

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA



EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LOS NIVELES DE
CITOCINAS INDUCIDOS POR EL TRATAMIENTO CON
GEL DE *Aloe vera* OBTENIDO DE LA COMUNIDAD DE
CAHUAYUMA COMBINADO CON FÁRMACOS
ANTICANCERÍGENOS EN MODELO MURINO

TESIS DE GRADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

POR: JHONY VICTOR APAZA MAMANI

La Paz – Bolivia

Septiembre, 2019

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA



EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LOS NIVELES DE
CITOCINAS INDUCIDOS POR EL TRATAMIENTO CON
GEL DE *Aloe vera* OBTENIDO DE LA COMUNIDAD DE
CAHUAYUMA COMBINADO CON FÁRMACOS
ANTICANCERÍGENOS EN MODELO MURINO

TESIS DE GRADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

POR: JHONY VICTOR APAZA MAMANI

TUTOR: DR. LUIS FERNANDO SOSA TORDOYA Esp.
CO-TUTOR: DR. JUAN ANTONIO ÁVILA ILLANES *Ph. D*

La Paz – Bolivia

Septiembre, 2019

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA

Tesis de grado:

**EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LOS NIVELES DE CITOCINAS
INDUCIDOS POR EL TRATAMIENTO CON GEL DE *Aloe vera* OBTENIDO DE
LA COMUNIDAD DE CAHUAYUMA COMBINADO CON FÁRMACOS
ANTICANCERÍGENOS EN MODELO MURINO**

Presentado por: Jhony Victor Apaza Mamani

Para optar al grado académico de *Licenciatura en Bioquímica*

Nota numeral.....

Nota literal.....

Ha sido

Director de Carrera de Bioquímica. Dr. Yohel Jiménez Velarde

Asesor. Dr. Luis Fernando Sosa Tordoya Esp.

Co-asesor. Dr. Juan Antonio Ávila Illanes *Ph. D.*

Tribunal. Dr. Yohel Jiménez Velarde *M.Sc.*

Tribunal. Dra. Silvia Zambrana Santander *M.Sc.*

Tribunal. Dra. Natalia Nuñez del Prado Alanes *Ph. D.*

La Paz – Bolivia

Septiembre, 2019

Dedicatoria.

A Dios por darme la vida.

A mi amada familia, mamá, papá y hermano por brindarme su apoyo incondicional y por nunca dudar de mí.

A mis queridos profesores por toda la enseñanza impartida durante todos estos años

A mis amigos por brindarme su amistad y colaboración eterna.

A personas queridas que no están cerca, pero siempre han estado apoyándome.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar siempre a mi lado en este camino que es la Vida.

Al Instituto SELADIS, que se ha convertido en mi casa durante estos últimos años.

A mi asesor, Doctor Luis Fernando Sosa Tordoya, por ser mi maestro, orientador, instructor, sobre todo un gran amigo y al grandioso equipo de trabajo a su cargo, Dr. José Luis Choquehuanca, Dr. Sergio Cabrera, Esther Casablanca, Mabel de la Cruz, Jacqueline Cortez, Danny Barrozo y mi gran amiga Carmen Rosales.

A mi asesor, Doctor Juan Antonio Ávila Illanes, por la confianza y el apoyo brindado y a su equipo de trabajo del Proyecto, Doctora Grace Ruiz y Claudia.

A mis amigos que siempre me ofrecieron su apoyo ilimitado.

ÍNDICE DE CONTENIDO.

I.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
A.	JUSTIFICACIÓN	3
B.	OBJETIVOS	4
1.	OBJETIVO GENERAL	4
2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
II.	MARCO REFERENCIAL	5
A.	ANTECEDENTES GENERALES	5
1.	EL CÁNCER UN PROBLEMA PREVALENTE EN LA SALUD MUNDIAL	5
III.	MARCO TEÓRICO	7
A.	GENERALIDADES DEL CÁNCER	7
1.	DEFINICIÓN DEL CÁNCER	7
2.	TIPOS DE CÁNCER	8
a.	Cáncer de pulmón	9
b.	Mecanismo molecular del cáncer de pulmón	10
B.	EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER	11
1.	EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER EN AMÉRICA LATINA	12
2.	EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER EN BOLIVIA	12
C.	BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER	13
1.	ACTIVACIÓN DE ONCOGENES E INACTIVACIÓN DE GENES SUPRESORES DE TUMOR	13
2.	ACUMULACIÓN DE MUTACIONES SOBRE EL GENOMA	14
3.	PREDISPOSICIÓN HEREDITARIA AL CÁNCER	14
4.	INESTABILIDAD GENÉTICA	15
5.	CAMBIOS EPIGENÉTICOS	15
D.	ETIOLOGÍA DEL CÁNCER	16
1.	FACTORES BIOLÓGICOS	16
2.	FACTORES FÍSICOS	17
3.	FACTORES QUÍMICOS	17
4.	OTROS FACTORES ESTUDIADOS	17
E.	TRATAMIENTO PARA EL CÁNCER	18
1.	TRATAMIENTO CONVENCIONAL	18
a.	Cirugía	18
b.	Radioterapia	18
c.	Quimioterapia	19
d.	Inmunoterapia	19
i.	Inmunoterapia no específica	19
ii.	Inmunoterapia específica	19
e.	Últimos avances en el tratamiento contra el cáncer	20
2.	TRATAMIENTO ALTERNATIVO	21

F. ANTECEDENTES DEL USO DEL <i>Aloe vera</i> COMO MEDICINA ALTERNATIVA CONTRA EL CÁNCER	21
1. GENERALIDADES	21
2. ESTRUCTURA DE LA PLANTA	22
3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GEL DE <i>Aloe vera</i>	24
4. PROPIEDADES ANTICANCERÍGENAS DEL GEL	26
G. SISTEMA INMUNE Y CÁNCER	27
1. VIGILANCIA INMUNOLÓGICA	28
a. Eliminación	28
b. Equilibrio	29
c. Escape	29
2. RESPUESTA INMUNE FRENTE AL CÁNCER	30
3. CITOCINAS	30
a. Características funcionales de las citocinas	31
b. Citocinas involucradas en el cáncer	31
i. IL-4	31
ii. Relación de la IL-4 con el tumor	33
iii. IL-10	33
iv. Relación de la IL-10 con el tumor	34
v. IFN- γ	35
vi. Relación del IFN- γ con el tumor	36
vii. TNF- α	36
viii. Relación del TNF- α con el tumor	37
IV. MARCO CONCEPTUAL	39
A. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	39
1. PCR EN TIEMPO REAL	39
2. SISTEMAS DE DETECCIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL	40
3. CUANTIFICACIÓN DE GENES POR PCR EN TIEMPO REAL	41
a. Cuantificación absoluta	42
b. Cuantificación relativa	42
i. Genes <i>housekeeping</i>	43
ii. Método $\Delta\Delta C_t$	43
4. TEMPERATURAS DE DISOCIACIÓN (CURVAS DE DISOCIACIÓN)	44
5. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL PCR EN TIEMPO REAL	45
B. MODELOS ANIMALES	45
1. MODELOS DE INDUCCIÓN DE TUMOR	46
a. Inducción de tumor por Benzo(a)pireno	46
V. DISEÑO METODOLÓGICO	47
A. POBLACIÓN EN ESTUDIO ÁMBITO Y PERIODO DE INVESTIGACIÓN	47
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	47
2. INDUCCIÓN DE TUMOR	47
3. FÁRMACO QUIMIOTERAPÉUTICO DE ELECCIÓN	48
B. TIPO DE INVESTIGACIÓN	48

C. MATERIALES, MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	48
1. MATERIAL BIOLÓGICO	48
2. HOMOGENEIZACIÓN DE TEJIDO DE PULMÓN	49
3. EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO ARN TOTAL A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN	49
4. EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO ARN TOTAL A PARTIR DE TEJIDO DE PULMÓN DE RATÓN	50
5. CUANTIFICACIÓN DE MATERIAL GENÉTICO ARN TOTAL	50
6. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO	50
7. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL O CUANTITATIVA	51
8. PLANILLA DE CÁLCULOS DE $\Delta\Delta CT$	52
D. ANÁLISIS DE DATOS	53
VI. RESULTADOS	54
A. OPTIMIZACIÓN DEL VOLUMEN DE MUESTRA REQUERIDO PARA LA EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN	54
B. TEMPERATURAS DE DISOCIACIÓN (TEMPERATURA MELTING) CORRESPONDIENTE A CADA PRODUCTO AMPLIFICADO	56
C. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA IL-4, IL-10, IFN- γ Y TNF- α EN SANGRE PERIFÉRICA	58
D. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA IL-4, IL-10, IFN- γ Y TNF- α EN TEJIDO DE PULMÓN	60
E. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LAS CITOCINAS EN ESTUDIO	62
VII. DISCUSIÓN	64
A. EFECTO DEL VOLUMEN DE MUESTRA EN LA CONCENTRACIÓN DE MATERIAL GENÉTICO AISLADO	64
B. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON GEL DE <i>Aloe vera</i> , CISPLATINO Y LA COMBINACIÓN DE AMBOS SOBRE LOS CAMBIOS EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA IL-4, IL-10, IFN- γ Y TNF- α	66
C. BALANCE SOBRE LA RESPUESTA INMUNE DE TIPO TH1 Y TH2 MEDIADO POR LA RESPUESTA INDUCIDA POR EL CISPLATINO Y EL GEL DE <i>Aloe vera</i>	70
VIII. CONCLUSIÓN	71
IX. RECOMENDACIONES	73
X. BIBLIOGRAFÍA	74

ÍNDICE DE ANEXOS

- I. AVAL ETICO
- II. TABLA EXCEL MODELO PARA LA MANIPULACIÓN DE LOS DATOS,
OBTENIDOS POR EL EQUIPO

INDICE DE TABLAS Y GRAFICOS

Tabla 1. Compuestos químicos que forman parte constituyente del gel de *Aloe vera*.

Tabla 2. Aplicación de tratamientos, dosis farmacológica y vías de administración

Tabla 3. Secuencia de cebadores seleccionados

Tabla 4. Comparación de concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ de ARN total obtenidos por el método del TRIzol a partir de diferentes volúmenes de muestras de sangre.

Tabla 5. Resultados de la cuantificación de ARN total obtenido de sangre periférica de ratón

Grafica 1. Promedio de las temperaturas de disociación de cada cebador evaluado en función al tipo de tratamiento empleado en muestras de sangre periférica.

Grafica 2. Promedio de las temperaturas de disociación de cada cebador evaluado en función al tipo de tratamiento empleado en muestras de tejido de pulmón.

Grafica 3. Niveles de expresión y represión de los genes de las Citocinas en estudio, obtenidos de sangre periférica de ratón, en función a tratamientos con Gel de *Aloe vera*, cisplatino y cisplatino/*Aloe vera*, en ratones con cáncer de pulmón.

Grafica 4. Niveles de expresión y represión de los genes de las Citocinas en estudio, obtenidos de tejido de pulmón de ratón, en función a tratamientos con Gel de *Aloe vera*, cisplatino y cisplatino/*Aloe vera*, en ratones con cáncer de pulmón.

Gráfica 5. Cambios en los niveles de expresión según el tipo de material biológico empleado y el tratamiento ejecutado en los animales de experimentación.

INDICE DE IMÁGENES Y FIGURAS

Imagen 1. Fotografía de la planta del *Aloe vera*.

Imagen 2. Fotografía microscópica de la planta de *Aloe vera*

Imagen 3. Vista microscópica del corte transversal de la hoja del *Aloe vera*

Imagen 4. Estructura molecular del acemanano

.

Figura 1. Esquema de la progresión del cáncer de pulmón

Figura 2. Conceptualización grafica de la inmunovigilancia

Figura 3. Estructura molecular de la Interleucina 4.

Figura 4. Estructura molecular de la Interleucina 10

Figura 5. Estructura molecular del Interferón gamma

Figura 6. Estructura molecular del Factor de Necrosis Tumoral Alfa

Figura 7. Comparación entre la reacción química entre SYBR Green I y TaqMan

INDICE DE ABREVIATURAS

OMS: Organización Mundial de la Salud

MAC: Medicina alternativa y complementaria

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral Alfa

IFN- γ : Interferón Gamma

IL-4: Interleucina 4

IL-10: Interleucina 10

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

VPH: Virus del Papiloma Humano

INC: Instituto Nacional del Cáncer

EGFR: Factor de Crecimiento Epidérmico

TGF- β : Factor de Crecimiento Beta Transformante

LOH: Perdida del Heterocigoto

VEGF: Factor de Crecimiento Vascular Endotelial

HPA: Hidrocarburos Policíclicos

13-HODE: 13-hidroxiocadecadienoico

GM-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos-Monocitos

PDFGR β : Factor de Crecimiento Derivados de Plaquetas

HVS-1: Virus Oncolítico Herpes Simple Tipo 1

APC: Células Presentadoras de Antígeno

CRISPR: Sistema de Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas Regularmente Espaciadas

NK: Natural Killer

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IL-2: Interleucina 2

IL-7: Interleucina 7

IL-9: Interleucina 9

IL-15: Interleucina 15

CCR4: Receptor de Quimioquina tipo 4

CD25: Cluster de Diferenciación 25

TAM: Macrófago Asociado a Tumor

MSDC: Células Mieloides Supresoras Derivadas

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

MHC: Complejo Principal de Histocompatibilidad

IgG: Inmunoglobulina de tipo G

DD: Dominios de Muerte

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

Ct: Cycle threshold (ciclo umbral)

GAPDH: Gliceraldehido 3-fosfatodeshidrogenasa

T_m: Temperatura de Fusión (Temperature Melting)

EDTA-K3: Ácido Etilendiaminotetraacético tripotásico

ARN: Ácido Ribonucleico

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

RESUMEN

El cáncer es una de las enfermedades con la mayor tasa de mortalidad a nivel mundial y debido a su complejidad, la terapia utilizada como la quimioterapia, radioterapia en la mayoría de los casos no son insuficientes para controlar o curar la enfermedad, ocasionando en muchos casos efectos tóxicos en el paciente, sin tomar en cuenta los efectos secundarios que conllevan estos tratamientos. Este hecho ha motivado la investigación y el empleo de productos naturales, ya sea como alternativa terapéutica para esta enfermedad o como complemento.

Producto de diferentes trabajos de investigación, el gel de *Aloe vera* ha sido propuesto como alternativa terapéutica en diferentes enfermedades entre ellas el cáncer. En particular se ha atribuido a los componentes que forman parte del gel de *Aloe vera*, propiedades inmunológicas anticancerígenas. Debido a que la composición de metabolitos secundarios de las plantas varía en función a la región geográfica y condiciones medioambientales en las que crece, es importante evaluar si el gel de *Aloe vera* obtenido de la comunidad de Cahuayuma del departamento de La Paz tiene el efecto inmunomodulador esperado.

OBJETIVO. Evaluar los cambios en los niveles de citocinas producidas por células murinas mononucleares de sangre periférica y tejido de pulmón, inducido a cáncer con benzopireno y tratadas con gel de *Aloe vera* obtenido de la comunidad de Cahuayuma, ya sea solo o en combinación con el fármaco anticancerígeno cisplatino.

METODOLOGÍA. Se conformaron 4 grupo de ratones inducidos a cáncer de tejido de pulmón por Benzopireno, el primer grupo fue el grupo control, ratones que no recibieron ningún tipo de tratamiento, el segundo grupo, ratones tratados con gel de *Aloe vera* 100 μ L (88 mg/Kg), el tercer grupo, ratones tratados con cisplatino 2 mg/Kg y el cuarto grupo, ratones con ambos tratamientos con las dosis antes descritas. Se aisló el ARN a partir de células sanguíneas y tejido de pulmón para evaluar los cambios en la expresión génica de las citocinas, se cuantifico su expresión genética con PCR en tiempo real empleando el método de $\Delta\Delta$ Ct y evidenciar la expresión y represión de los genes de las citocinas IL-4, IL-10, IFN- γ y TNF- α .

RESULTADOS. En células sanguíneas se logró evidenciar que el tratamiento con gel de *Aloe vera*, favorece la expresión de los genes de la IL-10, IFN- γ , TNF- α y reprime a la IL-4, el tratamiento con cisplatino, induce la expresión de la IL-10, y reprime a la IL-4, IFN- γ y TNF- α y el tratamiento combinado, estimula la expresión de IL-10 y IFN- γ y al mismo tiempo reprime la expresión de IL-4, TNF- α .

En tejido de pulmón de ratón se observó que el tratamiento con gel de *Aloe vera* favorece la expresión de IFN- γ y reprime la expresión de IL-4, TNF- α , el tratamiento con cisplatino induce expresión de IL-4, IFN- γ , TNF- α y el tratamiento combinado estimula la expresión de IFN- γ y reprime la expresión de IL-4, TNF- α .

CONCLUSIÓN. Los cambios en la expresión de genes de las citocinas en células de sangre periférica y en tejido de pulmón muestran que el tratamiento con gel de *Aloe vera* favorece la expresión de las citocinas relacionadas con la respuesta de tipo Th1 y el tratamiento combinado de gel de *Aloe vera*/cisplatino si bien favorece la respuesta de tipo Th1 disminuye los niveles de expresión de citocinas Th1 alcanzados cuando ambos compuestos estudiados se administran de manera independiente.

PALABRAS CLAVE. Gel de *Aloe vera*, cisplatino, PCR en tiempo real, gen control endógeno, transcripción inversa.

SUMMARY

Cancer is one of the diseases with the highest mortality rate worldwide and due to its complexity, the therapy used as chemotherapy, radiation therapy in most cases are not insufficient to control or cure the disease, causing many cases toxic effects on the patient, without taking into account the side effects of these treatments. This fact has motivated the research and use of natural products, either as a therapeutic alternative to this disease or as a complement.

As a result of different research work, *Aloe vera* gel has been proposed as a therapeutic alternative in different diseases including cancer. In particular it has been attributed to the components that are part of the *Aloe vera* gel, anticancer immune properties. Because the composition of secondary plant metabolites varies depending on the geographic region and environmental conditions in which it grows, it is important to evaluate whether the *Aloe vera* gel obtained from the Cahuayuma community in the La Paz department has expected immunomodulatory effect.

OBJECTIVE. Evaluate changes in cytokine levels produced by mononuclear maline cells of peripheral blood and lung tissue, induced to benzopyrene cancer and treated with *Aloe vera* gel obtained from the Cahuayuma community, either alone or in combination with the cisplatin anticancer drug.

METHODOLOGY. 4 groups of mice induced to lung tissue cancer by Benzopirene were formed, the first group was the control group, mice that did not receive any treatment, the second group, mice treated with *Aloe vera* gel 100 μ L (88 mg/kg), the third group, mice treated with cisplatin 2 mg/kg and the fourth group, mice with both treatments with the doses described above. RNA was allocated from blood cells and lung tissue to assess changes in the gene expression of cytokines, their genetic expression was quantified with real-time PCR using the $\Delta\Delta$ Ct method and evidence the expression and repression of genes of the cytokines IL-4, IL-10, IFN- γ and TNF- α .

RESULTS. In blood cells it was possible to show that treatment with *Aloe vera* gel, promotes the expression of the genes of IL-10, IFN- γ , TNF- α and represses IL-4, treatment with cisplatin, induces the expression of IL-10, and suppresses IL-4, IFN- γ and

TNF- α and treatment combined, it stimulates the expression of IL-10 and IFN- γ and at the same time suppresses the expression of IL-4, TNF- α .

In mouse lung tissue it was observed that treatment with Gel of *Aloe vera* promotes the expression of IFN- γ and suppresses the expression of IL-4, TNF- α , treatment with cisplatin induces expression of IL-4, IFN- γ , TNF- α and the combined treatment stimulates the expression of IFN- γ , and suppresses the expression of IL-4, TNF- α .

CONCLUSION. Changes in the expression of cytokines genes in peripheral blood cells and lung tissue show that Treatment with *Aloe vera* gel promotes the expression of cytokines related to Th1 response and combination treatment of *Aloe vera* gel/cisplatin although it favors th1-type response decreases Th1 cytokine expression levels achieved when both studied compounds are administered independently.

KEYWORDS. *Aloe vera* gel, cisplatin, real-time PCR, endogenous control gene, reverse transcription.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Organización Mundial de la Salud (OMS) el año 2016, informó que el cáncer ocupa el segundo lugar en el registro total de muertes reportadas, con una cifra de 9.0 millones y que, a su vez, esto representa el 22 % del total de las muertes a nivel mundial, detrás de las enfermedades cardiovasculares que ocupan el primer lugar con un 44 % de muertes. (World Health Statistics, 2018).

De la misma manera el cáncer ocupa el segundo lugar en casos de mortalidad en nuestro país, causa alrededor de 14 muertes por día, y esta cifra ha sido permanente en los últimos años (Ministerio de Salud, 2017). El promedio de la esperanza de vida en nuestro país es de 65 años, sin embargo, esta patología reduce esta cifra, debido a factores fisiológicos, que implican un conjunto de alteraciones y desequilibrios que inducirían la proliferación celular, la capacidad de evadir el mecanismo natural de control del ciclo celular, originando una acumulación de células cancerígenas con capacidad de invadir tejido y posterior mal funcionamiento tisular. (Cabrera M., 2012).

Esta enfermedad afecta a ambos sexos, se presenta a cualquier edad, no distingue entre condiciones sociales, ni de raza. (Ramírez C., 2012). Una de las razones que incrementa la tasa de mortalidad, es la falta de acceso al tratamiento, en particular a los fármacos anticancerígenos. Estos productos y/o terapias son de costo elevado y de alto nivel de toxicidad para el paciente, sin embargo, puede o no existir una respuesta positiva al tratamiento indicado. Los pacientes que padecen cáncer, sus familias y el entorno social que lo rodea, deben realizar diferentes esfuerzos y sacrificios para acceder a la medicación anti-cáncer específica. Los pacientes al no poder acceder a estos fármacos, abandonan el tratamiento durante las sesiones de radioterapia o quimioterapia, sus síntomas empeoran, el estado de salud se compromete aún más, lo que conlleva a su muerte.

El año 1999, la OMS dio a conocer la utilidad de muchas plantas y/o hierbas, en lo referente a Medicina Alternativa y Complementaria (MAC), para el tratamiento de muchas enfermedades, entre ellas el Cáncer. Para lo cual, las investigaciones sobre plantas de interés medicinal se incrementaron en los últimos años (Chaparro C. et al, 2011).

Esta información dispuesta por la OMS aumentó el interés en el estudio de diferentes plantas con presunta capacidad curativa, entre ellas el *Aloe vera*. Este trabajo de investigación forma parte del proyecto denominado: “Determinación de la actividad anticancerígena y efecto potencializador del *Aloe vera*”, que busca demostrar los beneficios sobre la salud, que brinda esta planta. En base a estos antecedentes, diversos estudios han demostrado que el gel de *Aloe vera*, puede utilizarse como una terapia alternativa en el tratamiento de cáncer y otras enfermedades de carácter inflamatorio. (Calderón, M. et al, 2011). No se conoce si el gel de *Aloe vera*, obtenido a partir de las plantas que crecen en la localidad de Cahuayuma ubicado a una altitud de 4016 metros sobre el nivel del mar, tienen el potencial anticancerígeno o inmunomodulador suficiente para inducir la producción de citocinas proinflamatorias “tipo Th1” como el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α), Interferón Gamma (IFN- γ) y disminuir o inhibir la producción de citocinas antiinflamatorias “tipo Th2” Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 10 (IL-10), con el conocimiento del tipo de citocinas que esta planta induce a producir, se podría inferir si tiene capacidad de incrementar o reprimir la actividad citotóxica contra células cancerígenas.

Por todo lo anteriormente mencionado, el presente trabajo de investigación pretende responder la siguiente pregunta de investigación: ¿El gel de *Aloe vera* obtenido de las plantas que crecen en la localidad de Cahuayuma será capaz de favorecer la expresión de citocinas de tipo Th1 y la represión o reducción de la expresión de síntesis de citocinas tipo Th2, en sangre y tejido obtenidos de tumores inducidos en animales de experimentación?

A. JUSTIFICACIÓN

El Registro Nacional del Cáncer, informo el año 2014 que en Bolivia existían alrededor de 3000 casos de cáncer en varones y de 4000 en mujeres, siendo los tipos de cáncer más frecuentes los de cáncer próstata, estómago y colorrectal en varones, y en mujeres el cáncer cervicouterino (OMS, 2014). La calidad de vida, los costos elevados de los quimioterapéuticos y las largas sesiones de radioterapia a las que se someten los pacientes, hacen que se reduzca la probabilidad de sobrevivir a esta enfermedad. De esta manera las personas que no cuentan con seguridad social o recursos económicos suficientes, incumplen el tratamiento o directamente lo abandonan, lo cual favorece el desarrollo progresivo del tumor e incrementa el riesgo de metástasis.

Por lo mencionado anteriormente y siguiendo las recomendaciones de la OMS es necesario realizar investigaciones sobre productos naturales que presenten alguna actividad curativa. El presente trabajo se ha propuesto evaluar el efecto antitumoral de productos de origen natural, como es el caso del *Aloe vera*, en particular el gel de *Aloe vera*, contenido en sus hojas.

Si bien en el campo de la MAC diferentes investigaciones han demostrado que el gel de *Aloe vera* posee propiedades antioxidantes y antitumorales entre otras. Es importante realizar estudios, en el campo de la inmunología para evaluar si evidentemente el gel de *Aloe vera*, particularmente el que obtiene de las plantas que crecen en la localidad de Cahuayuma, que por las condiciones de altitud y medioambiente en las que crecen (a su vez le brindaría una mayor composición de componentes orgánicos, inorgánicos y componentes bioactivos), tendrán la capacidad de modular el sistema inmune hacia una respuesta protectora contra el desarrollo del tumor, este tipo de respuestas puede ser inferido gracias al estudio de citocinas (López, T. 2004). Debiéndose evaluar la capacidad del gel de *Aloe vera* de inducir y/o reducir la producción de citocinas en células mononucleares de sangre periférica o tejido de pulmón, solo o en combinación con quimioterapia convencional, el cual será un elemento de juicio que nos permita establecer una asociación entre el éxito o fracaso del tratamiento anticancerígeno estudiado.

B. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar los cambios en los niveles de citocinas producidas por células murinas mononucleares de sangre periférica y en tejido de pulmón, inducido a cáncer con benzopireno y tratadas con gel de *Aloe vera* obtenido de la comunidad de Cahuayuma, ya sea solo o en combinación con el fármaco anticancerígeno cisplatino.

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer las condiciones óptimas del método de aislamiento de ARN de sangre de ratón para emplearse en la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la cuantificación de la expresión de genes de citocinas IL-4, IL-10, IFN- γ y TNF- α de origen murino.
- Cuantificar los niveles la expresión relativa de los niveles de citocinas proinflamatorias IFN- γ , TNF- α y citocinas antiinflamatorias IL-4, IL-10, por el método de cuantificación de Ct comparativa, en sangre periférica obtenida de ratones inducidos a cáncer por benzopireno y tratados con cisplatino, gel de *Aloe vera* o en combinación de ambos.
- Cuantificar los niveles la expresión relativa de los genes de citocinas proinflamatorias IFN- γ , TNF- α y citocinas antiinflamatorias IL-4, IL-10, por el método de cuantificación de Ct comparativa, en tejido de pulmón de ratones inducidos a cáncer por benzopireno y tratados con cisplatino, gel de *Aloe vera* o en combinación de ambos
- Comparar los niveles de expresión o represión de los genes de las citocinas en estudio en sangre periférica y en tejido de pulmón de los grupos de ratones en estudio.

II. MARCO REFERENCIAL

A. ANTECEDENTES GENERALES

1. EL CANCER UN PROBLEMA PREVALENTE EN LA SALUD MUNDIAL

El cáncer es considerado una de las principales causas de muerte en todo el mundo, según la OMS hasta el 2015, abarco 8.8 millones de muertes registradas, los principales países afectados son aquellos en los cuales la mayor parte de su población es de media y baja clase social, con recursos económicos limitados y una esperanza de vida menor a la de los demás países de la región, como es el caso de Bolivia. (OMS, 2014).

Bolivia hasta el año 2014, mostró una esperanza de vida en promedio de 68 años, con 65 años para varones y 70 en mujeres. (OMS, 2014). Una de las enfermedades que ha reducido considerablemente la esperanza de vida en nuestro país es el cáncer. Es una enfermedad multicausal, la OMS menciona que un 20% se debe a causas genéticas y el otro 80% a causas ambientales o del entorno de vida. Proponiéndose como principales factores de riesgo a cáncer en adultos: el consumo de tabaco, consumo de alcohol, obesidad entre otros. (OMS, 2015).

El cáncer causa un impacto económico muy fuerte en los países de bajo desarrollo económico y social, debido a la pobre implementación de políticas de prevención, vigilancia y medidas para el tratamiento de esta enfermedad. El año 2015, solo el 35 % de los países informó que contaban, con los servicios necesarios para atender esta enfermedad (OMS, 2015).

En el compendio sobre las Estrategias de la OMS sobre Medicina Tradicional 2014 – 2023, se señala el limitado acceso a la medicina convencional por parte de los habitantes de países con bajo desarrollo, sin embargo, la medicina tradicional y herbolaria se encuentra al alcance de los habitantes de dichos países como una medida curativa para distintas enfermedades. (OMS, 2014)

Unlu el año 2016, publica una revisión sistemática sobre los diferentes usos del *Aloe vera*, en medicina cosmética y como producto medicinal alternativo. Además, en ella menciona que posee una actividad anticancerígena, a través de una actividad inmunomoduladora,

producida por los componentes bioactivos que posee la planta, más específicamente el gel contenido al interior de las hojas, el acemanano, antraquinonas y antracenos, serían los encargados de proporcionar la actividad antiproliferativa. (Unlu, A. et al, 2016)

El año 2013, Pan et al, evidencian que la Aloína obtenida del *Aloe vera*, tenía la capacidad de inhibir la producción del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), inhibiendo de esta manera la angiogénesis, proceso fisiológico presente en el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos alrededor del tumor. (Pan, Q. et al, 2013).

Kumar et al, demostraron el potencial inmunomodulador del gel de *Aloe vera*, debido a que este incrementa la expresión del TNF- α y de la IL-1, las cuales son capaces de aumentar la circulación de linfocitos en el microentorno del tumor. (Kumar et al, 2015). El año 2016 Arango M. et al, indicaron que la infiltración de linfocitos en el entorno tumoral es un marcador óptimo de la efectividad de la quimioterapia empleada (Arango M. et al, 2016).

III. MARCO TEORICO

A. GENERALIDADES DEL CÁNCER

1. DEFINICIÓN DEL CÁNCER

La OMS asume al Cáncer como: " «Cáncer» término genérico que se aplica a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias malignas». " (OMS, 2017)

El término cáncer proviene del término griego *καρκίνου* (*karkinos* = cangrejo), que hace referencia a la capacidad de invadir con nuevas venas alrededor del tumor, como las patas del cangrejo. (Castillo J., 2012). El cáncer consiste en la multiplicación rápida e incontrolada de células anormales que se puede originar por la exposición a agentes cancerígenos ya sean de origen químico, físico o biológico, o simplemente por predisposición genética (ACS, 2016). Esta proliferación puede diseminarse a otros órganos sobrepasando sus límites y transportarse por la sangre o la linfa, a través de un proceso llamado metástasis, esta constituye la principal razón de muerte por cáncer (Herrera, 2013).

Una de las características importantes de esta enfermedad, es la capacidad de diseminar el tejido canceroso sin presentar los síntomas evidentes para un tratamiento oportuno, en la mayoría de los casos suele no presentar síntomas sino hasta la fase crónica de la enfermedad donde es más difícil emplear un tratamiento efectivo. Castillo J., el año 2012, hace referencia a que una vez que se encuentra una nueva entidad patológica en el organismo, lo más lógico es buscar y detectar al agente causal, con la finalidad de prevenir el nuevo contacto del agente causal con un nuevo paciente. (Castillo J. 2012).

En el desarrollo y crecimiento normal del cuerpo humano, debe existir una relación de equilibrio entre la generación y eliminación, proliferación y muerte de todas las células. (Arias I., 2011) Además las mismas células tienen mecanismos de control, que regulan el crecimiento y proliferación de manera controlada, estos mecanismos de control se encargan de eliminar células defectuosas y/o dañadas (Aguilera et al, 2013). Sin embargo, cuando estos mecanismos sufren un trastorno, estas evidentemente permitirán una proliferación descontrolada de las células, capaces de crecer independientes de los factores de crecimiento e incapacidad de diferenciación celular. (Flood J., 2006). Incluso estas

células adquieren la libertad de anclaje de una superficie sólida, lo que les permite poder movilizarse, con la posibilidad de invadir otros tejidos y ocasionando finalmente la metástasis. (Sánchez C., 2013).

Se identificaron como factores de riesgo, aquellos que comúnmente no están vinculados de manera directa con la aparición del cáncer, estos factores podrían ser, la exposición a agentes biológicos: virus (ej. VPH; Virus del Papiloma Humano), bacterias (ej. *Helicobacter pylori*); la exposición a sustancias químicas de uso laboral o de consumo (ej., tabaco, alcohol); radiaciones (ej. luz UV, rayos X o tan solo la exposición al sol), alteraciones en el equilibrio nutricional (ej. la alta ingesta de grasas saturadas, excesos en sustancias proteicas de consumo humano, productos industrializados como la comida rápida); enfermedades de transmisión sexual, predisposición genética, contactos con sustancias nocivas, tóxicas, mutagénicas e incluso la contaminación atmosféricas (OMS, 2015) (Sanz B. et al 2014).

El inicio para la formación de la célula cancerígena, se da por mutaciones repetitivas en su ADN, varias veces y en varios genes. (Martin de Civetta M., et al 2011). La acumulación de estos cambios, en la estructura normal del ADN, hacen que la célula pueda evadir mecanismos de control, eludiendo señales apoptóticas que a su vez les permite generar sus propias señales mitogénicas, adquiriendo la capacidad de dividirse aceleradamente, generando de esta manera descendencia con las mismas mutaciones, convirtiéndose en clones de la primera célula alterada. (Sánchez C. 2013) (Pérez, I. 2010).

Las células cancerígenas tendrían la capacidad de producir señales de crecimiento propias y la generación espontánea de clones, hace que estas células puedan inducir cambios en las células vecinas alterando completamente el microambiente natural celular. (Martin de Civetta M., et al 2011)

La mayoría de los tumores no son de carácter heredable, pero es importante saber si el paciente tiene un familiar directo que padeció esta enfermedad, este aspecto se convertiría en un factor de susceptibilidad a padecer cáncer. De ser así, el paciente debe someterse a continuas revisiones médicas para la detección temprana en fases iniciales. (Aguilera et al, 2013).

2. TIPOS DE CÁNCER

Según el Instituto Nacional del Cáncer (2015), y por el tipo de células que forman ese tejido, estos son los principales tipos:

Carcinomas. Este tipo de cáncer se origina en las células epiteliales, que se encuentran recubriendo todas las superficies del organismo, como también, revistiendo los órganos huecos, glándulas, la piel y mucosas. (INC, 2015)

Sarcomas. Es aquel tipo de cáncer que se origina en el tejido de conexión y sostén en el cuerpo, denominado como tejido mesenquimatoso. Las células de este tipo de cáncer se pueden ubicar en casi cualquier parte del cuerpo, incluyendo adipocitos, articulaciones, vasos sanguíneos o hasta huesos. (Albin R., 2012)

Linfomas. Tipo de cáncer se origina a partir de las células de la línea linfoide, más específicamente a los linfocitos T, linfocitos B y en alguno de los casos a las células Natural Killer. Debido a que estas células pertenecen al sistema inmune, estas tienen la capacidad de ubicarse en cualquier lugar del tejido linfoide, siendo más comunes los linfomas de Linfocitos B. (Murrieta, H. et al., 2009).

Leucemias. Este tipo de cáncer es denominado cáncer de los glóbulos blancos, por una proliferación clonal de los mismos que inicialmente se origina en la médula ósea, existiendo la probabilidad de dirigirse a sangre, linfa, bazo, hígado y otros órganos. (Ruiz, L., 2013)

Mieloma. Este tipo de tumores se presenta en las células plasmáticas, glóbulos blancos encargados de producir anticuerpos, se caracteriza por la producción continua y en grandes proporciones de anticuerpos o componentes monoclonales, que se pueden detectar en el suero y/o orina (Aguilera et al, 2013).

a. Cáncer de pulmón

Conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación y multiplicación descontrolada de las células del tracto respiratorio, que se pueden originar independientemente ya sea del bronquio, de las células parenquimatosas o tan solo de la pleura, se denomina como cáncer de pulmón. (Estrada G., 2017).

Debido a que la enfermedad no presenta síntomas específicos, es muy difícil diagnosticarla en estadios tempranos de desarrollo de la misma, de esta manera se hace más énfasis en la prevención y específicamente en políticas destinadas a evitar el consumo de tabaco, el cual ha sido identificado como principal responsable del desarrollo de esta enfermedad. (Amorin E., 2013). Sin embargo, además del tabaco existen otras moléculas carcinogénicas suspendidas en el ambiente, que provocarían alteraciones en el genoma de las células, alterando genes implicados en la producción de enzimas encargadas de degradar carcinógenos o alterando mecanismos de control y reparación en el ADN. (Iniesta P., 2007).

b. Mecanismo molecular del cáncer de pulmón

En el inicio de la enfermedad, se presentan una serie de eventos a nivel molecular como ser: la exposición a los carcinógenos externos como ser la nicotina, alquitrán pueden ocasionar variaciones en la secuencia de ADN genómico, mutaciones que alterarían la expresión de genes normales, promoviendo a la proliferación clonal con evasión de los mecanismos de control. (Nooshinfar E. et al, 2017). La alteración en genes responsables de la integridad del ADN como la p53, expresión de la telomerasa no considerada oncogénica, sino que permite una mayor probabilidad de división celular acumulando mutaciones que favorecen el proceso tumoral. (Fig. 1) (Iniesta P., 2007).

Uno de los genes alterados en esta enfermedad, es el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el cual es importante en procesos celulares de gran importancia como el crecimiento, proliferación y apoptosis. (Taus A., et al 2010). Una mutación en el gen del EGFR hace que las células cancerosas sean independientes de señales de supervivencia que expresan otros genes, generando de esta manera receptores propios en la membrana como: a) receptores de señales bioquímicas como la p53 que le permitirían evadir el mecanismo de apoptosis natural, b) receptores para las señales del factor de crecimiento beta transformante TGF- β ligado a la formación del tumor y c) alteración en los genes reparadores del ADN lo que permite que se sigan produciendo alteraciones una tras otra. (Amorin E., 2013).

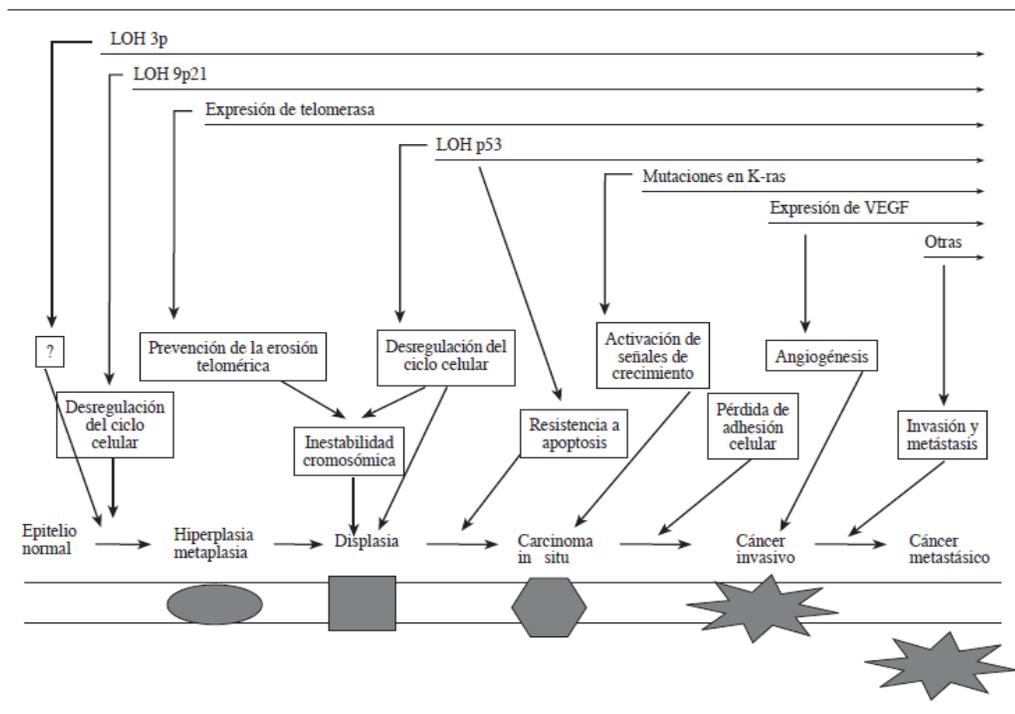


Figura 1. Esquema de la progresión del cáncer de pulmón. Las modificaciones que se producen en el ADN pueden llevar a la ganancia o pérdida de secuencias, que pueden ocasionar evasión a los puntos de control del ciclo celular y a la proliferación del epitelio pulmonar. LOH: pérdida del heterocigoto, VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial (Iniesta P., 2007).

B. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

Durante el estudio publicado por Roser & Ritchie (2015), hasta el año 2016, se estimó que más de 8 millones de personas, que padecerían algún tipo de cáncer, pasarían a ser muertes confirmadas como producto de la complicación de esta enfermedad. (Roser et al., 2015). Esto posiciona al cáncer como la segunda causa de muerte a nivel mundial.

Hasta el año 2016, se estimó que aproximadamente 40 millones de personas padecían cáncer de cualquier tipo. Según el Our World In Data (2018) de estos 40 millones, algo más de 8 millones de casos están reportados como cáncer de mama, 6,3 millones como cáncer de recto y colon, 5,7 millones como cáncer de próstata y con una menor tasa de incidencia se encuentran el cáncer de tráquea, bronquios, pulmón y de estómago con 2,8 y 2,3 millones respectivamente. (Roser et al., 2015).

1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER EN AMERICA LATINA

Según Carioli et al, durante un estudio sobre el número de muertes a causa del cáncer, se reportó que la incidencia de muertes en países latinoamericanos como ser en Argentina se reportaron aproximadamente 120000 muertes (88000 en varones y 44000 en mujeres, en Chile 63000 muertes (16000 en varones y 47000 en mujeres), Colombia 31000 muertes en varones y 52000 en mujeres, México 39000 en varones y 79000 en mujeres y en Venezuela solo se obtuvo reportes de 26000 muertes en mujeres. (Carioli et al, 2017).

En el mismo contexto, se evidenció que la mayor incidencia de cáncer en varones, se presenta como cáncer de pulmón, seguido por el cáncer de estómago y una menor tendencia por el cáncer colorrectal y de próstata. Por otro lado, la mayor incidencia en mujeres, está en pacientes que padecen cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón y una menor incidencia en cáncer de mama y útero. (Carioli et al, 2017).

2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER EN BOLIVIA

La OMS el año 2016, reveló los datos de 48 centros especializados en cáncer en Sud América, donde se pudo observar que los tipos de cáncer más diagnosticados son cáncer de próstata, pulmón, mama, cuello cérvico uterino y estómago. Este mismo informe hace conocer que en Bolivia y el país vecino Perú, existe una prevalencia mayor de cáncer de estómago y de cuello cérvico uterino. (OMS, International Agency for Research on Cancer, 2016).

Existen factores de riesgo que predisponen a padecer de esta enfermedad, entre estas se encuentran las de riesgo laboral como la exposición a metales como el mercurio y arsénico, que ocasionan cáncer de vejiga, hígado y pulmón. Según Pavilonis et al, (2016) 1,3 de cada 100 personas padecían de alguno de los tipos de cáncer antes mencionados, causados por la exposición a metales pesados como arsénico y mercurio proveniente de las labores mineras en los andes de Bolivia. (Pavilonis B. et al, 2017).

El año 2017, Surriabre et al, reportaron que Bolivia tiene la mayor tasa de incidencia en Latinoamérica, de 100 mujeres 39,5 que padecen cáncer cérvico uterino, con una tasa de mortalidad de 16,5 de cada 100 mujeres, esto se debe mayormente a las condiciones de vida en las que viven muchas familias. (Surriabre P. et al, 2017).

El Ministerio de Salud, señaló que el año 2017 existía una incidencia en mujeres de 351,53 por cada 100.000 y de 183,80 varones por cada 100.000 que padecían la enfermedad. La distribución por departamentos fue de la siguiente manera: en pacientes del sexo masculino en La Paz (1881), Santa Cruz (1735) y Cochabamba (1102) son los 3 departamentos con tasas elevadas de nuevos casos de pacientes diagnosticados con Cáncer seguidos por Potosí (488), Chuquisaca (471), Oruro (409), Tarija (348), Beni (267) y Pando (78). Por otro lado, del sexo femenino los departamentos con mayores tasas son: Santa Cruz (3975), La Paz (3905), Cochabamba (2512) y Potosí (1103), seguidos por Chuquisaca (881), Tarija (787), Oruro (705), Beni (576) y Pando (187). (Ministerio de Salud, Programa Nacional de Lucha contra el Cáncer, 2017).

C. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

El cáncer es ocasionado por un daño a nivel del ADN, que lleva a una función anormal de las células y de los genes responsables del control de la división celular de las mismas. (Merino C., 1995). Los eventos identificados como responsables de la transformación de una célula normal a una célula cancerosa a nivel molecular son:

1. ACTIVACIÓN DE ONCOGENES E INACTIVACIÓN DE GENES SUPRESORES DE TUMOR

Los proto-oncogenes, son genes que se encuentran de manera normal en las células, cumplen funciones necesarias para el desarrollo, crecimiento, proliferación y supervivencia celular. Sin embargo, estas sufren mutaciones en su secuencia, que generan una proteína con funciones alteradas que estimulan la proliferación de células tumorales, adquiriendo la capacidad de invadir en el tejido cercano. (Bando C. et al, 2011).

Por otro lado, si existe el estímulo suficiente para que las células sigan proliferando, existen también los genes supresores de tumor, encargados de producir moléculas capaces de detener el ciclo celular, proporcionando el tiempo necesario para la reparación del daño. (Jiménez A., 2011). Sin embargo, una alteración en estos genes supresores ocasionará un desequilibrio en la producción de moléculas responsables de la detención del ciclo celular, a esto se aumenta la evasión de la apoptosis, adquiriendo una resistencia

al sistema inmune, acelerando el metabolismo energético y proporcionando el medio suficiente para inducir a la angiogénesis. (Vera L., 2014).

2. ACUMULACIÓN DE MUTACIONES SOBRE EL GENOMA

Es probable que una sola mutación en el genoma no sea lo suficiente para convertir una célula normal en una célula cancerosa, al contrario, la acumulación de mutaciones no solo se daría un gen mutado sino implicaría la mutación de varios genes implicados en el metabolismo y desarrollo normal de la célula. (Arredondo E., 2011).

Estas acumulaciones sucesivas y constantes durante el desarrollo del cáncer hacen que la célula pierda la funcionalidad completa, incrementa el consumo de energía metabólica y comienza a afectar el funcionamiento normal de los tejidos vecinos. (Balzano L. & Diez N., 2010).

Las mutaciones que sufre el ADN, a veces ocasionan que se pierda un pequeño segmento de la proteína sintetizada que no afectaría su funcionalismo como tal. Sin embargo, las mutaciones con gran pérdida de segmentos de ADN o deleciones en el cromosoma, provoca inestabilidad en las moléculas sintetizadas perdiendo estabilidad molecular y funcional. (Ferbeyre L. & Salinas J., 2005).

3. PREDISPOSICIÓN HEREDITARIA AL CÁNCER

Otro evento responsable de la aparición de esta enfermedad, es la predisposición genética a padecer de la misma. La alta incidencia familiar, existe ya que familiares que padecieron por esta patología, hacen que el paciente posea una alta probabilidad de presentar los síntomas y signos de la enfermedad. De la misma manera, la aparición de varios tipos de cáncer en una misma generación familiar, puede deberse a la presencia del gen responsable en una generación anterior. (Bando H. et al, 2011).

Existe dos tipos de predisposición genética a esta enfermedad como ser: a) la predisposición hereditaria, que sigue una secuencia de herencia mendeliana y b) por agregación, que por el contrario en este caso no se puede determinar el patrón específico de aparición del tipo de cáncer. (Valdespino V. & Valdespino V., 2015). Además, se ha determinado que polimorfismos de simple nucleótido (SNP), pueden incrementar la

probabilidad de adquirir la enfermedad por una predisposición genética o por el otro lado ser un factor protector para no padecer la enfermedad. (Rahman N., 2014).

4. INESTABILIDAD GENETICA

La inestabilidad genética se ha convertido en un evento indispensable para la formación del tumor, pero entre cada tumor la presentación de la inestabilidad es diferente. (Pérez R. et al, 2017). Las diversas mutaciones que dan origen a la inestabilidad genómica sirven como un proceso de progresión y desarrollo del tumor, a partir de esto se origina diferentes procesos biológicos como, el inicio de una respuesta inflamatoria, para contener las elevadas exigencias en cuanto a materia y energía da lugar a un reprogramación o reconfiguración del metabolismo para mantener la división celular acelerada y por último la evasión del sistema inmune, impidiendo su reconocimiento como extrañas. (Hernández R., 2016).

El ADN sufre alrededor de 100000 cambios por día, que pueden deberse a cambios espontáneos debido a procesos biológicos básicos, errores cometidos durante la reparación, replicación y recombinación, o cambios inducidos por agentes externos ambientales ya sean físicos, químicos o biológicos. Sin embargo, este número de modificaciones serian incompatibles para mantener la vida, pero que con los procesos de reparación y control normales se eliminan el mayor porcentaje de errores producidos. (López A., 2003).

Existen dos tipos de inestabilidad genómica una a nivel cromosómico, como ser las traslocaciones, deleciones o inversiones, y otras a nivel del ADN, como son las mutaciones puntuales, inserciones de microsátélites. La aparición de un tipo de inestabilidad o ambos pueden factores importantes para el desarrollo de cáncer de diferentes tipos. (Alazzouzi H., 2006).

5. CAMBIOS EPIGENÉTICOS

Por último, entre los eventos responsables que favorecen el desarrollo de esta enfermedad, se encuentran los cambios epigenéticos, se denominan así por cambios o modificaciones en el reordenamiento de la cromatina de células normales, que, si bien no produce cambios la secuencia del ADN, puede favorecer la expresión o represión de genes. (Tume L.,

2014). Estos cambios epigenéticos están relacionados con el silenciamiento de genes supresores de tumor, la activación de oncogenes, la modificación de la estructura de las histonas y la metilación del ADN, procesos que probablemente no sean reversibles (Lambert M. & Herceg Z., 2008).

Son tres los mecanismos relacionados con el desequilibrio en el epigenoma que inducen la transformación de una célula normal a una cancerosa. Estos son: A) la hipermetilación de los promotores de los genes supresores de tumor, sucede de manera aleatoria que cambie la conformación de proteínas responsables del control de supervivencia y proliferación. (McCabe M. et al, 2009). B) Sobreexpresión de las histonas des-acetiladas, que puede ser la causa de la metilación de otros genes, silenciando su actividad y promueve un incremento en la división celular, proceso completamente irreversible y C). Alteración en el remodelamiento de la cromatina, esta modifica la estructura compacta de la cromatina, permitiendo la metilación de genes y la modificación en las histonas. (Valdespino V. & Valdespino V., 2015).

D. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad multifactorial, en muchos casos se ha observado que se origina a través de factores endógenos que tienen como base los cambios a nivel genético, como también los factores exógenos conocidos como factores ambientales (Ferris et al, 2004). Sin embargo, varios investigadores los clasifican en 3 grandes grupos de factores:

1. FACTORES BIOLÓGICOS

Dentro de este grupo de factores, se encuentra la predisposición a las infecciones recurrentes con parásitos, bacterias y virus. (Velázquez et al., 2011). El mecanismo de infección se da de manera distinta en microorganismos, los parásitos y bacterias promueven una inflamación crónica, estimulando la proliferación y causando daño a nivel de ADN y proteínas de membrana. Los virus, se encargarían de insertar oncogenes no activos, inhibiendo genes supresores de tumor y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana tiene la característica de alterar la respuesta citotóxica normal, promoviendo la producción de antagonistas naturales. (Dalton L., & Kellam P. 2009).

2. FACTORES FÍSICOS

La exposición a la luz solar, compuesta por los 3 espectros de luz (ultravioleta, visible e infrarroja), de los cuales un alto porcentaje de estas radiaciones, sufren modificaciones durante su ingreso en la atmosfera. Un mínimo porcentaje de estas radiaciones (como la luz UV) que ingresa de la atmosfera, puede ocasionar mutaciones en el ADN, produciendo errores en el mecanismo de apoptosis normal y estimulación de la proliferación de clones. (Cabrera C. & Lopez M. 2006).

3. FACTORES QUÍMICOS

Aquellos componentes químicos cancerígenos, son aquellos que pueden causar alteraciones en el genoma humano, ocasionando la producción de tumores dentro del organismo, ya sea por inhalación o contacto. (Martínez L. 2001). La exposición a estos compuestos en las fuentes laborales debería ser controlada, por ejemplo, el formaldehído de uso en universidades y hospitales, como desinfectante, en las industrias farmacéuticas, para su producción. El año 2014, Idrobo E., reportó que la exposición al formaldehído causa entrecruzamiento de proteínas del ADN humano (debido a la oxidación de las cadenas laterales los aminoácidos, que conlleva a una oxidación del ADN ocasionando la ruptura de sus cadenas), evidenciando la presencia de tumores pequeños en el epitelio nasal por inhalación. (Idrobo E., et al, 2014; Alessio H. et al, 2006). Incluso el año 2009 Zuluaga et al., reveló que la exposición a componentes atmosféricos que podrían ser mutagénicos y carcinogénicos, como es el caso de los contaminantes industriales, moléculas de las emisiones vehiculares, residuos de petróleo y los hidrocarburos policíclicos (HPA), como es el caso del Benzo(a)pireno. (Zuluaga et al., 2009).

4. OTROS FACTORES ESTUDIADOS

Se ha observado que no solo los componentes antes mencionados son los principales factores predisponentes para padecer esta enfermedad. El consumo de alcohol se posesiona como la droga más consumida a nivel mundial (OMS, 2015), esta tendría la capacidad de disminuir las concentraciones de folato en el organismo, a esto se suma su capacidad de bloquear la adenosilmetionina, importante componente en la síntesis de ADN, incrementando el riesgo de padecer cáncer. (Gonzales R., 2011). Por otra parte, el

consumo de tabaco, de parte de los fumadores pasivos y activos, es un factor más asociado a padecer cáncer debido a que al inhalar el humo del cigarrillo se liberan, más de 4000 sustancias altamente nocivas, entre ellas la nicotina y el alquitrán, además de la gran cantidad de monóxido de carbono al cual se exponen las células pulmonares, alterando su material genético incrementando la probabilidad de convertirse en células cancerígenas. (De vito E., et al 2005).

Sin embargo, no solo el consumo de drogas es predisponente a padecer cáncer, la ingesta elevada de grasas saturadas y colesterol, incrementan la cantidad de lípidos en los intestinos, activando especies reactivas de oxígeno y liberando mutágenos en el medio como el 13-hidroxiocetadecadienoico (13-HODE) alterando el metabolismo de las células alrededor promoviendo proliferación. También se ha observado que algunos fármacos están asociados con la generación de células cancerosas, alterando el material genético, siendo este su principal mecanismo de acción. (James V. et al., 2011).

E. TRATAMIENTO PARA EL CÁNCER

1. TRATAMIENTO CONVENCIONAL

Para iniciar un tratamiento adecuado se debe tomar en cuenta el estado funcional, la edad y el tipo de cáncer que padece el paciente. De esta manera la cirugía es considerada como la más efectiva, pero también la radioterapia es una media adecuada. Sin embargo, la medida menos indicada es la quimioterapia por su alta toxicidad. (Cajaraville G., et al 2005).

a. Cirugía

El tratamiento más antiguo he indicado hasta la actualidad ha sido la cirugía, que se aplica en tumores sólidos, evitando así la metástasis. La cirugía, tiene el papel de reducir la masa tumoral, alivia los dolores ocasionados por obstrucción ocasionada por los tumores y esta se integraría con otros tratamientos alternativos, para una rehabilitación favorable. (Cajaraville G., et al 2005).

b. Radioterapia

La radioterapia se entiende como la aplicación de energía ionizante, mediante rayos X o gamma al sitio donde se ubica el tumor. Sin embargo, este tipo de energía podría generar

radicales libres que ocasionan la ruptura del ADN, produciéndose la apoptosis celular, ya sea en células tumorales o células normales, de esta manera el éxito o fracaso de este tratamiento depende mucho de la ubicación del tumor. (Flood J., 2006).

c. Quimioterapia

La quimioterapia ha demostrado tener un efecto positivo y favorable en un número mínimo de tumores, esta terapia utiliza agentes citostáticos que impiden la proliferación y multiplicación celular, ocasionando aductos en el ADN impidiendo su mecanismo de síntesis natural. En la actualidad la mayoría de los componentes aislados tienen origen vegetal (Ej. Los taxanos que son aislados de la corteza de la *Taxus brevifolia*, en la actualidad los más empleados son el Paclitaxel y Docetaxel, estos no permiten la unión de los microtúbulos en la mitosis, que conducen a la detención de la división celular), para lo cual resalta la importancia de continuar con las investigaciones sobre plantas con efecto antitumoral y antiproliferativo. (Llopart N., 2007)

d. Inmunoterapia

La inmunoterapia se basa en la estimulación del sistema inmunológico haciendo más eficiente el reconocimiento y la destrucción del sistema inmune sobre las células cancerosas y controlar los mecanismos de evasión para una respuesta antitumoral positiva. (Arredondo E., 2011).

Este tipo de terapia se divide en dos

i. Inmunoterapia No Específica

Derivadas o sintetizadas por patógenos. Se trata de la administración de agentes derivados de bacterias para generar una respuesta inmune específica de carácter inflamatorio frente a las células tumorales. Como ejemplo tenemos al Bacilo Calmette-Guérin que estimula la liberación de citocinas proinflamatorias IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF – α , IFN- γ y Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos-Monocitos (GM-CSF), además de incrementar el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos. (Compte M., 2011)

ii. Inmunoterapia Específica

Esta se subdivide en pasiva y activa

Pasiva. Consiste en la administración de anticuerpos monoclonales contra los antígenos de superficie de las células tumorales o en células implicadas en el proceso angiogénico.

Activa. Esta terapia se basa en estimular al sistema inmune del enfermo, esto implica la vacunación con lisados de células tumorales o con las células como tal, vacunas de células dendríticas, ADN recombinante, moléculas pequeñas como péptidos y proteínas. Estas vacunas hacen que el sistema inmune reconozca a las células tumorales eliminándolas. (Segura M. et al, 2015).

e. Últimos avances en el tratamiento contra el cáncer

Entre los últimos alcances terapéuticos tenemos a los inhibidores de la dinámica de los microtúbulos, su mecanismo de acción se ejerce sobre el ciclo celular, estas moléculas se unen a la β -tubulina, inhibiendo su polimerización, es así que impide la alineación de las cromátidas para su posterior separación, bloqueando el ciclo provocando la apoptosis de las células tumorales. (Zamora P., 2018)

Los inhibidores de las proteínas cinasas, se encuentran entre otras alternativas para el cáncer, estas bloquean vías de señalización sobre los receptores de presentes en células cancerosas como el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) o el Receptor Beta del Factor de Crecimiento Derivados de Plaquetas (PDFGR β), presentes tanto en células cancerosas y en células endoteliales de los vasos sanguíneos inhibiendo así también el proceso angiogénico. (Armengol C. et al, 2017; Fron C. et al, 2018)

La ruta PD/PD-L1, es un bloqueo en la activación de los ligandos PD y PD ligando 1, esta conexión es propia de las células cancerosas para evadir el reconocimiento por las células T, una vez bloqueado este ligando las células T pueden destruir a las células anormales. (Bustos C., 2018)

El antígeno receptor quimérico de células T o CAR T, es una terapia basada en ingeniería genética orientada a modificar genéticamente a los linfocitos T y generar clones, que tengan la capacidad de reconocer receptores quiméricos transgénicos en células comprometidas a un proceso cancerígeno. (Hernández D. et al, 2018)

Dentro de la viroterapia oncolítica ya aprobada se encuentra el Virus Oncolítico Herpes Simple Tipo 1 (HVS-1), es un virus modificado genéticamente que se inyecta directamente al tumor infectando y posteriormente destruyendo a la célula cancerígena, la liberación del Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos-Granulocitos, recluta a células presentadoras de antígeno APC al sitio del tumor para efectuar el reconocimiento de las células cancerosas por células T, en el sitio y células que hayan migrado fuera del entorno tumoral. (Johnson D. et al, 2015; Morales F. 2018).

Dentro de las perspectivas futuras se tiene al Sistema de Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas Regularmente Espaciadas (CRISPR) asociados a la endonucleasa Cas, es una debido a la capacidad propia de este sistema de insertar o eliminar secuencias del ADN. Se ha descubierto que podría inducir una reparación del ADN o inducir a la eliminación de secuencias participes en la proliferación celular, en tipos de cáncer como el colorrectal, páncreas, hígado y cáncer de pulmón. (Callejas M. et al, 2018)

2. TRATAMIENTO ALTERNATIVO

La medicina tradicional o alternativa fue considerada como una opción para el tratamiento de diversas enfermedades desde 1976, año en el cual la OMS promueve la aplicación de productos de origen natural característicos de cada país (Quintero C., 2015) Los productos naturales han demostrado tener efectos benéficos sobre la salud humana, en especial sobre de enfermedades de características agresivas, como es el caso del cáncer. (González A., 2011). Además, la medicina tradicional propia de cada región permite a través de varios estudios e investigaciones, comprobar que evidentemente causen una menor toxicidad e incrementen la probabilidad de contrarrestar la enfermedad y desarrollo de la misma. (Ramírez C., 2012)

F. ANTECEDENTES DEL USO DEL *Aloe vera* COMO MEDICINA ALTERNATIVA CONTRA EL CÁNCER

1. GENERALIDADES

Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller), es una planta que pertenece a la familia de las Liliáceas, crece en ambientes tropicales y/o subtropicales y hasta la fecha ha demostrado tener alrededor de 75 componentes activos que posiblemente tengan propiedades curativas

y/o alimenticias. (Hussain A., et al 2015). Entre las propiedades benéficas para la salud como un cicatrizante efectivo, efecto hipoglicemiante, antifúngico, antibacteriano, antiviral, un efecto antiinflamatorio, antitumoral a parte de la propiedad inmunomoduladora, y un efecto gastroprotector. (Bonilla M. et al, 2016).



Imagen 1. Fotografía de la planta del *Aloe vera*, perteneciente a la familia *Liliaceae*, ahora *Asphodelaceae*. (Vila R., et al 2001).

2. ESTRUCTURA DE LA PLANTA

La planta está formada por múltiples hojas en forma de racimo con un tallo corto a nivel del suelo. Las hojas están compuestas por dos componentes importantes como, una corteza delgada que representa alrededor del 25 % de la planta y el otro 75 % está representado

por el gel, que se encuentra al interior de la misma. Esta última tiene características gelatinosas transparente que supondría que le daría las propiedades curativas a la planta. (Moreno J., 2014).

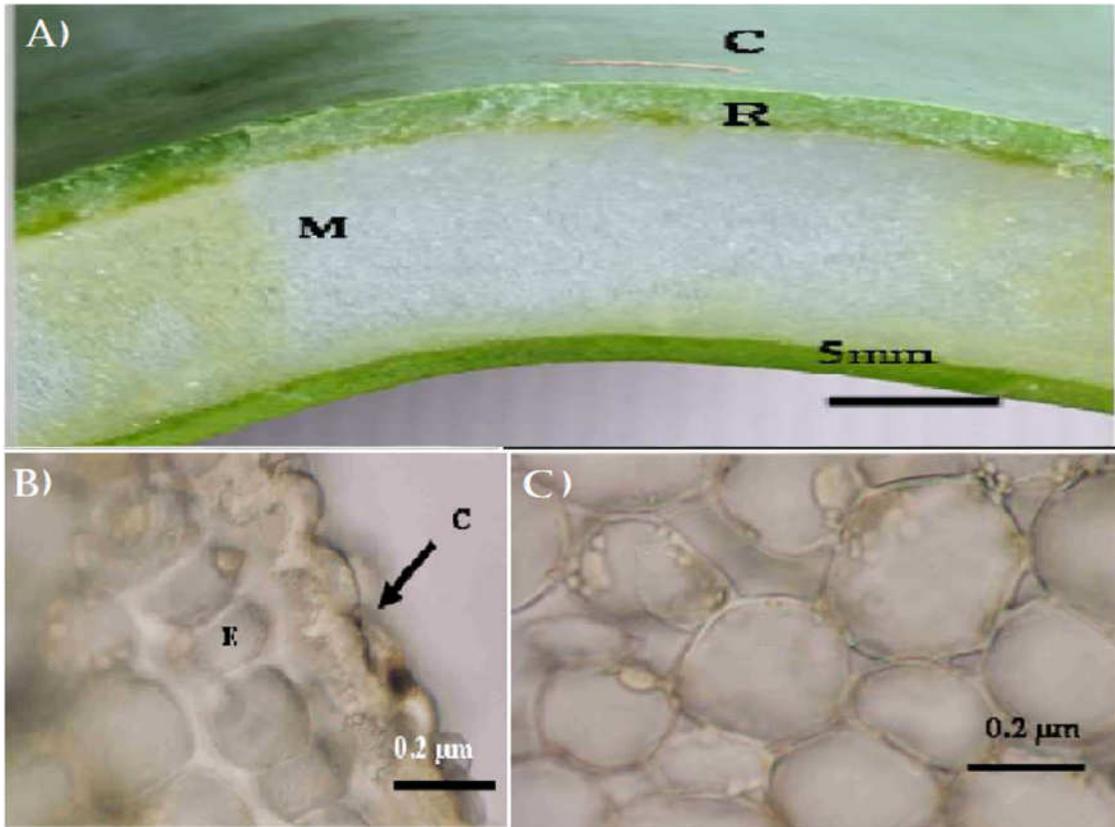


Imagen 2. Fotografía microscópica de la planta de *Aloe vera* A) Corte transversal de la hoja de *Aloe vera*, donde M, representa el mesófilo compuesto de materiales orgánicos y fluidos foliares R, es la corteza compuesta de varias células con alto contenido de cloroplastos y C, es la cutícula que reviste a la hoja en su totalidad. B) y C) Imágenes microscópicas del corte transversal de la hoja de *Aloe vera*, donde se puede apreciar la cutícula que se forma y E muestra la epidermis formada por células flexibles y resistentes. (Navarro D., 2013)

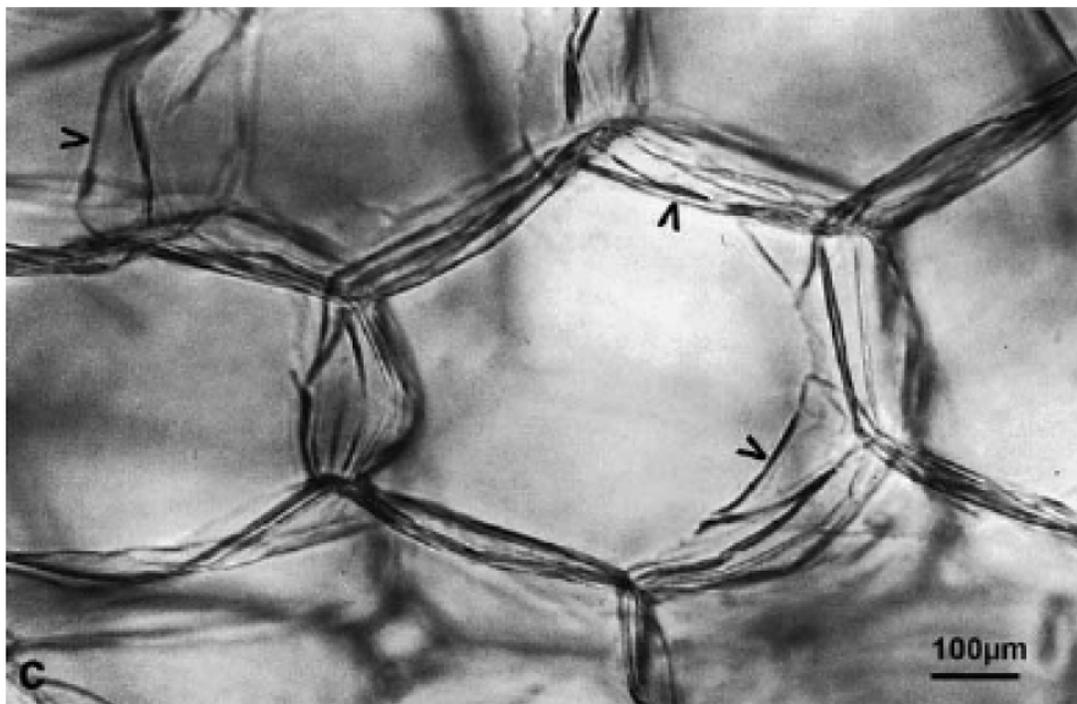


Imagen 3. Vista microscópica del corte transversal de la hoja del *Aloe vera*, donde se puede apreciar las paredes celulares que componen el mesófilo de la hoja. (Navarro D., 2013).

3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GEL DE *Aloe vera*

La planta está compuesta por una diversidad de componentes químicos mismos que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Compuestos químicos que forman parte constituyente del gel de *Aloe vera*. (Caubin R., et al 2012; Bayati J. & Moradi N., 2014)

LIGNINA

SAPONINAS

ANTRAQUINONAS

Aloína, Isobarbaloína, Antraceno, Acido cinámico, Emodina, Emodina de aloe, Estero de ácido cinámico, barbaloina, Antranol, Acido aloético, aceites etéreos, Resistanoles, Acido crisofánico

MINERALES

Calcio, Magnesio, Sodio, Cobre, Hierro, Manganeso, Potasio, Cinc, Cromo, Cloro, Vitaminas (Betacaroteno,

		Vitamina B1, Vitamina B2, Ácido fólico, Vitamina C, Vitamina B3, Vitamina E, Vitamina B6, Colina)
MONO POLISACÁRIDOS	Y	Celulosa, Glucosa, Manosa, Galactosa, Arabinosa, Aldonentosa, L-Ranosa, Acemanano, Acido Uronico, Xilosa, Acido GLucoronico.
AMINOÁCIDOS ESENCIALES		Lisina, Treonina, Valina, Metionina, Leucina, Isoleucina, Fenilalanina, Triptófano.
AMINOACIDOS SECUNDARIOS		Histidina, Arginina, Hidroxiprolina, Acido aspártico, Serina, Acido Glutámico, Prolina, Glicerina, Alanina, Cistina, Tirosina.
ENZIMAS		Oxidasa, Amilasa, Catalasa, Lipasa, Alinasa
TANINOS		
ESTEROIDES		
ESTEROLES		Colesterol, Sitosterol, Campesterol, Lupeol

También se ha determinado que la planta del *Aloe vera* se desarrolla entre los 1500 a 2600 metros sobre el nivel del mar, adaptándose a ambientes tanto húmedos como secos, con temperaturas que oscilan entre los 15 a los 40 °C. De esta manera, se observó que el contenido de gel dentro de las hojas incrementaba a una mayor altura, aumentando la concentración de componentes bioactivos de utilidad medicinal. (Stevens N., 1997) (Sánchez P., 2012).

El gel de *Aloe vera*, es un líquido transparente, mucilaginoso, pegajoso, que se encuentra al interior de los parénquimas de las hojas, está compuesto por un 98 a 99 % de agua, el restante 1,98 % aproximadamente está compuesto por el polisacárido acemanano y el restante 0,02 % por aminoácidos, glicoproteínas, enzimas, vitaminas, minerales, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos. (Moreno J. 2014).

El acemanano, es un polisacárido altamente acetilado de tipo Beta-(1-4)-manano O-acetilado, con un peso molecular de 1000 kDa., que se presume que tiene las propiedades inmunoestimuladoras, que se han atribuido a esta planta. (Yates K. 2012).

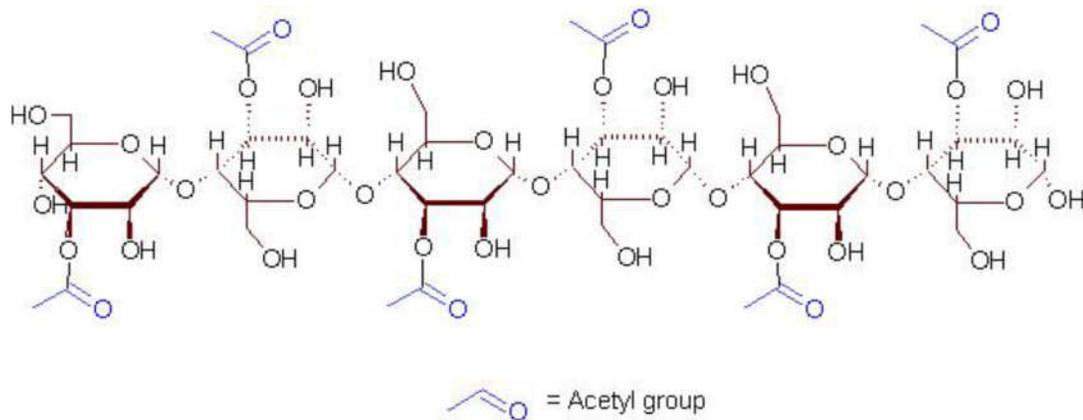


Imagen 4. Estructura molecular del acemanano. (Yates K., 2012)

Paz M. et al, observo que el acemanano, además de poseer propiedades inmunomoduladoras, contiene propiedades protectoras a nivel gástrico, proporcionando el ambiente adecuado para el desarrollo y colonización de *Lactobacillus* y *Bifidubacterium*, que cumplen funciones benéficas en el sistema digestivo, incrementa la capacidad de degradación de alimentos de gran tamaño. (Paz M. et al, 2017).

Por otro lado, el acemanano tiene aplicación en la cosmética, este tiene la capacidad de estimular fibroblastos, favorece la producción de colágeno, reduciendo el periodo de cicatrización de las heridas, además estimula la producción de células epidérmicas y la regeneración de tejido conectivo. (Rahman S. et al 2017).

4. PROPIEDADES ANTICANCERÍGENAS DEL GEL

La elevada concentración de polisacáridos del gel de *Aloe vera*, le permite difundir fácilmente a través del tejido epitelial, en especial la lignina y algunas enzimas proteolíticas facilitan la inserción de otros componentes de utilidad terapéutica como es el acemanano. (Garces M., 2004). El acemanano es el componente que tiene propiedades inmunoestimulantes en el gel de *Aloe vera*, a través de posibles interacciones entre las moléculas de superficie de células inmunitarias, modificando su respuesta según el tipo de célula. (Vila y Guinea, 2001)

Entre los efectos importantes del Acemanano del *Aloe vera* se destaca, la activación del sistema del complemento a nivel del C3, estimulación en la formación de macrófagos y leucocitos, induciendo la síntesis de óxido nítrico, activación la fagocitosis por los

macrófagos, aumento en la liberación de citoquinas, estimulación de las interacciones entre los macrófagos, linfocitos T y linfocitos B, favorece la formación de linfocitos T citotóxicos, estimula células NK e induce la maduración de células dendríticas. (Vila & Guinea, 2001).

También se ha observado que el acemanano tiene la capacidad de estimular a los macrófagos para la síntesis de Interleucina 1 beta (IL-1 β), Interleucina 6, Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α) e incrementar la respuesta inmune vía de receptores de manosa en los mismos macrófagos. (Kwon J. et al, 2001).

El Acemanano tiene la capacidad de reducir el crecimiento de los tumores y en todo caso de causar regresión en los mismos. La complejidad de los polisacáridos que contiene el gel de *Aloe vera*, hace que las células en proliferación presentes en los tumores, ya no sigan un curso acelerado de proliferación. A dosis bajas de 670 μ L se ha logrado conseguir la disminuir el desarrollo del tumor, como ayuda a los quimioterapéuticos de uso convencional u otros productos naturales (López, 2004; Calderon M. et al, 2011). También se evidencio que este componente del gel incrementa la actividad fagocítica, incrementa la producción de IL-1 e IL 6, además de incrementar la transcripción de genes implicados en la síntesis de citocinas. (Llaurado G. et al, 2011).

Otros componentes como la aloemodina, demostró que, en leucemias multirresistentes al tratamiento de fármacos, podría actuar deteniendo el crecimiento celular, otros trabajos han demostrado que componentes de concentración baja de este gel tienen la capacidad de prevenir la carcinogénesis o inducir las enzimas implicadas en el metabolismo de los carcinógenos. (Radha et al, 2014).

Otras moléculas también halladas en el gel de *Aloe vera*, como las cromonas y la aloesina tienen la capacidad de inhibir a las enzimas responsables de la acumulación de melanina en la piel, responsable de la aparición de manchas características de la exposición a la radiación UV (Vila & Guinea, 2001).

G. SISTEMA INMUNE Y CÁNCER

El sistema inmune se en carga de controlar y regular el desarrollo o formación de tumores. Sin embargo, se ha descubierto que el sistema inmune cumple una doble función, la

primera suprimiendo el crecimiento del tumor y la segunda promoviendo su desarrollo. (Arango M. & Rodríguez C., 2016).

Por otro lado, al acumularse las células cancerosas, estas como mecanismo de sobrevida induce la formación de un microambiente favorable para el desarrollo del tumor, que proporciona de componentes necesarios y vitales para el crecimiento del mismo como ser, nutrientes, oxígeno, factores de crecimiento y mediadores químicos, indispensables para la multiplicación acelerada, incrementado la posibilidad de invadir más tejido y metastatizar a otros órganos lejanos del sitio de partida. Además de la inflamación persistente hace que sea un sitio con un mayor espacio de intercambio de los componentes ya mencionados. (Ogino S. et al, 2011).

1. VIGILANCIA INMUNOLÓGICA

El proceso de la inmunovigilancia o vigilancia inmunológica frente a cáncer es un proceso netamente ejercido por los linfocitos T. El principal concepto que propone la inmunovigilancia es el reconocimiento de células tumorales y su eliminación evitando el proceso de formación del tumor. (Naranjo T. et al 2005) Para lo cual se proponen tres procesos naturales.

a. Eliminación

El proceso de vigilancia inmunológica ocurre durante esta primera fase, el tumor situado como tal comienza a producir componentes o moléculas propias, entre ellas están moléculas angiogénicas, esto debido al aumento en el tamaño del tejido. Este estímulo de crecimiento recluta células el sistema inmune innato, como células NK, linfocitos T, macrófagos y células dendríticas, las cuales de manera natural controlan y eliminan a las células que son reconocidas como extrañas. (Lopez M., 2006).

La mayoría de las células tumorales son eliminadas por las células NK y los macrófagos, mediante los mecanismos de FAS - FAS ligando o mecanismos dependientes de perforinas y las granzimas. Las células presentadoras de antígeno presentan vía antígenos leucocitarios humanos, los antígenos asociados a tumor producto de la destrucción de las células tumorales activando de esta manera la respuesta inmune adaptativa. (Acebes A., 2015)

b. Equilibrio

Si la eliminación de las células tumorales no es completa en la fase previa, se ingresa a la siguiente que es la denominada fase de equilibrio. En esta etapa, la repuesta inmune adaptativa se encarga de mantener a las células tumorales en un periodo de latencia por mucho tiempo, sin causar alteraciones o daño, donde unas pueden resistir al control de la respuesta inmune adaptativa y otras no. (Barrio M., 2009).

Además, se ejerce una presión selectiva por los linfocitos y el IFN- γ suficiente para contener a las células tumorales, pero no eliminarlas del todo. Sin embargo, esta misma presión sobre células que son inestables genéticamente comienzan a generar cambios celulares como ser menos inmunogénicos, siendo así menos reconocible a las células del sistema inmune, inducen el paso a un estado de inmunosupresión provocando un proceso de inflamación crónica, que puede llevar a un desarrollo lento de progresión del tumor. (Scrimini S. et al, 2015).

c. Escape

Durante esta etapa el sistema inmune no es capaz de contener el desarrollo progresivo del tumor (Aragon R. et al, 2013). Esto sucede de la siguiente manera: A) El estímulo de la inmunosupresión incrementa la producción de células inmunosupresoras en este caso de linfocitos T reguladores, que se caracterizan por secretar citocinas con actividad inmunosupresora como el TGF- β (factor transformante de crecimiento de fibroblastos beta) que promueve la metástasis (Vargas M. et al, 2016). B) La presencia y la persistencia de antígenos extraños, la formación y la sobreexpresión de neoantígenos en la superficie de las células tumorales, hace que los linfocitos efectores se agoten o ingresen en un estado “exhausto” donde no son totalmente efectivos en sus funciones normales. Además de diferentes fenómenos como el incremento de señales de peligro, aumento de la densidad de la expresión de los neoantígenos, transformación de células presentadoras de antígenos profesionales a tolerogénicas (es decir regula negativamente la respuesta efectora de las células) o disfuncionales (que ya fueron expuestas a otros antígenos) y el incremento de las células derivadas mieloides supresoras (células inmunosupresoras que inhiben la actividad antitumoral natural). (Villegas C. & Ramírez D., 2015).

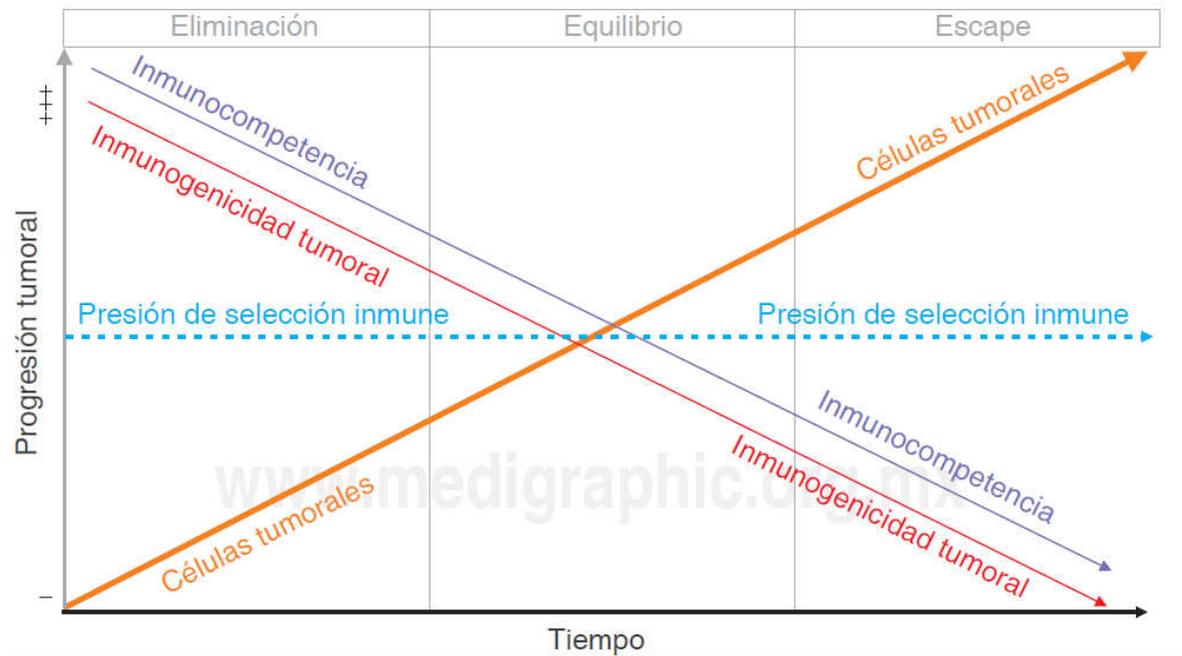


Figura 2. Conceptualización grafica de la inmunovigilancia. (Jacobo, P., et al, 2017)

2. RESPUESTA INMUNE FRENTE A CÁNCER

Durante el proceso carcinogénico, se destacan distintos tipos celulares como ser; macrófagos, neutrófilos, mastocitos y linfocitos tanto de tipo T como B que se encargan de producir distintos tipos de citocinas y quimioquinas como mensajeros del sistema inmune. (De la Fuente M. et al, 2017). De esta manera los cambios en los niveles de estos mensajeros moleculares, se consideran como un marcador para observar la detección de tumores o la evolución del mismo. Se ha observado que las citocinas involucradas en procesos de proliferación celular, activan mecanismos de supervivencia y, por lo tanto, la subsecuente migración de las mismas células, por lo que se presume que están implicadas en la progresión y evolución del tumor. (Landskron G. et al, 2014).

3. CITOCINAS

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular, que tienen funciones como mediadores de la comunicación entre células, se producen por células del sistema inmune células mesenquimales estromales, fibroblastos y algunas células endoteliales. (Zamarron B. & Chen W., 2011).

a. Características funcionales de las citocinas

El término “citocina”, fue propuesto por Cohen el año 1977, que conforme paso el tiempo, se fue descubriendo que estas tenían la capacidad de actuar sobre todos los procesos biológicos, donde cada una cumplía una función diferente, ya sea promoviendo el crecimiento, proliferación o diferenciación celular. (De la Cruz J., 2014). Además de ello tienen otras características funcionales:

Pleiotropismo. Se entiende a la capacidad de ejercer diferentes efectos biológicos en distintos tipos celulares. Por ejemplo, en las células Natural Killer su capacidad citolítica se ve incrementada por la inducción de la IL-2, pero también esta citocina promueve la proliferación de los linfocitos T, además es capaz de estimular la biosíntesis de inmunoglobulinas en las células B. (Lin J. et al 1995)

Redundancia, es el efecto común ocasionado por varias citocinas para el desarrollo de la misma función en el mismo tipo celular. Por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 y la IL-15, tienen un mismo efecto como factores de crecimiento y desarrollo de las células T. (Callejas D., 2011).

Las citocinas forman una red de interacciones complejas, una puede provocar la producción de una o más citocinas o una citocina puede inhibir la producción de otras. Esta interacción es responsable de mantener el equilibrio de las citocinas en lo que la respuesta inmune se refiere. (Carrasco L., 2011).

b. Citocinas involucradas en el cáncer

Entre las citocinas involucradas en el desarrollo o regresión del tumor tenemos algunas como:

i. IL-4

El gen que sintetiza esta citocina se encuentra en el cromosoma 11 en el exón número 4.

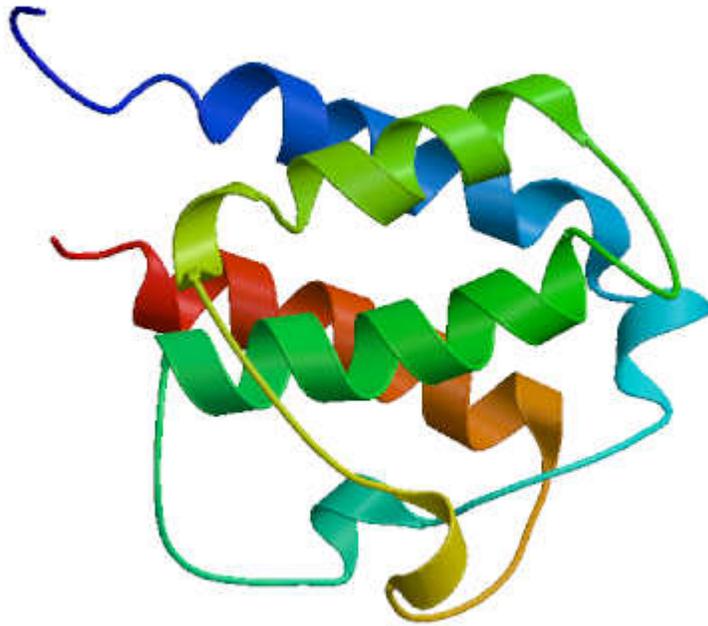


Figura 3. Estructura molecular de la Interleucina 4. (NCBI, National Center for Biotechnology Information Search database)

Citocina secretada por linfocitos tipo Th2, como también mastocitos, basófilos y células mesenquimales estromales. Ejerce función biológica en varias células a decir: promoción de la diferenciación celular Th0 a Th2, incrementa la respuesta de tipo humoral a través de la estimulación para la diferenciación de linfocitos B. (Jiménez A., 2011). En la respuesta frente al tumor, estimula a linfocitos B y macrófagos a inhibir el crecimiento tumoral. (Muñoz V., 2011). Sin embargo, estudios han demostrado que la IL-4 es responsable de polarizar la diferenciación de Macrófagos Asociados a Tumor (TAM) “M1” a macrófagos “M2” o induce la actividad catepsina que promueve la progresión de metástasis y favorece la angiogénesis e invasión de las células cancerígenas a tejidos vecinos (metástasis). (Setrerrahmane S. & Xu H., 2017) También, se observó que la IL-4, conjuntamente con la IL-10, el TGF- β , el CD25 y CCR4 (Receptor de Quimioquina tipo 4), incrementan la metástasis en cáncer de mama y reclutan linfocitos T reguladores en el nicho de desarrollo de las células cancerosas. (Setrerrahmane S. & Xu H., 2017)

ii. Relación de la IL-4 con el tumor

La IL-4 tiene actividad protumoral cuando los niveles de esta citocina, conjuntamente con niveles de IL-13 (Interleucina 13) se encuentran aumentados, producen la activación de Macrófagos Asociados A Tumor (TAM's) y de Células Mieloides Supresores Derivadas (MSDC), incrementa la producción de moléculas anti-apoptóticas Bax, Bcl 2 y cit C. (Suzuki A. et al, 2015). Sin embargo, Mager L. et al, indica que la IL-4, es capaz de estimular eosinófilos dependientes de esta citocina, que tendrían actividad anti-tumoral, concluye que la IL-4 tiene distintas funciones de acuerdo al ambiente tumoral en el que se encuentre, es decir, puede presentar actividad anti-tumoral como pro-tumoral. (Mager L et al, 2015).

iii. IL-10

El gen que sintetiza a la interleucina 10 se encuentra en el cromosoma 5 en el exón 5.

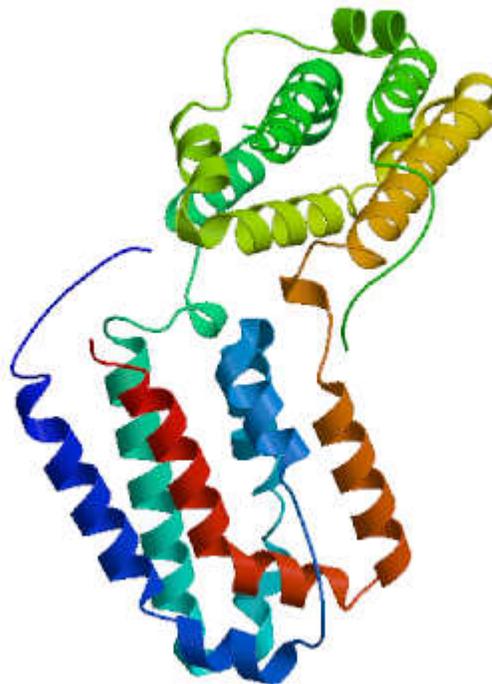


Figura 4. Estructura Molecular de la Interleucina 10 (NCBI, National Center for Biotechnology Information Search database)

Producida por varias células inmunitarias como ser, células T y B, monocitos, macrófagos, mastocitos, células dendríticas y queratinocitos. (Landskron G. et al, 2014). Es una citocina con una actividad inmunosupresora potente, entre sus funciones se destaca la inhibición de la producción de otras citocinas como, el IFN- γ , TNF- α , IL-2 y IL-12, inhibición de la producción de especies reactivas de Oxígeno (ROS), y moléculas de adhesión en la superficie de monocitos. (Muñoz V., 2011). Otra de la fuente de producción son las células tumorales, donde también se evidencio la infiltración de macrófagos asociados a tumor a efecto de esta citocina. (Landskron G. et al, 2014).

iv. Relación de la IL-10 con el tumor

La IL-10, también reduce o inhibe la producción de antígenos de superficie del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) tanto en células Presentadoras de Antígenos Profesionales (APC) de clase II como de clase I en células tumorales. También contribuye de manera conjunta con la relación monocito/macrófago, en la liberación de factores que contribuyen a la angiogénesis y posteriormente a la metástasis, factores como el factor de crecimiento vascular endotelial y la matriz metaloproteinasas. (Mannino M. et al, 2015).

Debido a que esta citocina inhibe en las células cancerígenas la capacidad de presentación de antígenos a linfocitos T, se la considera como una citocina pro-tumoral. Sin embargo, emplea mecanismos como la activación de células NK, macrófagos e incrementa la producción de óxido nítrico. El incremento de los niveles de IL-10 disminuye la actividad citotóxica de los linfocitos T. (Siachoque H. et al, 2005). La IL-10 puede inhibir los estímulos para la formación de nuevos vasos sanguíneos alrededor del tumor o angiogénesis y mejora la producción especies reactivas de nitrógeno como el óxido nítrico para promover la regresión del tumor. (Mocellin C. et al, 2005).

v. IFN- γ

El gen encargado de sintetizar al IFN- γ se encuentra en el cromosoma 10 en el exón número 5. (NCBI)

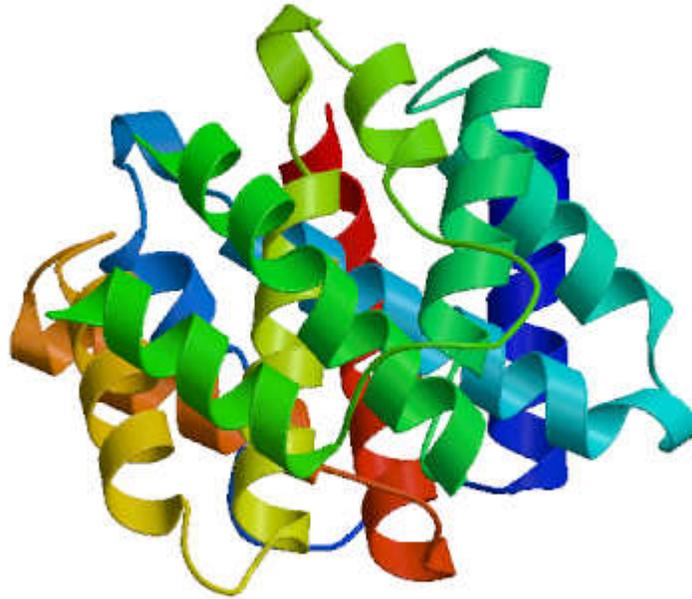


Figura 5. Estructura molecular del Interferón Gamma (NCBI, National Center for Biotechnology Information Search database)

Producida por linfocitos T CD4+, CD8+ como también por células NK. Se aumenta su producción en condiciones patológicas, entre ellas podemos tomar en cuenta al cáncer, esta se encarga de inducir la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias como la interleucina 12 y 15, el factor de necrosis tumoral, además induce la activación de factores de transcripción proinflamatorios como NF- κ B (Factor de Transcripción Nuclear kappa B). (Mata D. et al & Hernández R., 2008).

Conocida también como Interferón tipo II, es importante en la activación de la respuesta inmune innata como adaptativa, es conocida por su actividad antitumoral como un factor importante de la activación de macrófagos y la expresión de moléculas MHC de clase II.

Por otro lado, esta misma citocina induciría en células B la producción de IgG2 e IgG3 lo cual facilitaría la activación de la respuesta inmune humoral. (Kosmidis C. et al, 2018).

vi. Relación de la IFN- γ con el tumor

Esta citocina se caracteriza por su capacidad anti-angiogénica, de manera que, incrementa la expresión de genes que producen antígenos que participan en la vía de presentación antigénica, promueve a una mayor ingestión de cuerpos por macrófagos y estimula la producción de quimioatrayentes para monocitos, macrófagos y linfocitos T al sitio requerido. (Alper M. et al 2016). La IL-12 es una citocina esencial para la producción del IFN- γ , de esta manera, si los niveles de la IL-12 se encuentran bajos ocasionaría la disminución en la producción del IFN- γ por las células productoras de la misma. (Lippitz B. 2013).

Por lado se ha observado que la inactivación o la disminución de la producción del receptor del IFN- γ , produciría un mayor riesgo a padecer algún tipo de cáncer. (Kosmidis C. et al, 2018).

vii. TNF- α

El gen que se encarga de sintetizar al Factor de Necrosis Tumoral Alfa se localiza en el cromosoma 17 en el exón 4.

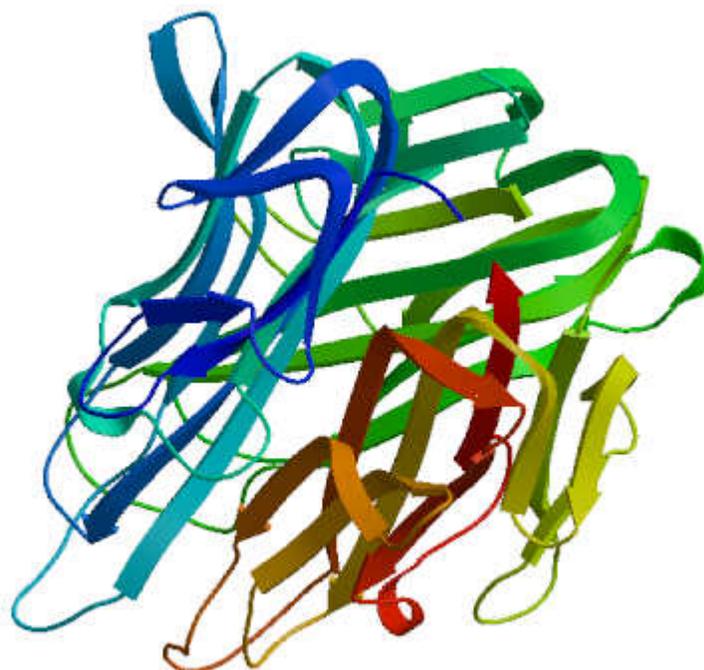


Figura 6. Estructura molecular del Factor de Necrosis Tumoral Alfa (NCBI, National Center for Biotechnology Information Search database)

Esta citocina es producida por macrófagos, linfocitos T y células NK, (Van-Horsen R. et al, 2006). Es una citocina proinflamatoria. Sin embargo, para que esta citocina demuestre su actividad antitumoral debe encontrarse en altas concentraciones, así ocasionaría un efecto citotóxico sobre las células tumorales, además mediante la unión del TNF – α con su receptor, induciría la activación de la apoptosis por el mecanismo de las caspasas, asociado con las proteínas de dominio de muerte. (Zhou X. et al, 2017). También se ha observado que tendría la capacidad de ocluir los neo vasos sanguíneos formados alrededor del tumor evitando así la llegada de oxígeno y nutrientes para que el tumor se disemine. (Waters J. et al, 2013).

viii. Relación de la TNF- α con el tumor

Esta citocina tiene la capacidad de incrementar la permeabilidad endotelial cerca al sitio de desarrollo del tumor e incrementa la producción de moléculas relacionadas con el control de división celular como la p53. (Wajant H. 2009). Se ha identificado que, cuando el TNF - α se une a su receptor, inicia una cascada de señales intracelulares, que contiene los denominados dominios de muerte (DD), que da comienzo a la apoptosis dependiente de caspasas, ocasionando el fraccionamiento de la hebra del ADN. (Cansino J., 2012).

Por otro lado, su respuesta inmunológica depende del tipo celular donde vaya a actuar, se ha encontrado estudios que menciona que esta tiene la capacidad de incrementar sus receptores de la misma citocina en la propia célula incrementado así su efecto citotóxico. De manera que mientras más receptores de membrana existan, mayor será la afinidad de esta citocina por esta célula, que da inicio a la muerte celular programada. (Ávila Z., 2012).

IV. MARCO CONCEPTUAL

A. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La Reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica *in vitro*, que permite amplificar un fragmento en específico de una secuencia del ADN, de manera que, a través de múltiples ciclos a temperaturas diferentes y tiempos diferentes, utilizando una enzima polimerasa estable a temperaturas elevadas como la *Taq polimerasa*, que produce copias del mismo fragmento en millones de copias, realizadas por el mismo operador. (Parras D., 2014).

Esta técnica ofrece rapidez, alta sensibilidad y gran eficiencia en los productos amplificados obtenidos durante PCR. Permite al Biólogo Molecular, una mayor capacidad de manipulación del ADN de diferentes organismos, en diferentes ensayos, bajo diferentes condiciones y con una gran capacidad de reproducibilidad, incluso tan solo con volúmenes pequeños de muestra a partir del material biológico con el que se trabaja, se obtienen resultados confiables. (Cubillos et al, 2008)

Las etapas de un PCR convencional son desnaturalización, donde la doble hebra de ADN se desenrolla para abrir paso a las enzimas presentes en el medio, comienza la segunda etapa la alineación, donde las sondas de ADN específicas del gen a amplificar se hibridizan, para seguir con la tercera etapa, la elongación, donde actúa la enzima *Taq*, incorporando las bases nitrogenadas de acuerdo a la secuencia sense (sentido), formando la hebra anti-sense (antisentido) complementarias. (Tamay de Dios L. et al, 2013)

1. PCR EN TIEMPO REAL

El PCR en tiempo real se aplica en diferentes áreas de investigación, permite la resolución de problemas, ya sea en el área de la salud u otras áreas. Una de sus aplicaciones más relevantes es evaluar la expresión de genes de proteínas características de enfermedades prevalentes de una determinada área geográfica, elaboración de productos, a través de la inserción de genes amplificados para el mejoramiento genético, etc. (Stordeur et al., 2002)

Esta técnica utiliza dos tipos de material genético base: el ADN y ADNc (ADN complementario, producto de la retrotranscripción del ARN mensajero). El ARN mensajero es una secuencia genética, que se expresa durante ciertos tiempos en la célula,

durante determinadas etapas en cada organismo. Si bien es una molécula muy inestable, sin embargo, genera información útil en el campo de la investigación y diagnóstico. (Burgos C. 2009).

2. SISTEMAS DE DETECCIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL

Para que la detección y amplificación de la secuencia de interés o en estudio, la técnica utiliza un sistema de detección fluorescente, que mide la cantidad de ADN sintetizado por cada ciclo ya que la emisión química de fluorescencia es inversamente proporcional a la cantidad de ADN formado. (Garrido A., 2013).

El principio químico de la reacción se basa en; fluoroforos o agentes intercalantes, no específicos que se unen en determinadas regiones al ADN y en sondas de hibridación específicas de la región de interés. (Rodríguez M & Rodríguez W, 2006)

Agentes intercalantes, Este tipo de señal utiliza fluoroforos que se unen a la doble cadena de ADN. Entre los más empleados tenemos al SYBR Green que se une al surco menor de la doble cadena que se forma. (Ponchel F. et al, 2003). Una de las ventajas de utilizar este método es su bajo costo que tiene, pero una de sus grandes desventajas es su baja especificidad, para lo cual se deben trabajar con sondas altamente específicas y evitar la formación de dímeros, que pueden elevar la fluorescencia. (Costa J., 2004).

Sondas de hibridación específicas. Para este tipo de sistema de detección se utiliza una sonda aparte de los cebadores. Entre los sistemas más empleados esta las sondas Taqman, esta emplea, una sonda específica complementaria a la secuencia de interés que tiene en sus extremos un reportero y aceptor, los cebadores y las sondas Taqman. La reacción se genera de la siguiente manera: al permanecer unidos la secuencia y la sonda no generan fluorescencia, sin embargo, cuando la DNA polimerasa va amplificando la hebra complementaria comienza cortando la sonda liberando al reportero, la emisión generada por el mismo aumenta mientras se generan más copias de la secuencia en estudio y se detecte por el equipo. (Arya M. et al, 2005) (Tamay de Dios L. et al, 2013).

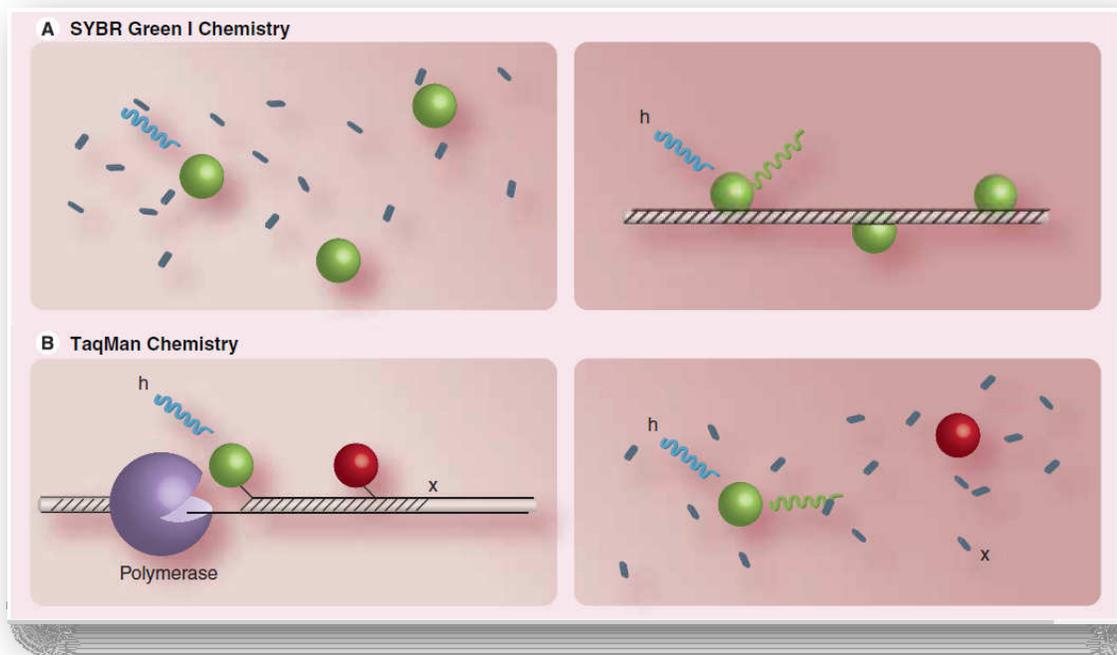


Figura 7. Comparación entre la reacción química entre SYBR Green I y TaqMan (A) Se observa como el SYBR Green se encuentra libre en solución al principio de la reacción, una vez que se van formando copias del segmento de interés, este comienza a intercalarse en el surco menor, es excitado a una longitud de onda de 480 nm y la longitud de onda de emisión es de 520 nm lo cual es perceptible por el detector. (B) La polimerasa rompe la unión de la sonda con el reportero y este último emite fluorescencia detectable.

h = con fluorescencia

x = sin fluorescencia

Tomado de Parida M. et al, 2008

3. CUANTIFICACIÓN DE GENES POR PCR EN TIEMPO REAL

Mientras los ciclos pasan, la señal fluorescente va en aumento hasta llegar a un punto que supera el límite umbral, a esta señal se la conoce como ciclo umbral o del inglés *Cycle threshold*. Por otro lado, para corroborar que el producto amplificado es específico de la secuencia de interés se somete a un incremento de temperatura gradual para separar la doble cadena formada, determinando así la temperatura de fusión (T_m , Temperatura

melting), que es una propiedad única de la longitud y composición de la secuencia. (Valasek M. & Repa J., 2005).

El Ct es inversamente proporcional a la cantidad de amplicon en la muestra, es decir, mientras mayor sea el Ct, menor será la concentración de amplicon en la muestra y si es menor el Ct, la concentración del amplicon será mayor (Schmittgen & Livak, 2008).

La expresión genética es un proceso biológico el cual cumple el Dogma Central de Biología Molecular, que dice que el ADN de un organismo se replica formando dos hebras iguales, que estas por transcripción se convierten en el ARN mensajero que lleva la información genética necesaria para su traducción a proteína. (Parras D., 2014). Es decir, que la expresión genética se puede medir, la cantidad de proteínas producidas se puede medir por métodos como Western Blot, ELISA y el ADN, ARN mensajero se pueden cuantificar por PCR en tiempo real. (Rivas F., 2010).

Comúnmente para la cuantificación de genes inmersos en la expresión genética se utilizan los siguientes:

a. Cuantificación absoluta

Este tipo de cuantificación utiliza una curva de calibración con estándares calificados y precisos que relacionan la señal obtenida de la amplificación por PCR en tiempo real con la señal obtenida de los estándares. Por otro lado, esto representa adquirir los estándares que, en su mayoría, son costosos, no tienen estabilidad a largo plazo y el proceso de almacenamiento resulta ser muy complejo, por lo cual no puede llevarse de manera constante en los laboratorios u otros experimentos. (Vinueza C., 2009).

b. Cuantificación relativa

Este tipo de cuantificación mide o calcula los cambios en la expresión de los genes en estudio en comparación con un experimento referente, pero además este utiliza un gen conservado como control interno, o denominado gen *housekeeping*, que no altera o varía sus niveles durante cualquier tratamiento, donde su expresión genética es estable y constante. (Rivas F., 2010).

i. Genes *HOUSEKEEPING*

Los genes Housekeeping, son genes que poseen una estabilidad en el organismo (niveles inalterables) en estudio ya sea en tejidos y células, sanas o afectadas por algún tratamiento. (Parras D., 2014). Son denominados controles de expresión de genes que incrementan la sensibilidad del ensayo de PCR en tiempo real. Los genes más empleados son: el gen de la β -actina (proteína del citoesqueleto celular, forma el anclaje transmembranal enlazado con la fibronectina en la matriz extracelular) y la GAPDH, Gliceraldehido 3-fosfatodeshidrogenasa (enzima involucrada en el metabolismo de la glucólisis). (Wong M. & Medrano J., 2005).

ii. Método $\Delta\Delta Ct$

Este método emplea valores de Ct de hasta 38 considerando a los valores cercanos a 40 como baja expresión o casi nula, además no requiere la utilización de curvas de calibración o de estándares, ya que emplea un control endógeno (gen *housekeeping*) y una muestra calibrador considerada como no afectada o sin tratamiento (Parras B. 2014; Wong M. & Medrano J., 2005).

Para realizar los cálculos matemáticos y obtener los cambios en la expresión relativa de los genes en estudio se emplea el método comparativo de $\Delta\Delta Ct$ o el método $\Delta\Delta Ct$, propuesto por Livak & Schmittgen. (Livak K. & Schmittgen T., 2008).

Donde

$$\Delta Ct = Ct_x - Ct_r$$

ΔCt ; Es la diferencia entre en Ct del gen de interés y el Ct del gen endógeno o de referencia.

Ct_x ; Ct del gen de interés

Ct_r ; Ct del gen de endógeno o referencia

La fórmula anterior aplica para conseguir los cambios por cada gen y aplicarlos en la siguiente formula:

$$-\Delta\Delta Ct = -(\Delta Ct_{xq} - \Delta Ct_{rcb})$$

$-\Delta\Delta Ct$; Es la diferencia entre el ΔCt_{xq} del gen en estudio y el ΔCt_{rcb} del gen control o calibrador.

ΔCt_{xq} ; Diferencia en el gen en estudio

ΔCt_{rcb} ; Diferencia en el gen control o calibrador.

Finalmente, para obtener los niveles del cambio en la expresión del gen en estudio se aplica:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Utilizando los datos obtenidos anteriormente.

Por otro lado, para determinar si el gen en lugar de expresarse se reprime o reduce, solo se aplica la siguiente formula sobre la anterior. (Schmittgen T. & Livak K. 2008) (Parras D., 2014).

$$\frac{-1}{2^{-\Delta\Delta Ct}}$$

4. TEMPERATURAS DE DISOCIACIÓN (CURVAS DE DISOCIACIÓN)

Se denomina temperatura de disociación a la temperatura donde ya se ha formado la mitad de los productos del proceso de amplificación posterior a la PCR, consiste en un incremento gradual de la temperatura donde las hebras bicatenarias de ADN liberan el fluoroforo contenido en su estructura, descendiendo la fluorescencia de manera drástica. (Gonzales D., 2014).

También denominadas temperaturas melting (T_m), ofrecen información importante sobre el proceso de PCR, la especificidad de los cebadores empleados y la amplificación de productos no específicos (dimeros de primers, o mutaciones puntuales producto de la secuencia de interés). (Navarro M., 2009).

Los T_m son propios de las secuencias de los cebadores, de su longitud y la composición de los mismos es decir de la proporción Guanina/Citocina y estos no deben diferir más de 2° C entre ellos. (Castro G., 2010).

5. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL PCR EN TIEMPO REAL

Entre las ventajas del PCR en tiempo real, tenemos que su alta sensibilidad, que permite obtener un gran número de amplificaciones con poca muestra. Entre otros tenemos la rapidez de la técnica, el tiempo estimado para un ensayo de esta técnica son desde 40 minutos hasta 2 horas, esta última incluye la determinación de los C_t y el análisis de las curvas de temperatura de fusión T_m . (Rivas F., 2010). Además, entre las ventajas tenemos la baja probabilidad de contaminación siendo un sistema cerrado, donde al mismo tiempo de producirse la amplificación se produce la detección y posterior cuantificación en el mismo. (Astorga J., 2012).

Una ventaja importante sobre el PCR convencional, es que este al ser de punto final la fase de detección serían en la fase de platea es decir en el punto final donde se agotan los reactivos del medio. En PCR en tiempo real, la detección se realiza en la fase logarítmica cuando la cantidad de amplificación pasa el límite umbral, es decir, la cantidad de copias amplificadas está en incremento y no así cuando los reactivos se hayan agotado. (Castro G., 2010).

Sin embargo, esta técnica tiene algunas desventajas como la susceptibilidad a inhibición por componentes presentes en la muestra, es decir, moléculas como la urea o la hemoglobina que no permitirían realizar el ensayo. Para evitar este tipo de inconvenientes se debe hacer una cuantificación y evidenciar que los índices de pureza sean los correctos. (Castro G., 2010)

Otra de las desventajas es la alta probabilidad de errores por el operador, debido a que son volúmenes demasiado pequeños que pueden o no tener la cantidad adecuada de reactivos necesarios para que se lleve a cabo el ensayo. (Valasek M. & Repa J., 2005).

B. MODELOS ANIMALES

Es el uso de animales de experimentación durante el proceso de investigación en el cual puede reproducirse o simular alguna enfermedad o proceso relacionado con la misma, con el fin de estudiar los cambios biológicos que surjan en su metabolismo como la conducta misma. (Belmar M., 2014).

El modelo más estudiado es el ratón (*Mus musculus*), siendo este el segundo organismo con su secuencia genética completa, ampliamente utilizado para estudios de cambios genéticos y fisiológicos, cambios que son similares en los humanos y que permitirán observar una posible replica en los mismos. (Benavides F. & Guéten J., 2003).

1. MODELOS DE INDUCCIÓN DE TUMOR

Los más empleados en la investigación son por a) inducción o experimentales que son el resultado de la administración de sustancias químicas o biológicas, b) modificación genética o transgénicos, conocido como la inserción de secuencias ya conocidas y c) negativos que son la administración de dietas modificadas. (Fernández W. et al, 2016)

a. Inducción De Tumor Por Benzopireno

El Benzo(a)pireno (Bap) se encuentra dentro del grupo de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, químicamente ejerce efectos dañinos en el organismo, por activación metabólica. (Xue W. & Warshawsky D., 2005). En 1931 se determinó el efecto pro-cancerígeno del Bap donde se evidencio que la exposición de trabajadores expuestos al mismo presentó un elevado índice de tumores en los pulmones. (Franco Y. & Ramírez C., 2013).

Este compuesto ocasiona mutaciones en la p53, causando distorsión en esta molécula responsable del mecanismo de control de la apoptosis, favoreciendo la aparición de cáncer. (García N. 2015). Como también ocasiona la disminución de la metilación del ADN, obstruyendo la incorporación de la maquinaria de metilación al control de la expresión de los genes. (Rico G. et al, 2014).

V. DISEÑO METODOLÓGICO

A. POBLACIÓN EN ESTUDIO ÁMBITO Y PERIODO DE INVESTIGACIÓN.

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para el presente estudio se utilizaron 4 grupos de 5 ratones Swiss Albinos, a quienes se les había inducido cáncer de pulmón con Benzo(a)pireno, los 4 grupos de ratones estudiados recibieron los tratamientos que se muestran en la Tabla 3. La inducción de cáncer y el tratamiento correspondiente fue realizada como parte de otro estudio por el grupo de investigadores de la Unidad de Ensayos Biológicas o Bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas a cargo del Dr. Juan Antonio Ávila.

Tabla 2. Aplicación de tratamientos, dosis farmacológica y vías de administración

GRUPO	NUMERO DE RATONES	DOSIS DE TRATAMIENTO	DEL VÍA DE ADMINISTRACIÓN
I	5	Ningún tratamiento Inducido con benzo(a)pireno	-----
II	5	100 µL de gel de <i>Aloe vera</i>	Vía orogástrica por 21 días
III	5	2 mg/Kg de cisplatino	Vía intraperitoneal única dosis a los 21 días después de inducido con BP
IV	5	2 mg/Kg de cisplatino 100 µL de gel de <i>Aloe vera</i>	Vía intraperitoneal única dosis a los 21 días después de inducido con BP Vía orogástrica durante 21 días.

El experimento concluyo al día 75 de nacimiento, día en el cual los animales fueron sacrificados por métodos químicos establecidos por la Unidad de Investigaciones Biológicas – Bioterio, FCFB.

2. INDUCCIÓN DE TUMOR

A los 20 ratones suizos albinos con edad menor a las 24 horas, se les administro por vía subcutánea en la región escapular por única vez con 20 µl de benzopireno (0.5 mg/ratón) utilizando como vehículo una suspensión de gelatina acuosa al 1 % para la inducción de tumores.

El benzopireno es un componente que ocasiona mutaciones en la p53, causando distorsión en esta molécula responsable del mecanismo de control de la apoptosis, favoreciendo la aparición de cáncer. (García N. 2015).

3. FÁRMACO QUIMIOTERAPEUTICO DE ELECCIÓN

Se empleó como fármaco quimioterapéutico de uso convencional el cisplatino. Este fármaco actúa a nivel del ADN, ocasionando distorsiones o aductos, causando la muerte celular sobre células cancerígenas. (Moreno E. 2013). Tanto el grupo III como el IV fueron tratados con una solución de 2mg/kg de peso administrado en dosis única por vía intraperitoneal.

B. TIPO DE INVESTIGACIÓN.

Experimental, transversal y descriptivo

C. MATERIALES, MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

Una vez terminado el periodo de ensayo de inducción de tumor y tratamiento anti tumor a los 75 días, los animales de experimentación fueron sacrificados por método químico con atmosfera de éter.

Todas las muestras biológicas empleadas en el presente estudio fueron proporcionadas por la Unidad de Ensayos Biológicos - Bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas

Las muestras de sangre periférica fueron tomadas mediante punción venosa cardiaca a punto final mediante la cual se colectaron 500 µL de sangre en un tubo con anticoagulante EDTA-K3.

Se removieron los pulmones de cada individuo de experimentación asépticamente, de los cuales se proporcionó un lóbulo pulmonar con un peso de 500 a 700 g. en solución fisiológica identificados según el tratamiento correspondiente.

2. HOMOGENEIZACIÓN DE TEJIDO DE PULMON

Para la utilización de las células del tejido de pulmón, se realizó una homogeneización mediante triturado manual en mortero de porcelana. Previamente lavado, esterilizado y secado para cada muestra de tejido de cada ratón en estudio.

3. EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO ARN TOTAL A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN

La extracción de ARN total se realizó con el reactivo comercial TRIzol® LS Reagent (Life Technologies Corporation), utilizado para mantener la estructura intacta del ARN. Por normas de bioseguridad se trabajó en un área especial para extracción de material genético que cuenta con ventilación y con material estéril de trabajo.

La extracción de ARN total se realizó de la siguiente manera: se colocó 500 ml de sangre periférica colectada en anticoagulante EDTA-k3 en un microtubo cónico Eppendorf, el cual se centrifugó por 5 minutos a 3000 rpm, se desechó el sobrenadante y el pellet de células se resuspendió con 500 µL de solución de Lisis (Cloruro de amonio 8.99 g., bicarbonato de potasio 1 g EDTA-Na₂ 18.6 g, csp 1 litro de agua destilada) y se centrifugó por 5 minutos a 10000 rpm, posteriormente se desechó el sobrenadante. Al precipitado obtenido se adicionó 500 µL de TRIzol, se mezcló hasta obtener una solución homogénea, dejando reposar por 5 minutos y centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos.

En una nueva serie de tubos cónicos nuevos, se trasladó todo el sobrenadante obtenido del tubo anterior y se adicionó 200 µL de cloroformo frío, obteniendo de esta manera una solución homogénea blanquecina, luego se centrifugó por 10 minutos a 12000 rpm. El sobrenadante se transfirió un tubo nuevo Eppendorf teniendo cuidado de no mezclar o contaminar con el precipitado, posteriormente al sobrenadante se le adicionó 500 µL de alcohol isopropílico frío se dejó reposar a -20° C toda la noche.

Al día siguiente se centrifugó el tubo a 12000 rpm por 10 minutos, se desechó el sobrenadante, obteniéndose así un pequeño precipitado de color blanquecino en el fondo

del tubo correspondiente al material genético obtenido (ARN total). Al pellet obtenido se adicionó 500 μ L de etanol al 70%, se resuspendió y centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos, el proceso de lavado se repitió dos veces más. Concluidos los lavados se desechó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente por 30 minutos dentro de una cabina.

Para iniciar con los ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) cada muestra se resuspendió con 100 μ L de agua libre de nucleasas DEPC-Treated Water, Ambion®,USA. (En caso de utilizar la muestra después de un periodo de tiempo se recomienda guardar el pellet a -20° hasta su uso).

4. EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENETICO ARN TOTAL A PARTIR DE TEJIDO DE PULMON DE RATON

Una vez obtenido el homogenizado de tejido de pulmón se adiciono los 500 μ L de solución de lisis, trasladando la mayor cantidad de homogenizado al tubo Eppendorf a partir de este punto seguir con el protocolo anteriormente mencionado.

Concluido el proceso de extracción, las muestras de ARN total obtenida de cada animal de experimentación se conservó en seco a -20° C y solo se resuspendió en agua libre de nucleasas al momento de sintetizar la cadena ADN complementario.

5. CUANTIFICACIÓN DE MATERIAL GENETICO ARN TOTAL

La cuantificación se realizó por espectrofotometría UV utilizando el equipo (BioPhotometer Eppendorf) en cubetas de plástico (Uvette® Eppendorf). Se determinó la concentración en diluciones en las siguientes proporciones de ARN total y Agua libre de nucleasas, 1:10 respectivamente, para cada muestra y se obtuvieron las lecturas a 260 y 280 nm como las más relevantes y la relación 260/280 para determinar el índice de pureza de las muestras, siendo los recomendados los índices entre 1,8 a 2,0.

El índice 260/230, permitirá obtener el grado de contaminación de las muestras con compuestos que absorben luz a 230 como fenol y carbohidratos, mismos que son utilizados durante el proceso de extracción (Alejos L. et al, 2014).

6. SINTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO

En una primera etapa se preparó una solución que contenía por cada tubo: 2 µL de RT buffer 10X, 0,8 µL de dNTP 25X, 2 µL de RT Randon Primers 10X, 1 µL de MultiScribe Reverse (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, USA) y agua libre de nucleasas 4,2 µL.

En la segunda etapa, utilizando microtubo de PCR de 200 µL se añadió 10 µL del ARN total que contenía 1 a 5 µg de ARN total y 10 µL de la solución preparada anteriormente. Se programó el termociclador (Eppendorf Mastercycler, USA) de la siguiente manera, 10 minutos a 25 °C, 120 minutos a 37 °C, 5 minutos a 85 °C y se mantendrá a 4 °C hasta su uso para PCR en tiempo real.

7. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESION GENICA POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL O CUANTITATIVA

La elección de cebadores se realizó por revisión bibliográfica y para corroborar la identidad de la secuencia se utilizó el programa en línea NCBI (National Center Biotechnology Information), evidenciando que las secuencias corresponden al genoma de Ratón (*Mus musculus*).

Invitrogen se encargó del diseño de cebadores.

Tabla| 3. Secuencia de cebadores seleccionados

<i>Gen</i>	<i>Secuencia del primer</i>	<i>Longitud</i>	<i>Acceso</i>	<i>Referencia</i>
<i>IL-4</i>	Fw: 5'-ACAGGAGAAGGGACGCCA T-3' Rv: 5'-GAAGCCCTACAGACGAGC TCA-3'	72bp	M25892	Overbergh L. et al, 2003
<i>IL-10</i>	Fw: 5'-GTGAAGACTTTCTTTCAAACAAAG-3'	194 bp	NM_010548	Larocque R. et al, 2003

	Rv: 5'- CTGCTCCACTGCCTTGCTCTTATT-3'			
<i>IFN-γ</i>	Fw: 5'- TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA- 3'	79 bp	NM_008 337.3	Keitou Y. et al, 2016
	Rv: 5'- TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3'			
<i>TNF-α</i>	Fw: 5'- ATAGCTCCCAGAAAAGCAAGC-3'	130 bp	M13049	Wang G. et al, 2008
	Rv: 5'- CACCCGAAGTTCAGTAGACA-3'			
<i>Beta actina</i>	Fw: 5'- GCTCCTCCTGAGCGCAAG -3' Rv: 5'- CATCTGCTGGAAGGTGGACA -3'	75 bp	NM_007 393.3	Qian G. et al, 2015

Se utilizó tiras de 8 tubos para PCR (Applied Biosystems, Micro Amp), por cada tubo se colocó 10 μ L de Power SYBR Green Master Mix PCR, 0,8 μ L de los cebadores Forward, Reverse a una concentración de 100 μ M y 4,4 μ L de agua libre de nucleasas. Dentro de los mismos tubos se adicionó 4 μ L de ADN copia, obteniendo un volumen final de 20 μ L.

Para la PCR en tiempo real se utilizó el equipo PCR Real Time (Applied Biosystems Step One 7500, USA) y las condiciones térmicas fueron; ciclo inicial 10 minutos a 95 °C (etapa de activación enzimática), posteriormente 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto (desnaturalización, alineamiento y elongación), por ultimo una tercera etapa para el análisis de curvas melting (curvas de temperatura de disociación) que se realiza una sola vez: 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto y 95 °C por 15 segundos.

8. PLANILLA DE CALCULOS DE $\Delta\Delta CT$

Los valores obtenidos de la expresión de los genes en estudio obtenidos de equipo se obtienen en Ct (Cycle threshold), este valor es hallado según el tipo de tratamiento que se esté aplicando, como control endógeno se empleó el gen conservado de la Beta actina. Para lo cual, los valores de Ct hallados, fueron introducidos en a una planilla en Excel (que puede ser una plantilla preelaborada o una elaborada por el mismo operador que fue

el caso) en la cual se hizo el cálculo del $\Delta\Delta\text{CT}$ propuesto por Livak et al, el $\Delta\Delta\text{CT}$ permitió establecer los niveles de expresión y represión del gen de interés bajo el modelo que se muestra en el anexo N° 2

D. ANALISIS DE DATOS

Todos los datos fueron analizados por el programa estadístico Minitab. Se utilizó en análisis de varianza ANOVA, para ver si existían diferencias significativas entre los tratamientos empleados. Un $p < 0,05$ fue considerado como diferencia estadísticamente significativa.

VI. RESULTADOS

A. OPTIMIZACIÓN DEL VOLUMEN DE MUESTRA REQUERIDO PARA LA EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA DE RATON.

La extracción del ARN total se realizó empleando el reactivo TRIzol según el protocolo establecido por Casablanca E. 2018. En la tabla 1, se observa que a partir de un volumen de muestra de 500 μL de sangre periférica anticoagulada con EDTA- K_3 , se obtiene un índice de pureza del ARN 1.840 (óptimo).

Por otra parte, se observa que el índice obtenido de 1.783 a la razón de absorbancias 260/230 confirma que la muestra de ARN obtenido estaba en el rango de contaminación aceptable para la realización de pruebas de PCR. Con respecto a los otros dos volúmenes de extracción evaluados se observó que las muestras estaban contaminadas con restos de fenol o carbohidratos utilizados durante el proceso de extracción.

Tabla 4. Comparación de concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ de ARN total obtenidos por el método del TRIzol a partir de diferentes volúmenes de muestras de sangre.

<i>Volumenes de muestra evaluados</i>	\bar{X} $\mu\text{g/mL}$	\bar{X} Abs 230	\bar{X} Abs 260	\bar{X} Abs 280	\bar{X} Abs 340	\bar{X} Índice de pureza	\bar{X} Índice de contaminantes a 230 nm
						260/280	260/230
200 μL	3,5 *	0,112	0,088	0,068	0,023	1,294	0,786
300 μL	16,6 *	0,413	0,315	0,252	0,043	1,250	0,763
500 μL	26,5 *	0,484	0,863	0,469	0,276	1,840	1,783

* factor de dilución 1/10

Tabla 5. Resultados de la cuantificación de ARN total obtenido de sangre periférica de ratón

PARÁMETROS	RESULTADOS
VOLUMEN DE SANGRE PERIFÉRICA	500 μ L
CONCENTRACIÓN DE ARN	> 200 μ g/mL
PUREZA	1.8 (1.8 – 2.0) Optimo
CONTAMINACIÓN	1.7 (1.7 - 2.1) Aceptable
MÉTODO EMPLEADO	Reactivo TRIzol (Modificado)

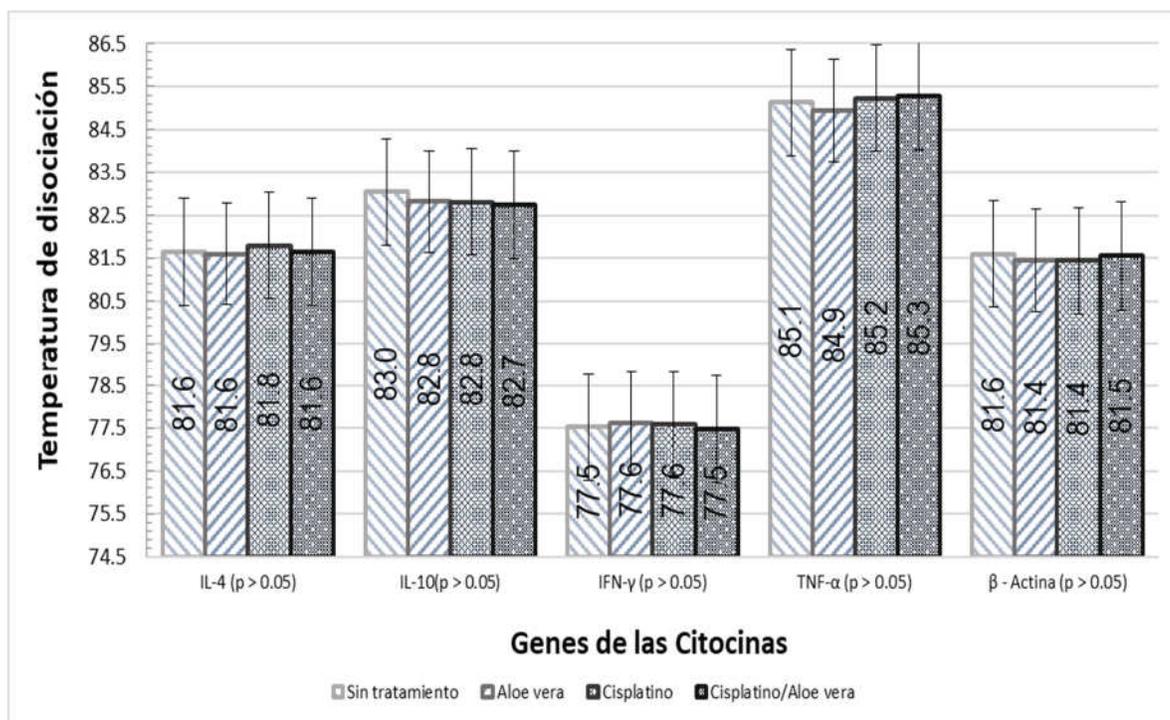
El volumen indicado en la tabla 2 permite obtener una concentración adecuada y óptima para realizar trabajos de amplificación con la menor probabilidad de contaminación y evitando el proceso de amplificación posterior.

Para el proceso de extracción a partir de tejido de pulmón no se realizó la optimización de la cantidad de muestra empleada, debido a que los lóbulos pulmonares de los individuos en investigación no mostraban un tamaño similar entre ellos, razón por la cual se realizó la extracción de ARN directamente de un solo lóbulo pulmonar.

B. TEMPERATURAS DE DISOCIACIÓN (Temperatura Melting) CORRESPONDIENTE A CADA PRODUCTO AMPLIFICADO

Durante la validación del método de PCR en tiempo real, acondicionado para un protocolo de 40 ciclos de amplificación, se evaluaron las curvas de las temperaturas de disociación de cada cebador amplificado, todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

En el experimento con muestra de sangre periférica de ratón, se pudo evidenciar que, para los diferentes genes en estudio, se alcanzaron temperaturas de disociación óptimas, mismas que se pueden apreciar en la gráfica N° 1

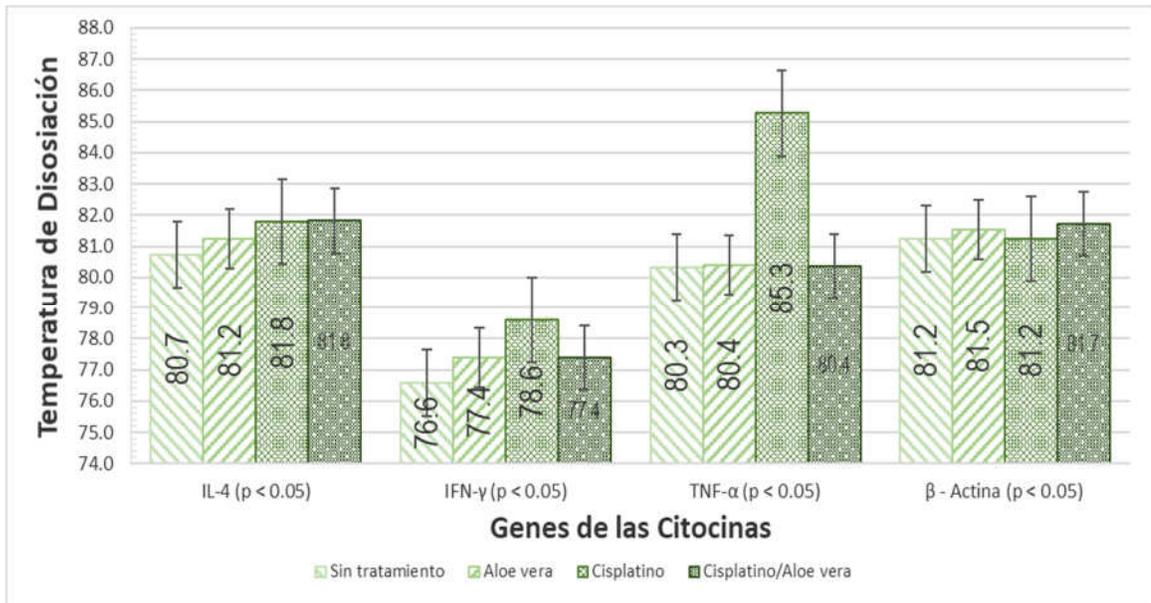


Grafica 1. Promedio de las temperaturas de disociación de cada cebador evaluado en función al tipo de tratamiento empleado en muestras de sangre periférica.

Los promedios obtenidos de las temperaturas de disociación para cada gen en estudio a partir de muestras de sangre periférica, permite observar que no existen diferencias interensayo estadísticamente significativas ($p > 0.05$) a nivel de cada uno de los productos genéticos de las citocinas estudiadas.

Por otra parte, en las muestras de tejido de cáncer de pulmón de ratón (grafica N° 2), se muestra que las Temperaturas Melting obtenidas durante la amplificación de los genes que sintetizan las citocinas en estudio no difieren de manera significativa.

En tejido de pulmón no se logró determinar la temperatura de disociación del gen que sintetiza a la IL-10, lo cual se debe a la ausencia de la expresión del gen en las diferentes condiciones de experimentación evaluadas.



Grafica 2. Promedio de las temperaturas de disociación de cada cebador evaluado en función al tipo de tratamiento empleado en muestras de tejido de pulmón.

C. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESION DE LOS GENES DE LA IL-4, IL-10, IFN- γ Y TNF- α EN SANGRE PERIFERICA.

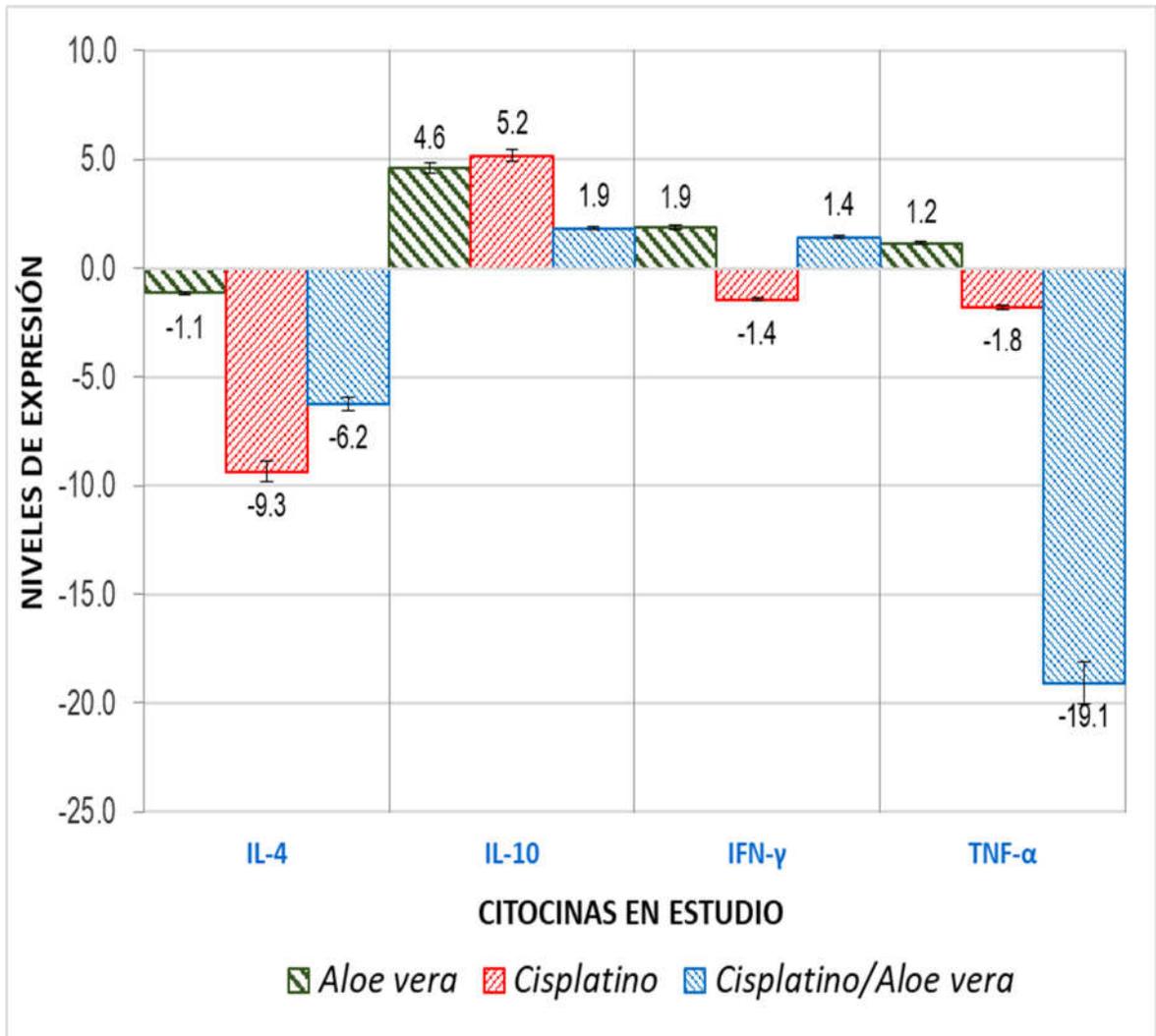
La cuantificación de la expresión o represión genética de los genes que codifican las citocinas en estudio se realizó en función a los niveles de expresión del gen empleado como control endógeno (housekeeping).

Una vez conocidos los valores normalizados de $\Delta\Delta CT$ calculado, se demuestra que, en muestras obtenidas de sangre periférica de los animales de experimentación, los niveles de expresión del gen de la IL-4 se encuentran reprimidos 1.1 veces con el tratamiento con gel *Aloe vera* y que en ratones tratados solamente con cisplatino los niveles de expresión de esta citocina se reprimen 9.3 veces; cuando los ratones fueron tratados con la combinación de cisplatino/*Aloe vera* se consiguió reprimir la expresión del gen de la IL-4 cerca de 6.2 veces respecto al control endógeno.

En el caso del gen de la IL-10 se observó que este se expresa 4.6 veces con el tratamiento con gel de *Aloe vera*, la expresión se incrementa con el cisplatino 5.2 veces y disminuye a 1.9 veces cuando se usa ambos tratamientos de manera combinada.

Por otra parte, los resultados nos permitieron observar que el gel de *Aloe vera*, favorece la expresión del gen del IFN- γ 1.9 veces, siendo que el cisplatino reprime su expresión 1.4 veces y cuando se combina con el tratamiento de cisplatino/ *Aloe vera* se consigue un nivel de expresión del gen 1.4 veces.

En el caso del TNF- α , se resalta que cuando se combina el cisplatino y el gel de *Aloe vera* sus niveles de expresión se reprimen 19.1 veces respecto al control endógeno. Sin embargo, el mismo gen se expresa 1.2 veces cuando se trata únicamente con gel de *Aloe vera*, contrariamente, el tratamiento con cisplatino reprime 1,8 veces.



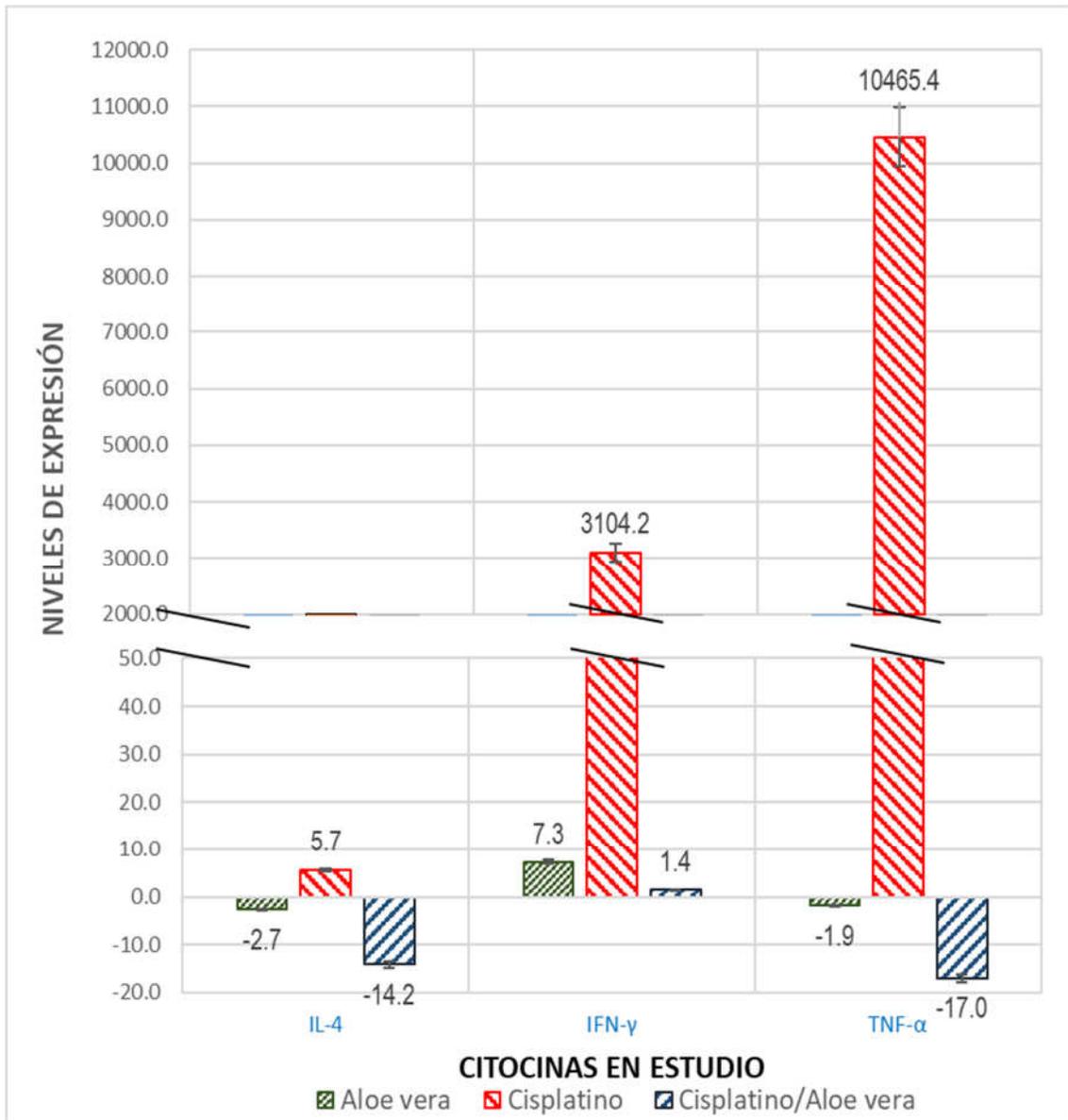
Grafica 3. Niveles de expresión y represión de los genes de las Citocinas en estudio, obtenidos de sangre periférica de ratón, en función a tratamientos con Gel de *Aloe vera*, cisplatino y cisplatino/*Aloe vera*, en ratones con cáncer de pulmón. (valor $p > 0.05$)

D. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESION DE LOS GENES DE LA IL-4, IL-10, IFN- γ Y TNF- α EN TEJIDO DE PULMON

Se observó que el tratamiento con gel de *Aloe vera*, indujo represión de 2.6 veces del gen de la IL-4, sin embargo, existe una expresión de 7.33 veces del gen del IFN – γ y una represión de 1.88 veces del gen del TNF – α respecto al control endógeno. Ver grafica 4.

El tratamiento con cisplatino favorece la expresión 5.7 veces más del gen de la IL-4, similar hallazgo se observó para el gen del IFN- γ donde éste se expresa 3104.18 veces respecto al control endógeno, además se observó que, el cisplatino por si solo induce la expresión de altos niveles de TNF- α (10465.3 veces).

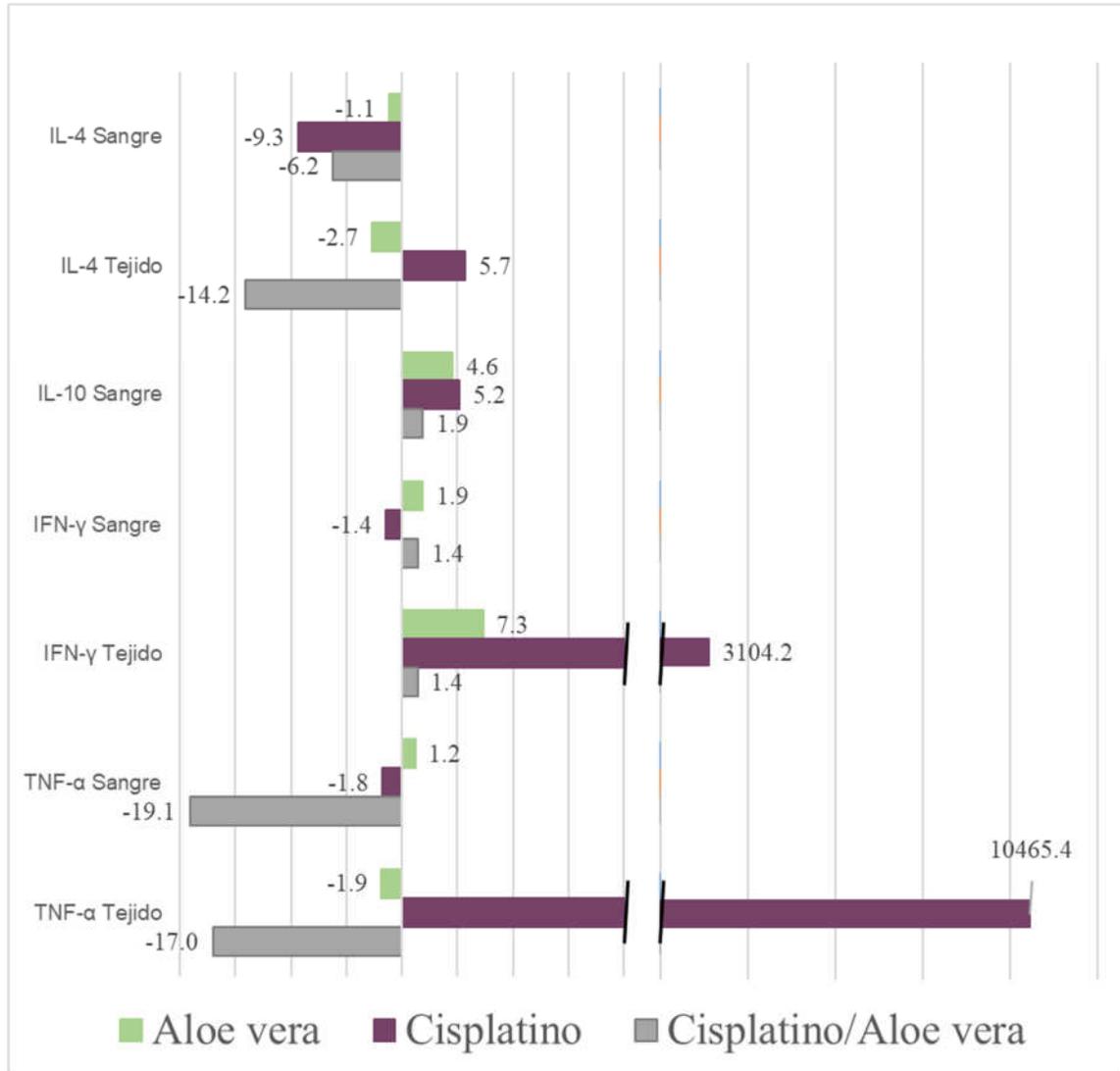
En el caso de la combinación de ambos tipos de tratamiento, se evidenció que el gen que sintetiza al IFN- γ , solo se expresó 1.3 veces respecto al control endógeno. Sin embargo, el mismo tratamiento indujo la represión de 14.1 veces del gen de la IL-4 y 16.9 veces del gen que sintetiza al TNF- α .



Grafica 4. Niveles de expresión y represión de los genes de las citocinas en estudio, obtenidos de tejido de pulmón de ratón, en función a tratamientos con Gel de *Aloe vera*, cisplatino y cisplatino/*Aloe vera*, en ratones con cáncer de pulmón. (valor $p > 0.05$)

E. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESION DE LOS GENES DE LAS CITOCINAS EN ESTUDIO

Además de efectuar el análisis de la expresión de genes de cada una de las matrices biológicas (sangre periférica y tejido de pulmón) empleadas en el estudio, se efectuó el análisis comparativo según niveles de la expresión o reducción de la expresión de los genes de interés.



Gráfica 5. Cambios en los niveles de expresión según el tipo de material biológico empleado y el tratamiento ejecutado en los animales de experimentación. (niveles de expresión del gen en color verde y niveles de reducción de la expresión del gen en rojo)

En la gráfica 5 se puede apreciar que los niveles de expresión del gen del TNF- α se ven reducido con el tratamiento combinado, sin embargo, la expresión de este gen se eleva solo en tejido y no así en células de sangre periférica.

Por otro lado, los niveles de expresión del gen del IFN- γ se encuentran aumentados en ambas matrices biológicas, solo siendo reprimida con el tratamiento con el quimioterapéutico elegido en sangre periférica.

La IL-10 solo se logró cuantificar en sangre periférica, en la misma matriz biológica se puede observar que el gen se expresa producto de la administración de cada tratamiento y la combinación de ambos.

Finalmente, tanto en tejido de pulmón como en células de sangre periférica, los niveles del gen de la IL-4 se encuentran reducidos o reprimidos, que por otro lado solo muestra expresión en tejido con el tratamiento con cisplatino.

VII. DISCUSIÓN

La producción y posterior liberación de determinadas moléculas por parte de una célula se puede demostrar mediante la transcripción y posterior expresión de los niveles ARN mensajero del gen que codifica dicha molécula. Los niveles de expresión del gen varían según el estado fisiológico de la célula en sí y ello a su vez refleja los niveles de expresión génica del material genético del propio organismo vivo. (Vinueza C., 2009).

A. EFECTO DEL VOLUMEN DE MUESTRA EN LA CONCENTRACIÓN DE MATERIAL GENÉTICO AISLADO

La retro transcripción o transcripción inversa es un proceso *in vitro*, que permite transformar moléculas de ARN en ADN complementario. Sin embargo, la eficacia de este proceso se puede ver afectada por la contaminación del material genético empleado, ya sea por componentes celulares propios de la muestra (proteínas, carbohidratos, ADN genómico) o sustancias químicas empleadas en el proceso de aislamiento de ARN (fenol, alcohol). (Torrez I., 2014). Es así que, la concentración del ARN está definida por la absorción del espectro de luz a 260 nm y la calidad de la misma se determina por el grado de contaminación con proteínas utilizando el índice obtenido por la razón de la absorbancia a 260/280. (Ahmad S. et al, 2015)

O'Neill M. et al, el año 2011, sugieren que los valores recomendados de índice de pureza para realizar pruebas moleculares cuando este es determinado por espectrofotometría UV a dos densidades 260, 280 y la razón de 260/280, es de 2.0 a 2.2 para ARN, teniendo como límite inferior 1.8. (O'Neill M. et al, 2011). En el presente estudio el valor obtenido de la proporción 260/280 a partir de un volumen de 500 μ L de sangre periférica de ratón fue de 1.8, este valor se encuentra dentro de los rangos permitidos, lo que indica que existe una mayor tendencia a obtener material genético menos contaminado que si se emplea volúmenes menores de muestra de sangre periférica de ratón.

Con respecto a la contaminación con otros componentes propios del procedimiento de extracción de ARN total, Peimbert M. el año 2016, señala que el rango de valor del índice de 260/230, va desde 1.7 hasta 2.0, mismo que define si la muestra tiene una alta presencia de componentes contaminantes que fueron empleados en el aislamiento como ser: fenol,

sales inorgánicas empleadas como la guanidina (compuesto base del TRIzol). (Peimbert M. et al, 2016). Por lo mencionado anteriormente, este estudio demostró que con el protocolo de aislamiento empleado se obtiene un índice de 1.78 mismo que se encuentra dentro de los rangos permitidos, se observó que con volúmenes menores de muestra existe contaminación evidente, probablemente producto del proceso de aislamiento, por lo cual el volumen empleado de 500 µl de muestra es el adecuado para realizar técnicas de PCR en tiempo real.

Las variaciones en los índices de pureza pueden verse afectadas por la relación entre el reactivo base de proceso de aislamiento como el TRIzol y el volumen de muestra requerido, se propuso emplear un volumen menor de muestra para poder realizar diferentes pruebas o repeticiones en caso de excepcionales. Sin embargo, al disminuir el volumen, se observó un mayor grado de contaminación que afectaría directamente sobre la calidad del material genético y por ende el rendimiento de la PCR.

La pureza y calidad del ARN aislado se reflejan en la reproducción de los productos génicos amplificados. Sin embargo, cada método debe tener determinadas modificaciones (ser optimizado) en sus protocolos debido a: la matriz biológica empleada (siendo que, si se utiliza sangre total o leucocitos aislados o un tipo de tejido en específico, el método debe ser el adecuado y reproducible) según el tipo de sujeto de experimentación (ratones, ratas, conejos), tomando en cuenta que también se puede extraer material genético a partir de microorganismos (parásitos, hongos, bacterias) como también de plantas. Esto debido a las diferentes composiciones bioquímicas y biológicas de cada organismo vivo. (Rocha P. 2002).

B. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON GEL DE *Aloe vera*, CISPLATINO Y LA COMBINACIÓN DE AMBOS SOBRE LOS CAMBIOS EN LOS NIVELES DE EXPRESION DE LOS GENES DE LA IL-4, IL-10, IFN- γ Y TNF- α .

El tratamiento de una condición patológica con productos de origen vegetal se emplea comúnmente como una alternativa terapéutica y debido a la falta de estudios científicos que demuestren su eficacia terapéutica, solo deben ser tomados en cuenta como medicina alternativa y complementaria al tratamiento en cada patología, lo cual a su vez implica que, se debe seguir con el tratamiento convencional prescrito por el médico. Se utilizó un modelo de cáncer inducido en ratones Swiss Albinos, empleando el gel de *Aloe vera* con un volumen de administración de extracto puro de 100 μ L a una concentración de 88 mg/Kg con objeto de evaluar si demuestra actividad inmuno-moduladora en comparación al efecto inducido por el tratamiento con cisplatino que de manera convencional se emplea como medicamento antineoplásico de amplia utilidad en oncología.

Se define como actividad inmunomoduladora, a la capacidad de un agente biológico y/o farmacológico o de otra naturaleza, de aumentar o magnificar la respuesta inmune innata o adaptativa provocando una acción ya sea estimulante o supresora sobre el sistema inmune. (Santander S., 2012).

El rol principal de las células T helper, es favorecer la producción de señales para la activación de linfocitos T citotóxicos, como respuesta inmediata frente a células tumorales. Al mismo tiempo, se promueve la producción de citocinas de tipo Th1 y del desarrollo de células dendríticas productoras de moléculas co-estimuladoras que favorezcan una eficiente activación de las células Th0. Por otra parte, una respuesta de tipo Th2 implicaría una respuesta de tipo humoral frente al tumor. (Shurin M. et al, 1999; Dosne C., 1998).

Por lo mencionado anteriormente, se estudió la actividad inmunomoduladora del gel de *Aloe vera* y su efecto sobre las células productoras de citocinas ya sea de tipo Th1 (IFN- γ , TNF- α) y tipo Th2 (IL-4, IL-10.)

El gen de la IL-4, demostró niveles de represión tanto a nivel tisular como a nivel de células sanguíneas cuando a los animales de experimentación se administró el tratamiento con gel de *Aloe vera* o con la combinación de cisplatino/*Aloe vera*. Esto no se observó en animales tratados con cisplatino, donde sus niveles en tejido se expresan aproximadamente unas 5 veces más, de manera opuesta se observó que en sangre periférica los niveles se reprimen 9 veces en comparación con el gen control empleado en este estudio. Shi Q. et al, 2018, en un estudio similar observaron que los niveles del ARN mensajero de la IL-4 en ratones tratados con vincristina (un anticancerígeno ampliamente utilizado) se encontraban disminuidos lo cual implicaría actividad antitumoral. Por otro lado, Lee D. et al, 2018, mencionan que la administración del gel procesado de *Aloe vera* disminuye los niveles de expresión del gen de la IL-4 en ratones tratados con este producto y su disminución es dependiente de la dosis administrada. (Shi Q. et al, 2018). Si bien el mecanismo por el cual el gel de *Aloe vera* induce a una disminución de los niveles de esta citocina aún no está dilucidado, se presume que el efecto de la disminución en su producción se relaciona con la reducción de la polarización a macrófagos de tipo M2 caracterizados por tener actividad pro-tumoral y estaría presente la probabilidad de que se bloquee la formación de vasos sanguíneos alrededor del tumor, por lo tanto, inhibe el proceso de angiogénesis.

La IL-10 es una citocina con funciones no bien definidas en el cáncer, si bien la IL-10 podría estimular el crecimiento y desarrollo del tumor o por otro lado puede también inhibir el proceso de angiogénesis y la metástasis del tumor en cualquier sitio. (Mannino M. et al, 2018). Durante el desarrollo de la presente investigación, se encontró que los niveles del gen que sintetiza a la IL-10 se expresaban entre 4 y 5 veces con el tratamiento de gel de *Aloe vera* y cisplatino respectivamente. Pero en el tratamiento combinado, se observó que la expresión de esta citocina era mucho menor con respecto a los anteriores tratamientos, si bien se promueve la expresión del gen solo es de aproximadamente 1 vez respecto al control endógeno. Meng H. et al, 2017, demostró que los niveles de expresión del gen de esta citocina en modelo murino comparado con otros fármacos nefrotóxicos entre estos el cisplatino, incrementaba la expresión del gen de la IL-10 en 3,5 veces respecto al control endógeno (Meng H. et al, 2017). En contraste con los resultados de Meng H., Lee D. et al. (2018), observaron que los niveles del gen de la IL-10 en ratones

tratados con gel de *Aloe vera* se ven disminuidos en comparación con ratones sin tratar. (Lee D. et al, 2018). Debido a que los macrófagos y las células Th Reguladoras son productoras de esta citocina, la estimulación inducida por el *Aloe vera* no reprimiría la expresión del gen de esta citocina, este tratamiento podría disminuir la transcripción de la misma inhibiendo de esta manera el proceso angiogénico producido por la disminución de la síntesis del VEGF (Factor de Crecimiento endotelial Vascular)

Stoecklin G. et al, el año 2007 afirmaron que entre las razones para no tener niveles detectables del gen de la IL-10 en muestras de tejido, se debería a que la misma es una secuencia rica en bases nitrogenadas Adenina/Uracilo, regiones que al ser reconocidas por la proteína tristetraprolina, proteína encargada para identificar y degradar estas secuencias (Stoecklin G. et al, 2007).

Tanto IFN- γ como TNF- α , juegan un rol importante en el desarrollo de la inflamación desde la cooperación en la producción de otras moléculas proinflamatorias hasta la producción de moléculas de superficie. El presente estudio demostró que los niveles del gen que sintetiza al IFN- γ bajo el tratamiento con gel de *Aloe vera* y el tratamiento combinado con cisplatino, el gen se expresa como mínimo 1 vez más. Park H. et al, el año 2009, demostraron que la administración de cisplatino (4 mg/Kg) en combinación con HemoHIM (una mezcla de hierbas de origen asiático) tienen la capacidad de estimular la expresión de IFN- γ y de la IL-2, en ratones con melanomas. (Park H. et al, 2009). Bhalsinge R. el año 2018, demostró que la administración en ratas de 200 a 400 mg/Kg de extracto de gel de *Aloe vera*, promueve una mayor respuesta fagocítica y producción de Óxido Nítrico, producto de la estimulación en la producción de IFN- γ , TNF- α y IL-6. (Bhalsinge R. et al, 2018). Por otro lado, el cisplatino administrado a una dosis de 4 mg/Kg, estimula la expresión de TNF- α , como también de otras citocinas proinflamatorias como la IL-1B y la IL-6, sin embargo, la administración conjunta de cisplatino y sibelium (Flunarizina, un vasodilatador cerebral), causa la disminución en la expresión del gen del TNF- α (So H. et al, 2007). Faubel S. el año 2007, observo en células renales que si bien los niveles de IL-10 se encuentran incrementados en el medio, promovería que el cisplatino incremente la expresión del gen del TNF- α y moléculas de adhesión de tipo 1, ocasionando un probable fallo renal por acumulación de moléculas proinflamatorias.

(Faubel S. et al, 2007). Se considera que el acemanano del gel de *Aloe vera* es el principal agente responsable de la estimulación de los macrófagos para la producción de TNF- α y IFN- γ por una interacción con los receptores de manosa. Moreno M el año 2014 menciona que los macrófagos incrementan la síntesis y producción de otras citocinas pro-inflamatorias además de IFN- γ (IL-1, IL-6 y TNF- α), debido a una probable unión del acemanano con los receptores de manosa propios de los macrófagos y células dendríticas, lo cual le daría el efecto inmunomodulador esperado. (Moreno M., 2014)

El gel de *Aloe vera*, no solo tiene la capacidad de activar la respuesta inmune celular, también la respuesta de tipo humoral. Vahedi G., el año 2011, reportó que la administración del gel de *Aloe vera* deriva en la formación de anticuerpos específicos como inespecíficos (por activación policlonal de linfocitos B productores de anticuerpos), en particular de inmunoglobulinas G y M. (Vahedi G. et al, 2011). Si bien los niveles de IFN- γ se encontrarían elevados en el microentorno tumoral esta respuesta estaría asociada a la producción de anticuerpos de tipo IgG, que iniciaría una respuesta de tipo humoral favorable al tratamiento administrado.

Im S. el año 2014, no solo evidenció que el gel administrado a una concentración de 400 mg/kg, estimularía a la producción de citocinas como la IFN- γ , IL - 2, IL - 4 e IL - 6, en las placas o glándulas de Peyer en el tracto intestinal, sino que el mismo gel también cumpliría un efecto inmunomodulador sobre los eritrocitos elevando su número en circulación posterior a la administración del gel (Im S. et al, 2014). Ali A. et al, el año 2014, menciona que entre los posibles responsables del incremento del número glóbulos rojos en circulación, esta la riboflavina, tiamina y ácido fólico mismos que están presentes en cantidades mínimas en el *Aloe vera* los cuales contribuyen al proceso de producción y maduración de los eritrocitos. (Ali A. et al, 2014). El incremento en circulación tanto de leucocitos y eritrocitos promoverían una mejor respuesta inmunológica y hematológica como efecto inmuno-modulador de la administración del gel de *Aloe vera* debido a que la planta como tal tiene diferentes moléculas importantes en su composición.

C. BALANCE SOBRE LA RESPUESTA INMUNE DE TIPO Th1 Y Th2 MEDIADO POR LA RESPUESTA INDUCIDA POR EL CISPLATINO Y EL GEL DE *Aloe vera*

Lim H. et al, el año 2019, informaron que una mezcla de compuestos quimioterapéuticos como ser doxorubicina, cisplatino y lipiodol administrados de vía intraarterial, inducirían cambios en el balance Th1/Th2 especialmente haciendo mención al balance entre IFN- γ /IL-10 el cual se vería incrementado (Lim H. et al, 2018). En el presente estudio el balance IFN- γ /IL-10 en células sanguíneas (dato no mostrado en resultados), si bien se encontraría disminuido debido a que existe una mayor expresión del gen de la IL-10 que del gen del IFN- γ , a nivel tisular el IFN- γ presenta niveles elevados en su expresión lo que presumiblemente incrementaría este balance hacía el favorecimiento de una respuesta de tipo Th1(anti-tumoral). Esta respuesta como también lo mencionaría Lim H. et al, sería un valor predictivo para una respuesta de favorable en la sobrevivencia de pacientes que padecen cáncer.

Vahedi G. et al, el año 2003, mencionaron que la administración del *Aloe vera* se puede relacionar con el incremento en la estimulación de linfocitos T CD4 y T CD8 como respuesta de tipo Th1 y el incremento de IgG e IgM en el suero como respuesta de tipo Th2 (Vahedi G. et al, 2003). Dentro de los resultados hallados, se podría mencionar que la respuesta citotóxica de tipo Th1 sería mayor que la respuesta humoral de tipo Th2 cuyo agente implicado en este balance sería el cisplatino a nivel tisular dentro del microentorno tumoral. Por otro lado, ambas respuestas se verían beneficiadas a nivel sanguíneo con la administración del gel de *Aloe vera* si bien no es mayor que el efecto producido por el quimioterapéutico los resultados podrían presentar una alternativa terapéutica interesante con su efecto inmunomodulador evidente.

Dennis, K. et al, el año 2013, menciona que si bien la IL-10 tiene una función inmunosupresora (reguladora) de la respuesta Th1 y Th2 en el sistema inmune, con lo cual podría promover al desarrollo del tumor, también se conoce que la IL-10 en combinación con la IL-2 promueve el incremento del número de linfocitos T CD8 aumentando su actividad citolítica en el entorno tumoral. (Dennis, K. et al, 2013).

En base a todos los argumentos antes mencionados, la monitorización de los cambios en los niveles de las citocinas estudiadas son una herramienta útil para determinar el efecto inmunomodulador del gel de *Aloe vera* sin dejar de lado la importancia que tiene la administración del quimioterapéutico empleado como el cisplatino, siendo ambos útiles para el tratamiento del cáncer.

VIII. CONCLUSIONES

- Durante la optimización del protocolo de extracción de ARN por el método del TRIzol modificado se estableció que con un volumen de 500 μ L de sangre periférica de ratón anticoagulada con EDTA-K3, se puede obtener un producto con pureza y concentración aceptable para realizar una prueba molecular de PCR en tiempo real.
- En relación a la cuantificación de la expresión relativa de los genes de las citocinas en sangre periférica de ratón, se estableció que en el grupo de ratones tratados con gel de *Aloe vera* existe una predisposición a expresar los genes de las citocinas IL-10, IFN- γ , TNF- α y reprimir la expresión de IL-4; el tratamiento con cisplatino tiende a reprimir la expresión de los genes de la IL-4, IFN- γ y TNF- α y expresar el gen de la IL-10; el tratamiento combinado del gel de *Aloe vera*/cisplatino reprime la expresión de los genes de la IL-4, TNF- α , favoreciendo la expresión de los genes de las citocinas IL-10 y IFN- γ .
- Al cuantificar el efecto de los tratamientos estudiados en tejido de pulmón de ratón se estableció que, con el tratamiento con gel de *Aloe vera* se reprime la expresión de los genes de las citocinas IL-4, TNF- α y se favorece la expresión del gen del IFN- γ en 7.3 veces, el tratamiento con cisplatino favorece la expresión de los genes de la IL-4, e induce que los genes del IFN- γ y TNF- α expresen más de 3000 veces sus niveles; el tratamiento combinado gel de *Aloe vera*/cisplatino reprimió la expresión de los genes de la IL-4, TNF- α y favoreció la expresión de 1.4 veces del gen del IFN- γ .
- Cuando se comparan los niveles de expresión o represión de las citocinas en sangre o tejido y en función al tipo de tratamiento empleado, se establece claramente que en tejido pulmonar el tratamiento con cisplatino es el que favorece la mayor expresión de los genes de las citocinas TNF- α e IFN- γ ambas asociadas con una respuesta de tipo Th1, en cambio el tratamiento con gel de *Aloe vera* únicamente indujo la expresión de IFN- γ en una proporción 5 veces menor al cisplatino y finalmente el tratamiento combinado favorece niveles de expresión bajos con respecto a los dos tratamientos administrados de manera independiente. Con respecto a los niveles en sangre periférica el tratamiento con gel de *Aloe vera*

favoreció la expresión de las citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 lo cual indica una predisposición hacia una respuesta de tipo Th1 antitumoral y se observó que los tres tipos de tratamientos reprimen el gen que codifica la IL-4 que promueve respuesta inmune de tipo Th2.

- Como conclusión general se afirma que el gel de *Aloe vera* obtenido de la comunidad Cahuayuma del departamento de La Paz tanto en sangre como en tejido de ratones con cáncer inducido de pulmón, tiende a favorecer la expresión de los genes de las citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10, reprimiendo la expresión del gen que codifica la citocina IL-4. Además, cuando se administra como tratamiento único los niveles de expresión y represión del ARN mensajero de las citocinas antes mencionadas son mayores que cuando se administra en combinación con el cisplatino.

IX. RECOMENDACIONES

- Si bien se ha demostrado que el tratamiento único con gel de *Aloe vera* muestra un efecto que favorece una respuesta de tipo Th1 antitumoral y que cuando se administra de manera combinada con el cisplatino si bien se mantiene la expresión de citocinas de tipo Th1 los niveles de expresión de estas son más bajos. Por lo tanto, es recomendable administrar el tratamiento combinado debido a que el cisplatino tiene acción antitumoral por mecanismos de alteración en la estructura normal del ADN principalmente (que también podría tener este efecto sobre células normales ocasionando toxicidad renal y hematológica), ha demostrado que en tejido donde se desarrolla el tumor el cisplatino favorece la expresión de IFN- γ y TNF- α en más de 3000 y 10000 veces respectivamente, con lo cual, se demuestra que este tratamiento convencional estimula al sistema inmune para montar una respuesta anti tumor de tipo Th1.
- No está dilucidado cuál de los componentes activos del gel de *Aloe vera*, que le otorgan el efecto inmuno-modulador sobre el sistema inmunológico, se recomienda hacer estudios sobre cada uno de los componentes del gel que ayuden a determinar el efecto particular de cada uno de ellos sobre la respuesta antitumoral.
- Por otro lado, se estudió los cambios en los niveles de citocinas de tipo Th1 y Th2, sin embargo, debería hacerse un seguimiento a los cambios en las diferentes etapas de desarrollo del tumor y medir la expresión de moléculas pro-apoptóticas y antiapoptóticas y determinar la asociación entre citocinas y moléculas relacionadas con el proceso normal de apoptosis.
- Se debe seguir trabajando sobre otros modelos inducido de tumor de diferentes tejidos y evidenciar si el efecto producido por el gel de *Aloe vera* sobre el cáncer de pulmón, es similar en otros tipos de tumor y ver la factibilidad de utilizar este producto natural dentro de la terapéutica de apoyo establecida para el cáncer.

X. BIBLIOGRAFIA.

- Ahmad, S., Zoheir, K., Ansari, M., Korashy H., Bakheet S., Ashour A., Attia, S. (2014). Stimulation of the histamine 4 receptor with 4-methylhistamine modulates the effects of chronic stress on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunobiology*. 220(3):341-9. doi: 10.1016/j.imbio.2014.10.014.
- Albin, R. (2012). Sarcomas: etiología y síntomas. *Revista Finlay*, 2(2). Recuperado de <http://www.revfinlay.sld.cu/index.php/finlay/article/view/108>.
- Alazzouzi, H. (2006). *La inestabilidad genómica en Cáncer*. Barcelona. España.
- Alessio, H. y Hagerman, A. (2006). *Oxidative Stress, Exercise and aging*. Imperial College Press
- Alper, M. y Esendagli, G. (2016). The untold story of IFN- γ in cancer biology, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 31: 73-81, doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.07.005.
- Amorín, E. (2013). Cáncer de pulmón, una revisión sobre el conocimiento actual, métodos diagnósticos y perspectivas terapéuticas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 30(1), 85-92.
- Arango, M. y Rodríguez, C. (2016). Protagonismo del sistema inmune en el microambiente de los tumores malignos de la mama. *Revista Cubana de Hematología, Inmunol y Hemoter*. 32(2):190-202.
- Arredondo, E. (2011). *Evaluación del efecto anticancerígeno y citotóxico in vitro de la porfirina no simétrica A3B NS1, el compuesto HS01 de la planta hibiscus sabdariffa y la proteína quimérica E2- IL-18*. Nuevo León. México.
- Arias, I. (2011). *Evaluación de la actividad antitumoral de diferentes extractos de varias especies de Kalanchoe en una línea celular de Cáncer de Próstata*. México D. F. México

- Armengola, C., Sarriasa, M. y Salaa, M. (2018). Carcinoma hepatocelular: presente y futuro. *Medicina Clínica*, 150(10): 31-34. Doi: 10.1016/j.medcli.2017.08.010
- Fron, C. y Blanc, J. (2018). Carcinoma hepatocelular. *EMC - Tratado de medicina*, 22(2): 1-7. Doi: 10.1016/S1636-5410(18)89309-6
- Balzano, L. y Diez, N. (2010). Mecanismos asociados a la agresividad tumoral y su empleo para diagnosticar este fenómeno. *Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 2(1):77-86.
- Bando, H. (2011). Planteamientos básicos del cáncer hereditario: Principales síndromes. ADEMÁS Comunicación Gráfica, s.l.
- Bayati, J. & Moradi-Kor, N. (2014). Component and Application *Aloe Vera* Plant in medicine. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*. 2.1876-1882.
- Belmar, M. (2014). *Estudio del Efecto de Polifenoles Vegetales sobre un Modelo de Fotoenvejecimiento en Ratones SKH1*. Murcia
- Bonilla, M. y Jiménez, L. (2016). Potencial industrial del *Aloe vera*. *Revista Cubana de Farmacia*, 50(1), 139-150.
- Bustos, C. (2018). *Nuevos tratamientos anti-PD1 en el tratamiento del cáncer*. Madrid. España.
- Caubín, A. Ruiz, J., Brito, E. y Navarro, R. (2012). Aplicaciones terapéuticas del *Aloe Vera*. *Canarias Médica y Quirúrgica*. 9(27): 42-50.
- Cabrera, C. y López, M. (2006). Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. *Oncología*, 29(7): 291-298.
- Callejas, D. (2011). *Caracterización de la respuesta inmunitaria-inflamatoria en el cuello uterino en pacientes con displasias de cérvix*. Zulia. Venezuela.

- Callejas, M., Escobar, M., Hernández, D., Mariela, K., Villacorta, A. y Rodríguez, S. (2018). Aplicación del sistema CRISPR/Cas9 como futura opción terapéutica para el tratamiento del cáncer. *Sinapsis UJMD*, 8(1): 42-50.
- Cabrera M. (2012). *Flavonoides y análogos como moduladores de enzimas detoxificantes de xenobióticos. Potenciales agentes quimiopreventivos para el cáncer*. Universidad de la Republica. Uruguay.
- Calderón, M., Quiñones, M. y Pedraza, J. (2011). Efectos benéficos del *Aloe* en la salud. *Vertientes*, 4(2):53-73.
- Carioli, G., La Vecchia, C., Bertuccio P., Rodriguez, T., Levi, F., Boffetta, P., Negri, E. y Malvezzi, M. (2017) Cancer mortality predictions for 2017 in Latin America. *European Society for Medical Oncology*
- Castillo, J. (2012). *Oncología y ontología: Un análisis semiótico-material del cáncer*. Barcelona. España.
- Castro, G. (2010). *Estandarización de la técnica RT-PCR a tiempo real para la detección del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) en la trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss)*. Lima. Perú.
- Compte, M. (2012). *Desarrollo de nuevas estrategias de inmunoterapia antitumoral basadas en la secreción in vivo de anticuerpos biespecíficos*. Madrid. España.
- Cogliano, J., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Lauby, B., El Ghissassi, F., y Wild, C. (2011). Preventable exposures associated with human cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(24), 1827–1839. doi:10.1093/jnci/djr483
- Cubillos, K., Pinilla, G. & Rodríguez, M. (2008). Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 6(9) p. 65-75. ISSN 2462-9448. doi: 10.22490/24629448.397.

- Chaparro, C. García, E. & Ochoa J. (2017). *Medicina Alternativa Vs Medicina Convencional: ¿Quién Tiene La Razón? Alfabetización Científica Y Tecnológica De Jóvenes Y Adultos Para La Prevención De Enfermedades Cancerígenas*. Bogotá. Colombia.
- Dalton, L. y Kellam, P. (2009). Infectious causes of cancer and their detection. *Journal of Biology*, 8(67).
- Dale, M., Rang, P., & Dale, M. (2014). Rang & Dale. Farmacología. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Dennis, K., Blatner, N., Gounari, F., y Khazaie, K. (2013). Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. *Current opinion in oncology*, 25(6), 637–645. doi:10.1097/CCO.0000000000000006
- De la cruz, J. (2014). *Citocinas proinflamatorias: participación en la modulación de la actividad del melanoma experimental B16*, España.
- De Vito, E. y Rojas, R. (2005). El humo ambiental de tabaco. *Medicina*, 65: 545-549.
- Domínguez, N. Arzate, I. Chanona, J. Chanes, J. Alvarado J. Calderón, G. Garibay, V. & Gutiérrez, G. (2012). El gel de *Aloe vera*: estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1), 23-43.
- Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014 – 2023. (2013). Hong Kong, China.
- Estrada, G. (2017). *El carcinoma broncogénico en la provincia de Segovia. Análisis de una década*. Madrid. España.
- Ferrís, J., Ortega, J. y López, B. (2004). La etiología y la prevención del cáncer pediátrico. *An Pediatr (Barc)*, 61(1): 1-4.

- Fuente, M., Hermoso, M., Abedrapo, M., Carrillo, K. y López, S. (2017). Mediadores inflamatorios y su influencia en la evolución del cáncer colorrectal. *Rev Hosp Clín Univ Chile*; 28: 36 – 43.
- Ferbeyre, L. y Salinas, J. (2005). Bases genéticas y moleculares del cáncer / 1a. parte Cancer: Molecular and Genetic basis. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 4(2).
- Fernández, L. Torres M. & Real F. (2016). Somatic mosaicism: on the road to cáncer. *Nature Reviews Cancer* 16, 43–55 doi:10.1038/nrc.2015.1
- Hee, K. Hong, K., Min, S., Youn, B., Shin, S., Hong, J. y Park, Y. (2011). Antimicrobial and immunomodulatory effects of *Aloe vera* peel extract. *Journal of Medicinal Plant Research*. 5.
- Hernández, D. y Madrigal, A. (2018). Terapias celulares: una nueva era en la batalla contra el cáncer. *Gac Med Mex*.154: 547-549
- Hernández, R. (2016). Genética Molecular del Cáncer: Una visión global. *Rev Cubana Genet Comunit*, 10(2): 9-16.
- Herrera, M. Herrera, A., Domínguez G., Silva J., García V., García, J., Gómez I., Soldevilla B., Muñoz C., Provencio, M., Campos, M., García de Herreros, A., Casal I., Bonilla, F. y Peña1 C. (2013). Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients. *Cancer Science*, 104(4):437-444 doi: 10.1111/cas.12096
- Hussain, S., Patil, G., Reddi S., Yadav, V., Pothuraju, R., Singh, R. y Kapila, S. (2017). *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) supplemented probiotic lassi prevents *Shigella* infiltration from epithelial barrier into systemic blood flow in mice model, *Microbial Pathogenesis*.102: 143-147. Doi: 10.1016/j.micpath.2016.11.023.

Instituto Nacional del Cáncer. 2015.

Im, S., Kim, K., Kim, H., Lee, K., Shin, E., Do, S. y Lee, C. K. (2014). Processed *Aloe vera* gel ameliorates cyclophosphamide-induced immunotoxicity. *International journal of molecular sciences*, 15(11), 19342–19354. doi:10.3390/ijms151119342

Iniesta, P. (2007), Carcinogénesis pulmonar. *Rev Patol Respir*, 10(1): 50-54

Jiménez, A. (2011). *Cáncer de pulmón y Citocinas: Variantes Clínicas y Genéticas*. Salamanca. España.

Johnson, D., Puzanov, I. y Kelley, M. (2015). Talimogene laherparepvec (T-VEC) for the treatment of advanced melanoma. *Immunotherapy*, 7(6), 611–619. doi: 10.2217/imt.15.35

Kumar, S. y Bhan A. (2016) Immunomodulatory potential of acemannan (polysaccharide from *Aloe vera*) against radiation induced mortality in Swiss albino mice, *Food and Agricultural Immunology*, 27:1, 72-86, doi: 10.1080/09540105.2015.1079594

Kosmidis, C., Sapalidis, K., Koletsa, T., Kosmidou, M., Efthimiadis, C., Anthimidis, G. y Kesisoglou, I. (2018). Interferon- γ and Colorectal Cancer: an up-to date. *Journal of Cancer*, 9(2), 232–238. doi:10.7150/jca.22962

Kristen, D., Nichole, B., Fotini, G. & Khashayarsha K. (2013). Current status of IL-10 and regulatory T-cells in cáncer. *Current Opinion Oncology*. 25(6): 637-645. Doi. 10.1097/CCO.0000000000000006.

Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C. y Hermoso, M. (2014). Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. *Journal of Immunology Research*, doi: 10.1155/2014/149185

Lambert, M. y Herceg, Z. (2008). Epigenetics and cancer. *Molecular Oncology*, 2:33-48

- Lee, H., Jang, J., Lee, S., Yoo, S., Kwon, J., Nam, S., y Yoon, S. (2019). Inflammatory cytokines and change of Th1/Th2 balance as prognostic indicators for hepatocellular carcinoma in patients treated with transarterial chemoembolization. *Scientific reports*, 9(1), 3260. doi:10.1038/s41598-019-40078-8
- Lippitz, B. (2013). Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol.*14(6):e218-28. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70582-X
- López, T. (2004). Aloe vera Actividad farmacológica, indicaciones y reacciones adversas. *Offarm*, 23(9):96.100.
- López, A. (2003). Estudio de la inestabilidad genómica espontanea e inducida en mutantes deficientes en la reparación de DNA de *Drosophila melanogaster*. Barcelona. España.
- López, T., (2004) *Aloe vera*. Actividad farmacológica, indicaciones y reacciones adversas. *OFFARM*, 23(9), 96-100.
- Llauradó, G., Morris, H., Albear, M., Castan, L. y Bermúdez, C. (2011). Plantas y hongos comestibles en la modulación del sistema inmune. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 30. 511-527.
- Llopart, N. (2016). *Las plantas medicinales como fuente de compuestos antineoplásicos*. Madrid. España.
- Mager, L., Wasmer, M., Rau, T. y Krebs, P. (2016). Cytokine-induced Modulation of Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*, 6(96) doi: 10.3389/fonc.2016.00096
- Merino, C. (1995). Caracterización biológica del carcinoma vesical: expresión de p53, EGF -R y oncogen retrovirico erbB-2/NEU. Madrid. España.
- Ministerio de Salud, Unidad de enfermedades no trasmisibles, Unidad de Epidemiología, 2017.
- Ministerio de Salud: Programa Nacional de Lucha contra el Cáncer. 2017.

- McCabe, M., Brandes, J. y Vertino, P. (2009). Cancer DNA Methylation: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Clin Cancer Res*, 15(12): 3927-3937. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2784
- Mannino, M., Zhu, Z., Xiao, H., Bai, Q., Wakefield, M. y Fang, Y. (2015). The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Letters*, doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.009
- Moreno, J. (2014). *Extracción de compuestos antioxidantes del gel de Aloe vera. Optimización del proceso mediante la aplicación de la metodología de superficie de respuesta*
- Morales, F. (2018). Terapia génica en el arsenal de terapéutica de la enfermedad oncológica. *Revista Clínica de la Escuela de Medicina UCR – HSJD*, 8(1): 11-17.
- Mocellin, S., Marincola, F. y Young, H. (2005). Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *Journal of Leukocyte Biology*, 78 doi: 10.1189/jlb.0705358.
- Martín de Civetta, M., & Civetta, J. (2011). Carcinogénesis. *Salud Pública de México*, 53 (5), 405-414.
- Muerrieta, H., Villalobos, A. y Garcia S. (2009). Linfoma: Aspectos clínicos y de imagen. *Anales de Radiología México*, 1:81-97.
- Naranjo, J., McCook N., Menéndez, R., Martínez, S., Fernández, M., y Almarales, M. (2005). Evaluación biológica de un crudo de polisacáridos aislado del Aloe barbadensis Miller en ratones sometidos a mielosupresión. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 10(2)
- Nooshinfar, E., Bashash, D., Abbasalizadeh, M., Safaroghli-Azar, A. y Sadreazami, P. (2017). The Molecular Mechanisms of Tobacco in Cancer Pathogenesis, *Int J Cancer Manag.*; 10(1):e7902. doi: 10.17795/ijcp-7902

OMS. International Agency for Research on Cancer. 2016

Owen, J., Punt, J. & Stranford, S. Kuby. *Inmunología*. México; México D.F. 7ma Edición: Editorial McGrawHill.

Ogino, S., Galon, J., Fuchs, C., y Dranoff, G. (2011). Cancer immunology--analysis of host and tumor factors for personalized medicine. *Nature reviews. Clinical oncology*, 8(12), 711–719. doi: 10.1038/nrclinonc.2011.122

Organización Mundial de la Salud. *Perfiles Oncológicos de los Países*. 2014.

Our World In Data. 2015

O'Neill, M., McPartlin, J., Arthure, K., Riedel, S. y McMillan, N. (2011). Comparison of the TLDA with the Nanodrop and the reference Qubit system. *Journal of Physics: Conference Series*. 307. Doi: 10.1088/1742-6596/307/1/012047.

Pérez, L. (2017). *Inhibidores de la coestimulación inmune en cáncer*. Madrid. España.

Pérez, I. (2010). Bases moleculares del cáncer y factores de riesgo: el caso del cáncer de páncreas. *Revista de Gastroenterología de México*. 2(75):203-204

Pan, Q., Pan, H., Lou H., Xu, Y. y Tian, L. (2013). Inhibition of the angiogenesis and growth of Aloiin in human colorectal cancer in vitro and in vivo. *Cancer Cell Int*. 13: 69. doi: 10.1186/1475-2867-13-69

Peimbert, M. y Alcaraz, L. (2016) Hitchhiker's Guide to Metatranscriptomics. *Experimental Designs in High-Throughput Sequencing*, Doi 10.1007/978-3-319-31350-4_13

Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F., Douglas, S., Field, S. Markham, A. (2003). Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC biotechnology*, 3, 18. doi:10.1186/1472-6750-3-18

- Park, H., Ju, E., Jo, S., Jung, U., Kim, S., y Yee, S. (2009). Enhanced antitumor efficacy of cisplatin in combination with HemoHIM in tumor-bearing mice. *BMC cancer*, 9, 85. doi:10.1186/1471-2407-9-85
- Pavilonis, B., Grassman, J., Johnson, G., Diaz, Y. y Caravanos, J. (2017). Characterization and risk of exposure to elements from artisanal gold mining operations in the Bolivian Andes. *Environmental Research*, 154:1-9 doi: 10.1016/j.envres.2016.12.010
- Quezada, M., Salinas, C., Gotteland, M. y Cardemil, L. (2017). Acemannan and Fructans from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) Plants as Novel Prebiotics. *J Agric Food Chem*, 65(46):10029-10039. doi: 10.1021/acs.jafc.7b04100
- Ramírez C. (2012). *Utilización de Medicina no Convencional en adultos con diagnóstico de Cáncer por Tumores Sólidos en tratamiento con quimioterapia atendidos en la Unidad de Quimioterapia Ambulatoria del Hospital Base Osorno. Mayo a diciembre 2011.* Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.
- Rahman, M. (2014). Realizing the promise of cancer predisposition genes. *NATURE*, 505: 302-308. doi: 10.1038/nature12981
- Radha, M., y Laxmipriya, N. (2014). Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of *Aloe vera*: A systematic review. *Journal of traditional and complementary medicine*, 5(1), 21–26. doi: 10.1016/j.jtcme.2014.10.006
- Rezaei, N. (2015) *Cancer Immunology*. Theran, Iran: Springer.
- Ruiz, L. Puesta a punto de la cuantificación mediante PCR a tiempo real de la expresión genética de marcadores miogénicos. Pamplona. España.
- Sanchez M. (2013). Expresión de los genes abc-b1, abc-c1 y abc-g2 y su correlación clínica en el pronóstico de las leucemias agudas. México.

- Sanz, B., Prieto M., Otero, L., Abt, A., Bernal, M. y Cambas N. (2014). Percepción de los factores de riesgo de cáncer por la población española. *Gaceta Sanitaria*, 28(2):137-145. doi: 10.1016/j.gaceta.2013.10.008
- Siachoque, H., Ibáñez, M., Chuairé, L., García, O., Guzmán, A. y Flórez, L. (2005). Determinación de interleucina-10 (IL-10) en pacientes con cáncer en estadios III y IV tratados con dexametasona. *Rev. Cienc. Salud*, 3 (2): 148-155
- Schmittgen T. & Livak K. (2004). Analysis of relative gene expression data using real - time quantitative PCR and the 2⁻Delta C(T) Method *New England Journal. Medical*. 32(178).
- Schmittgen, T. y Livak K. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*.3(6):1101-8.
- Segura, M. (2015). Tratamiento Oncológico No Quirúrgico del cáncer pulmonar, mesotelioma maligno de pleura y tumores de mediastino
- Scrimini, S., Pons, J. y Sauleda, J. (2016) Células mieloides supresoras: potencial vínculo entre la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y el cáncer de pulmón, *Archivos de Bronconeumología*, 52(1): 29-35. Doi: 10.1016/j.arbres.2015.07.003.
- Shurin, M., Lu, L., Kalinski, P., Stewart, A. y Lotze M. (1999). Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer Semin Immunopathol*.21(3):339-59.
- Shi, Q., Cai, X., Shi, G., Lv, X., Yu J, y Wang F. (2018). Interleukin-4 protects from chemotherapy-induced peripheral neuropathy in mice modal via the stimulation of IL-4/STAT6 signaling. *Acta Cir Bras. Jun*;33(6):491-498. doi: 10.1590/s0102-865020180060000003.
- So, H., Kim, H., Kim, Y., Kim, E., Pae, H. O., Chung, H. T. y Park, R. (2008). Evidence that cisplatin-induced auditory damage is attenuated by downregulation of pro-inflammatory

- cytokines via Nrf2/HO-1. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology: JARO*, 9(3), 290–306. doi:10.1007/s10162-008-0126-y
- Stoecklin, G., Tenenbaum, S., Mayo, T., Chittur, S., George, A., Baroni, T., Anderson, P. (2008). Genome-wide analysis identifies interleukin-10 mRNA as target of tristetraprolin. *The Journal of biological chemistry*, 283(17), 11689–11699. doi:10.1074/jbc.M709657200
- Stordeur, P., Poulin, L., Craciun, L., Zhou, L., Schandené, L., De Lavareille, A. Goriely, S. & Goldman, M. (2002). Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. *Journal of Immunological Methods* 259;(55 – 64) Recuperado de: doi: 10.1016/S0022-1759(01)00489-6.
- Setrerrahmane, S. y Xu, H. (2017). Tumor-related interleukins: old validated targets for new anti-cancer drug development, *Molecular Cancer*, 16:153 Doi. 10.1186/s12943-017-0721-9
- Surriabre, P., Allende, G., Prado, M., Cáceres, L., Bellot, D., Torrico, A., Ustariz, K., Rojas, S., Barriga, J., Calle, P., Villarroel, L., Mary, R., Baay, M., Rodriguez, P. y Fontaine V. (2017). Self-sampling for human papillomavirus DNA detection: a preliminary study of compliance and feasibility in BOLIVIA. *BMC Women's Health*, 17(135) doi: 10.1186/s12905-017-0490-z
- Taus, A., Vollmer, I. y Arriola, E. (2011). Mutaciones de sensibilidad y resistencia del gen epidermal growth factor receptor (EGFR) en el cáncer de pulmón de célula no pequeña: una realidad clínica. *Archivos de Bronconeumología*, 47(2): 103-105. Doi: 10.1016/j.arbres.2010.06.013.
- Tume, L. (2014). Las alteraciones epigenéticas en la progresión del cáncer. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 13(4): 236-243.
- Torabi, A., Tahmoorespur, M., Vahedi, F., Mosavari, N. & Nassiri, M. (2013). Quantiation of IL-4, IL-10 and IFN- γ Genes Expression after Immunization of Mice with CFP-10 and ESAT-6 Containing Vectors. *Iranian Journal of Immunology*, 10(4), 205-215.

- Ünlü, A., Nayir E., Ay, H., Kirca, O. y Özdoğan, M. (2016). *Aloe vera* and cancer. *Turk J Oncol*, 31(2):68-72. doi: 10.5505/tjo.2016.1433
- Valdespino, V., Valdespino, P. y Valdespino, V. (2013). Alteraciones genómicas estructurales y funcionales de las células tumorales en cánceres esporádicos: el modelo del cáncer mamario. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 12(6): 419-425.
- Vahedi, G., Taghavi, M., Kheirollahzade, A. y Habibian, R. (2011). The effect of *Aloe vera* extract on humoral and cellular immune response in rabbit. *African Journal of Biotechnology*. 10.
- Villegas, C. y Ramírez, D. (2015). Las células Treg en la inmunomodulación e inflamación asociada al cáncer. *Revista de la Facultad de Medicina*, 58(6): 5-17
- Vikis, H., Gelman, A., Franklin, A., Stein, L., Rymaszewski, A., Zhu, J. y You, M. (2012). Neutrophils are required for 3-methylcholanthrene-initiated, butylated hydroxytoluene-promoted lung carcinogenesis. *Molecular carcinogenesis*, 51(12), 993–1002. doi: 10.1002/mc.20870
- Vinueza, Christian. (2009). PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular (Real Time PCR: the new age of cellular genetic information). *RedVet*. X.
- Vila, R. & Guinea, M. Gel de *Aloe vera*. *Revista de Fitoterapia*, 2001; 1 (4): 245-256
- Wang, G. Petzke, M. Iyer, R. Wu, H. & Schwartz I. (2008). Pattern of Proinflammatory Cytokine Induction in RAW264.7 Mouse Macrophages Is Identical for Virulent and Attenuated *Borrelia burgdorferi* *The Journal of Immunology* 180 (12) 8306-8315; doi: 10.4049/jimmunol.180.12.8306.
- Ward, E. M., Flowers, C. R., Gansler, T., Omer, S. B. and Bednarczyk, R. A. (2017), The importance of immunization in cancer prevention, treatment, and survivorship. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67: 398–410. doi:10.3322/caac.21407.

- Wong, M. y Medrano, J. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 39(1):75-85
- Waters, J., Pober, J. y Bradley, J. (2013). Tumour necrosis factor and cancer. *Journal of Pathology* 230: 241–248 doi: 10.1002/path.4188
- Wajant, H. (2009). The role of TNF in cancer. *Results Probl Cell Differ*. 49:1-15. doi: 10.1007/400_2008_26.
- World Health Statistics 2018. Luxembourg: World Health Organization; 2018 (http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2018/en/ acceso 12 de junio de 2018).
- Xue W. y Warshawsky D. (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol*. 206(1):73-93.
- Yates, K. (2012). Acemannan Review. *Cela Care*
- Zamora, P. (2018). Nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento del cáncer de mama. Madrid. España.
- Zamarron, B. y Chen, W. (2011). Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression. *Intternattiionall Journnall off Biollogiicall Sciencess*, 7(5):651-658
- Zhou, X., Li, Z. y Zhou J. (2017). Tumor necrosis factor α in the onset and progression of leukemia. *Exp Hematol*. 45:17-26. doi: 10.1016/j.exphem.2016.10.005.
- Zuluaga, M., Valencia, A. y Ortiz, I. (2009). Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos. *Medicina UPB*, 28(1): 33-41

ANEXOS

Anexo 1. Aval ético

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**
COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE LA UMSA
CEI - UMSA
Resolución Honorable Consejo Universitario No. 125/10

**CERTIFICADO DE AVAL ÉTICO**
Código de Registro: CEI-UMSA0616

A quien corresponda,

El Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Mayor de San Andrés (CEI-UMSA), en el marco de la VI Convocatoria para Proyectos financiados con recursos del IDH 2015-2016 (Res. HCU No. 393/2014), ha recibido para su evaluación y aval ético el Proyecto:

Título del Proyecto: 'Determinación de la actividad anticancerígena y efecto potencializador en combinación con fármacos citotóxicos del *Aloe vera* de altura de la Comunidad de Cahuyuma del departamento de La Paz, Bolivia'

Coordinador responsable: Juan Antonio Ávila Illanes
Co-coordinador responsable: Luis Fernando Sosa Tordoya
Institución proponente: Unidad UIB-B - Instituto SELADIS, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas

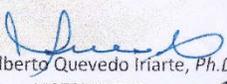
El proyecto fue evaluado bajo la normativa internacional en ética de la investigación (Pautas CIOMS/OMS; Helsinki/AMM, Ezekiel Emanuel), en la que se incluyen los principios y criterios éticos que se deben tomar en cuenta para investigaciones que involucran seres vivos, según aplique:

- Validez social** (la pertinencia, atinencia y relevancia del proyecto)
- Validez científica** (que el proyecto cumple con todo el rigor de la metodología científica)
- Selección equitativa del sujeto** (tamaño de la muestra, criterios de inclusión / exclusión, participación de grupos vulnerables, etc.)
- Relación favorable del riesgo/beneficio** (que el riesgo sea mínimo y el beneficio mayor para los sujetos del estudio)

Una vez evaluado el Proyecto, así como las correcciones/complementaciones realizadas por el equipo investigador, el CEI-UMSA certifica que el proyecto 'Determinación de la actividad anticancerígena y efecto potencializador en combinación con fármacos citotóxicos del *Aloe vera* de altura de la Comunidad de Cahuyuma del departamento de La Paz, Bolivia' cumple con los requisitos éticos arriba mencionados, por lo que le otorga el presente **CERTIFICADO DE AVAL ÉTICO**.

La emisión de este AVAL es válida solo para este proyecto y obliga al equipo de investigadores, al fiel cumplimiento y compromiso de desarrollo de actividades, en el marco de lo propuesto, corregido y recomendado; lo contrario, podría dar lugar a la revocación de este AVAL.


Dra. Katty Terrazas Aranda, M.Sc., Ph.D.
Coordinador Comité de Ética de la Investigación
UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS


Dr. Alberto Quevedo Iriarte, Ph.D.
VICERRECTOR
Presidente Comité de Ética de la Investigación
UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS



La Paz, Abril de 2016
Cc/ Coordinación del Proyecto., DIPGIS., CEI-UMSA

Av. Villazón N° 195, Monoblock, Piso 1 Telf. (591-2) 2440493
e-mail: cei@umsa.bo - La Paz - Bolivia

Anexo 2. Tabla Excel modelo para la manipulación de los datos, obtenidos por el equipo.

EXPRESION DEL GEN DEL GEN X EN MUESTRA DE RATON SIN TRATAMIENTO Y CON TRATAMIENTO CON ALOE VERA						
MUESTRA	CT CITOCINA	CT CONTROL ENDOGENO	Δ CT (PROM CT GEN INTERES - PROM CT CONTROL)	$\Delta\Delta$ CT (PROM Δ CT DEL TRATAMIENTO - PROM CT S/TRATAMIENTO)	VALOR NORMALIZADO RELATIVO AL S/T $2^{-\Delta\Delta$ CT	CORECCION
SIN TRATAMIENTO	Ct 1	Ct 1				
	Ct 2	Ct 2				
	Ct 3	Ct 3				
			Δ CT 1	Δ CT 1 - Δ CT 1		
TRATAMIENTO	Ct 1	Ct 1				
	Ct 2	Ct 2				
	Ct 3	Ct 3				
			Δ CT 2	Δ CT 2 - Δ CT 1	$2^{-\Delta\Delta$ CT	$-1/2^{-\Delta\Delta$ CT

En el anexo 1 observamos los primeros 3 Ct que corresponden a tratamiento calibrador en nuestro caso fueron ratones que no fueron tratados con ningún tipo de tratamiento, del mismo se obtuvo 3 Ct de su control endógeno, en seguida, se observa 3 Ct que corresponde al tratamiento ensayo (en esta oportunidad se trataran de manera independiente ya sea los ratones tratados con gel de aloe vera, cisplatino o la combinación de ambos), del mismo se obtuvo 3 Ct de su control endogeno.

Se hace una resta Ct del gen de interés menos el Ct del control endógeno correspondiente, ya sea del tratamiento calibrador y por otro lado del tratamiento en estudio. Del promedio de estas diferencias, se aplica la diferencia de Δ CT-2 del tratamiento en estudio con el Δ CT-1 que corresponde al promedio de la diferencia del tratamiento calibrador. Este valor se conoce como $\Delta\Delta$ CT, ese mismo valor se eleva a la potencia negativa de 2, con el cual obtenemos los niveles de expresión del gen respecto al control endógeno bajo la influencia del tratamiento. Por otro lado, para interpretar valores menores a 1 se realiza una segunda operación al valor de $\Delta\Delta$ CT, la unidad negativa se divide sobre el valor de $\Delta\Delta$ CT, lo cual nos muestra números mayores a uno, pero que se interpreta como represión del gen respecto al control endógeno influenciado por el tratamiento en estudio.