 61–68. DOI: 10.1016/j.gene.2018.12.072
- Zhu, H., Blake, S., Kusuma, F. K., Pearson, R. B., Kang, J., y Chan, K. T. (2020). Oncogene-induced senescence: From biology to therapy. *Mechanisms of Ageing and Development*, 187, 111229. DOI: 10.1016/j.mad.2020.111229
- Ziller, M. J., Hansen, K. D., Meissner, A., y Aryee, M. J. (2015). Coverage recommendations for methylation analysis by whole-genome bisulfite sequencing. *Nature Methods*, 12(3), 230–232. DOI: 10.1038/nmeth.3152
- Zimta, A. A., Tigau, A. B., Muntean, M., Cenariu, D., Slaby, O., y Berindan-Neagoe, I. (2019). Molecular links between central obesity and breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 1–21. DOI: 10.3390/ijms20215364
- Zuber, J., Shi, J., Wang, E., Rappaport, A. R., Herrmann, H., Sison, E. A., ... Vakoc, C. R. (2011). RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature*, 478(7370), 524–528. DOI: 10.1038/nature10334