
Capacidad pro-apoptótica *in vitro* de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata* sobre una línea celular de cáncer de mama.

Jeniffer Williams Ibarra¹, Yenddy Carrero², José Homero Vargas¹ y Michael Acosta¹

¹Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador.

²Facultad de Ciencias de la Salud. Carrera de Medicina. Laboratorio de Biología Molecular y Celular. Universidad Técnica de Ambato. Ambato, Ecuador.

Palabras clave: Bcl-2, BAX; extracto plantas; *Valeriana*; cáncer de mama.

Resumen. El cáncer representa un problema de salud pública a nivel mundial, con altas tasas de incidencia y mortalidad en países desarrollados y no desarrollados. En la actualidad se están evaluando alternativas terapéuticas de origen natural, con el propósito de establecer tratamientos más eficientes y menos invasivos. Dado que la apoptosis es el tipo de muerte programada que experimentan las células cancerosas por los tratamientos con los fármacos antineoplásicos, el objetivo de esta investigación, fue evaluar *in vitro* la capacidad pro-apoptótica y citotóxica de los extractos de valeriana, sobre una línea celular de cáncer de mama (MCF-7). En este estudio las células MCF7 se cultivaron y trataron con diferentes concentraciones de los extractos de la raíz, hojas y tallos de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata*. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT. Para la determinación de la expresión génica de las proteínas anti y pro-apoptóticas (Bax, Bcl-2 y p53), se usó el ensayo de la PCR cuantitativa de transcripción inversa. Las diferentes concentraciones de los extractos (10^{-8} a 10^{-1} mg/mL) disminuyeron la viabilidad (proliferación) celular en concentraciones dependientes. Estos extractos indujeron la expresión génica de las proteínas Bax y Bcl-2, pero no de p53. La expresión de Bax fue mayor que la de Bcl-2 e indujo un elevado índice Bax/Bcl-2 (condición pro-apoptótica). En conclusión, se determinó que los extractos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* poseen efecto reductor de la viabilidad (proliferación) de la línea celular de cáncer de mama MCF-7, probablemente mediado por la alteración de la relación de las proteínas Bax y Bcl-2 vinculadas a la apoptosis.

In vitro pro-apoptotic capacity of Valerian rigid and Valerian decussata in cancer cells.*Invest Clin* 2022; 63 (4): 376 – 387**Keywords:** Bcl-2; BAX; plant extract; *Valeriana*; breast cancer.

Abstract. Cancer represents a worldwide public health problem, with high incidence and mortality rates in developed and undeveloped countries. Currently, therapeutic alternatives of natural origin are being evaluated with the purpose of establishing more efficient and less invasive treatments. Apoptosis is the type of programmed death cancer cells undergo during treatment with anti-neoplastic drugs. Therefore, the aim of this research was to evaluate *in vitro* the pro-apoptotic and cytotoxic capacity of valerian extracts on a breast cancer cell line (MCF-7). In this study, MCF7 cells were cultured and treated with different concentrations of the extracts of the root, leaves and stems of *Valeriana rígida* and *Valeriana decussata*. Cell viability was assessed by the MTT assay. Quantitative reverse transcription PCR assays were used for the determination of gene expression of anti- and proapoptotic proteins (Bax, Bcl-2, p53). Different concentrations of the extracts (10^{-8} to 10^{-1} mg/mL) decreased cell viability (proliferation) in a concentration-dependent manner. These extracts induced gene expression of Bax and Bcl-2 proteins but not of p53. The expression of Bax was higher than that of Bcl-2, causing an elevated Bax/Bcl-2 ratio (proapoptotic condition). In conclusion, it was determined that *Valeriana decussata* and *Valeriana rígida* extracts have a viability (proliferation) reducing effect on the MCF-7 breast cancer cell line, probably mediated by altering the ratio of Bax and Bcl-2 proteins linked to apoptosis.

Recibido: 21-04-2022 Aceptado: 16-07-2022

INTRODUCCIÓN

El cáncer se define como el crecimiento anormal del tejido, debido a la proliferación incontrolada de células anormales o mutantes¹. Es una enfermedad que representa un problema de salud pública, con una alta incidencia de muerte en todo el mundo². Uno de los principales mecanismos de control en los organismos, es la muerte celular programada; proceso genéticamente regulado, en el cual las células deben morir para preservar el desarrollo, homeostasis e integridad de los organismos multicelulares³. Entre estos mecanismos se encuentra la apoptosis, que

se caracteriza por ser un proceso controlado por la velocidad de división celular, además de reducir la proliferación de células malignas⁴.

Existen diferentes tipos de tratamiento contra el cáncer que han sido estudiados y representan a los agentes quimioterapéuticos que permiten el control y la remisión⁵. Sin embargo, estos agentes promueven la aparición de efectos secundarios a los procedimientos oncológicos y que inciden directamente en la calidad de vida de los pacientes⁶.

A nivel mundial las plantas representan una gran alternativa, que sienta las bases del estudio de sus beneficios en la medicina actual. Durante siglos han sido empleadas con

diferentes propósitos médicos, entre ellos el tratamiento del cáncer. La Organización Mundial de la Salud (OMS), reconoce los beneficios del uso de plantas en Medicina por sus efectos farmacológicos⁷. Se han aislado diferentes moléculas a partir de ellas, para la elaboración de fármacos quimioterapéuticos, que han demostrado una alta eficacia clínica y potencial anticancerígeno.

La palabra valeriana designa a cualquier planta del género *Valeriana*, el cual pertenece a la familia *Caprifoliaceae* y cuya especie más conocida es *V. officinales*⁸. Es una planta originaria de Europa y partes de Asia. Se conocen alrededor de 400 especies distribuidas en diferentes lugares del mundo, entre ellos Ecuador. Su morfología es muy variable, forman fuertes rizomas con sus raíces alargadas y pequeñas ramificaciones y se caracterizan por emitir un olor fuerte y desagradable. Se le han conferido diferentes propiedades medicinales debido a su composición química (valtrato, flavonoides, aceites como valeranona y valeranal, monoterpenos bicíclicos y ácidos valéricos), y es comúnmente usada para tratar afecciones médicas como el insomnio, el estrés, enfermedades neurológicas y la ansiedad⁹.

El valtrato es considerado un éster epoxi iridoide, aislado de la medicina herbal china, especialmente de la *Valeriana jatamansi* Jones, y se le ha conferido actividad antiproliferativa contra diversas líneas celulares de cáncer humano; sin embargo, los mecanismos moleculares implícitos no se conocen con exactitud¹⁰.

En la actualidad, se han reportado investigaciones en las cuales se han incluido plantas de valeriana, se usaron semillas, rizomas, raíces, estolones, extractos, aceites esenciales, resinas y otros componentes, para el estudio de las vías apoptóticas y los efectos antitumorales que estas especies pudiesen inducir¹¹.

Los ácidos linolénicos conjugados (CLN), obtenidos de los aceites de semillas de *V. officinalis*, demostraron que podrían ser fácilmente absorbidos por las células cance-

rosas como ácidos grasos libres, mostrando un buen potencial como sustancias antitumorales¹².

De igual forma, se ha probado el efecto de los extractos de valerianas en algunos tipos de cáncer como el de hígado¹³, pancreático¹⁴, cervical¹⁵ y de mama. Shi y col.¹⁶ demostraron que el ácido valérico obtenido de raíces de *V. officinalis*, puede disminuir la proliferación de células de cáncer de mama, mediando modificaciones epigenéticas como la inhibición de las histonas desacetilasas (HDAC) y alteraciones en la metilación del ADN. Estas propiedades del ácido valérico en la HDAC también tienen un amplio espectro de actividad anticancerígena, con una alta citotoxicidad para el cáncer de hígado en ensayos de proliferación celular, formación de colonias, cicatrización de heridas, invasión celular y formación de esferoides en 3D. Algunos modelos de ratón demostraron que la administración sistemática de ácido valérico encapsulado en nanopartículas a base de lípidos, disminuye significativamente la carga tumoral, mejorando la tasa de supervivencia¹³.

Se ha descrito ampliamente el proceso de la apoptosis y su función biológica en la patogenia de varias enfermedades tales como el cáncer, trastornos metabólicos, neuropatías, lesiones miocárdicas y alteraciones del sistema inmunitario. Tomando como premisa que aproximadamente el 50% de los tumores humanos están asociados a mutaciones del gen p53, es de vital importancia el estudio de los mecanismos de apoptosis en el proceso de carcinogénesis, así como el efecto de principios activos en estos mecanismos, en pro de la identificación de posibles blancos terapéuticos. Las señales de apoptosis están reguladas por diferencias en la expresión de proteínas promotoras e inhibitorias, especialmente los miembros de la familia Bcl-2 que están integrados por: Bcl-2, Bax, Bad, Bel-X1, Bel-Xs, Mcl-1 y algunas proteínas efectoras como las caspasas. Es necesario conocer la expresión de proteínas y su incremento y disminución a expensas de

posibles tratamientos que puedan ser coadyuvantes en el proceso de muerte celular en células cancerígenas.

En virtud que existen diversos mecanismos por dilucidar y tomando en consideración que se han reportado otras especies de valeriana propias de la región, que pudiesen estudiarse en modelos celulares, el presente estudio planteó como objetivo determinar el potencial terapéutico *in vitro* de *Valeriana rígida* y *Valeriana decussata* en células MCF-7, mediante la determinación de la capacidad pro-apoptótica y citotóxica del extracto de sus hojas, tallos y raíces.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de extractos

Los especímenes de valerianas se recolectaron en el cerro Igualata, ubicado en el cantón Quero, perteneciente a la provincia de Tungurahua-Ecuador, previa autorización emitida por la Dirección Provincial del Ambiente Tungurahua N°06-2018-IC-FLO-FAU-DPATVS. A cada una de las especies se les evaluó las características organolépticas y físicas; como estado, olor y estructura de hojas, tallos, flores y raíces. El material vegetal recolectado fue transportado al laboratorio de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología para llevar a cabo el proceso de lavado y secado a 60°C. Luego se pulverizaron, tamizaron y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso posterior. Para la obtención del extracto, se resuspendió el material vegetal pulverizado en PBS 1X estéril relación 1:20, después se homogenizó con un vórtex. Posteriormente, cada extracto fue transferido a otro tubo estéril de 15 mL a través de un filtro de 0,22 μm , con el objetivo de eliminar contaminantes o material seco y así conseguir la esterilidad. Se obtuvo un extracto de tipo acuoso con PBS en concentración 1X en relación 1:20 con los extractos de Valeriana, los cuales presentaron una coloración marrón de poca viscosidad. Se escogió este tipo de extracto debido a la composición bioquímica de las

valerianas que, a la habitual administración farmacológica y el PBS como solución tampón, mantiene la presión osmótica y el equilibrio de las células. Todos los extractos se mantuvieron en congelación (-20°C).

Cultivo Celular

Para el desarrollo de la investigación se empleó la línea celular MCF7 ATCC®HTB-22™ derivada del cáncer de mama humano. Las células se cultivaron en frascos Roux de 75mL, en medio DMEN (Dulbeccos Modified Eagle Medium), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina/estreptomocina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 1% de glutamina. Las células fueron incubadas a 37°C, 5% de CO₂ y atmosfera húmeda. Los pases celulares se realizaron en base a la proliferación y población celular contenida en los frascos, con una confluencia entre el 80 y 100%. Para el conteo celular se utilizó una cámara de Neubauer siguiendo el protocolo establecido, a la cual se le añadieron 10 μL de la disolución final teñida con “azul tripán” y se leyó en un microscopio óptico (magnificación 10X). Finalmente, se obtuvo el número de células viables por cada mL de suspensión.

Análisis de viabilidad celular

Para calcular la citotoxicidad de los extractos en células MCF-7, se empleó el ensayo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) de Invitrogen™ (USA). El tratamiento con los extractos se realizó a diferentes concentraciones en diluciones seriadas, en función de la base logarítmica 10 (Rango 10⁻⁸ a 10⁻¹ de acuerdo con la concentración inicial de proteínas contenidas en cada extracto: *decussata* raíz (DDR) (4mg/mL), *decussata* hoja y tallo (DHT) (6,3 mg/mL), *rígida* hoja y tallo (RHT) (3,6 mg/mL) y *rígida* raíz (RR) (3,2 mg/mL). Seguidamente se agregaron los extractos en las células cultivadas en placas de 96 pocillos con una densidad de 1,0 x 10⁴ cel/pozo y se leyeron en un lector de placas Perkin Elmer Víctor X3 (USA), según el protocolo descrito por

la casa comercial ¹⁷. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. El valor de la concentración inhibitoria media (IC50) se determinó utilizando el programa GraphPad Prism V7.0 (Software Inc., San Diego, CA, USA).

Determinación de Proteínas

Para la cuantificación de proteínas se empleó el método Bradford, se elaboró la curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA) a 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,25, 1,50 y 1,75 mg/mL. se realizó la lectura de las absorbancias a 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas (PerkinElmer Víctor X3, USA).

Expresión Génica

Para comparar los datos experimentales, se realizó una RT-qPCR para determinar la expresión de Bax, Bcl-2 y p53 a partir del ARN obtenido de las células MCF-7 tratadas y del control (no tratadas).

El proceso se inició con la extracción de ARN de la suspensión celular, utilizando el estuche PureLink® RNA Mini Kit, según el protocolo del fabricante ¹⁸, se determinó el valor de concentración (ng/ μ L) y se almacenó a -80°C (12). El ADNc se sintetizó a partir del ARN total utilizando el protocolo Maxima First Strand cDNA Synthesis (ThermoScientific) ¹⁹.

Finalmente, para realizar la RT-qPCR se utilizó el protocolo GoTaq® qPCRMaster. En una tira de tubos Eppendorf se agregaron 10 μ L de Mix (2X), 1 μ L de Forward Primer, 1 μ L de Reverse Primer (Tabla 1), 1,6

μ L del templado de ADNc por cada tubo (según la reacción) y se completó hasta 20 μ L con agua libre de ARNasa. Los tubos se centrifugaron y fueron colocados en el Thermal Cycler (CFX96** Real-time System, USA). El equipo se programó según el protocolo de Promega (Promega GoTaq®, 2014). Las condiciones de amplificación fueron: activación de la polimerasa a temperatura de 95°C durante 30 segundos, desnaturalización del ADNc a 95°C durante 15 segundos; amplificación a 58°C durante 25 segundos en un total de 32 ciclos.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron con el programa GraphPadPrism V7.0 (Software Inc., San Diego, CA, USA). Se expresaron como media y desviación estándar ($\bar{x} \pm DS$). Para el análisis de varianza se utilizó ANOVA de un solo factor con post test de Bonferroni, considerando significativos los valores de $p \leq 0,05$ con un 95% de límite de confianza.

RESULTADOS

Efecto de los extractos en la viabilidad de las células neoplásicas

La Fig. 1 muestra el efecto de los extractos de DR y DHT en la viabilidad de las células neoplásicas. Si bien se observaron diferentes grados de efecto inhibitorio según las dosis de los extractos, el mayor efecto inhibitorio se encontró en la dosis de 10⁻³ mg/mL. La Fig. 2 muestra el efecto inhibitorio de los extractos de la RR y la RHT. La RHT

Tabla 1
Secuencia de Primers.

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGA
ACTINA	CGGTTCCGATGCCCTGAGGCTCTT	CGTCACACTTCATTGATGGAATTGA
BAX	CAAGACCAGGGTGGTTGGG	ATCTTTGTGGCGGGAGTG
Bcl-2	CATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	GCCGGTTCAGGTACTCAGTCA
p53	GACGGTGACACGCTTCCCTGGATT	GGGAACAAGAAGTGGAGAATGTCA

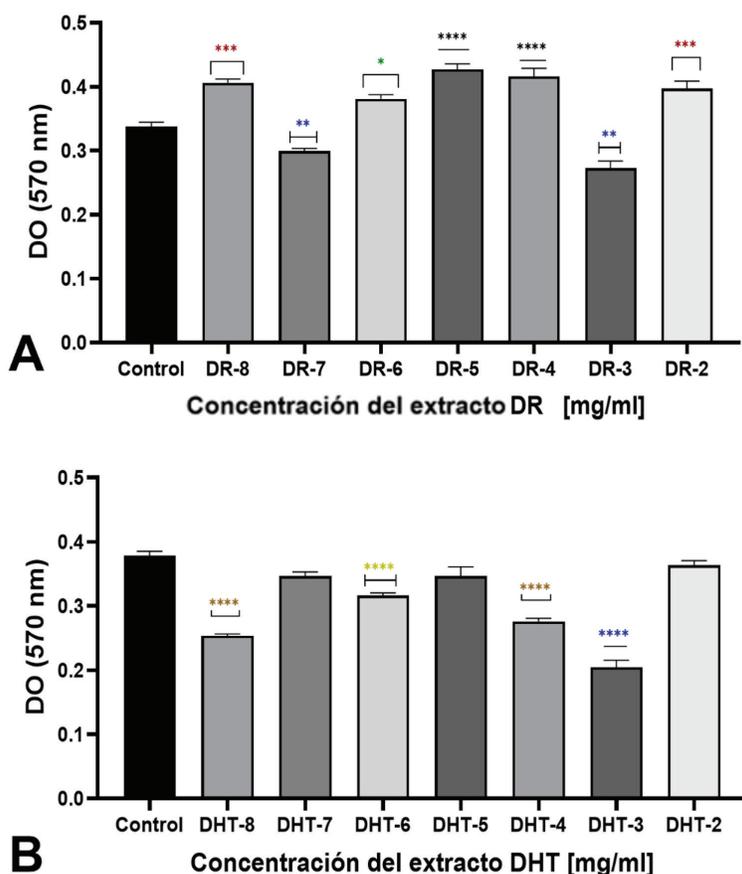


Fig. 1. Ensayo de viabilidad de los extractos de valeriana en células MCF-7. Las células se sembraron a 1×10^4 células por pozo y se trataron con dosis crecientes (10^{-8} mg/mL a 10^{-1} mg/mL) de *Valeriana decussata* raíz (DR: 4 mg/mL) (A) y *Valeriana decussata* hojas y tallos (DHT: 6,3 mg/mL) (B). Los experimentos se realizaron por triplicado para evaluar la concentración inhibitoria media máxima (IC50: 10^{-3} mg/mL) para los extractos de plantas. Tratamiento Vs. control ($\alpha = 0,05$, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$).

presentó fluctuaciones en el efecto inhibitorio de acuerdo con las dosis (Fig. 2A), sin embargo, todas las dosis de RR fueron similarmente inhibitorias (Fig. 2B). Ambos extractos tuvieron el mayor efecto inhibitorio en la dosis de 10^{-3} mg/mL.

Expresión génica de proteínas vinculadas con la apoptosis

No se observó expresión génica de la proteína p53 en las células tratadas con los extractos, sin embargo y en menor proporción a las células no tratadas, se apreció expresión de Bax y Bcl-2 en las células neoplásicas tratadas, encontrándose mayor

expresión de Bax (Figs. 3 A y B). Como es esperado índice Bax/Bcl-2 se observa elevado en los diferentes tratamientos con los extractos, presentándose los mayores valores en los tratamientos con extractos de *Valeriana decussata* (HT) y *Valeriana rígida* (RR) (Fig. 3C).

El gen de control endógeno GAPDH no presentó variación significativa en su expresión génica después de la aplicación de los tratamientos de *Valeriana decussata* y *Valeriana rígida* (Fig. 4). La expresión relativa normalizada de la proteína Bcl-2 y Bax se muestran en la (Fig. 4).

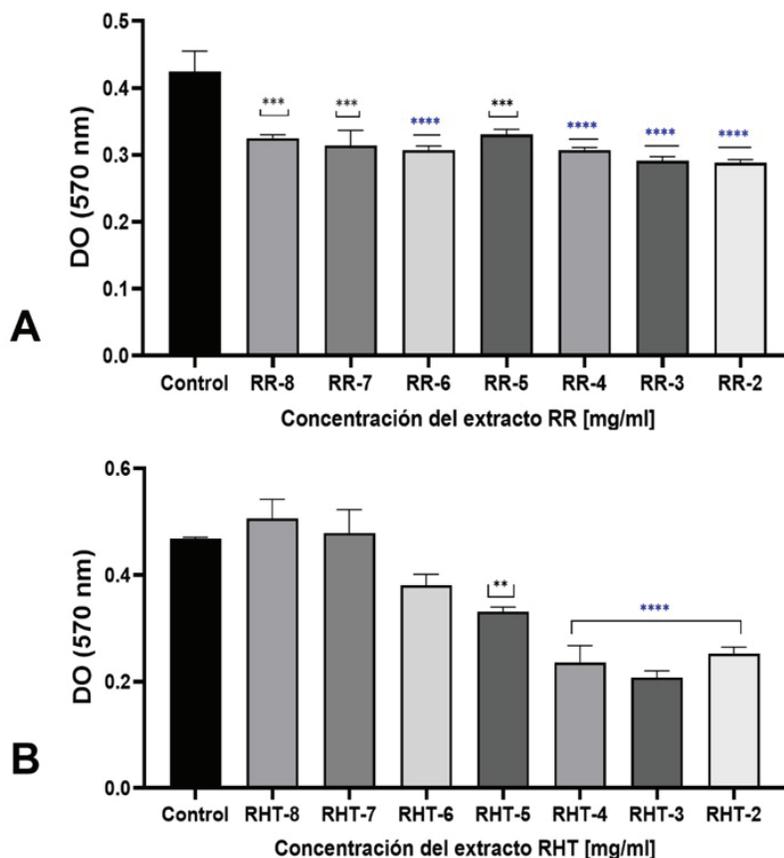


Fig. 2. Ensayo de viabilidad de los extractos de valeriana en células MCF-7. Las células se sembraron a 1×10^4 células por pozo y se trataron con dosis crecientes (10^{-11} mg/mL a 10^{-1} mg/mL) de Valeriana rígida raíz (RR: 3,2 mg/mL) (A) y Valeriana rígida hojas y tallos (RHT: 3,6 mg/mL) (B). Los experimentos se realizaron por triplicado para evaluar la concentración inhibitoria media máxima (IC50: 10-3 mg/mL) para los extractos de plantas. Tratamiento Vs. control ($\alpha = 0,05$, ** $P < 0,05$; **** $P < 0,0001$).

DISCUSIÓN

Es de gran importancia el estudio de compuestos fitoquímicos en pro de la búsqueda de alternativas o coadyuvantes en la terapéutica convencional del cáncer. A la fecha se han atribuido múltiples propiedades a las valerianas principalmente a la *V. officinalis*; sin embargo, son muchas las variedades que quedan por estudiar, algunas endémicas de la Sierra del Ecuador.

En la actualidad, no se conoce un efecto real de la Valeriana sobre células cancerígenas, ya que su uso terapéutico se ha limitado al sistema nervioso para el tratamiento del insomnio y la ansiedad. Sin embargo, la

Valeriana tiene compuestos que potencian la interacción sinérgica de otros medicamentos depresores del SNC (sistema nervioso central) al inducir la eficacia del tratamiento ²¹. También existen investigaciones de la inducción de la actividad ansiolítica, la relación con el efecto del ácido valérico y la interferencia del ácido acetoxi valerénico. Garrido en el 2007 determinó mediante la técnica de cromatografía de gases, que la *Valeriana Prionophylla* contiene ácido valerénico, acetoxivalerénico e hidroxivalerénico y los Valepotriatos contienen derivados como el baldrinal, homobaldrinal, acevaltrato, didrovaltrato, didrovaltrato, isovaltrato y valtrato. La cantidad de compuestos y ácidos

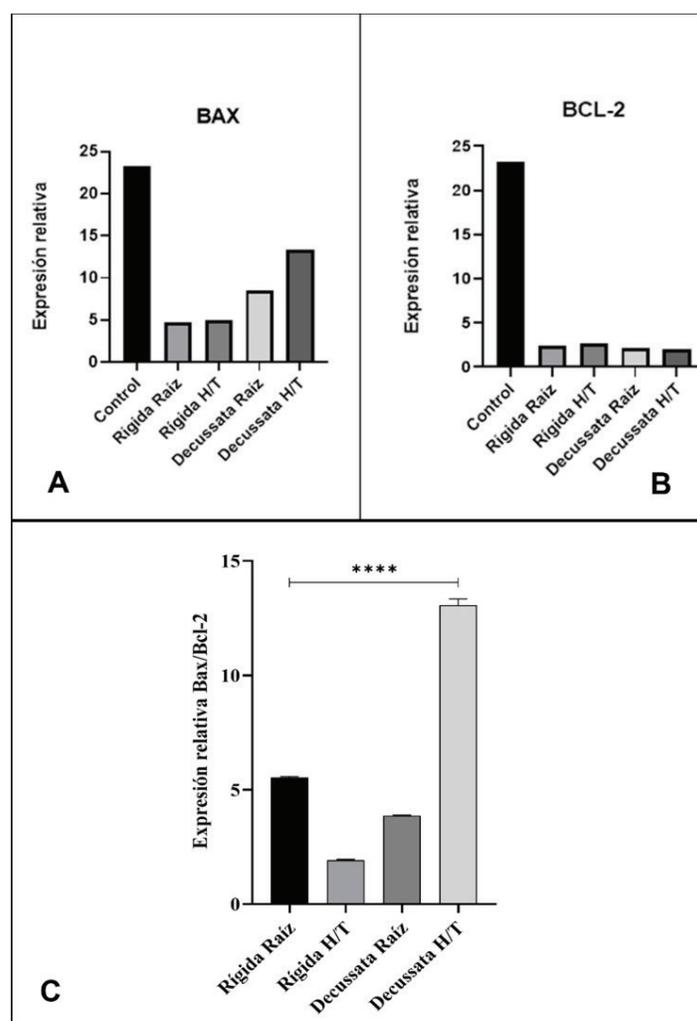


Fig. 3. Expresión relativa normalizada de las proteínas Bax (A) y Bcl-2 (B) según el método $\Delta\Delta Ct$: Se compara la expresión relativa del gen endógeno GAPDH vs la expresión génica de las células MCF-7. La expresión relativa Bax/Bcl-2 se muestra en el panel C (**** $P \leq 0,0005$), (** $P \leq 0,05$), (* $P \leq 0,05$).

tuvo diferencias en función de los extractos a partir de hojas y raíces ²².

El ensayo de MTT evidenció un potencial efecto de los extractos en la proliferación celular y el bajo nivel de citotoxicidad, mostrando el comportamiento y funcionalidad de las células MCF-7 sometidas a tratamientos ²³.

Los extractos inhiben la proliferación celular de forma dependiente a una concentración determinada en la dilución logarítmica 10^{-3} ²⁴. Al comparar el comportamiento celular con cada extracto se evidenció que

para ambas valerianas se obtuvieron mejores resultados de los extractos a partir de hojas y tallos. Esto puede ser ocasionado por composición bioquímica presente en las plantas que inducen a la inhibición en la proliferación celular.

La proliferación evidenciada en concentraciones logarítmicas diferentes a 10^{-3} posiblemente pudo ser ocasionada por la interacción entre las células y el extracto acuoso como lo mencionaron Flores y Martínez en 2019 ²⁵ dependiendo del tipo de planta y el extracto acuoso que se utilice, la prolifera-

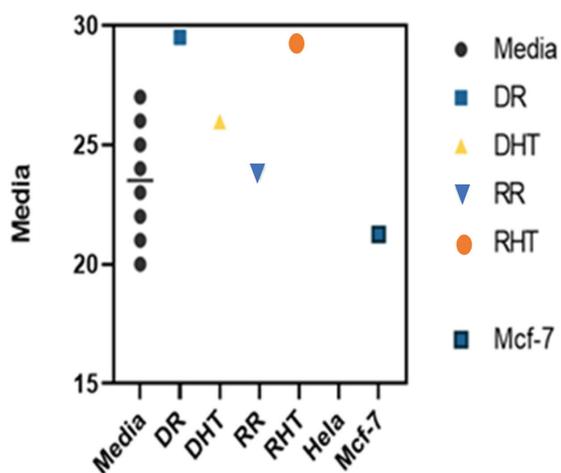


Fig 4. Análisis de los valores de Cts obtenidos para el gen GAPDH: Se analizó y validó al GAPDH como gen calibrador y de referencia. ($P > 0,05$) Las medias de las muestras estuvieron en el margen de la media para GAPDH ($P > 0,05$). *Valeriana decussata* raíz (DR) *Valeriana decussata* hojas y tallos (DHT) *Valeriana rigida* raíz (RR) *Valeriana rigida* hojas y tallos (RHT).

ción celular variará para diferentes concentraciones.

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre concentraciones, dependientes de las especies de valeriana y la estructura vegetal con la que se preparó el extracto y los ensayos; sin embargo, según otros estudios realizados con valeriana, las porciones subterráneas de la planta contienen mayor concentración de compuestos citotóxicos, lo cual podría explicar que en estas investigaciones la citotoxicidad fue mayor. Es importante mencionar que algunos extractos no presentaron diferencia significativa lo cual se pudo originar por la composición bioquímica de la planta, además que las especies incluidas no han sido estudiadas previamente. Esta variación puede ser ocasionada como una respuesta de las células ante sustancias extrañas, que considera como peligrosas para su interior o por compuestos presentes en la valeriana que inducen la proliferación, por lo cual es rele-

vante realizar a futuro ensayos fitoquímicos que muestren la composición los extractos.

Los resultados de la expresión génica mostraron variaciones de las proteínas que inducen la apoptosis; estos cambios pueden ser ocasionados por la composición bioquímica presente en las raíces, hojas y tallos de las Valerianas, de allí la importancia de haber realizado la presente investigación. Sin embargo, es necesario profundizar en la composición química y los grupos funcionales presentes en las diferentes especies de Valeriana que estarían incidiendo directamente en la capacidad pro-apoptótica de las células MCF-7.

Se pudo observar que la expresión de genes pro-apoptóticos Bax y Bcl-2 para RR y DHT no superaron el valor alcanzado por el control, esto es un indicativo de la ausencia de compuestos inductores de dichos genes o la represión de estos. Sin embargo, para las demás muestras, se evidenció un aumento de expresión con relación al control. Los valores bajos de expresión génica pueden ser debidos a varios factores, sin embargo, se cree que están principalmente relacionados con el solvente y el método usados para obtener el extracto. Según Páez-Hernández y col.²⁶, la mayor cantidad de compuestos con actividad quimiprotectora e inductora de los genes Bax y Bcl-2, se encuentra en los aceites esenciales de las plantas.

La relación de las proteínas Bcl-2 y Bax es muy importante en la activación de la apoptosis ya que esta depende de la regulación de ambas. Bcl-2 es una familia de proteínas que presenta actividad anti-apoptótica, que ha generado el estudio de su regulación en la apoptosis y la respuesta celular ante diferentes terapias contra el cáncer. Por su parte, Bcl-2 puede inducir o reprimir la liberación de factores indispensables para la apoptosis como citocromo c y el AIF (Factor inductor de apoptosis)²⁷. La proteína pro-apoptótica Bax es una subfamilia homóloga de Bcl-2. Para que se desencadene el proceso de apoptosis es necesaria la regulación de Bax/Bcl-2. Bax tiene como función principal

la permeabilidad de la mitocondria. Estudios realizados por Hussein y Chavi en 2015, demostraron que la inducción de apoptosis en células MCF-7 era ocasionada por la regulación de Bax²⁸, lo cual está relacionado con la inducción apoptótica de p53 que regula a otras proteínas pro-apoptóticas como Bax. En este estudio se pudo apreciar incremento en la expresión génica de Bax en relación con la expresión de Bcl-2, lo que conduciría a la permeabilización de las mitocondrias con el subsiguiente proceso apoptótico²⁹.

La proteína p53 no se expresó en las células tratadas con extractos de valeriana, esto pudo ser ocasionado por la interacción de los compuestos presentes en las especies de valeriana que indujeron a la activación de proteínas celulares, que pudieron afectar el funcionamiento de p53. Esto puede ser un indicativo de la proliferación celular a ciertas concentraciones de los extractos, ya que, si no se activa la proteína por daño genético o alteraciones en el mecanismo de control, puede ocasionar la proliferación celular³⁰.

La proteína p53 cumple diversas funciones biológicas y es un factor indispensable en los procesos intra y extracelulares. En el presente estudio, se evaluó la capacidad de inducción al suicidio celular apoptótico. Diferentes factores de estrés inducen a que la proteína p53 cruce la mitocondria, active la expresión de genes pro-apoptóticos e inhiba la expresión de genes anti-apoptóticos²⁶. Un estudio realizado en células MCF-7 con extracto de *Trifolium Pratens L.*, demostró que inducía apoptosis mediante la regulación de la proteína p53, de manera dependiente de la dosis y del tiempo del extracto, induciendo autofagia y apoptosis³¹. En nuestro estudio, la falta de expresión génica de la proteína p53 en las células tratadas con los extractos, sugiere un papel no relevante de esta proteína.

En función de los resultados obtenidos se puede inferir que las diferentes especies de Valeriana estudiadas, contienen compuestos que inducen la expresión de proteínas que dirigen la apoptosis en células cancerí-

genas de mama. Se requieren más estudios cuantitativos que permitan esclarecer el efecto de estos extractos en otros tipos de cáncer y la verificación cuantitativa del desarrollo de la apoptosis, debido a la expresión de las proteínas pro-apoptóticas como mecanismo de acción de estos sustratos. Este estudio establece la posibilidad del uso de los derivados de la valeriana para optimizar la terapia contra este tipo de cáncer.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Dirección de Investigación y Desarrollo (DIDE) por el financiamiento de los proyectos: “Estudio etnobotánico y bioensayos de plantas medicinales relacionadas con el tratamiento de cáncer de cérvix en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua, Ecuador, aprobado con resolución: 0904-CU-P-201, y “Caracterización morfológica molecular fitoquímica y métodos de propagación en especies silvestres del género valeriana de la provincia de Tungurahua” aprobado con la resolución: 1569-CU-P-2017.

Número ORCID de los autores

- Jennifer Williams Ibarra (JWI): 0000-0051-5129-0317
- Yenddy Carrero (YC): 0000-0003-4050-4468
- José Homero Vargas (JHV): 0000-0002-3627-8069
- Michael Acosta (MA): 0000-0001-9437-828X

Contribución de los autores

- Propuesta y diseño del trabajo YC/JHV.
- Trabajo Experimental YC/JWI/MA.
- Recolección/obtención de resultados YC/JWI/MA.
- Recolección de especies vegetales y preparación del material de estudio JHV/JWI.

- Análisis e interpretación de datos YC/JWI/MA.
- Redacción del manuscrito YC/JWI.
- Asesoría y Revisión crítica del manuscrito YC/JWI.
- Aprobación de versión final YC/JWI/JHV/MA.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. NIH. Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. Cáncer metastático. 2016 Disponible: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cancer-metastatico>
2. GLOBOCAN. Informe de OMS [Internet]. 2018 Available from: <https://www.redaccionmedica.ec/secciones/salud-publica/ecuador-registra-28-058-nuevos-casos-de-cancer-seg-n-informe-de-oms-92834>.
3. Martínez A, Gómez L, Rodríguez C. La muerte celular: un proceso indispensable para la vida. *Ciencia UANL* 2018; 21(87). Disponible: <http://cienciauanl.uanl.mx/?p=7517>.
4. Mohan H. Patología. 6ª ed. Médica Panamericana 2012; 45–49.
5. Pérez-Machado J, Lie-Concepción A. Apoptosis, mecanismo de acción. *Medimay* 2012;18(2):15 p. Disponible en: <http://revemhabana.sld.cu/index.php/remh/article/view/572>.
6. Murray M, Birdsall T, Pizzomo J, Reilly P. La Curación del Cáncer: Métodos Naturales - Michael Murray, Tim Birdsall, Joseph E. Pizzorno, Paul Reilly. Google Libros. 2004: 127–130 p. Disponible: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=w2PKw5JFAvgC&oi=fnd&pg=PA9&dq=tratamientos+naturales+contra+el+cancer&ots=k_GQmqiKYZ&sig=wEc6G0-tQSKoL5E8e7mo4-L4gT8#v=onepage&q=tratamientos+naturales+contra+el+cancer&f=false
7. S.N Fundación Salud y Naturaleza. Libro Blanco de los herbolarios y las plantas medicinales 2007.
8. DEEL. DEEL - Diccionario Etimológico Español en Línea [Internet]. 2020 . Disponible: <http://etimologias.dechile.net/>
9. Kutschker A. Revisión del género *Valeriana* (Valerianaceae) en Sudamérica austral. Vol. 68, *Gayana - Botanica*. Universidad de Concepcion; 2011. 244–296.
10. Li X, Chen T, Lin S, Zhao J, Chen P, Ba Q, Guo H, Liu Y, Li J, Chu R, Shan L, Zhang W, Wang H. *Valeriana jatamansi* constituent IVHD-valtrate as a novel therapeutic agent to human ovarian cancer: in vitro and in vivo activities and mechanisms. *Curr Cancer Drug Targets* 2013;13(4):472-483. doi:10.2174/1568009611313040009.
11. Centro de Investigación del Cáncer. Nuevos tratamientos. Estrategias terapéuticas derivadas de la Biología Molecular. Centro de investigación del Cáncer - Comprehensive Cancer Center Research [Internet]. 2017. Disponible en: <http://www.cicancer.org/es/nuevos-tratamientos-estrategias-terapeuticas-derivadas-de-la-biologia-molecular>
12. Honma T, Shiratani N, Banno Y, Shiratani N, Banno Y, Kataoka T, Kimura R, Sato I, Endo Y, Kita K, T Suzuki T, Takayanag T. Seeds of *Centranthus ruber* and *Valeriana officinalis* contain conjugated linolenic acids with reported antitumor effects. *J Oleo Sci* 2019;68(5):481-491. doi:10.5650/jos.ess19007
13. Han R, Nusbaum O, Chen X, Zhu Y. Valeric acid suppresses liver cancer development by acting as a novel HDAC inhibitor. *Mol Ther Oncolytics* 2020;19:8-18. Published 2020 Aug 29. doi:10.1016/j.omto.2020.08.017.
14. Chen L, Feng D, Qian Y, Cheng X, Song H, Zhang X, Wu Y, Huawei L, Liu Q, Cheng G, Yang B, Gu M. Valtrate as a novel therapeutic agent exhibits potent anti-pancreatic cancer activity by inhibiting Stat3 signaling. *Phytomedicine* 2021;85:153537. doi:10.1016/j.phymed.2021.153537.
15. Matsumoto T, Kitagawa T, Imahori D, Yoshikawa H, Okayama M, Kobayashi M, Kojima N, Yamashita M, Watanabe T. Cell death-inducing activities via 2Hsp inhibition of the sesquiterpenes isolated from *Va-*

- leriana fauriei. J Nat Med 2021;75(4):942-948. doi:10.1007/s11418-021-01543-9.
16. Shi F, Li Y, Han R, Alan F, Ronghua W, Olivia N, Qin Q, Xinyi C, Li H, Yong Z. Valerian and valeric acid inhibit growth of breast cancer cells possibly by mediating epigenetic modifications. Sci Rep 2021;11(1):2519. doi:10.1038/s41598-021-81620-x.
 17. Farshori N, Saad E, Mohammad M, Musarrat J, Ali A, Ahmed M. Anticancer activity of *Petroselinum sativum* seed extracts on MCF-7 human breast cancer cells. Asian Pacific J Cancer Prev 2013; 14. doi:10.7314/APJCP.2013.14.10.5719.
 18. Purelink®. PureLink™ RNA Mini Kit. Cell [Internet]. 2010;(12183020):1–4. Disponible en: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_rna_mini_kit_man.pdf
 19. Thermo Scientific™. Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, with dsDNase. 2019. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1671?SID=srch-srp-K1671#/K1671?SID=srch-srp-K1671>.
 20. Vaddavalli PL, Schumacher B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in cancer and aging [published online ahead of print, 2022 Mar 25]. Trends Genet 2022;S0168-9525(22)00037-3. doi:10.1016/j.tig.2022.02.010
 21. Ugalde M, Reza V, González-Trujano ME, Avula B, Khan IA, Navarrete A. Isobolographic analysis of the sedative interaction between six central nervous system depressant drugs and *Valeriana edulis* hydroalcoholic extract in mice. J Pharm Pharmacol 2005;57(5):631-639. doi:10.1211/0022357056000.
 22. Garrido J. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución de ácido valerénico o sus derivados en extracto de hojas y raíz de valeriana (*Valeriana prionophylla* Standl.) Universidad de San Carlos de Guatemala. USAC.2007; 38p. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2611.pdf
 23. Navarro E, Ginebra M. Desarrollo y Caracterización de Materiales Biodegradables para Regeneración Ósea [Internet]. Catalunya; 2005 Disponible en: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/93360/05Mnt05de11.pdf?sequence=5&isAllowed=y>
 24. Amiri A, Namavari M, Rashidi M, Fahmidehkar MA, Seğhatoleslam A. Inhibitory effects of *Cyrtopodion scabrum* extract on growth of human breast and colorectal cancer cells. Asian Pac J Cancer Prev 2015;16(2):565-570. doi:10.7314/apjcp.2015.16.2.565.
 25. Flores AMC, Martínez BM., Ruiz V, Reyes, Leyva. J. Evaluación *in vitro* de la actividad citotóxica y antitumoral de plantas medicinales en Cuetzalan del Progreso, Puebla, México. Polibotánica [Internet]. 2019;0(46):113–35.Disponible en: <http://www.polibotanica.mx>.
 26. Páez-Hernández G, Espinosa-Andrews H, Castillo-Herrera G, Herrera-Rodríguez S. Uso de aceites esenciales como agentes quimiopreventivos contra el cáncer colorectal. RevSalJal 2020; 6 (3):199-205.
 27. Chuaqui R, Cuello M, Emmert-Buck M. Inactivación de genes supresores de tumores en la carcinogénesis del cuello uterino. Rev Med Chil 1999.;127(12):1501–12. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003498871999001200014&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
 28. Hussain A, Sharma C, Khan S, Shah K, Haque S. Aloe vera inhibits proliferation of human breast and cervical cancer cells and acts synergistically with cisplatin. Asian Pac J Cancer Prev 2015;16(7):2939-2946. doi:10.7314/apjcp.2015.16.7.293.
 29. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. Cell Death Differ 2018;25(1):65-80. doi:10.1038/cdd.2017.186.
 30. Kakehashi A, Kato A, Ishii N, Wei M, Morimura K, Fukushima S, Wanibuchi H. Valerian inhibits rat hepatocarcinogenesis by activating GABA(A) receptor-mediated signaling. PLoS One 2014; 9(11):e113610. doi:10.1371/journal.pone.0113610.
 31. Condori M, Oviedo M. Evaluación del efecto antiproliferativo y apoptótico del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Annona muricata* (Guanábana) sobre células cancerígenas (pc-3) y células epiteliales sanas de próstata humana (HPrEC), Boston, MA. 2016. MOSAICO. Arequipa; s.n; 2017; 19-21.