

Análisis de los efectos antiglicantes de la piel de uva Tannat y su posible rol preventivo del cáncer de mama.

Br. Agustina Faulord-Sosa

Laboratorio de Interacciones Célula-Ambiente (LICA),
Departamento de Genética,
Facultad de Medicina,
Universidad de la República.

Tutora: Dra. Lucía Pastro-Cardoso

Co-tutora: Dra. Adriana Fernández-Fernández

julio 2024

En este camino recorrido quiero agradecerle a Lucía y a Adriana, por guiarme con paciencia y dedicación. También agradecer a Lucía y a Cecilia que leyeron con atención mi trabajo e hicieron críticas por lo más constructivas. A mis compañeras y compañeros de la Unidad Académica de Genética de la Facultad de Medicina, en particular a Poli, Fer, Checha y Rodrigo, que hacen amenas mis mañanas y tardes en el laboratorio.

Quiero agradecer a mi familia, por creer en mí incluso cuando ni yo misma lo hacía. A mi mamá Gabriela, mi hermano Franco, mi abuela Carmen, mi tía Viviana, mi abuelo Cacho y mis primos Lucas y Santi. A Marcelo y a Leo por llegar para completar la familia con cariño y respeto.

A mis amigas, a las de toda la vida, Rocío, Alfo, Pau y Caro, por tener siempre la palabra justa e impulsarme a ser la mejor versión de mí. A mis amigos del C100, en especial a Manu, Clari, Agus, Fausto, Bruno, Sofi y Leo, por compartir curiosidades y afecciones sobre el mundo que nos rodea.

A la familia que armamos con Fede, Renata, Caro y Cata, por regalarme la certeza de que nunca voy a estar sola.

A Avi y a Lean, por la paciencia y el cuidado, por crear hogar todos los días y sostenerme.

A la Universidad de la República, por darme la oportunidad de redescubrirme entre sus paredes una y mil veces, por la posibilidad de aprender de eminencias que nunca pidieron nada a cambio más que mi atención. A la FEUU y al C100, por aportar todo aquello que implica la formación universitaria afuera del aula.

Índice

Figuras	3
Tablas	3
Resumen	4
Introducción	5
Materiales y métodos	9
Extracción de compuestos fenólicos de la piel de uva Tannat	9
Sistema modelo de formación de AGEs	9
Cultivos 2D de células de mama MCF10A	11
Cultivo en tres dimensiones (3D) de acinos glandulares mamarios de células MCF10A	12
Análisis del efecto inhibitor del extracto de piel de uva Tannat sobre cultivos en 3D de acinos glandulares mamarios	12
Resultados y discusión	14
Proceso de extracción	14
Inhibición de los AGEs solubles in vitro	15
Citotoxicidad del extracto	16
Curva de crecimiento celular en presencia del extracto	16
Análisis fenotípico por fluorescencia	17
Conclusiones y perspectivas	20
Anexos	21
Bibliografía	21

Figuras

Figura 1. Ensayo de inhibición AGEs solubles.10

Figura 2. Esquema del ensayo para la confección de la curva de crecimiento.14

Figura 3. Absorbancia producto del cambio de color de la resazurina metabolizada por las células crecidas con distintas concentraciones de extracto de piel de orujo en DMSO como medida indirecta del crecimiento de las células.16

Figura 4. Curva de crecimiento en células MCF10A.17

Figura 5. Fotos tomadas con el microscopio confocal con un aumento de 63x de los preparados teñidos con DAPI y faloidina en condiciones de rigidez sin tratar y tratados con extracto de piel de uva. 17

Figura 6. Cantidad de acinos por condición 18

Figura 7. Circularidad de los acinos en las distintas condiciones (entendida como un rango entre 0,05-1, siendo 1 un círculo perfecto).19

Tablas

Tabla 1. Rendimiento de la extracción hidro-alcohólica-ácida 13

Tabla 2. Porcentaje de inhibición de la formación de AGEs solubles in vitro en las distintas condiciones 14

Resumen

En Uruguay, la neoplasia con mayor incidencia y mortalidad en mujeres es el cáncer de mama, destacándose la edad como el factor de riesgo más importante. Asociado al envejecimiento se encuentra la acumulación de los productos finales de glicación avanzada (AGEs), tanto por su producción endógena, consecuencia del metabolismo, como por su consumo en la dieta, producto de la cocción de los alimentos. En cuanto al tejido epitelial de mama, los AGEs se acumulan en la membrana basal (MB) entrecruzando sus componentes proteicos y afectando la homeostasis del tejido. Alteraciones en la MB generan mecano-señales aberrantes, que desregulan aspectos fundamentales de la vida de la célula como las interacciones célula-célula y célula-MB, alterando la proliferación y la migración celular. La piel de uva Tannat proveniente del orujo podría prevenir los cambios en la MB por su perfil en compuestos fenólicos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la piel de uva Tannat presente en el orujo, como inhibidor natural de AGEs en cultivos 3D de acinos mamarios y su posible rol preventivo del cáncer de mama. Se sembró MB comercial con glicolaldehído, seguido de una incubación a 37°C. Se utilizaron células epiteliales de mama MCF10A (no tumoral). El extracto de la piel se obtuvo mediante extracción hidro-alcohólico-ácida y mostró una inhibición de la formación de AGEs en modelos abióticos. En cultivo celular, el extracto no es citotóxico para las células MCF10A. Por microscopía de fluorescencia se estudiaron aspectos fenotípicos como la circularidad de los acinos. Los cultivos que crecieron sobre MB rígida con extracto de piel de uva Tannat en el medio celular presentaron acinos más circulares. Estos ensayos preliminares mostraron el potencial del extracto de piel de uva Tannat para prevenir el cáncer de mama inhibiendo la formación de AGEs y preservando el fenotipo de los acinos mamarios. Este trabajo abre las puertas a la reutilización del residuo de la industria del vino, capaz de inhibir o retardar la rigidez de la matriz extracelular, como tratamiento para una posible estrategia de prevención y tratamiento del cáncer de mama.

Palabras clave: Cáncer de mama, Orujo de uva Tannat, AGEs, compuestos bioactivos, compuestos fenólicos.

Introducción

Epidemiología del cáncer de mama

Se estima que, a nivel mundial, se diagnostican 2,3 millones de casos de cáncer de mama (BC por sus siglas en inglés) por año según los datos disponibles más recientes [1]. En Uruguay, el BC es la neoplasia con mayor incidencia en mujeres y la de mayor mortalidad según datos de la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer [1]. Excluyendo el cáncer de piel, el BC es el cáncer más frecuente en Uruguay, registrándose unos 2000 casos anuales [1]. El factor de riesgo más importante es el sexo, seguido por la edad (más de 40 años). Dentro de los diagnósticos de cáncer de mama aquellos que son por motivos hereditarios corresponden a un 5% del total [1, 2, 3, 4, 5].

Existen otros factores que aumentan los riesgos de padecer BC, como la obesidad, la dieta, la terapia hormonal, la raza, el historial reproductivo o el consumo problemático de alcohol y tabaco [3, 4]. Luego de la menopausia, los ovarios dejan de producir estrógenos, hormona que favorece la proliferación celular en el tejido de mama. En las mujeres posmenopáusicas, la síntesis de estrógenos está dada por las células estromales del tejido adiposo, motivo por el que la obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de BC. La edad de la menarca y de la menopausia inciden en las probabilidades de desarrollar BC en menor medida que la dieta y los factores conductuales [2, 4].

La mortalidad debida a este adenocarcinoma se encuentra descendiendo tanto a nivel nacional como mundial [1, 4], justificado en parte por las medidas de *screening* para la rápida detección en la población, sin embargo, su prevalencia no ha disminuído [2]. Esta patología disminuye de forma considerable la calidad de vida de las pacientes [4] por lo que su prevención sigue siendo fundamental para la salud de las mujeres en los países desarrollados y sub-desarrollados.

Estructura y función de la glándula mamaria

La glándula mamaria está formada por estructuras glandulares o acinos, conectados a un sistema ramificado de conductos que tiene como fin primario la producción y el transporte de leche hacia el pezón. Una única capa de células epiteliales polarizadas baso-apicalmente definen la luz ductal o acinar, dependiendo de las estructuras, y ésta se encuentra hacia el lado apical de las células. En el lado basal, las células epiteliales contactan con células mioepiteliales (que permitirán la movilidad del contenido del lumen o de la luz del conducto) y con la matriz extracelular que es, en este caso, un tipo especializado denominado membrana basal (MB) [6].

Las matrices extracelulares (MEC) separan los tejidos, siendo una de sus funciones protegerlos del estrés mecánico. Los componentes de la MEC son secretados por las células y están asociados, evolutivamente, a la aparición de la pluricelularidad [7, 8]. Contrario al pensamiento clásico de que la MEC solo aporta soporte y se comporta como una estructura estática, se han reportado evidencias respecto al dinamismo de las distintas MEC que componen los tejidos, coordinando el comportamiento celular [7, 8].

La MB es un tipo de MEC específica de los tejidos epiteliales y está compuesta en su mayoría por laminina, colágeno tipo IV, glicoproteínas (como nidogen y proteoglicanos), y heparán sulfatos (como perlecan). El ensamblaje de la MB comienza cuando el heterodímero de laminina se une a la superficie celular a través de glicolípidos sulfatados y receptores celulares que interactúan con la matriz como β -integrina y α -dístroglicano. A

grandes concentraciones locales, la laminina se ensambla entre sí y sirve de andamio para la elaboración del resto de la MB. El colágeno tipo IV está constituido por tres cadenas proteicas largas, sintetizadas por separado que se enrollan entre sí conformando un trímero o fibrilla de colágeno que sale al espacio extracelular. Fuera de la célula, se da el último paso de síntesis de la fibra de colágeno, que implica una desaminación oxidativa de los residuos de lisina y prolina, formando aldehídos altamente reactivos que interactúan con los aldehídos de otras fibrillas mediante enlaces covalentes para dar lugar a una configuración supramolecular, responsable de darle la capacidad a la MB de brindar soporte y anclaje a las células, así como elasticidad a los tejidos [9]. La desaminación oxidativa del colágeno, último paso de su síntesis, está catalizada por la enzima LOX y las enzimas LOX-like 1-4, siendo LOXL2 la responsable de la catálisis de esta reacción para el colágeno tipo IV [10, 11].

Las integrinas son proteínas transmembrana de anclaje a la MB que interactúan con los componentes de ésta y el citoesqueleto celular. Las integrinas presentes en la porción basal de las células sirven como puntos de anclaje y receptores de los componentes de la MB formando parte de un complejo macromolecular que llamamos hemidesmosoma [7, 8, 9]. La relación entre el colágeno IV y los hemidesmosomas influyen la integridad de la organización del citoesqueleto, y repercuten en la polaridad de la célula epitelial [7]. Se ha propuesto que la pérdida de la polaridad apico-basal es un evento necesario para el desarrollo del tumor [8].

La asociación entre la MB y la célula del acino mamario influyen en eventos de señalización y regulación como también a sus funciones exocrinas. La producción de leche por los acinos y el subsiguiente transporte hacia el pezón, requiere interacciones célula-célula y célula-MB para establecer restricciones mecánicas y redes bioquímicas altamente complejas, esenciales para la homeostasis del tejido y su función fisiológica [6]. La MB, no sólo brinda soporte y permite definir la arquitectura del tejido sino que también modula factores de crecimiento que controlan procesos esenciales como la supervivencia, proliferación y diferenciación celular [6, 9].

El epitelio de mama tiene un comportamiento excepcional si lo comparamos con otros tejidos del cuerpo humano, ya que continúa su desarrollo luego del nacimiento y experimenta a lo largo de la vida diversas modificaciones sujetas a la presencia de las hormonas sexuales implican alteraciones a nivel celular pero también en lo que respecta a la MB. Modificaciones dramáticas de la MB se dan durante el envejecimiento y su rigidez ha sido asociada a los BC más agresivos [9].

Cáncer de mama

El BC se origina en células epiteliales, tanto aquellas que revisten los conductos como en las que forman los acinos. El proceso de carcinogénesis se da de forma localizada en el conducto o en el acino, lo que llamamos cáncer *in situ*. Si bien este tipo de neoplasia presenta un bajo potencial para producir metástasis, si no es detectado a tiempo este cáncer *in situ* puede progresar e invadir el tejido mamario, propagándose por los ganglios linfáticos cercanos a otros órganos [2].

El mal funcionamiento celular precede a la aparición de tumores y éstos son producto de la división celular aberrante. El camino hacia la tumorigénesis no depende únicamente de la

capacidad de escapar de los mecanismos de control proliferativo sino también de evitar que se desencadene la muerte celular [12].

Productos finales de glicación avanzada (AGEs)

Los AGEs (del inglés productos finales de glicación avanzada) son un conjunto heterogéneo de moléculas derivadas de la glicación y oxidación no enzimática de proteínas y/o ácidos nucleicos en una reacción denominada reacción de Maillard [12, 13, 14, 15].

La reacción de Maillard se da entre un grupo carbonilo de un azúcar reductor y el grupo amino de una proteína o ácido nucleico, formando una base de Schiff inestable. Esta es una reacción reversible y requiere pocas horas para ocurrir. Luego de semanas, a partir de este producto inestable y mediante rearrreglos intramoleculares, se genera otro más estable, que se denomina producto de Amadori. Los productos de Amadori son capaces de degradarse para formar α -dicarbonilos reactivos como metilglioxal o 3-desoxiglucosa (MGO y GO respectivamente) y son capaces a su vez de reaccionar con un grupo amino de las cadenas laterales de las proteínas, en particular los presentes en lisina y arginina o con un grupo tiol presente en las cisteínas, entrecruzando estos residuos [16].

Puede tomar de meses a años que la sucesión de varias reacciones reversibles origine un compuesto más estable al que nos referimos como AGE. Los AGEs son producidos normalmente en el organismo y están asociados a proteínas de larga vida como colágeno, seroalbúmina, elastina, LDL (low density lipoprotein), entre otras. Estas proteínas glicadas pierden su funcionalidad y son resistentes a la degradación proteolítica. Esta glicación ocurre de forma lenta y constante, causando la acumulación de AGEs. Esta acumulación se correlaciona positivamente frente a las patologías en las que el envejecimiento es factor de riesgo [12].

La formación aumentada de AGEs sucede en condiciones de estrés oxidativo, diabetes mellitus y el envejecimiento. El *pool* de AGEs en el organismo se puede ver enriquecido por aquellos que son producto de la dieta. Es así como podemos definir dos tipos de AGEs, aquellos que son producto del metabolismo, es decir, endógenos; y aquellos que consumimos en la dieta y denominamos exógenos. Los AGEs exógenos son en esencia la misma reacción anteriormente descrita y están asociados principalmente a los procesos de cocción de los alimentos [12, 14].

Los AGEs a nivel del organismo median sus efectos a través de tres mecanismos principales: 1) entrecruzamiento con proteínas de la matriz extracelular, afectando las propiedades mecánicas de los tejidos, 2) entrecruzamiento con proteínas intracelulares alterando sus funciones fisiológicas y 3) unión a sus receptores de membrana (por ejemplo, RAGEs) para inducir múltiples cascadas de señales intracelulares. Los receptores de los AGEs son expresados en varios tipos celulares, siendo receptores transmembrana multi-ligando que median los efectos de los AGEs en las células. Bajo condiciones fisiológicas normales la expresión de los RAGEs es baja mientras que, en condiciones patológicas tales como la inflamación y la diabetes, este receptor se encuentra más presente, coincidente con un mayor nivel de AGEs. La activación de RAGEs puede llevar a respuestas proliferativas, angiogénesis, como también respuestas migratorias e invasivas. RAGE estimula la fosforilación de quinasas extracelulares, promoviendo la transcripción del factor de transcripción NF- κ B y la producción de citoquinas proinflamatorias. Además, es

capaz de activar la vía de señalización de TGF- β [13]. Existe evidencia que sugiere la existencia de un rol activo por parte de los AGEs en el comienzo del proceso de carcinogénesis en las neoplasias de mama. [14]

Compuestos fitoquímicos como inhibidores de AGEs

Los fitoquímicos son compuestos bioactivos presentes en alimentos de origen vegetal. Dentro de este gran grupo de compuestos se encuentran los compuestos fenólicos, también llamados polifenoles, que tienen una gran actividad antioxidante y probada capacidad de inhibir la formación de AGEs [17]. Los polifenoles son capaces de inhibir la glicación proteica, principalmente por su actividad antioxidante y quelante, que les permite actuar como inhibidores o rompiendo los entrecruzamientos inducidos por AGEs en el colágeno. Las funciones específicas de los polifenoles en este rol no están plenamente descritas [18]. Los polifenoles se clasifican según el número de anillos fenólicos y los elementos estructurales que unen estos anillos [19].

La uva de la variedad Tannat, ampliamente cultivada en Uruguay, posee una gran cantidad de compuestos fenólicos, con antocianinas características, presentes principalmente en la piel de la uva [17]. Estas moléculas forman parte de un conjunto de compuestos llamados flavonoides. Existen también otros compuestos no flavonoides como los ácidos fenólicos dentro de los que se encuentra el ácido gálico y el cis-aconitato. La piel de uva Tannat con dichos compuestos fenólicos, presenta propiedades bioactivas como capacidad antioxidante, antiinflamatoria y de inhibición de las carbohidrasas (α -amilasa y α -glucosidasa) [16, 17].

La industria del vino produce anualmente grandes cantidades de subproducto sólido que llamamos orujo, compuesto por piel, semillas y tallos, considerado hasta hace relativamente poco como un desperdicio [21]. Este subproducto denominado orujo de uva presenta un perfil polifenólico rico en antocianinas y taninos, en el caso de las uvas tintas [17]. Durante la elaboración de los vinos tintos, las antocianinas aún permanecen en gran cantidad en la piel de la uva que compone al orujo debido a la retención de los compuestos fenólicos por parte de la matriz alimentaria [15, 18].

El extracto de la porción fenólica de la piel de uva Tannat proveniente del orujo con el que se trabajó en la presente tesina, se destaca por la presencia de flavonoides (quercetin-3-pyranoside, quercetin, quercetin-3- β -D-glucoside, myricetin y isorhamnetin); ácidos fenólicos (ácido gálico y ácido cis-aconitato) y antocianinas (malvidin-3-pyranoside, malvidin-3-O(6-p-coumaroyl) glucoside y malvidin-3-(6-acetylglucoside) [20]. Dichos compuestos fenólicos podrían tener un potencial efecto beneficioso para la salud.

Los flavonoides juegan un rol crucial y están asociados a beneficios positivos para la salud, incluyendo la longevidad y el reducido riesgo de enfermedades cardiovasculares en poblaciones con dietas ricas en flavonoides [12]. La capacidad inhibitoria de la formación de AGEs o capacidad antiglicante por parte de la piel proveniente del orujo, puede estar relacionada con la capacidad quelante de metales que presentan sus componentes, ya que la reacción de Maillard es promovida por iones metálicos. También, las propiedades antioxidantes de la piel de orujo de uva Tannat podrían ser causantes de su capacidad antiglicante, ya que la glicación de proteínas es acompañada de reacciones de oxidación.

Los fenoles en particular son capaces de funcionar como agentes que atrapan grupos carbonilo reactivos impidiendo que éstos interactúen con un grupo amino para desencadenar una base de Schiff [16]. La capacidad antioxidante no siempre coincide con las capacidades antiglicantes para todos los fitoquímicos [18].

Hipótesis

Los compuestos fenólicos presentes en la piel de uva Tannat son capaces de atenuar el efecto de la MB rigidizada sobre las células del epitelio de mama, considerando que una MB rígida precede al mal funcionamiento celular propiciando el desarrollo tumorigénico.

Objetivo general

Este trabajo tiene como objetivo general estudiar el efecto de la porción fenólica de la piel de uva Tannat proveniente del orujo en cuanto a su capacidad de inhibir la formación de AGEs, tanto en ensayos abióticos como en cultivos de tres dimensiones, sobre MB rígida (rica en AGEs) o nativa de células epiteliales de mama.

Objetivos Específicos

- Analizar el efecto inhibitorio proveniente de la extracción de la porción fenólica de la piel de orujo de uva Tannat sobre la formación de AGEs.
- Aplicar la técnica de cultivo 3D para la generación de acinos glandulares mamarios con células de la línea celular MCF10A.
- Determinar la capacidad de inhibir la acción del extracto en cultivos en 3D de acinos glandulares mamarios generados sobre matriz basal nativa en presencia de AGEs.

Materiales y métodos

Extracción de compuestos fenólicos de la piel de uva Tannat

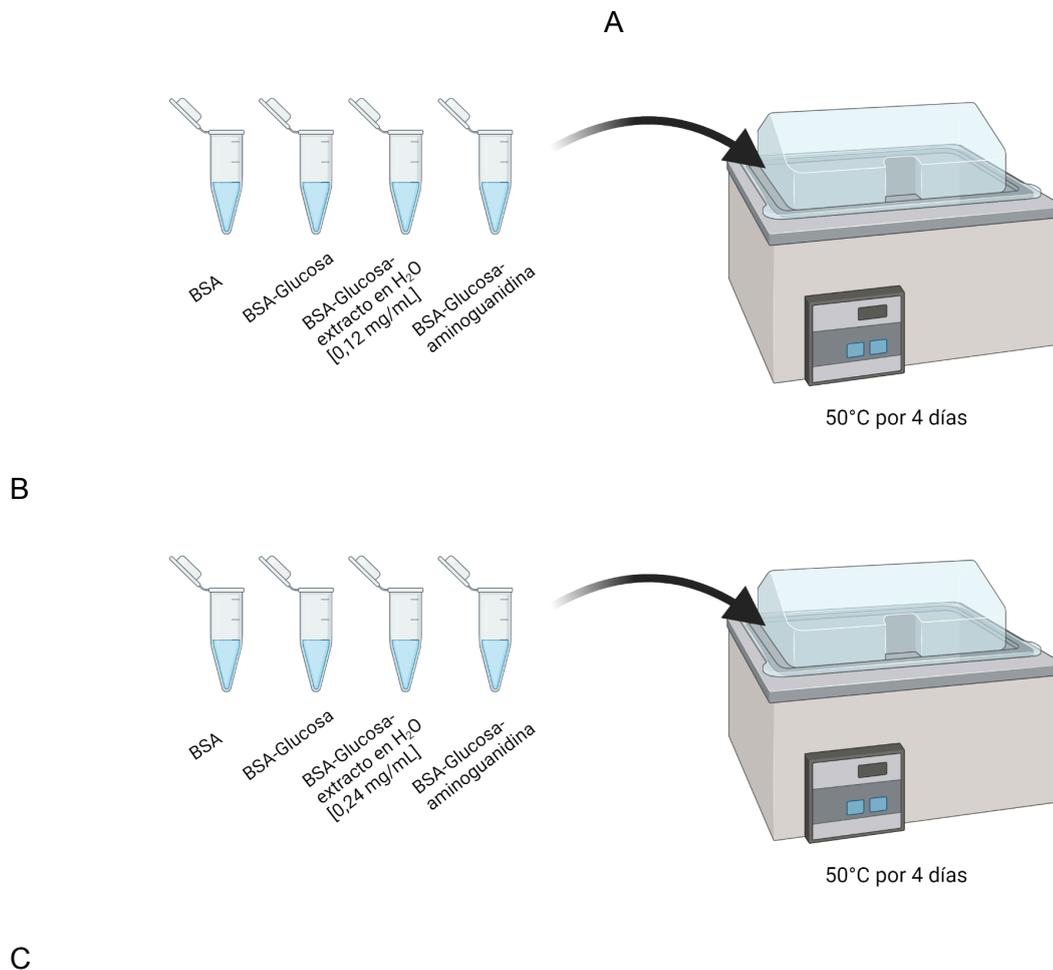
Para la extracción de la porción fenólica de la piel del orujo de uva Tannat, se realizó el protocolo descrito por Fernández-Fernández et al. [17]. Brevemente, se separó manualmente la piel de la semilla, se pesó el total húmedo de la muestra y se secó en estufa a 40°C durante 24 horas. A continuación, para disminuir el tamaño de partícula y así aumentar la superficie de contacto entre el solvente y la muestra, se molió la piel deshidratada con un molinillo de café doméstico.

Cada 20 g de muestra se colocaron 200 mL de la solución solvente hidro-alcohólico-ácido (agua:metanol:ácido fórmico en proporción, 25:70:5) y se agitó durante 5 min en plancha

con agitador magnético. Cumplido el tiempo de agitación, se filtró con papel de filtro Whatman 1 (WHA10010155) y se rotaevaporó en el rotavapor (BHI R-114, Büchi, USA) a 40°C. Una vez obtenido el extracto seco, se recuperó del balón con agua destilada. Finalmente, se liofilizó durante 4 días para concentrar los compuestos fenólicos extraídos y obtener un extracto seco para su conservación. El extracto obtenido se almacenó en freezer a -20°C.

Sistema modelo de formación de AGEs

Para evaluar la capacidad del extracto de piel de orujo de uva Tannat de inhibir la formación de los AGEs solubles *in vitro*, se siguió el protocolo propuesto por Bhatwadekar y Gholen [20] que consiste en la incubación a 50°C durante 4 días de 50 mg/mL de BSA y 0,5 M de glucosa en un buffer fosfato ajustado a pH 7,4. En estas condiciones se realizaron 2 ensayos, cada uno utilizando como inhibidor dos disoluciones, una con H₂O_{dd} y otra con DMSO (Fig 1.A-C).



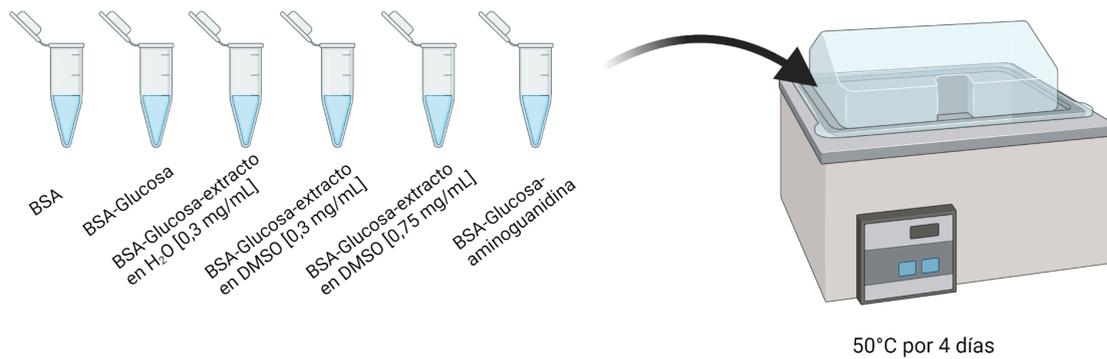


Figura 1. A- Primer ensayo de inhibición de AGEs solubles *in vitro* con una concentración de extracto disuelto en H₂O_{ad} de 0,12 mg/mL. B- Segundo ensayo de inhibición de AGEs solubles *in vitro* con una concentración de extracto disuelto en H₂O_{ad} de 0,24 mg/mL. C- Tercer ensayo de inhibición de AGEs solubles *in vitro* con una concentración de extracto disuelto en H₂O_{ad} (0,3 mg/mL) y dos concentraciones de extracto en DMSO (0,3 mg/mL y 0,75 mg/mL).

En todos los ensayos se utilizó como control un tubo conteniendo únicamente BSA (control negativo) y otro tubo que contenía aminoguanidina 0,1 M, compuesto inhibidor de referencia de la formación de AGEs (control positivo). Además, cuando se incubó BSA con glucosa, se colocó DMSO para descartar que estuviera el DMSO influyendo en la reacción y por tanto en las medidas de fluorescencia. Los AGEs son un grupo heterogéneo de moléculas, los que se miden por fluorescencia son metilglioxal (MG) y carboximetil-lisina (CML) entre otros de menor relevancia para la salud humana.

La forma en la que se cuantificaron los AGEs fue a través de fluorimetría utilizando el equipo Varioskan Flash (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), con una longitud de onda de excitación de 370 nm y una longitud de onda de emisión de 440 nm.

Cultivos 2D de células de mama MCF10A

Varias líneas celulares han sido utilizadas como modelos para estudiar el cáncer de mama, su tumorigénesis, metástasis y sensibilidad a drogas. La línea celular MCF10A de epitelio de mama humano ha sido ampliamente utilizada como modelo *in vitro* para estudiar el comportamiento normal del tejido epitelial en la conformación de acinos y la transformación maligna en el tejido de mama [24, 25, 26].

Estas células derivan de un tejido benigno proliferativo de una mujer caucásica de 34 años, extraído en el año 1984 e inmortalizadas de manera espontánea sin factores definidos. No son tumorigénicas y tampoco expresan el receptor de estrógenos. Sus características moleculares conocidas incluyen la pérdida del locus cromosomal que contiene los genes de p16 y p14ARF, ambos son críticos en la regulación de la senescencia y la amplificación del gen Myc [25].

0

Esta línea celular tiene las características de un epitelio normal de mama, si seguimos los siguientes criterios:

- no es tumorigénica en nude mouse
- es capaz de formar estructuras 3D si crece sobre colágeno
- su crecimiento en cultivo es controlado por hormonas y factores de crecimiento
- no es capaz de crecer si no está en un sustrato que permite su anclaje

- carecen de inhibición por contacto [24, 26]

Se sembraron las células en un placa de cultivo celular de 6 pocillos (cellstar) para generar una reserva con la que continuar trabajando y para conocer las características fenotípicas de las células, ya que era la primera vez que se trabajaba con esa línea celular en el laboratorio. Las células fueron crecidas en Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12 (MERCK nro de catálogo 51448C) enriquecido con 20 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Corning nro de catálogo 354052), 0,01 mg/mL de insulina (Insulin, human recombinant, zinc solution, Gibco, nro de catálogo 12585014), 500 ng/mL hidrocortisona (MERCK, nro de catálogo H0888), penicilina y estreptomina en una concentración de 10^5 unidades/L (Capricorn, referencia de catálogo PB-S), 5% de suero de caballo (Capricorn Scientific, nro de catálogo HOS-1A). Una vez confluentes, se levantaron las células para producir crioviales que se congelaron a -80°C para usos futuros.

Una vez generado un stock de células, éstas se sembraron en placa de 24 pocillos. Luego de 24 horas se incubaron distintas concentraciones de la solución de extracto de piel de orujo de uva Tannat en DMSO por triplicado. Se tomaron fotografías de cada uno de los pocillos con el microscopio (Nikon eclipse TE200) y se contó la cantidad de células con contador de partículas (Beckman Coulter).

Para definir un rango de concentraciones en el que el orujo no sea significativamente citotóxico para las células, se sembraron células al 50% de confluencia en placa de 96 pocillos con distintas concentraciones del extracto para establecer la citotoxicidad de las células. Se midió el impacto de las distintas concentraciones de cultivo a los 3 días.

Cultivo en tres dimensiones (3D) de acinos glandulares mamarios de células MCF10A

La modificación de las interacciones célula-célula y célula-matriz son propias de los procesos de carcinogénesis y de la transición epitelio-mesenquimal que caracteriza a los procesos metastásicos [26]. La utilización de cultivos celulares en 3D permite analizar en detalle estos procesos y también evaluar el rol inhibitorio del extracto de piel de uva Tannat.

El cultivo en 3D, comparado con el cultivo en 2D, emula de manera más fiel las condiciones *in vivo* por lo que es más deseable su utilización para el estudio del comportamiento celular y la función de las células normales y malignas. Para que las células adopten estructuras 3D se utilizó Geltrex™ LDEV-Free, hESC-Qualified, Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (Gibco, nro de catálogo A1413302) que es una membrana extracelular, aislada de células de sarcoma de ratón, que provee de una combinación de compuestos de la matriz extracelular similares a los que hay *in vivo* [25, 26].

El cultivo se realizó en *chamber slide system* de 8 pocillos (labtek) para facilitar la realización de la inmunofluorescencia *a posteriori*. Se siguió el protocolo establecido por la Dra. Rodríguez-Teja para la generación de AGEs entrecruzantes en una MB y el cultivo de células sobre ésta [27]. Se sembraron 40 μL de Matrigel en cada uno de los 8 pocillos y se dejó gelificar durante 30 min en estufa a 37°C . Una vez gelificada la matriz, se agregaron 300 μL de glicolaldehído para que se genere el entrecruzamiento de los AGEs con los componentes de la matriz y obtener lo que denominamos MB rígida (MB R). En los pocillos

control se colocaron 300 μ L de buffer fosfato salino (PBS) estéril, llamada MB nativa (MB N). Se dejó durante 14 horas en estufa a 37°C. Luego del tiempo de incubación, se cortó la reacción entre los componentes de la membrana y el glicolaldehído con 300 μ L de glicina-etil-éter en cada uno de los pocillos. Se incubó en la estufa durante 1 hora. Finalmente, se realizaron 5 lavados con PBS estéril para remover los restos de glicina y se dejó en estufa con PBS overnight.

Previo a sembrar las células, se realizaron varios lavados con PBS. Se sembraron 5×10^4 células por pocillo en medio DMEM suplementado como se describió anteriormente y con un 4% de MB sin gelificar para promover mejor la formación de acinos.

Análisis del efecto inhibitor del extracto de piel de uva Tannat sobre cultivos en 3D de acinos glandulares mamarios

Primero, para definir el IC₅₀ se sembraron células al 20% de confluencia en placa de 96 pocillos con 12 concentraciones distintas del extracto en diluciones seriadas, desde $7,5 \times 10^{-3}$ hasta 7,68 μ g/ μ L. El cultivo se dejó crecer durante 10 días considerando que el tiempo de duplicación de esta línea celular en nuestras condiciones de cultivo es de 96 horas según el repositorio cellsaurus [<https://www.cellosaurus.org/> consultado: 25/06/2023]. Finalmente, se utilizó resazurina 20% v/v con una concentración de 440 mM para cuantificar células. La resazurina es metabolizada por las células produciendo un cambio de color, por lo que es posible medir la fluorescencia con longitud de onda de excitación a 550 nm y de emisión a 590 nm.

En cuanto a la curva de crecimiento, se sembraron en placa de 48 pocillos, 36 pocillos con células al 10% de confluencia (Fig. 2). La mitad de la placa se trató exclusivamente con DMSO y la otra mitad con 0,03 μ g/ μ L de extracto disuelto en DMSO (concentración elegida como la óptima para las células en cultivo de 2D). Todas las placas presentaron un 0,5% v/v de DMSO o extracto en DMSO. Se levantaron 3 pocillos con tryplE (gibco nro de catálogo 12604021) para cada condición y se contaron las células en cámara de Neubauer cada 3 días para construir la curva de crecimiento.

Luego de 8 días de que se sembraron las células sobre la MB tanto rígida como nativa, se retiró el medio de cultivo con mucho cuidado de no dañar la matriz, y se hicieron lavados con PBS⁺ (buffer fosfato-salino junto con CaCl₂ 0,1 mM y MgCl₂ 0,5 mM) para retirar lo que pudiera quedar de medio. Se fijaron los acinos con paraformaldehído (PFA) 4% durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 5 lavados con solución *quenching* (75 mM de NH₄Cl y 20 mM de glicina en PBS⁺), agitando suavemente por 5 min a temperatura ambiente. Una vez cortada la reacción de fijado se procedió a permeabilizar con tritón 0,5% durante 30 min a temperatura ambiente. Para teñir los núcleos se colocó el colorante de diamidino-2-fenilindol (DAPI) que tiñe ADN y nos permite visualizar los núcleos. Para teñir la actina se usó faloidina Alexa Fluor 488 (invitrogen nro de catálogo A12379) que es una sonda para actina filamentosa (actina F) de alta afinidad conjugada con el fluoróforo Alexa Fluor 555.

Se tomaron 10 fotos en posiciones randómicas, de cada uno de los pocillos en las distintas condiciones en el microscopio Nikon eclipse Ti2 y se analizaron utilizando el software libre

Fiji/image J. Para el tratamiento de las imágenes se definió un algoritmo (Fig. 3) para analizar dos aspectos generales: la cantidad de acinos y su circularidad. Para esto se binarizó la imagen de forma tal que aquello que presentaba fluorescencia se manifestara como la presencia de señal y todo el fondo fuera, precisamente la ausencia de señal. Para esto es necesario definir un umbral, es decir un rango de valores que pueden tomar los píxeles que componen la imagen. Todos aquellos píxeles que presenten un valor de intensidad dentro del rango definido pasarán a valer 1, mientras que todos los demás serán de valor 0, descartando así lo que es ruido en la imagen.

Para esto, se separaron los 3 canales de señal que adquirimos y estaban guardados en un mismo archivo. Luego, utilizando el canal que capta la longitud de onda emitida por la coloración DAPI se eligió el umbral apropiado probando todos los umbrales disponibles con la función AutoTreshold. Este mismo umbral se aplicó a todas las imágenes de las distintas muestras. Una vez binarizada la imagen siguiendo un criterio uniforme, se cuantificaron las partículas que presentaban señal utilizando la función Analyze Particles, que permite además medir su circularidad y el área de superficie que éstas ocupaban. Se consideró un tamaño de acinos entre 40-80 μm y se definió circularidad entre 0,05 - 1.

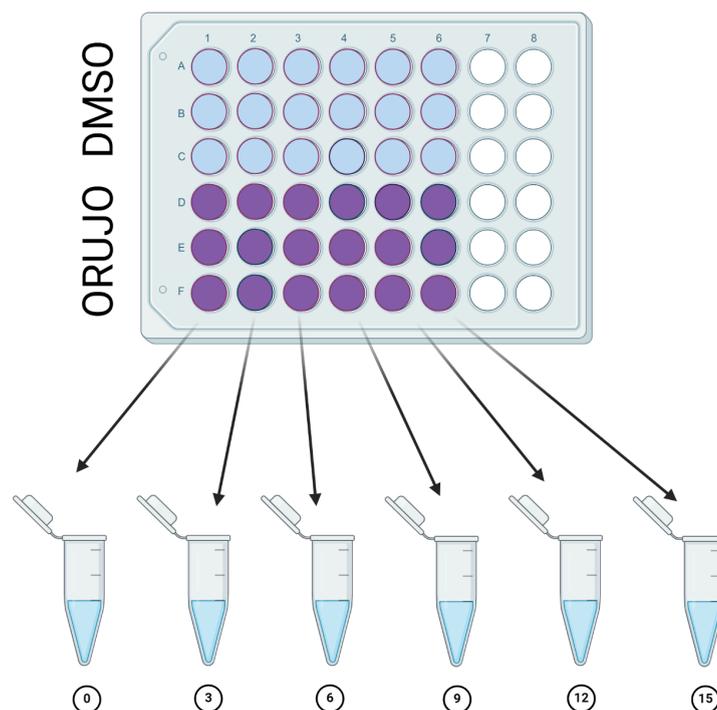


Figura 2.- Esquema del ensayo para la confección de la curva de crecimiento. Los números corresponden a los días de cultivo en los que se contaron las células

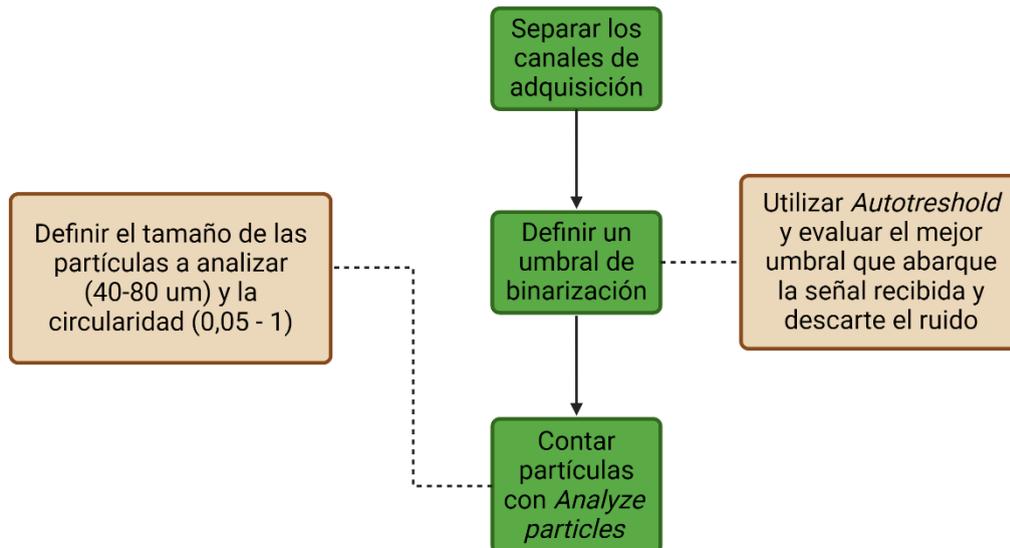


Figura 3.– Algoritmo seguido para el análisis de las fotos usando el software libre ImageJ

Resultados y discusión

Extracción de compuestos fenólicos de piel de orujo de uva Tannat

La masa inicial de piel de uva con la que se inició el secado fue de 453,7 g. Luego de las 24 horas de secado en estufa a 40°C y moler la muestra, se recogieron 150,5 g obteniendo un 33,2% de la muestra inicial, por lo que el porcentaje de humedad fue de 76,8%, similar a lo reportado [17].

La extracción de compuestos bioactivos con potencial aplicación biotecnológica puede ser compleja y requerir diferentes métodos debido a que los mismos pueden encontrarse en vacuolas, dentro del núcleo o estableciendo enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con otras moléculas de la célula vegetal. La utilización de solventes con distintas polaridades para la extracción permite obtener un perfil de compuestos bioactivos más amplio [17, 20]. El rendimiento de la extracción llevada a cabo en el presente trabajo fue similar al reportado por Fernández-Fernández et al. [17], por lo que la aplicación del método de extracción hidro-alcohólica-ácida fue adecuada (Tabla 1).

Tabla 1- Rendimiento de la extracción hidro-alcohólica-ácida

Masa de piel seca (g)	Masa después de liofilizar (g)	Rendimiento
150,5	20,232	13,5%

Inhibición de los AGEs solubles in vitro por compuestos fenólicos del extracto de piel de orujo de uva Tannat

Para estudiar la capacidad de inhibir la formación de AGEs de los compuestos obtenidos previamente, se realizaron tres ensayos de inhibición *in vitro*. El sistema de formación de AGEs *in vitro* utilizado consiste en modificar concentraciones de reactivos y temperatura, para acelerar el proceso. Estas condiciones no se asemejan a lo que sucede a nivel fisiológico, sin embargo, Bhatwadekar y Gholen [20] demostraron que este sistema de formación de AGEs presenta los mismos resultados que el sistema clásico, que utiliza la misma temperatura corporal normal (37°C) y tiene una duración entre 20 y 30 días.

En primer lugar, se realizó un ensayo de inhibición en presencia de extracto disuelto en H₂O en una concentración de 0,12 mg/mL. Los resultados mostraron que a esta concentración el extracto no fue capaz de inhibir la formación de AGEs solubles (dato no mostrado), por lo que se modificó la concentración en un segundo ensayo (0,3 mg/mL). Si bien en este segundo ensayo se observó inhibición en la formación de AGEs (Tabla 2), el extracto no se disolvió totalmente en agua, por lo que la concentración efectiva estaba siendo sobreestimada. Para intentar disolver el extracto completamente, se decidió probar un disolvente orgánico como el di-metil sulfóxido (DMSO), obteniéndose una disolución completa de los compuestos en DMSO al 100%. El extracto disuelto en DMSO, a una concentración de 0,3 mg/mL y 0,75 mg/mL inhibió la formación de AGEs solubles un 72,5% y 82,8% respectivamente, considerando como el 100% la cantidad de AGEs presentes en el control (BSA-Glucosa) (Tabla 2). Estos resultados coinciden con lo reportado para la inhibición de AGEs *in vitro* por otros compuestos bioactivos como el extracto polifenólico de *Cyperus rotundus*, que fue capaz de inhibir la formación de AGEs en un 82% a una concentración de 0,25 mg/mL [28]. Estudios realizados en modelos que usaban extracto de *Clitoria ternatea* como antiglicante mostraron un porcentaje de inhibición del 49,40% en una concentración de 1,0 mg/mL [29].

Tabla 2- Porcentaje de inhibición de la formación de AGEs solubles *in vitro* por extracto de piel de orujo de uva Tannat en diferentes solventes

Ensayo	Promedio del porcentaje de inhibición (%)
Extracto en H ₂ O [0,3 mg/mL]	58,3
Extracto en DMSO [0,3 mg/mL]	72,5
Extracto en DMSO [0,75 mg/mL]	82,8

Si bien el DMSO disuelve el extracto, en volúmenes pequeños, permitiendo no sobreestimar las concentraciones en los ensayos posteriores, presenta un nuevo problema respecto a la citotoxicidad de este solvente en las células, ya que este no es totalmente inerte afectando la viabilidad celular. Por lo que, en los estudios realizados se utilizó una concentración final de 0,5 % v/v de DMSO en el cultivo que no afecta a las células.

En este sistema, se observó una reducción en la formación de AGEs mayor en el caso del extracto disuelto en DMSO, por lo que podemos inferir que hay más compuestos fenólicos o mayor presencia de aquellos que son de interés, producto de una mejor capacidad para solubilizar dichos compuestos. En cada ensayo se utilizó aminoguanidina como control positivo, en una concentración de 0,1 M obteniendo una inhibición del 92,5% en la formación de AGEs. Este resultado no es comparable con el que se obtiene con el extracto, sin embargo, está ampliamente reportado que la actividad antiglicante de plantas medicinales y otras hierbas es igual o mayor que la actividad de la aminoguanidina, además de presentar menores o nulos efectos secundarios. Sin embargo, las condiciones de temperatura son muy importantes para la integridad de los polifenoles, por lo que, tal vez dentro de nuestro sistema de formación de AGEs *in vitro* se esté subestimando la capacidad antiglicante que podrían tener estos compuestos dentro del organismo [18,19].

Ensayo de citotoxicidad del extracto sobre cultivos de células epiteliales de mama

Para determinar si el extracto de piel de orujo de uva Tannat afecta la viabilidad celular, se realizó un ensayo para el cálculo del IC₅₀. La determinación indirecta del crecimiento celular fue realizada mediante la medición de la fluorescencia del producto de la metabolización de la resazurina por las células crecidas con distintas concentraciones de extracto de piel de orujo en DMSO.

Los resultados evidenciaron que, dentro del rango de concentraciones analizado, el extracto disuelto en DMSO no es citotóxico para las células (Fig. 4). Se definieron 0,015 mg/mL y 0,03 mg/mL (40 y 20 veces menos que la mayor concentración probada respectivamente) como las concentraciones de extracto a utilizar en los cultivos para el resto de los ensayos. Un estudio similar con células epiteliales NRK-52E aisladas de riñón de rata reportó que la Swertiamarin (compuesto fenólico derivado de la planta Gentianaceae) no afecta la proliferación en el rango de concentraciones desde 0 a 250 μ g/mL [30], por lo que se podría inferir que el extracto se podría comportar de forma similar.

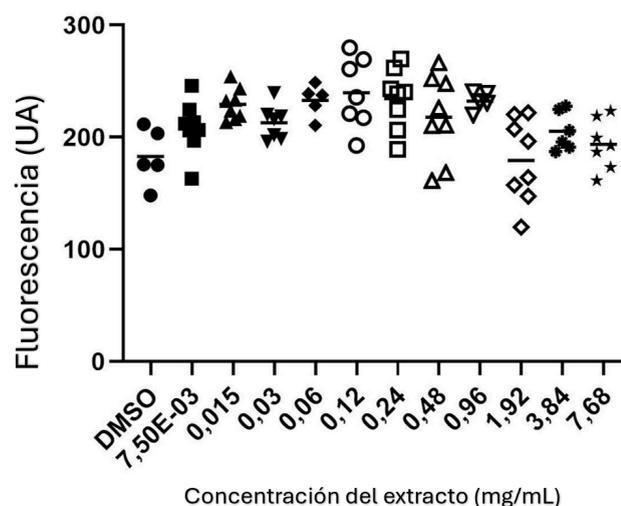


Figura 4.- Ensayo de citotoxicidad del extracto de piel de orujo de uva Tannat sobre células MCF10-A en cultivos en 2D después de 7 días de tratamiento (UA, unidades arbitrarias de fluorescencia, excitación a 550 nm y emisión a 590 nm).

Ensayo de proliferación celular en presencia del extracto fenólico

Para determinar si el extracto de piel de orujo de uva Tannat afecta la velocidad de crecimiento de las células MCF10A en cultivos en 2D, se realizó una curva de crecimiento. Los resultados obtenidos muestran que en presencia del extracto aumenta la proliferación celular, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) según un test t pareado, a los 15 días de cultivo (Fig. 5). No se encontró reportado en la bibliografía cultivos de la línea celular MCF10A con compuestos fenólicos para comparar el efecto del extracto sobre esta línea celular, así como tampoco conjeturas que expliquen lo que sucede a nivel molecular para que lleve al aumento de la proliferación celular.

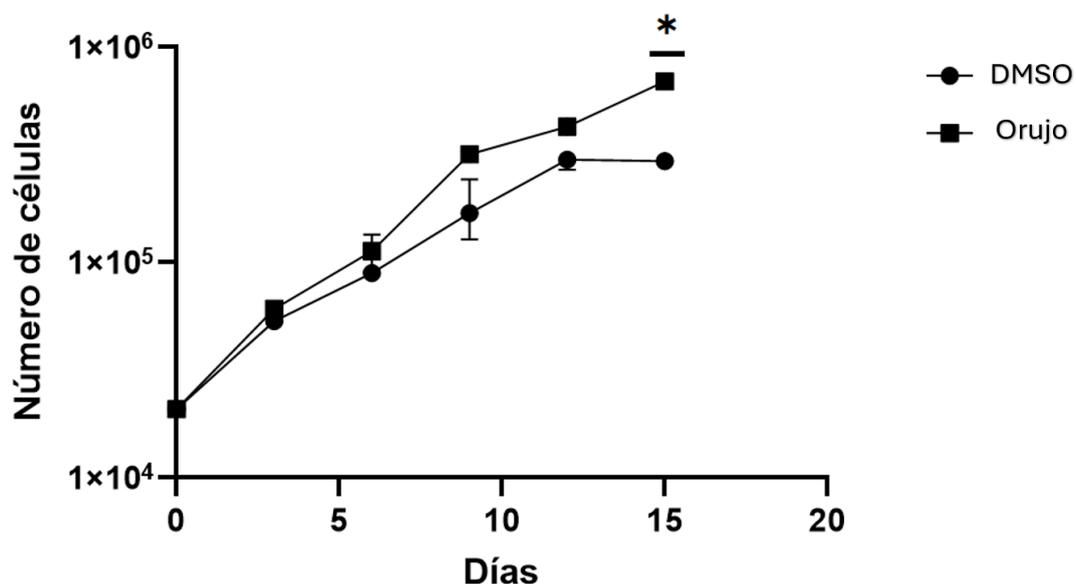


Figura 5.- Curva de crecimiento en células MCF10A en presencia de 0,03 mg/mL de extracto de la piel de uva Tannat. *($p < 0,05$) test t pareado

Efecto del extracto sobre cultivos 3D de acinos mamarios.

Los cultivos en 3D utilizando el modelo de trabajo en el laboratorio se pusieron a punto para esta línea celular en particular. Al igual que las células prostáticas con las que se trabaja en el laboratorio, MCF10A formó acinos en condiciones de MB N mientras que se vieron muy escasas y pequeñas estructuras tridimensionales en MB R (Fig. 6).

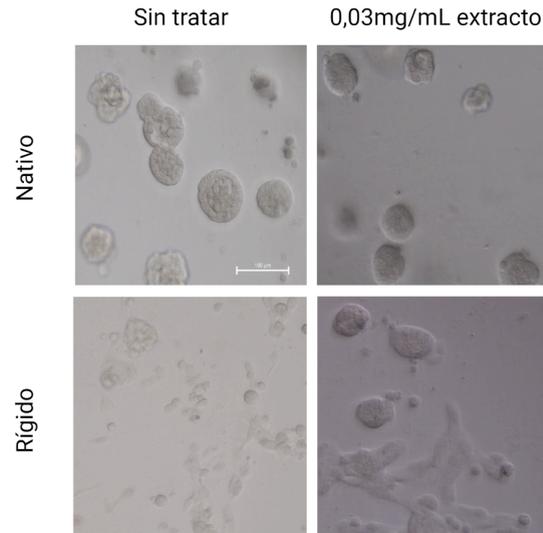


Figura 6.- Cultivos de células MCF10A en 3D sobre MB nativa y rica en AGEs (rígida). Fotos tomadas en campo claro con un aumento de 40x. Sin tratar (DMSO) y tratado con 0,03 mg/mL de extracto de la piel de orujo de uva Tannat

Para estudiar si el extracto modifica las condiciones en las que se forman los acinos en una MB R, se utilizaron técnicas de microscopía de fluorescencia sobre los cultivos 3D. Estos fueron fotografiados en el microscopio confocal (Fig. 7). Los resultados mostraron un cambio en la disposición de las fibras de actina y de los núcleos agrupados formando acinos.

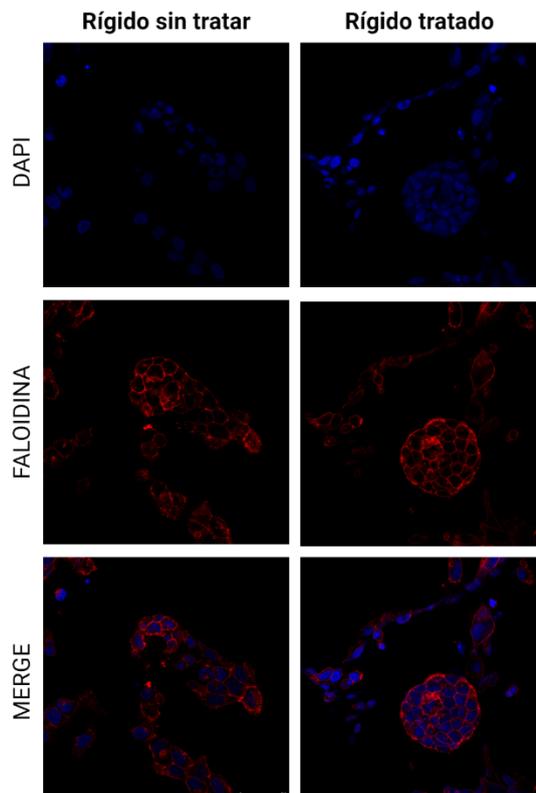


Figura 7.- Cultivos de células MCF10A en 3D sobre MB rica en AGEs (rígida). Fotos tomadas con el microscopio confocal con un aumento de 63x de los preparados tratados con DAPI (azul) y faloidina (rojo). Sin tratar (DMSO) y tratados con extracto de piel de uva (0,03 mg/mL). DAPI: tiñe ADN. Faloidina: tiñe filamentos de actina. .

En las condiciones de estudio no se observó un aumento en el tamaño de los acinos (datos no mostrados). Debido al aumento de la proliferación celular en el cultivo 2D en presencia del extracto de piel de orujo, respecto al cultivo sin tratar (DMSO), se podría inferir que habría un aumento del tamaño de los acinos. Vale la pena destacar que los cultivos no tuvieron la misma cantidad de días de crecimiento y tal vez eso explique por qué no se encontraron acinos más grandes en presencia de extracto. Tampoco se observaron cambios estadísticamente significativos ($p < 0,05$) según el análisis estadístico Kolmogorov-Smirnov, en el número de acinos formados en las distintas condiciones, tanto MB R como MB N (Fig.8). Sin embargo, se observaron diferencias en el número de acinos formados en condiciones de MB N vs MB R, este resultado coincide con los datos mostrados por Rodríguez-Teja et al. [27].

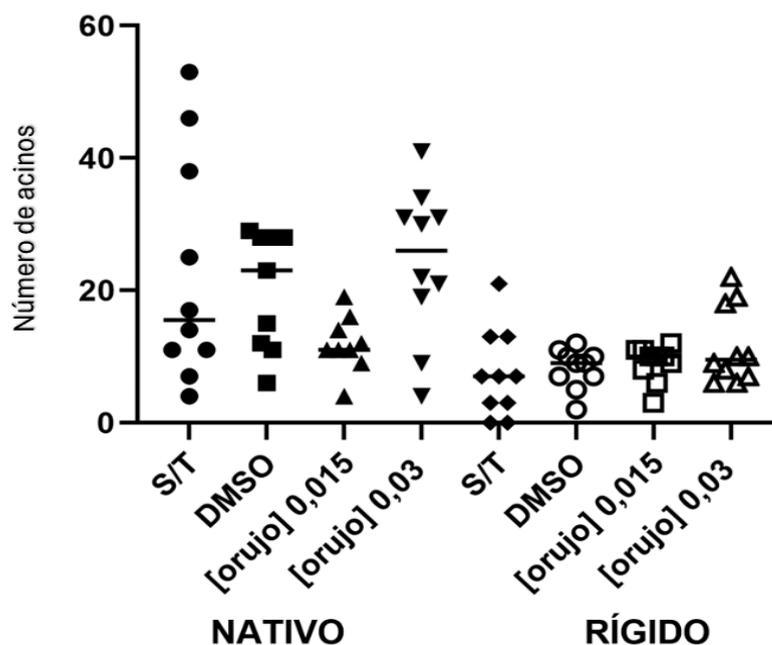


Figura 8.- Número de acinos formados por células epiteliales de mama MCF10A en cultivos de 3D, sobre MB N y MB R, tratadas con dos concentraciones de extracto de orujo (0,015 y 0,03 mg/mL), el vehículo (DMSO) y sin tratar.

El análisis de circularidad muestra una diferencia estadísticamente significativa en la circularidad de los acinos crecidos sobre MB R sin tratar de aquellos que fueron tratados con extracto de la piel de uva Tannat proveniente del orujo ($p < 0,02$), según el test de Mann-Withney (Fig. 9).

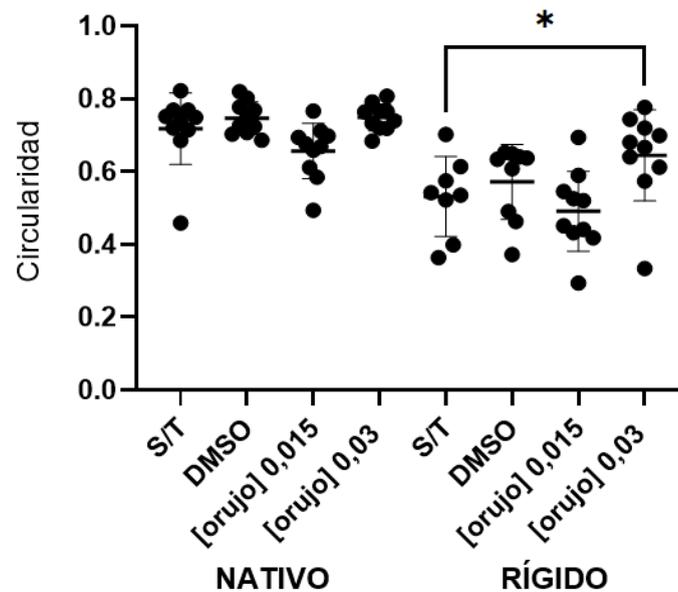


Figura 9.- Circularidad de acinos formados por células epiteliales de mama MCF10A en cultivos de 3D, sobre MB N y MB R, tratadas con dos concentraciones de extracto de orujo (0,015 y 0,03 mg/mL), el vehículo (DMSO) y sin tratar. La circularidad se midió en un rango de 0,05-1. *($p < 0,02$) test de Mann-Whitney.

En el contexto de un tejido epitelial, la MB sobre la que se anclan las células, requiere de una estructura específica supramolecular del colágeno, que incide en diversos aspectos de la vida de la célula, entre ellos su forma y las uniones celulares, dos aspectos altamente relevantes en la formación de las estructuras acinares de carácter tridimensional [11]. Durante las modificaciones postraduccionales necesarias para el correcto ensamblaje de la MB, la enzima LOX actúa a nivel del amino en la posición ϵ -amino generando una desaminación oxidativa en los residuos de lisina y prolina de la fibrilla de colágeno. Esta reacción enzimática es tejido-específica, sustentando las hipótesis de que la MB y sus componentes brindan estructura, soporte pero también controlan la homeostasis del tejido epitelial a través de mecano-señales que involucran a los hemidesmosomas [31].

La rigidez de la MB en el modelo utilizado en el presente trabajo se da por el entrecruzamiento de las proteínas de la MB por acción del glicolaldehído, contexto en el cual la mecano-señal que transducen las proteínas transmembrana hacia el citoesqueleto son aberrantes, de manera análoga a como sucede en un tejido envejecido que ha acumulado AGEs. En consecuencia, los acinos no se forman o en caso de formarse, no tienen la forma esperada en condiciones de MB nativa.

Por otra parte, los AGEs presentes en la membrana pueden interactuar también con receptores celulares, desencadenando cascadas de señalización intracelulares que pueden afectar el normal funcionamiento de la célula [15]. Los cambios que se producen en la interacción de la célula con la MB R pueden ser observados mediante microscopía de fluorescencia, con DAPI y faloidina, para evidenciar cambios en la polaridad apico-basal y las uniones célula-célula que definen el acino. Si bien, en condiciones de rigidez por acumulación de AGEs (tanto *in vitro* como *in vivo*) las mecano-señales que recibe la célula son aberrantes y afectan la formación de acinos [14, 15], en presencia del extracto, encontramos acinos con mejor circularidad (Fig. 9). De este resultado se podría inferir que

hay una recuperación del fenotipo acinar normal. Según lo reportado, esto podría explicarse por distintos mecanismos de acción: la capacidad antioxidante de los polifenoles a través de la neutralización de los radicales libres (que intervienen en la formación de AGEs) en particular de los flavonoides, donde a mayor sustitución de OH en la estructura básica mayor es su poder antioxidante como sucede con el quercetin, myrcetin e Isorhamnetin- [32,33]. Otras características como la presencia del catecol en el anillo B potencian la capacidad antioxidante (ver Anexo por estructura de los flavonoides y otros compuestos fenólicos más abundantes en el extracto utilizado para este trabajo) [18,19, 32].

Como se nombró en la introducción, MGO y GO, dos dicarbonilos de los más reactivos formados por rearrreglos de los productos de Amadori, podrían ser neutralizados por la capacidad de los polifenoles presentes en el extracto, de atrapar dicarbonilos. El ácido gálico, compuesto presente en gran proporción dentro del extracto utilizado, ha sido reportado por atrapar carbonilos y dicarbonilos con alta efectividad, al igual que quercetina y las epigallocatequinas, también presentes en el extracto [18, 32].

Conclusiones y perspectivas

En este trabajo, logramos una extracción de compuestos polifenólicos de piel de orujo de vino de uva Tannat eficiente a escala laboratorio y que produce mínimos residuos. Sin embargo, sería un gran aporte poder eliminar el metanol de la solución de extracción para lograr un proceso más ecológico.

A su vez, demostramos que el extracto inhibe la formación de AGEs solubles, con resultados similares a los reportados para extractos de otras matrices alimentarias.

El extracto tiene potencialmente capacidad inhibitoria de la formación de AGEs entrecruzantes.

Por otro lado, se implementó el modelo de cultivo 3D de células epiteliales mamarias por primera vez en el Laboratorio de Interacciones Célula-Ambiente (LICA), en el que hasta entonces se trabajaba con el mismo modelo, pero con una línea celular de próstata. En este mismo sentido, se puso a punto el cultivo con extracto de piel de orujo de uva Tannat, para esta línea celular en dos y tres dimensiones, algo que tampoco se había realizado hasta el momento en el LICA.

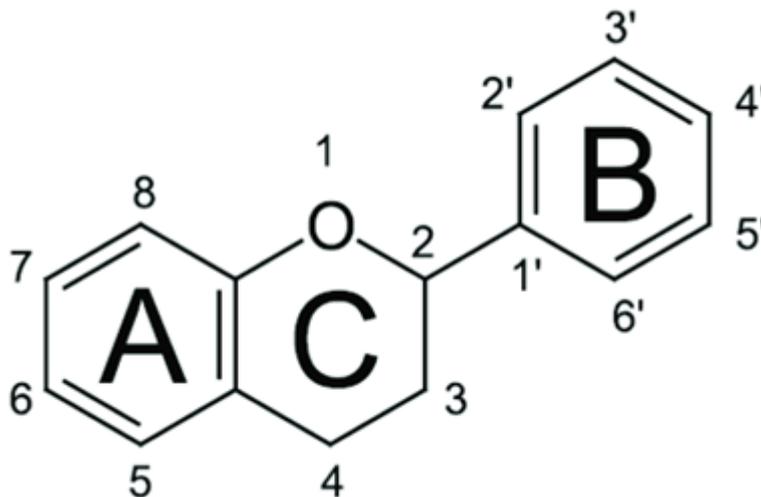
Existe una cantidad considerable de estudios clínicos en pacientes con diagnóstico de diabetes, algunos de ellos citados en este trabajo, donde se comparan con otras pacientes sin diagnóstico de diabetes como caso control y se les administra alimento enriquecido en polifenoles (algunos presentes en el extracto). Todos ellos concluyen que una dieta rica en polifenoles es un factor protector ante complicaciones consecuencia de la situación inflamatoria crónica que produce la diabetes en pacientes con cáncer de mama.

Un aspecto a tener en cuenta es que el extracto utilizado en nuestro trabajo, puede no ser similar a los compuestos que luego de la digestión y absorción en el intestino, estarían biodisponibles para las células. Investigaciones recientes en el Laboratorio de Bioactividad y Nanotecnología de Alimentos, en la tesis de maestría de la Mag. María Victoria Olt bajo la tutoría de la Dra. Fernández-Fernández, arrojaron resultados relacionados a aquellos polifenoles que finalmente se encuentran bioaccesibles luego de la ingesta de un alimento

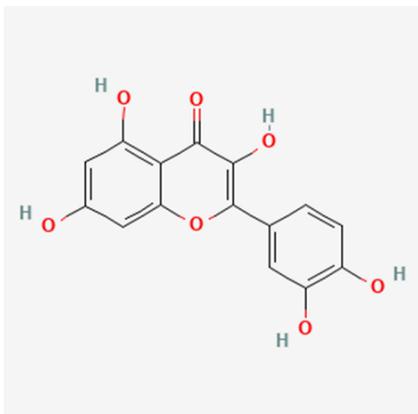
diseñado con orujo. En este sentido, proyectamos trabajar con el producto de digestión *in vitro*, en lugar del extracto, en este mismo modelo de cultivos en 3D de células epiteliales mamarias para poder conocer la fracción bioaccesible y su impacto sobre el tejido, teniendo una aproximación más fidedigna del rol que podría jugar en la prevención y tratamiento del cáncer de mama la ingesta de alimentos ricos en orujo de uva Tannat.

Por otra parte, se planea también extender estos estudios al cáncer de próstata, analizando cómo actúa el orujo sobre líneas celulares de este tejido y comparándolo con el de mama, considerando que ambas neoplasias se desarrollan en glándulas sexuales, hormono-dependientes y tienen como factor de riesgo más relevante la edad.

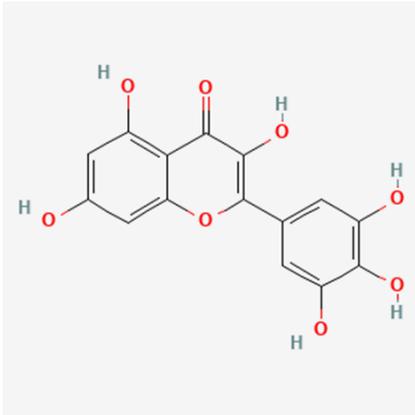
Anexo



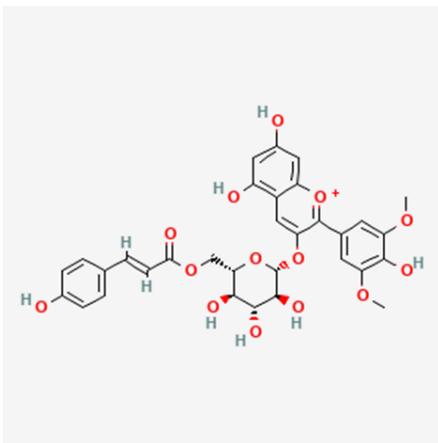
Estructura básica de los Flavonoides con dos anillos aromáticos (A y B) unidos por una estructura cíclica marcada (C)



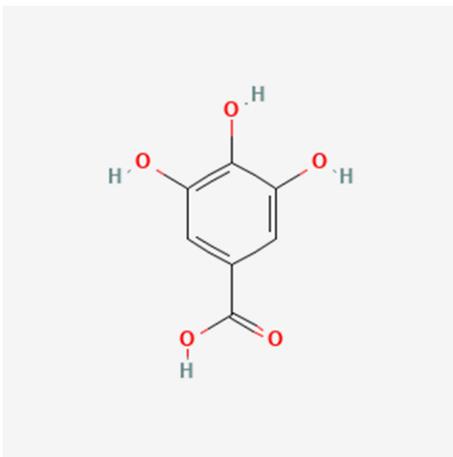
Quercetin



Myricetin



malvidin-3-O-(6-p-coumaroyl)glucoside (Antocianina)



Ácido gálico

Bibliografía

1. CHLCC. Resumen Estadístico – MAMA. Incidencia y Mortalidad periodo 2015-2019. Tendencia de la Mortalidad hasta 2020. <https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/RESUMENES-ESTADISTICOS-para-los-canceres-masfrecuentes--uc264> [Fecha de consulta: 22/07/2023]
2. Łukasiewicz, S. *et al.* Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers (Basel)*. **13**, (2021).
3. Lee, A., Moon, B. I., & Kim, T. H. (2020). BRCA1/BRCA2 Pathogenic Variant Breast Cancer: Treatment and Prevention Strategies. *Annals of laboratory medicine*, 40(2), 114–121. <https://doi.org/10.3343/alm.2020.40.2.114>
4. DeSantis, C. E., Bray, F., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Anderson, B. O., & Jemal, A. (2015). International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 24(10), 1495–1506. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0535>
5. Dunneram, Y., Greenwood, D. C., & Cade, J. E. (2019). Diet, menopause and the risk of ovarian, endometrial and breast cancer. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 78(3), 438–448. <https://doi.org/10.1017/S0029665118002884>
6. Vidi, P. A., Bissell, M. J., & Lelièvre, S. A. (2013). Three-dimensional culture of human breast epithelial cells: the how and the why. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 945, 193–219. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-125-7_13
7. Morrissey, M. A., & Sherwood, D. R. (2015). An active role for basement membrane assembly and modification in tissue sculpting. *Journal of cell science*, 128(9), 1661–1668. <https://doi.org/10.1242/jcs.168021>
8. Girigoswami, K., Saini, D., & Girigoswami, A. (2021). Extracellular Matrix Remodeling and Development of Cancer. *Stem cell reviews and reports*, 17(3), 739–747. <https://doi.org/10.1007/s12015-020-10070-1>

9. Acerbi, I., Cassereau, L., Dean, I., Shi, Q., Au, A., Park, C., Chen, Y. Y., Liphardt, J., Hwang, E. S., & Weaver, V. M. (2015). Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 7(10), 1120–1134. <https://doi.org/10.1039/c5ib00040h>
10. Añazco C, López-Jiménez AJ, Rafi M, Vega-Montoto L, Zhang MZ, Hudson BG, Vanacore RM. Lysyl Oxidase-like-2 Cross-links Collagen IV of Glomerular Basement Membrane. *J Biol Chem*. 2016 Dec 9;291(50):25999-26012. doi: 10.1074/jbc.M116.738856. Epub 2016 Oct 21. PMID: 27770022; PMCID: PMC5207071.
11. Vallet SD, Ricard-Blum S. Lysyl oxidases: from enzyme activity to extracellular matrix cross-links. *Essays Biochem*. 2019 Sep 13;63(3):349-364. doi: 10.1042/EBC20180050. PMID: 31488698.
12. Omofuma, O. O., Peterson, L. L., Turner, D. P., Merchant, A. T., Zhang, J., Thomson, C. A., Neuhouser, M. L., Snetselaar, L. G., Caan, B. J., Shadyab, A. H., Saquib, N., Banack, H. R., Uribarri, J., & Steck, S. E. (2021). Dietary Advanced Glycation End-Products and Mortality after Breast Cancer in the Women's Health Initiative. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 30(12), 2217–2226. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-21-0610>
13. Walter, K.R., Ford, M.E., Gregoski, M.J. et al. Advanced glycation end products are elevated in estrogen receptor-positive breast cancer patients, alter response to therapy, and can be targeted by lifestyle intervention. *Breast Cancer Res Treat* 173, 559–571 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4992-7>
14. Peterson, L. L., Park, S., Park, Y., Colditz, G. A., Anbardar, N., & Turner, D. P. (2020). Dietary advanced glycation end products and the risk of postmenopausal breast cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Cancer*, 126(11), 2648–2657. <https://doi.org/10.1002/cncr.32798>
15. Santolla, M. F., Talia, M., Cirillo, F., Scordamaglia, D., De Rosis, S., Spinelli, A., Miglietta, A. M., Nardo, B., Filippelli, G., De Francesco, E. M., Belfiore, A., Lappano, R., & Maggiolini, M. (2022). The AGEs/RAGE Transduction Signaling Prompts IL-8/CXCR1/2-Mediated Interaction between Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) and Breast Cancer Cells. *Cells*, 11(15), 2402. <https://doi.org/10.3390/cells11152402>
16. Sri Harsha, P. S. C., & Lavelli, V. (2019). Use of Grape Pomace Phenolics to Counteract Endogenous and Exogenous Formation of Advanced Glycation End-Products. *Nutrients*, 11(8), 1917. <https://doi.org/10.3390/nu11081917>
17. Fernández-Fernández, A.M., Iriando-DeHond, A., Dellacassa, E. et al. Assessment of antioxidant, antidiabetic, antiobesity, and anti-inflammatory properties of a Tannat winemaking by-product. *Eur Food Res Technol* 245, 1539–1551 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03252-w>

18. Añazco, C., Riedelsberger, J., Vega-Montoto, L., & Rojas, A. (2023). Exploring the Interplay between Polyphenols and Lysyl Oxidase Enzymes for Maintaining Extracellular Matrix Homeostasis. *International journal of molecular sciences*, 24(13), 10985. <https://doi.org/10.3390/ijms241310985>
19. Majid Khan, Huilin Liu, Jing Wang, Baoguo Sun, Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advance glycation end products: A comprehensive review, *Food Research International*, Volume 130, 2020, 108933, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108933>
20. Fernández-Fernández, A. M., Dellacassa, E., Nardin, T., Larcher, R., Ibañez, C., Terán, D., Gámbaro, A., Medrano-Fernandez, A., & Del Castillo, M. D. (2022). Tannat Grape Skin: A Feasible Ingredient for the Formulation of Snacks with Potential for Reducing the Risk of Diabetes. *Nutrients*, 14(3), 419. <https://doi.org/10.3390/nu14030419>
21. Fernández-Fernández, A. M., Iriondo-DeHond, A., Nardin, T., Larcher, R., Dellacassa, E., Medrano-Fernandez, A., & Castillo, M. D. D. (2020). In Vitro Bioaccessibility of Extractable Compounds from Tannat Grape Skin Possessing Health Promoting Properties with Potential to Reduce the Risk of Diabetes. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(11), 1575. <https://doi.org/10.3390/foods9111575>
22. Ranjna Sirohi, Ayon Tarafdar, Shikhangi Singh, Taru Negi, Vivek Kumar Gaur, Edgard Gnansounou, B. Bharathiraja, Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for sustainable biorefinery, *Bioresource Technology*, Volume 314, 2020, 123771, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123771>.
23. Bhatwadekar, A. D., & Ghole, V. S. (2005). Rapid method for the preparation of an AGE-BSA standard calibrator using thermal glycation. *Journal of clinical laboratory analysis*, 19(1), 11–15. <https://doi.org/10.1002/jcla.20048>
24. Qu, Ying & Han, Bingchen & Yu, Yi & Yao, Weiwu & Bose, Shikha & Giuliano, Armando & Cui, Xiaojiang. (2015). Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. *PLoS one*. 10. e0131285. 10.1371/journal.pone.0131285 .
25. Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, et al. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Research*. 1990 Sep;50(18):6075-6086. PMID: 1975513.
26. Puleo, J., & Polyak, K. (2021). The MCF10 Model of Breast Tumor Progression. *Cancer research*, 81(16), 4183–4185. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-1939>
27. Rodriguez-Teja, M., Breit, C., Clarke, M., Talar, K., Wang, K., Mohammad, M.A., Pickwell, S., Etchandy, G., Stasiuk, G.J., Sturge, J. How to Study Basement Membrane Stiffness as a Biophysical Trigger in Prostate Cancer and Other Age-related Pathologies or Metabolic Diseases. *J. Vis. Exp.* (115), e54230, doi:10.3791/54230 (2016).

28. Ardestani A, Yazdanparast R. Cyperus rotundus suppresses AGE formation and protein oxidation in a model of fructose-mediated protein glycoxidation. *Int J Biol Macromol.* 2007 Dec 1;41(5):572-8. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2007.07.014. Epub 2007 Jul 27. PMID: 17765965
29. Chayaratanasin P, Barbieri MA, Suanpairintr N, Adisakwattana S. Inhibitory effect of Clitoria ternatea flower petal extract on fructose-induced protein glycation and oxidation-dependent damages to albumin in vitro. *BMC Complement Altern Med.* 2015 Feb 18;15:27. doi: 10.1186/s12906-015-0546-2. PMID: 25887591; PMCID: PMC4337202.
30. Parwani K, Patel F, Patel D, Mandal P. Protective Effects of Swertiamarin against Methylglyoxal-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition by Improving Oxidative Stress in Rat Kidney Epithelial (NRK-52E) Cells. *Molecules.* 2021 May 7;26(9):2748. doi: 10.3390/molecules26092748. PMID: 34067107; PMCID: PMC8125635.
31. Lee, G. Y., Kenny, P. A., Lee, E. H., & Bissell, M. J. (2007). Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nature methods*, 4(4), 359–365. <https://doi.org/10.1038/nmeth1015>
32. Urios P, Grigorova-Borsos AM, Sternberg M. Flavonoids inhibit the formation of the cross-linking AGE pentosidine in collagen incubated with glucose, according to their structure. *Eur J Nutr.* 2007 Apr;46(3):139-46. doi: 10.1007/s00394-007-0644-0. Epub 2007 Mar 13. PMID: 17356796.
33. Akagawa M, Suyama K. Amine oxidase-like activity of polyphenols. Mechanism and properties. *Eur J Biochem.* 2001 Apr;268(7):1953-63. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02068.x. PMID: 11277917.