

EFFECTO DEL 6-SHOGAOL SOBRE LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA Y  
SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS TUMORALES DERIVADAS DE  
FIBROSARCOMA HUMANO (HT1080)

ANGIE CAROLINA ROMERO ARIAS

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE POSGRADOS

Maestría en Ciencias Biológicas

Bogotá, Colombia, 2018

EFFECTO DEL 6-SHOGAOL SOBRE LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA Y  
SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS TUMORALES DERIVADAS DE  
FIBROSARCOMA HUMANO (HT1080)

ANGIE CAROLINA ROMERO ARIAS

Trabajo de grado para optar por el título de Magíster en Ciencias Biológicas

LUDIS DEL ROSARIO MORALES, Ph.D.

Director del trabajo de grado

ANDRÉS FELIPE ARISTIZÁBAL, Ph.D.

Codirector del trabajo de grado

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE POSGRADOS

Maestría en Ciencias Biológicas

Bogotá, Colombia, 2018

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

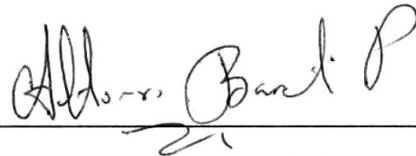
Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por los alumnos en sus trabajos de síntesis; sólo velará por que no se publique nada contrario al dogma y la moral católica y que las tesis no contengan ataques o polémicas puramente personales, antes bien, se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

EFFECTO DEL 6-SHOGAOL SOBRE LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA Y  
SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS TUMORALES DERIVADAS DE  
FIBROSARCOMA HUMANO (HT1080)

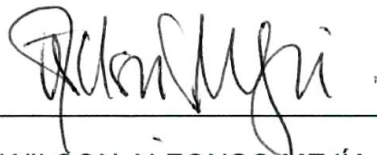
ANGIE CAROLINA ROMERO ARIAS

APROBADO



---

ALFONSO BARRETO PRIETO, Ph.D.



---

WILSON ALFONSO MEJÍA, Ph.D.



---

JOSE MIGUEL VILLARREAL, Ph.D.

EFFECTO DEL 6-SHOGAOL SOBRE LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA Y  
SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS TUMORALES DERIVADAS DE  
FIBROSARCOMA HUMANO (HT1080)

ANGIE CAROLINA ROMERO ARIAS

APROBADO

CONCEPCIÓN J. PUERTA, Ph.D.

Decana de Facultad

ALBA ALICIA TRESPALACIOS, Ph.D.

Directora de Posgrado



***“Porque las cosas invisibles de él, su eterno poder y deidad, se hacen claramente visibles desde la creación del mundo, siendo entendidas por medio de las cosas hechas, de modo que no tienen excusa”*** Así que, ***“Por la fe entendemos haber sido constituido el universo por la Palabra de Dios, de modo que lo que se ve fue hecho de lo que no se veía”***, Te alabo y te amo mi Dios por eso.

## **AGRADECIMIENTOS**

Doy gracias al que me fortaleció, a Cristo Jesús nuestro Señor, porque me permitió iniciar esta etapa de mi vida no solo académica, sino también personal y me concedió buen éxito y gracia para la realización de este proyecto.

A mis padres por el apoyo incondicional, paciencia, misericordia, ánimo y bondad que tuvieron conmigo en los momentos de regocijo y aun en los de aflicción.

A la Doctora Ludis Morales y al Doctor Andrés Aristizábal por sus enseñanzas, paciencia y guía durante la realización de este proyecto en el área más bonita de las ciencias biológicas y por su dirección y codirección en la ejecución del mismo.

A la Bióloga Adriana Grismaldo por su infinita paciencia en cada una de las explicaciones de protocolos, métodos y dirección en la realización del trabajo.

A todos nuestros compañeros del laboratorio por su acogida, ayuda y paciencia al compartir el mismo espacio de trabajo.

A mi iglesia por su apoyo en oración en los momentos difíciles, porque la oración eficaz del justo puede mucho.

## RESUMEN

El jengibre es una planta originaria del sur de China e India. Las infusiones preparadas a base de jengibre son remedios populares usados en muchas ciudades para el tratamiento de la tos, resfriados y gripes, y su uso está reportado en una amplia gama de enfermedades dentro de las cuales se encuentra el cáncer. En la última década, la investigación acerca de los compuestos del jengibre ha aumentado de forma significativa; dentro de sus componentes, el 6-shogaol es posiblemente uno de los compuestos que exhibe mayor capacidad antitumoral. Sin embargo, el mecanismo molecular a través del cual el 6-shogaol ejerce su efecto es aún desconocido. Es así que, en este trabajo se evaluó el efecto del 6-shogaol sobre la captación de glucosa y supervivencia de células tumorales derivadas de fibrosarcoma humano (HT1080). Para tal fin, se determinó la viabilidad celular bajo la exposición a 18 diferentes concentraciones de 6-shogaol (rango de 2,5 – 150  $\mu\text{M}$ ). Posteriormente, se evaluó el efecto del 6-shogaol sobre la producción de ROS (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*), la captación de glucosa y la expresión de proteínas de la vía de señalización PTEN/Akt/mTOR; Algunos de estos ensayos se realizaron en un modelo no tumoral, derivado de fibroblastos de ligamento periodontal (HPdLF), con el fin de realizar algunas comparaciones.

Los resultados obtenidos mostraron un  $\text{IC}_{50}$  de 52.8  $\mu\text{M}$  del 6-shogaol en el modelo tumoral; sobre la producción de ROS, el efecto del 6-shogaol evidenció aumento dosis dependiente, el cual fue atenuado en presencia del tratamiento con el compuesto antioxidante N-Acetil Cisteína (NAC), lo que también recuperó la viabilidad celular. Así mismo, se observó que la captación de glucosa disminuía con el aumento de las concentraciones de 6-shogaol, mientras que aumentaba la expresión de mTOR-p y Akt-p; PTEN se mantuvo activo a todas las concentraciones de 6-shogaol ensayadas. Por lo anterior, se puede considerar que el aumento en la producción de ROS -ocasionado por el 6-shogaol- está asociado con muerte celular, probablemente debido a la disminución de la disponibilidad de uno de los nutrientes principales para la célula tumoral como lo es la glucosa; por otra parte, el aumento en la expresión de proteínas como Akt y mTOR también se relaciona con la muerte celular inducida por ROS.



## ABSTRACT

Ginger is a native plant from southern China and India. Ginger-based infusions are popular medicines used in many cities for the treatment of coughs, colds and flu, and their use is reported in a wide range of diseases such as cancer disease. In the last decade, research on ginger compounds has increased significantly; within its components, 6-shogaol is possibly one of the compounds that exhibits the greatest antitumor ability. However, the molecular mechanism through which 6-shogaol exerts its effect is not elucidated yet. Thus, in this work, the effect of 6-shogaol on glucose uptake and survival of tumor cells derived from human fibrosarcoma (HT1080) was evaluated.

For this purpose, cell viability was determined under exposure to 18 different concentrations of 6-shogaol (Range of 2.5-150  $\mu$ M). Subsequently, the effect of 6-shogaol on ROS production (ROS, Reactive Oxygen Species), glucose uptake and protein expression of signaling pathway PTEN / Akt / mTOR was evaluated. Some of these tests were performed in a non-tumor model, derived from periodontal ligament fibroblasts (HPdLF), in order to make some comparisons.

The results obtained showed an IC<sub>50</sub> of 52.8  $\mu$ M of 6-shogaol in the tumor model; on the production of ROS, the effect of 6-shogaol showed dose-dependent increase, which was attenuated in the presence of the treatment with the antioxidant compound N-Acetyl Cysteine (NAC), which also recovered cell viability. Likewise, it was observed that glucose uptake decreased with increasing concentrations of 6-shogaol, while increasing the expression of mTOR-p and Akt-p; PTEN remained active at all 6-shogaol concentrations tested.

Therefore, it can be considered that the increase in the production of ROS, caused by 6-shogaol, is associated with cell death, probably due to the decrease in the availability of one of the main nutrients for the tumor cell as it is the glucose; On the other hand, the increase in the expression of proteins such as Akt and mTOR also are related with cell death induced by ROS.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	10
ABSTRACT .....	11
JUSTIFICACIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	17
MARCO DE REFERENCIA .....	18
EL JENGIBRE ( <i>Zingiber officinale</i> ) .....	18
Compuestos de jengibre .....	18
Propiedades bioactivas del jengibre asociadas a sus compuestos .....	18
Efecto antitumoral del 6-shogaol .....	20
CÁNCER.....	21
Metabolismo de células tumorales.....	22
Efecto Warburg.....	23
Vía de señalización PI3k/Akt/mTOR .....	23
ROS y respuestas celulares inducidas .....	27
OBJETIVOS .....	28
Objetivo General .....	28
Objetivos específicos .....	28
HIPÓTESIS .....	28
MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
Materiales .....	29
Reactivos y líneas celulares .....	29
Métodos .....	29
Cultivos celulares.....	29
Exposición al 6-shogaol.....	29
Evaluación de la viabilidad celular .....	30
Evaluación de la producción de ROS .....	30
Evaluación de la captación de glucosa.....	30
Análisis de expresión de proteínas por western blot.....	31
Análisis de expresión de Akt y Akt-p por citometría de flujo .....	31

Análisis estadístico .....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
6-shogaol induce muerte celular en la línea tumoral derivado de fibrosarcoma humano (HT1080).....	33
Efecto prooxidante del 6-shogaol en el modelo tumoral (HT1080) y disminución de este efecto por compuesto antioxidante.....	34
6-shogaol disminuye la captación de glucosa en el modelo tumoral y la aumenta en fibroblastos.....	38
6-shogaol disminuye la supervivencia tumoral a través de la modulación de la vía PI3K/Akt/mTOR.....	40
CONCLUSIONES.....	45
PERSPECTIVAS.....	45
REFERENCIAS.....	46
ANEXOS .....	52

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Vía de señalización PI3K/Akt/mTOR.....	24
Figura 2. Complejos de Raptor (mTORC1) y Rictor (mTORC2) de mTOR. ....	26
Figura 3. Viabilidad líneas celulares tratadas con 6-shogaol.. ....	33
Figura 4. Producción de ROS en condiciones basales de células HT1080 y fibroblastos.....	35
Figura 5. Producción de ROS de ambas líneas celulares .....	36
Figura 6. Producción de ROS de ambas líneas celulares tratadas con 6-shogaol y NAC.....	37
Figura 7. Reducción del efecto citotóxico del 6-shogaol.. ....	37
Figura 8. Captación de glucosa basal de células HT1080 y fibroblastos .....	38
Figura 9. Captación de glucosa células HT1080 .....	39
Figura 10. Captación de glucosa de fibroblastos.....	40
Figura 11. Expresión proteica de PTEN y mTOR evaluada por western blot.....	41
Figura 12. A. Análisis por densitometría de cambios de activación de mTOR en células HT1080 tratadas con 6-shogaol. B. Niveles de expresión proteica de mTOR fosforilado, PTEN fosforilado y $\beta$ -actina como control de carga en células HT1080 por western blot. ....	41
Figura 13. Análisis de expresión de Akt fosforilado/Akt de células HT1080 tratadas con 6-shogaol por citometría de flujo.. ....	42
Figura 14. Mecanismo propuesto de inducción de muerte producto del tratamiento por el 6-shogaol.....	44

## LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Resultados de la viabilidad de células HT1080 y fibroblastos sometidos a 2.5 – 150 $\mu$ M de 6-shogaol por 24 horas.....	52
Anexo 2. Resultados de la producción de ROS de células HT1080 y fibroblastos sometidos a 30 – 70 $\mu$ M de 6-shogaol por 24 horas. ....	53
Anexo 3. Producción de ROS de células HT1080 y fibroblastos sometidos a 70 $\mu$ M de 6-shogaol y atenuada por 5 mM de N-acetilcisteína. ....	54
Anexo 4. Viabilidad de células HT1080 sometidas a 30 – 70 $\mu$ M de 6-shogaol y 5 mM de N-acetilcisteína por 24 horas.....	55
Anexo 5. Captación de glucosa de células HT1080 y fibroblastos sometidos a 10 – 90 $\mu$ M de 6-shogaol por 24 horas.....	56
Anexo 6. Análisis de expresión de Akt fosforilado/Akt en células HT1080 tratadas con 6-shogaol.....	57
Anexo 7. Plots de citometría de expresión de Akt total en células HT1080 tratadas con 10 – 50 $\mu$ M de 6-shogaol.....	57
Anexo 8. Plots de citometría de expresión de Akt fosforilado en células HT1080 tratadas con 10 – 50 $\mu$ M de 6-shogaol.....	59

## ABREVIATURAS

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ARN - Ácido Ribonucleico

DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's medium*

GLUT - Transportadores de glucosa (del inglés: *glucose transporters*)

IC<sub>50</sub> - Concentración inhibitoria máxima media (del inglés: *half maximal inhibitory concentration*)

mTOR - Diana de la rapamicina en células de mamífero (del inglés: *mammalian Target of Rapamycin*)

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NAC - N-Acetil Cisteína

PI3K - Fosfatidil inositol trifosfato (del inglés: *phosphoinositide-3-kinase*)

PTEN - Fosfatasa y homóloga de la tensina (del inglés: *phosphatase and tensin homolog*)

pVHL – del inglés: Protein von Hippel-Lindau protein

ROS - Especies reactivas de oxígeno (del inglés: *reactive oxygen species*)

SBF - Suero bovino fetal

SD - Desviación estándar (del inglés: *standard deviation*)

SEM - Error estándar de la media (del inglés: *standard error of the mean*)

U.A. - Unidades arbitrarias

## JUSTIFICACIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Por muchos años la medicina tradicional china ha empleado múltiples alimentos y plantas para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales, condiciones como el envejecimiento y, patologías crónicas de origen inflamatorio como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes, entre otras (Dosoky & Setzer, 2018).

Uno de los alimentos comúnmente usado en este tipo de medicina es el Jengibre (*Zingiber officinale*), utilizado ancestralmente no solo para tratar desórdenes gastrointestinales (náuseas), sino también en la culinaria, como especia, por su naturaleza picante.

En la última década, la investigación acerca de las propiedades benéficas del jengibre alrededor del cáncer ha aumentado de forma significativa; su actividad antitumoral ha sido atribuida a sus compuestos pungentes gingeroles y shogaoles (Semwal, Semwal, Combrinck, & Viljoen, 2015), siendo el 6-shogaol, el compuesto químicamente más estable de todos los componentes del jengibre; el 6-shogaol es el principal compuesto pungente del jengibre deshidratado (Choi, Kim, Jeong, & Oh, 2018) y es obtenido a partir del 6-gingerol.

En patologías como el cáncer, el extracto de jengibre tiene como blanco algunas proteínas implicadas en vías de señalización, que regulan procesos de proliferación, crecimiento y supervivencia celular, tal es el caso de MAPK, caspasa 3 y Akt, y es encargado a su vez de regular varios procesos metabólicos y celulares tales como la producción de ROS, el potencial de membrana mitocondrial, entre otros (Akimoto, Iizuka, Kanematsu, Yoshida, & Takenaga, 2015; Romero et al., 2018). Es probable que la actividad antitumoral evidenciada en el extracto esté asociada a uno de sus principales componentes, el 6-shogaol, a través de la activación o inactivación de estas proteínas. Sin embargo, se desconoce cuál es el efecto que tiene el 6-shogaol en la vía de señalización PTEN/Akt/mTOR en un modelo tumoral agresivo, como lo es el fibrosarcoma humano y si su efecto puede estar relacionado con el metabolismo de la glucosa.

Por estos antecedentes se planteó la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es el efecto del 6-shogaol sobre la captación de glucosa y supervivencia de células tumorales derivadas de fibrosarcoma humano (HT1080)?

## MARCO DE REFERENCIA

### **EL JENGIBRE (*Zingiber officinale*)**

El jengibre es una planta originaria del sur de China e India (Semwal et al., 2015); actualmente se cultiva alrededor de todo el mundo, más comúnmente en América latina y el sureste de Asia. Las infusiones preparadas a base de jengibre son remedios populares usados en muchas ciudades para el tratamiento de la tos, resfriados y gripes, además su uso está reportado en una amplia gama de enfermedades tales como las cerebrovasculares, diabetes, disfunciones metabólicas, desórdenes óseos y vasculares, asma, cáncer, etc. (Choi et al., 2018).

Los extractos derivados del jengibre, bien sean etanólicos o acuosos han mostrado diversas propiedades biológicas dentro de las cuales se ha observado que poseen la capacidad de inducir citotoxicidad en células tumorales derivadas de fibrosarcoma humano (HT1080), esto asociado a la producción de ROS, a la hiperpolarización mitocondrial y a la inhibición de proteínas de vías de señalización implicadas en supervivencia (Romero et al., 2018). Adicionalmente y de manera interesante, poseen un efecto antioxidante disminuyendo la producción de ROS en modelos celulares normales y aumentándola cuando se trata de células cancerosas (Akimoto et al., 2015); posee efecto antimicrobiano en contra de patógenos como *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis* (Giriraju & Yunus, 2013) y recientemente se está evaluando la capacidad de mejorar la memoria espacial y de reconocimiento cuando es administrada por largos periodos de tiempo en modelos murinos, ensayos con efectos positivos hasta el momento (Khaliq et al., 2017).

### *Compuestos de jengibre*

En el jengibre se han identificado más de 400 compuestos químicos dentro de los cuales se encuentran carbohidratos, lípidos, terpenos y compuestos fenólicos. Estos compuestos cuando son aislados se clasifican químicamente en principios pungentes y principios saborizantes. Dentro de los pungentes encontramos los gingeroles, shogaoles, zingeronas, gingerdioles, gingerdionas y capsaicina; mientras que los saborizantes se clasifican en: sustancias volátiles y sesquiterpenos. Dentro de los compuestos volátiles, encontramos zingibereno, pineno, canfeno, cumeno, borneol, bisaboleno y zingiberol (Choi et al., 2018).

### *Propiedades bioactivas del jengibre asociadas a sus compuestos*

Los gingeroles y los shogaoles son los principales compuestos pungentes no volátiles del jengibre reconocidos por su contribución a la salud humana y a la nutrición; se cree que los extractos de jengibre tienen un 20% de gingeroles y



shogaoles (Sang et al., 2009).; por su olor y sabor picante es empleado también en gastronomía (Semwal et al., 2015).

Los gingeroles, se caracterizan por estar presentes en mayor concentración en la raíz fresca y son conocidos hasta el momento como 4-, 6-, 8-, 10- y 12-gingerol. El principal gingerol, es aquel que posee el doble enlace en el carbono 6, denominado 6-gingerol, los demás se encuentran en menores concentraciones. El 6-gingerol posee varias actividades biológicas descritas en el tratamiento de las enfermedades crónicas en humanos y modelos animales (Mohd Yusof, 2016). Dentro de estas actividades reportadas están efectos en contra del envejecimiento, los cuales se relacionan con la capacidad de inhibir la senescencia vascular regulada por la vía de señalización de mTOR (Shen et al., 2016), presentar efecto antitumoral, basado en la capacidad de modular algunas vías de señalización involucradas en la apoptosis, regulación del ciclo celular, actividad citotóxica e inhibición de la angiogénesis (Wang, Zhang, Yang, Product, & 2014, 2014).

Por su parte, los shogaoles, son compuestos análogos de los gingeroles; son térmicamente lábiles y se forman por reacciones reversibles de deshidratación a altas temperaturas a partir del gingerol (Semwal et al., 2015), o en algunos casos producto del almacenamiento. El nombre shogaol se deriva del nombre japonés del jengibre “shōga”.

El grupo de shogaoles se encuentra conformado por el 4-, 6-, 8-, 10- y 12-shogaol, siendo el principal por su abundancia, el 6-shogaol, el cual, al igual que el 6-gingerol presenta su doble enlace en el carbono número 6 de su cadena hidrocarbonada.

En la mayoría de los reportes de literatura, se ha observado que el 6-shogaol presenta mayores propiedades y actividad biológica que los demás principios pungentes del jengibre. A éste se le han atribuido diversas propiedades biológicas tales como antioxidante y prooxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano y antitumoral.

En cuanto a la capacidad antioxidante del 6-shogaol se ha reportado que es menor en comparación que el 6-gingerol cuando se evalúa por el método DPPH y FRAP que son métodos colorimétricos que miden la capacidad antioxidante (Ghasemzadeh, Jaafar, Baghdadi, & Tayebi-Meigooni, 2018); cuando se evalúa dicho efecto en cultivos celulares se encuentra que el 6-shogaol induce más producción de ROS en modelos tumorales cuando se compara con el 6-gingerol (Akimoto et al., 2015).

Por otra parte, y en cuanto a la capacidad del 6-shogaol de actuar como compuesto antiinflamatorio, se ha encontrado que inhibe la producción de la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) así como la expresión de citoquinas proinflamatorias tales como interleuquina 1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), p38 y factor nuclear kappa  $\beta$

(NF- $\kappa$ B). Además, inhibe la liberación de óxido nítrico y la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa. Estos efectos fueron evaluados en células de microglía de ratón (BV-2) tratadas con lipopolisacáridos (LPS), en un cultivo primario de neuroglia y en un modelo in vivo de neuroinflamación. Los resultados reportados fueron mayores a los presentados por el 6-gingerol (Ha et al., 2012).

Con relación a la capacidad antimicrobiana del 6-shogaol es importante mencionar que ésta ha sido medida a partir del extracto de jengibre en varios tipos de bacterias tales como *B. Cereus*, *S. Aureus*, *E. Coli*, *P. Aeruginosa*, *C. Albicans*, *G. Candidum*, exhibiendo concentraciones mínimas inhibitorias que oscilan entre 4 - 26  $\mu$ g/ml de extracto de jengibre seco, concentraciones mucho menores que las mínimas inhibitorias de antibióticos contra estas cepas. Sin embargo, se cree que esta capacidad depende del 6-shogaol, ya que cuando el jengibre se somete a diferentes tipos de deshidratación, se presentan mejores resultados porque se potencia el contenido de 6-shogaol (Ghasemzadeh et al., 2018).

#### *Efecto antitumoral del 6-shogaol*

Finalmente, y con relación a este trabajo, el 6-shogaol ha sido reportado en numerosos artículos como compuesto antitumoral, por la selectividad que presenta al disminuir la viabilidad de células tumorales, sin afectar células no tumorales.

A la fecha se ha descrito que el 6-shogaol induce varias clases de muerte celular en modelos tumorales como cáncer de seno (MCF-7), en el cual junto con células madre, se evaluó el efecto del 6-shogaol; se encontró que en este modelo, el compuesto tiene la capacidad de inducir autofagia, como principal causa de muerte, asociada a la disminución de la expresión de la proteína Notch1 y sus dianas Hes1 y Ciclina D1 (Ray, Vasudevan, & Sengupta, 2015).

Por otra parte, también se sabe que el 6-shogaol induce apoptosis e inhibición de invasión y metástasis en un carcinoma hepatocelular, modelo en el cual se caracteriza por disminuir la activación de Akt y MAPK. Adicionalmente, el tratamiento con 6-shogaol inhibió la activación de NF- $\kappa$ B y su translocación junto con STAT3, promoviendo la disminución de la expresión de MMP-2/-9 (Matriz Metaloproteinasas) y bloqueando la angiogénesis (Weng, Chou, Ho, & Yen, 2012).

La inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B y STAT3 por el 6-shogaol ha sido descrita de igual forma en líneas de cáncer de próstata (LNCaP, DU145, y PC3) en donde también se redujo el crecimiento celular. En ese estudio se realiza su efecto en comparación con el 6-gingerol y el 6-paradol (Saha et al., 2014).

Junto con la actividad inhibitoria del 6-shogaol sobre la vía de señalización de las MAPK, en un modelo de hepatoma humano, se describió su capacidad de promover

estrés del retículo endoplasmático, actuando como un factor que promueve la apoptosis (Wu et al., 2015).

El 6-shogaol también induce apoptosis a través de la disminución de la proteína survivina (proteína antiapoptótica) en células de cáncer de cabeza y cuello; adicionalmente, cuando las células son expuestas a irradiación, muestran una reducción sinérgica de la supervivencia clonogénica (Kotowski et al., 2018). Este mismo efecto se ha visto en células de cáncer de colon en donde también se observó una disminución de Bcl-2 (proteína antiapoptótica) y un incremento de Bax (proteína pro-apoptótica).

Otro mecanismo por el cual el 6-shogaol promueve la apoptosis celular se ha descrito en células de cáncer de pulmón, en las cuales promueve la escisión de las caspasas 3 y 7, además de inhibir la fosforilación de Akt en su isoforma 1/2. En conjunto, su efecto fue evaluado en modelo murino en donde su administración intraperitoneal disminuyó el crecimiento del tumor (Kim et al., 2014).

Finalmente, el último mecanismo descrito a través del cual el 6-shogaol ejerce su efecto antitumoral es mediante la detención del ciclo celular en fase G2/M y participando en la regulación de las proteínas p53 y p21, la primera conocida como el guardián del genoma y la segunda como la proteína inhibidora de CDK, todo esto en un modelo de cáncer colorrectal (Qi et al., 2015).

## **CÁNCER**

El cáncer es una patología crónica, multicausal, caracterizada por el crecimiento y diseminación descontrolada de las células cuya morfología se ve alterada, y que puede aparecer en cualquier tejido corporal, modificando su fisiología; su origen concreto es desconocido, sin embargo, se sabe que la unión de diversos factores genéticos, ambientales y fisiológicos predisponen la aparición de la patología. Dentro de los factores ambientales se encuentran la exposición a sustancias químicas, metales o pesticidas debido a su alto potencial carcinogénico, factores como la exposición a radiación ionizante, humo de tabaco y a factores genéticos (American Cancer Society, 2014).

El cáncer puede clasificarse en cuatro tipos de acuerdo a la localización del tejido en el que se origina; todos aquellos tumores malignos que afecten las células epiteliales se denominan carcinomas; corresponden al 80% de los tumores cancerosos y se subdividen en cuatro tipos: adenocarcinomas, que afectan glándulas como la prostática y la mamaria; melanoma que afecta los melanocitos; carcinoma de células basales, el cual es el tipo de cáncer de piel más común y,

carcinoma de células escamosas que altera todas aquellas células que no son glandulares (AECC, 2015).

Por otro lado, los sarcomas, son otro tipo de cáncer que afecta el tejido conectivo y su nombre varía de acuerdo con la localización del daño. Éste es el caso del fibrosarcoma, el cual es un tumor maligno originario de células mesenquimales, compuesto de fibroblastos transformados rodeados de colágeno. Existen dos tipos de fibrosarcoma, denominados primario y secundario. El tumor primario se caracteriza por ser una malignidad fibroblástica que produce cantidades variables de colágeno a nivel central y periférico, mientras que el tumor secundario surge de lesiones preexistentes o posteriores a radioterapia de hueso o tejidos blandos, y dando origen a tumores más agresivos y de difícil pronóstico (Dickey et al 2014).

Por último, los otros dos tipos de cáncer son las leucemias y los linfomas, patologías que afectan la sangre y el sistema linfático, respectivamente.

#### *Metabolismo de células tumorales*

La fisiopatología del cáncer parte de un proceso denominado tumorigénesis o carcinogénesis, que tiene su origen en mutaciones a nivel del material genético que pueden ser heredadas o adquiridas. Dichas mutaciones le confieren a la célula la capacidad de dividirse a una tasa mayor que la de su cohorte y generar descendencia que conserve estas transformaciones (Catherine Sánchez, 2013).

Una vez el material genético ha sido alterado, las células aumentan su capacidad de crecimiento y supervivencia, además generan capacidades proliferativas, tales como evasión de la inmunovigilancia tumoral, proceso mediante el cual las células del sistema inmune son capaces de eliminar las células tumorales; de esta forma, logran el desarrollo de neoplasias.

En la actualidad, se sabe que la tumorigénesis es dependiente de una reprogramación metabólica que sufre la célula tumoral como consecuencia directa o indirecta de mutaciones oncogénicas. A nivel metabólico, las células tumorales sufren diversos cambios tales como: captación desregulada de glucosa y aminoácidos, uso de modos oportunistas para la adquisición de nutrientes, uso de la glucólisis e intermediarios del ciclo de Krebs para la biosíntesis y la producción de NADPH, aumento de la demanda de nitrógeno, alteraciones en la regulación de genes impulsados por metabolitos, e interacciones metabólicas con el micro entorno (Pavlova & Thompson, 2016).

### *Efecto Warburg*

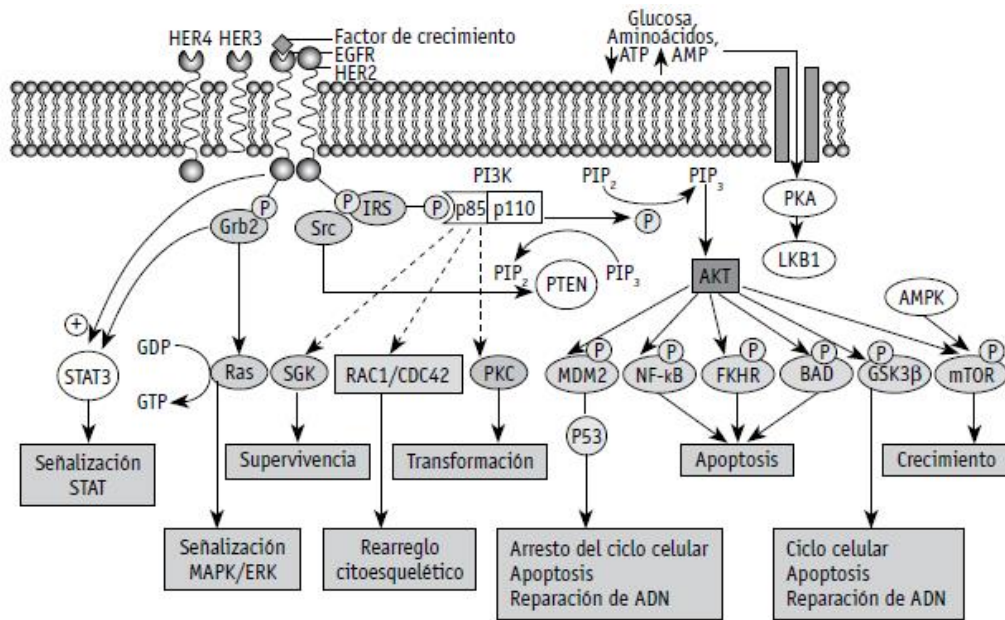
En cuanto a la captación desregulada de glucosa, en 1920 Otto Warburg y colaboradores, describieron por primera vez este fenómeno y lo denominaron “efecto Warburg”, el cual consiste en una capacidad aumentada por parte de la célula tumoral para captar glucosa y producir lactato inclusive en presencia de oxígeno, a diferencia de la célula normal que en presencia de oxígeno prefiere el metabolismo oxidativo para la oxidación de glucosa y posterior generación de energía. Este fenómeno metabólico ha sido observado en varios tipos de tumores, tales como cáncer colorrectal, mama, pulmón y glioblastoma (Potter, Newport, & Morten, 2016).

La principal causa de este fenómeno metabólico radica en la necesidad celular de cumplir con las demandas biosintéticas asociadas a la proliferación; para ello, la célula debe aumentar el importe de nutrientes del medio. Los nutrientes predilectos a importar son la glucosa y la glutamina, ya que ambos permiten la generación y mantenimiento de intermediarios de carbono, que serán usados como bloques de construcción para el ensamblaje de diversas macromoléculas (Pavlova & Thompson, 2016).

El principal mecanismo que presentan la mayoría de las células tumorales, por el cual tienen la capacidad de captar más glucosa, es a través del aumento de la translocación de GLUT-1 a la membrana citoplasmática. Este fenómeno está asociado comúnmente a mutaciones en el regulador negativo de la vía de señalización Akt/mTOR, PTEN (Pavlova & Thompson, 2016).

### *Vía de señalización PI3k/Akt/mTOR*

La vía de señalización PI3K/Akt/mTOR participa en el desarrollo del cáncer a través de 3 mecanismos de acción: disminución de la apoptosis, progresión del ciclo celular e incremento de las capacidades metastásicas de las células. La activación de esta vía se produce a través de receptores tirosina kinasa (RTK) o de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), los cuales responden a factores de crecimiento (como el epidérmico y tipo insulina entre otros) y citoquinas (IL-1, IL-2, 1L-3, 1L-4 e IL-6), que a su vez fosforilan el sustrato receptor de la insulina (IRS1); producto de este proceso, una de las subunidades de la PI3K es fosforilada, lo que resulta en un cambio conformacional de esta proteína, en donde la subunidad regulatoria (p85) se une a la subunidad catalítica (p110). La unión de ellas dos, causa la activación de la proteína PI3K, lo cual conduce a la activación de Akt (Figura 1).



**Figura 1. Vía de señalización PI3K/Akt/mTOR (Pinzón, Serrano, & Sanabria, 2009)**

Esta vía de señalización está compuesta por cuatro agentes principales: PI3K, Akt, mTOR y PTEN. PI3K, denominada Fosfatidil Inositol 3 quinasa, es una proteína heterodímera del grupo de las kinasas (Ser/Thr), compuesta por dos subunidades catalíticas p85 y p110.

Por otro lado, Akt es el homólogo humano del oncogen viral v-Akt (retrovirus Akt 8) y está relacionado con proteínas kinasas A (PKA) y C (PKC) en humanos. Akt posee tres isoformas las cuales se han visto implicadas en varios tipos de cáncer y en funciones específicas relacionadas con esta patología.

La proteína Akt puede estar constitutivamente activa, independiente de la activación del receptor, bien pudiera ser por mutaciones y/o moléculas corriente arriba constitutivamente activas. Esta proteína de acuerdo a su concepto canónico se encarga de proteger las células de la apoptosis y asegurar la progresión descontrolada del ciclo celular, las cuales son funciones innatas del metabolismo de una célula normal y están hiper activadas en el metabolismo de una célula tumoral (Chetram et al., 2013).

Una vez Akt es activada por PI3K, se inician mecanismos de proliferación y crecimiento celular que son mediados por la fosforilación de diferentes dianas. Estas dianas pueden ser clasificadas en tres grupos: proteínas apoptóticas; factores de

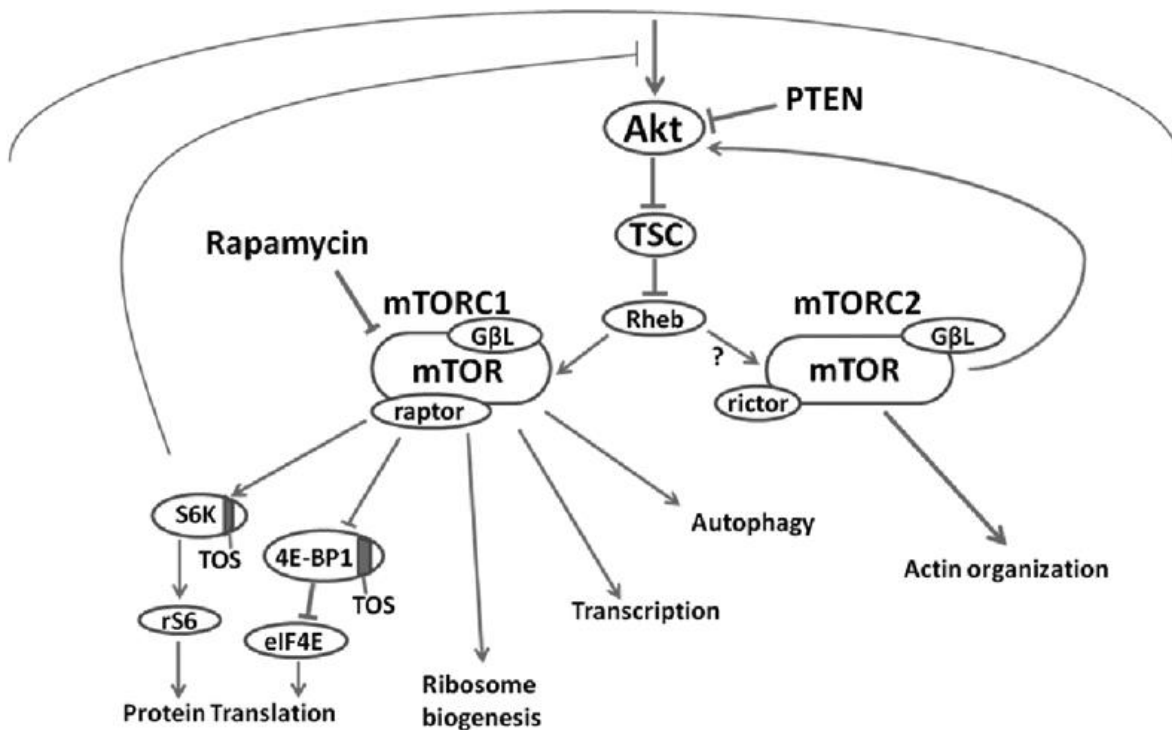
transcripción, siendo el principal NF-KB, encargado de incrementar la transcripción de genes anti-apoptóticos; y por último proteínas kinasas (Pinzón et al., 2009).

Dentro de este último grupo (proteínas kinasas que son activadas por Akt), se encuentra la proteína mTOR denominada así por sus siglas en inglés *mammalian Target of Rapamycin*. Esta kinasa es activada por fosforilación en esta vía de señalización, específicamente en el residuo de ser2448, pese a que posee otro sitio de fosforilación el cual está presente en las ser2441, y se activa por autofosforilación.

Por su parte, mTOR es una proteína de 289 kDa, específicamente Ser/Thr, regulador central del metabolismo, crecimiento, proliferación, y supervivencia celular; compuesta por 2549 aminoácidos. En su estructura mTOR presenta un terminal amino, y cuatro dominios: un dominio FRB (unión de la rapamicina), un dominio central FAT (del inglés *focal adhesion target*), otro con actividad kinasa y por último, un dominio FACT (del inglés *carboxy-terminal homology domain*). A nivel funcional mTOR forma parte del centro catalítico de dos complejos proteicos denominados mTORC1 y mTORC2, diferenciados por las proteínas que tienen asociadas (Escobar, M; Marquez, 2014).

El complejo mTORC1 presenta 5 componentes, mTOR (como subunidad catalítica), RAPTOR (Unidad regulatoria), mLST8, PRAS40 y DEPTOR; pese a que las funciones de cada uno de los componentes de este complejo no están dilucidadas completamente, se cree que RAPTOR y mLST8 actúan para estimular la actividad del complejo, mientras que PRAS40 y DEPTOR actúan como reguladores negativos. La regulación negativa logra ejercerse mediante la fosforilación de ambos componentes, la cual induce una menor interacción física de ellos con el complejo y culmina con su disociación, facilitando la activación de blanco corriente abajo. La regulación positiva de este complejo está asociada a proteínas corriente arriba como lo son PI3K, Akt y la vía de señalización RAS-ERK (Escobar, M; Marquez, 2014).

El complejo mTORC2 presenta 6 componentes, mTOR, RICTOR, mSIN1, PROTOR, mLST8 y DEPTOR. Las funciones de este complejo no están completamente dilucidadas y hasta el momento se ha descrito como un regulador corriente arriba de Akt, el cual posee la capacidad de fosforilar esta proteína en su residuo Ser473 y junto con PDK-1 fosforilarla en su residuo Thr308, logrando la activación completa de la kinasa (Escobar, M; Marquez, 2014) (Figura 2).



**Figura 2. Complejos de Raptor (mTORC1) y Rictor (mTORC2) de mTOR.**

Finalmente, en cuanto a PTEN denominado así por su nombre en inglés (*phosphatase and tensin homolog*) es una enzima fosfatasa que presenta dos actividades importantes: desfosforilar proteínas en los residuos tirosina, treonina y serina y presentar actividad lípido-fosfatasa quitando el grupo fosfato de la posición D3 del anillo inositol del fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato. Actualmente, es considerado el mayor regulador negativo de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR (Zhu & Baker, 2016).

La forma desfosforilada de PTEN coopera con AIP1 (Proteína de interacción con la actina 1) para suprimir la activación de Akt1, lo cual inhibe la migración celular, la proliferación celular mediada por las integrinas y la formación de la adhesión focal.

También se sabe que PTEN desempeña un papel como modulador clave de la vía de señalización Akt-mTOR controlando el ritmo del proceso de integración de las neuronas durante la neurogénesis, el desarrollo dendrítico y la formación de sinapsis. Por otra parte, puede ser un regulador negativo de la señalización de la insulina y del metabolismo de la glucosa en el tejido adiposo. La forma nuclear mono ubiquitinada posee un mayor potencial apoptótico, mientras que la forma citoplasmática no ubiquitinada induce menos capacidad supresora de tumores (Costa et al., 2015).



### *ROS y respuestas celulares inducidas*

Dentro de la reprogramación metabólica de la célula tumoral se encuentra la sobreproducción de ROS, propia de la privación de nutrientes, carencia de oxígeno, excesiva proliferación y angiogénesis, característica innata de los tumores sólidos. Es por esto, que se requiere la activación de múltiples vías de señalización que induzcan producción de moléculas como GSH, o enzimas antioxidantes como SOD, CAT, entre otras (Zhao et al., 2017).

Por su parte, los ROS son elementos que presentan un electrón o más desapareados en su orbital más externo y que tienen propiedades reactivas. Estas moléculas son potencialmente dañinas, y chocan con biomoléculas extrayéndoles un electrón, de tal forma que éstas se oxidan y pierden su función específica. Dentro de las biomoléculas más afectadas se encuentran principalmente los lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos (Rios Arrabal et al., 2013).

En el modelo de tumor sólido, se requiere un delicado equilibrio para que los niveles de ROS sean lo suficientemente altos para promover supervivencia, puesto que una de las respuestas celulares inducidas por la producción de ROS, es la inactivación de proteínas tirosinas fosfatasa (PTP) tales como PTEN, lo cual promueve la señalización de la vía PI3K/Akt/mTOR (Zhao et al., 2017).

Adicionalmente, y en contra posición, se requieren niveles de ROS lo suficientemente bajos para evitar que se afecten los lípidos de las membranas mitocondriales, lo cual trae en consecuencia la alteración de su integridad y el escape de estas especies hacia el espacio citosólico (Rios Arrabal et al., 2013).

La acumulación excesiva de ROS en el citosol causa la inactivación de enzimas esenciales en el metabolismo celular, y su fuga hacia el espacio nuclear produce bases modificadas, que generan el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis, por una parte, o la pérdida de la expresión de genes y posteriormente la muerte de la célula. Para contrarrestar el efecto de estas moléculas, se generan dos sistemas de defensa: sistema de defensa enzimático y sistema antioxidante. Los sistemas de defensa enzimáticos son vías endógenas compuestas por superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, y algunas catalasas, enzimas capaces de metabolizar la producción de ROS que genera procesos redox celulares. Por otra parte, el sistema de defensa antioxidante, está compuesto por todas aquellas moléculas tales como glutatión y algunas vitaminas (C y E) que presentándose a bajas concentraciones con respecto a una biomolécula retardan, inhiben o previenen la oxidación de éstas (Shen et al., 2016), El desequilibrio en las especies reactivas y en los mecanismos de neutralización por antioxidantes lleva a estrés oxidativo.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar el efecto del 6-shogaol sobre la captación de glucosa y la supervivencia celular de la línea tumoral derivada de Fibrosarcoma humano (HT1080).

### **Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto del 6-shogaol sobre la viabilidad de la línea celular HT1080, derivada de Fibrosarcoma humano.
2. Identificar el efecto del 6-shogaol en la producción de especies reactivas de oxígeno, en la línea tumoral HT1080.
3. Caracterizar el efecto de la exposición a 6-shogaol sobre la captación de glucosa en la línea tumoral HT1080
4. Evaluar el efecto del 6-shogaol sobre la expresión proteica de Akt, mTOR y PTEN en la línea tumoral HT1080.

## **HIPÓTESIS**

El 6-shogaol reduce la captación de glucosa a través de la modulación de la vía PTEN/Akt/mTOR, y promueve la disminución de la viabilidad celular, por mecanismos asociados al incremento de ROS.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

#### *Reactivos y líneas celulares*

El 6-shogaol fue obtenido de Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA). Los anticuerpos mTOR (#2972), phospho-mTOR-S2448 (#2971), PTEN (#9552), phospho-PTEN-S380/T382/383 (#9554), Akt (#9272), phospho-Akt-Ser473 (#9271) y GAPDH (14C10) Rabbit mAB (#2118) fueron obtenidos de cell signaling (Danvers, MA, USA). El anticuerpo usado como control de carga  $\beta$ -actina se obtuvo de ABCAM (Cambridge, MA, USA) con referencia #ab8227. La línea celular HT1080 derivada de fibrosarcoma humano, fue adquirida de ATCC (*American Type Culture Collection* ATCC, ref. ATCC-CCL-12). La línea celular HPdLF, fibroblastos derivados de ligamento periodontal humano, se obtuvo de LONZA (Walkersville, MD, USA. Ref. CC-7049).

### Métodos

#### *Cultivos celulares*

Las líneas celulares fueron cultivadas en DMEM suplementado con 10% de SBF y 1% de coctel de antibióticos (anfotericina, penicilina y estreptomina) a concentración final 500  $\mu$ M. Los cultivos celulares fueron mantenidos en incubadora a 37°C, en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando el cultivo alcanzó una confluencia del 80%, se lavó la capa celular con 0,25% (p/v) de una solución de PBS (Buffer fosfato salino) y se utilizó 1 ml de tripsina-EDTA para recolectar las células y proceder con la siembra de las placas para ensayo o crioconservación, previa inactivación de la tripsina con el doble de volumen de DMEM.

#### *Exposición al 6-shogaol*

Se realizó un stock de 6-shogaol (Sigma-Aldrich Chemical) en DMSO a concentración 361 mM a partir del cual se realizaron diluciones en DMEM suplementado con 10% de SBF para obtener una concentración final de 361  $\mu$ M de 6-shogaol. Para evaluar la viabilidad celular se usaron concentraciones de 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 y 150  $\mu$ M de 6-shogaol. Posteriormente, se escogieron concentraciones de 30, 40, 50, 60 y 70  $\mu$ M para evaluar la producción de ROS; para evaluar la captación de glucosa se escogieron concentraciones de 10 en 10 a partir de 10  $\mu$ M y hasta 90  $\mu$ M de 6-shogaol y finalmente para evaluar la expresión proteica se escogieron las siguientes concentraciones: 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu$ M de 6-shogaol.

### *Evaluación de la viabilidad celular*

La viabilidad celular en respuesta al tratamiento a diferentes concentraciones de 6-shogaol se evaluó por el método de MTT. Se sembró una placa de 96 pozos con 1.000 células/pozo. Una vez cumplidas las 24 horas de recuperación se dosificó con 2,5-150  $\mu\text{M}$  de 6-shogaol por 24h con base en reportes previos (T. Y. Li & Chiang, 2017). Pasado este tiempo se realizó cambio de medio y adicionó 10  $\mu\text{L}$  de MTT. Las células fueron incubadas por 2 horas a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de  $\text{CO}_2$ , hasta observar formación de cristales púrpura de formazán; posteriormente se agregó 100  $\mu\text{L}$  de dimetilformamida a todos los pozos. Los resultados fueron leídos en el fluorómetro FLUOstar (Omega, Offenburg, Alemania) a longitud de onda de 570 nm. Se determinó el  $\text{IC}_{50}$  a través de regresión no lineal.

El fundamento de este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (complejo II de la cadena transportadora de electrones) en el compuesto formazán (púrpura), lo que permite así determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas (Van Tonder, Joubert, & Cromarty, 2015).

### *Evaluación de la producción de ROS*

La medición de la producción de ROS se realizó por fluorimetría, usando una sonda de dihidroetidina (DHE) diluida en EtOH para medir producción de anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) generalizado. Las células fueron sembradas en placa de 96 pozos y tratadas con 30 hasta 70  $\mu\text{M}$  de 6-shogaol por 24 horas; posteriormente, fueron marcadas por 30 minutos con DHE a una concentración final de 2,5  $\mu\text{M}$ , en suspensión, a 37°C, en atmósfera húmeda y 5% de  $\text{CO}_2$ . La fluorescencia fue medida a 535/610 nm. Se utilizó peróxido de hidrógeno 1 mM como control positivo del ensayo y N-Acetil Cisteína (NAC) 5 mM como control negativo del ensayo, el cual fue usado en co-tratamiento con 6-shogaol para evaluar la recuperación de la muerte inducida por ROS.

### *Evaluación de la captación de glucosa*

La captación de glucosa fue medida por sonda NBDG-2 (del inglés: 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose). Brevemente, este reactivo es una molécula de glucosamina sustituida con un fluoróforo de 7-nitrobenzofurazano en su grupo amino, el cual actúa como análogo de glucosa, consiguiendo el ingreso a la célula para ser detectado por citometría de flujo a 430nm (laser verde) (Fang et al., 2018). Fueron sembradas 10.000 células en placas de 48 pozos y tratadas con 10-90  $\mu\text{M}$  de 6-shogaol por 24 horas; más adelante, se recogieron las células por tripsinización en eppendorf, y se procedió a lavar las células con 200  $\mu\text{L}$  de PBS para eliminar las trazas de la sonda y se analizó la

intensidad media de fluorescencia para dicha sonda. Se utilizó ácido ascórbico como control negativo del ensayo.

#### *Análisis de expresión de proteínas por western blot*

La activación de las proteínas a estudiar en respuesta al tratamiento con 6-shogaol fue evaluada por western blot. Las células fueron previamente tratadas con 10-50  $\mu\text{M}$  de 6-shogaol y posteriormente lisadas con buffer RIPA (50 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1% tritón 100x y cóctel inhibidor de proteasas y fosfatasas). El lisado de células para obtención de extracto de proteínas totales se realizó por agitación a 4°C. Se realizó cuantificación de proteína por el método de ácido bicinconínico. Cantidades equivalentes de proteína fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10%, transferidas a membranas de PVDF e incubadas durante la noche con anticuerpos primarios contra mTOR, phospho-mTOR (S2448), PTEN, phospho-PTEN (S380/T382/383) y  $\beta$ -actina, que se utilizó como control de carga. Posterior a la incubación, se realizaron 3 lavados con TBS-T, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario unido a peroxidasa durante 1 hora. Después de realizar 3 lavados con TBS-T, las membranas fueron tratadas con reactivos de quimioluminiscencia (ThermoScientific, Carlsbad, Canadá) para su revelado.

#### *Análisis de expresión de Akt y Akt-p por citometría de flujo*

Se usó la línea tumoral HT1080 (ATCC, Manassas VA, USA), la cual fue mantenida en DMEM suplementado con 10% de SBF y 5% de coctel de antibióticos. La línea celular fue tratada con 6 shogaol a concentraciones de 10 a 50  $\mu\text{M}$  e incubada durante 24 horas. Las células se fijaron con formaldehído al 1,6% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se permeabilizaron con 600  $\mu\text{L}$  de metanol absoluto durante 1 hora. Finalmente, luego de dos lavados con 600  $\mu\text{l}$  de medio de tinción (PBS 1X y 2 % de albumina sérica bovina) se marcaron con anti-Akt 1:100 (Cell Signaling Technology, Beverly MA, USA) y anti-phosphoAkt 1:100 (Cell Signaling Technology, Beverly MA, USA). Como anticuerpo secundario, se usó anticuerpo Antimouse Alexa 488 1:400 y Antirabbit Alexa 488 1:400. La lectura se hizo en el citómetro Guava easyCyte (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Se obtuvo la intensidad media de fluorescencia de láser verde; como control de la fluorescencia, se utilizó sólo anticuerpo secundario (Huang et al., 2018).

#### *Análisis estadístico*

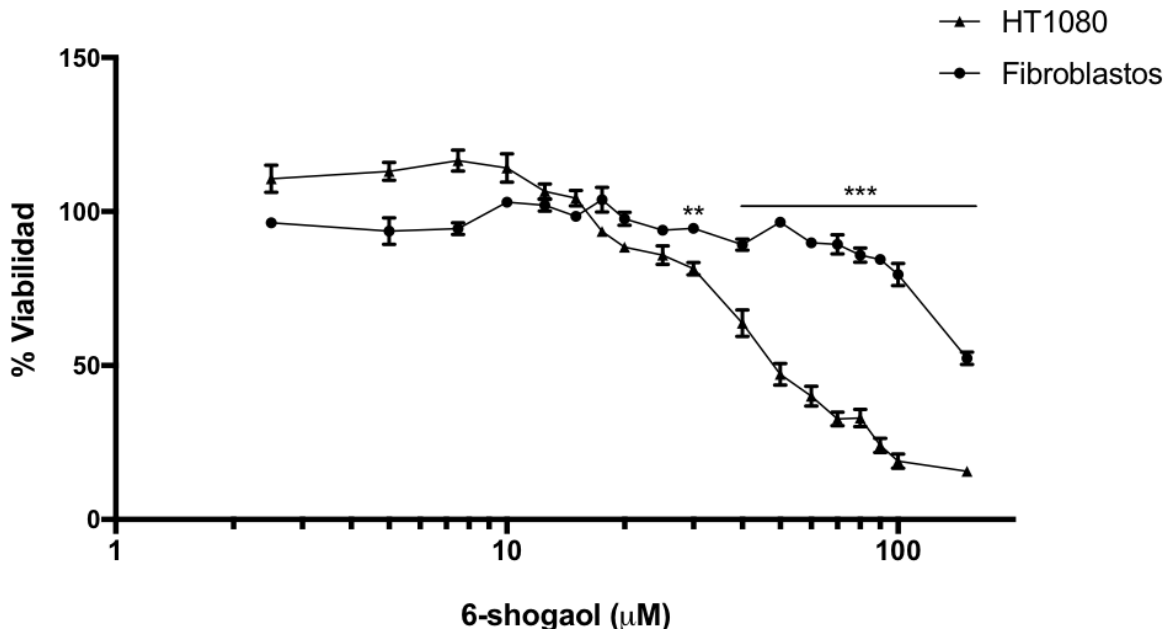
De cada ensayo se realizaron 3 réplicas biológicas por triplicado ( $n=9$ ). Los datos obtenidos son expresados como media  $\pm$  desviación estándar (SD). El análisis de varianza (ANOVA) fue empleado para las comparaciones entre grupos, seguido de la prueba de post-hoc de Dunnet. Se consideró estadísticamente significativo un valor de probabilidad  $< 0,05$  el cual se relaciona con un asterisco (\*); otros valores

de significancia fueron relacionados así:  $<0,01$  (\*\*),  $<0,001$  (\*\*\*). Todos los análisis fueron realizados con el software estadístico Graph Pad Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6-shogaol induce muerte celular en la línea tumoral derivado de fibrosarcoma humano (HT1080).

El tratamiento de la línea tumoral HT1080 a diferentes concentraciones de 6-shogaol (2,5-150  $\mu\text{M}$ ) resultó en la disminución progresiva de la viabilidad celular de forma dosis-dependiente, encontrando que el  $\text{IC}_{50}$  de 6-shogaol en este modelo fue de 52,8  $\mu\text{M}$ . A través de los diferentes tratamientos fue posible observar que las concentraciones más bajas de 6-shogaol no parecían exhibir un efecto sobre la viabilidad, pero a partir de 30  $\mu\text{M}$  se observa una evidente disminución de la viabilidad celular inclusive por debajo del 80%. Por otra parte, y aunque a partir de 80  $\mu\text{M}$  de 6-shogaol los fibroblastos derivados de ligamento periodontal humano (HPdLF) también se ven afectados en su viabilidad, los resultados mostraron que estas células exhiben mayor resistencia al tratamiento con 6-shogaol en comparación con la línea HT1080, de forma significativa a partir de 40  $\mu\text{M}$  de 6-shogaol ( $p= 0,0058$ ) (Figura 3). Es de anotar, que mientras las células HT1080 a 150  $\mu\text{M}$  de 6-shogaol presentaban una disminución de más del 80% de la viabilidad, esta dosis no alcanzó a disminuir la viabilidad de los fibroblastos en el 50%.



**Figura 3. Viabilidad líneas celulares tratadas con 6-shogaol.** Las líneas HT1080 y HPdLF fueron tratadas a partir de 2,5  $\mu\text{M}$  hasta 150  $\mu\text{M}$  de 6-shogaol. \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

Si bien es cierto, los efectos diferenciales del 6-shogaol en líneas celulares normales y tumorales han sido ya descritos, la causa por la cual este compuesto presenta este efecto diferencial aún es desconocida. Sin embargo, se puede pensar que tal efecto está relacionado con la producción incrementada de ROS inducida por el 6-shogaol, efecto que puede ser neutralizado más eficazmente por las células derivadas de tejido normal a través de mecanismos endógenos, lo cual redundaría en una menor afectación en la viabilidad celular. En adición, es de considerar que las células derivadas de tejidos tumorales ya presentan una elevada cantidad de ROS en su interior, lo cual puede hacerlas más sensibles a este tipo de daño, comprometiendo su viabilidad.

Los efectos citotóxicos del 6-shogaol han sido descritos en diversas líneas tumorales y a diferentes concentraciones, tal es el caso de células HT-29 que al ser tratadas con 60  $\mu\text{M}$ , redujeron su viabilidad en un 50%, y a 80  $\mu\text{M}$  se observó una disminución completa de la viabilidad de este modelo de cáncer colorrectal (T. Y. Li & Chiang, 2017). Otras líneas tumorales han evidenciado una mayor sensibilidad al 6-shogaol; entre estas, carcinoma de pulmón (células A549) y cáncer de seno (células MDA-MB-231), los cuales presentaron  $\text{IC}_{50}$  de 29,6 y 22,1  $\mu\text{M}$  respectivamente, cuando fueron tratadas con 6-shogaol por 48 horas (Nedungadi et al., 2018). La diferencia en el  $\text{IC}_{50}$  entre líneas tumorales puede deberse al perfil metabólico o diferencias histológicas de las líneas celulares, lo que les confiere mayor sensibilidad al 6-shogaol.

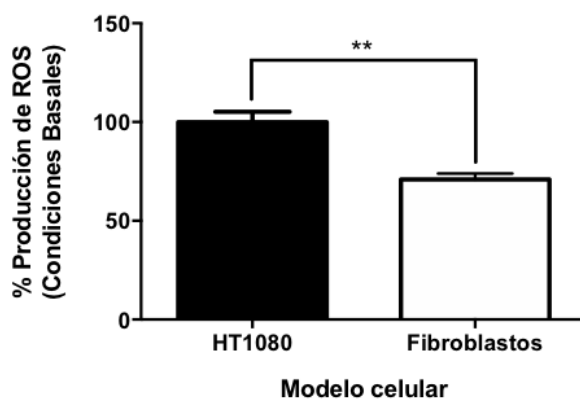
Por otra parte, las diferencias significativas en viabilidad observadas entre las células no tumorales (HPdLF) y la línea HT1080 en respuesta al efecto del 6-shogaol ( $p=0,0001$ ) coincide con reportes descritos en fibroblastos gingivales humanos (HGF-1) en donde a partir de 80  $\mu\text{M}$  de 6-shogaol se comienza a observar una disminución del 10% de la viabilidad celular (Annamalai, Kathiresan, & Kannappan, 2016).

### **Efecto prooxidante del 6-shogaol en el modelo tumoral (HT1080) y disminución de este efecto por compuesto antioxidante.**

Se midió la producción de ROS basal de ambos modelos celulares, encontrando que la línea HT1080 presenta de forma significativa ( $p=0,0011$ ) una mayor producción de ROS, en comparación con los fibroblastos derivados de ligamento periodontal; en la Figura 4 se muestra esta diferencia. Lo anterior puede ser explicado desde los hallazgos presentados, por diferentes grupos anteriormente, los cuales demostraron que las células tumorales presentan mayor producción de ROS, debido a sus alteraciones genéticas, metabólicas y del microambiente tumoral que les permiten aumentar su crecimiento, proliferación y supervivencia (Nogueira & Hay, 2013). Para contrarrestar el efecto que el aumento de ROS produce sobre la



viabilidad, estudios recientes indican que las células tumorales desarrollan mecanismos alternos de activación de vías antioxidantes. Por otra parte, es sabido que la producción aumentada de ROS en células tumorales induce activación descontrolada de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR, en comparación con la respuesta de células normales. En respuesta a esta activación, no solo se activa la vía Ras-MAPK la cual le permite a la célula tumoral proliferar, sino que también se activa PI3K/Akt/eNOS resultando en modulación metabólica y en supervivencia; adicionalmente, la hiperactivación resultante de HIF- $\alpha$  mediada también por factores como VEGF, modulan la angiogénesis, aumento en proliferación y migración celular, entre otros (Kumari, Badana, G, G, & Malla, 2018).

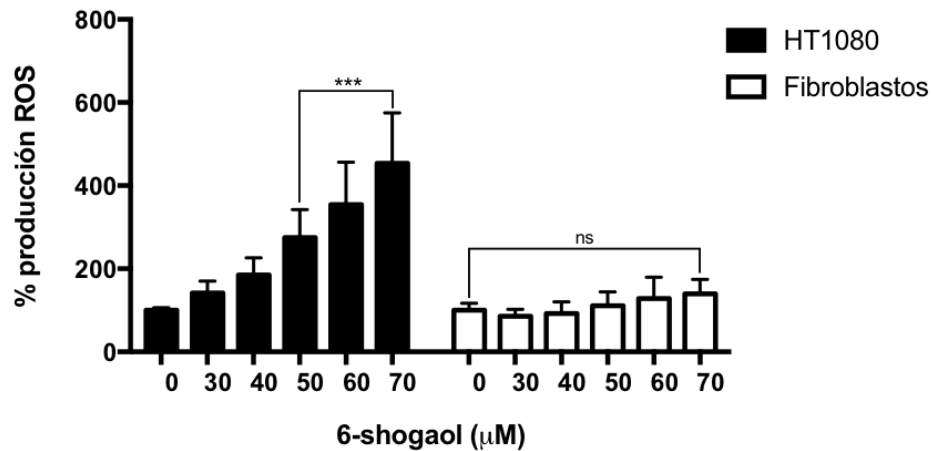


**Figura 4. Producción de ROS en condiciones basales de células HT1080 y fibroblastos.** Producción de ROS por ambos modelos celulares en condiciones basales de estrés celular. \*\* $p > 0,01$ .

Una vez obtenidos los resultados de producción de ROS basal y con el fin de evaluar la dinámica celular en respuesta al tratamiento con 6-shogaol, se empleó un rango de concentraciones (30  $\mu$ M - 70  $\mu$ M) en las cuales se había observado disminución significativa en la viabilidad celular de la línea tumoral; concentraciones también empleadas para los ensayos con las células no tumorales. Los resultados mostraron claramente un efecto dosis-dependiente en las células HT1080, y significativo a partir de 50  $\mu$ M de 6-shogaol ( $p = 0,0001$ ). Los fibroblastos mostraron una leve tendencia incremental de ROS en respuesta a los tratamientos con 6-shogaol, aunque no hubo diferencias significativas con respecto al basal. Estos resultados permiten observar que el 6-shogaol tiene un efecto selectivo entre células tumorales y no tumorales en cuanto a la producción de ROS (Figura 5).

Se ha descrito que la capacidad prooxidante del 6-shogaol en células tumorales, ha sido asociada a un grupo carbonilo  $\alpha, \beta$  insaturado el cual participa en las reacciones de Fenton y promueve la producción de radicales hidroxilo, los cuales presentan

alta afinidad por el ADN y algunas proteínas, lo que le permite disminuir la viabilidad de este tipo de células (Annamalai et al., 2016).



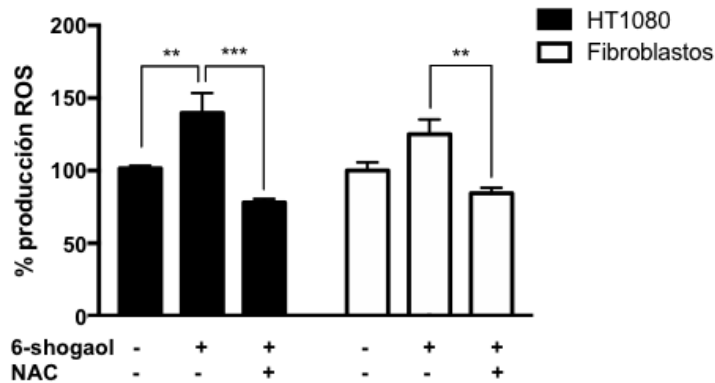
**Figura 5. Producción de ROS de ambas líneas celulares.** Producción de ROS de células HT1080 y fibroblastos tratados con 30-70 μM de 6-shogaol. \*\*\* $p < 0,001$ ; ns: no significativo.

Como se mencionó anteriormente, es muy probable, que la maquinaria celular de las células no tumorales permita una mejor eliminación de los ROS disminuyendo el efecto que el 6-shogaol ejerce como compuesto prooxidante. En las células tumorales, la presencia de complejas alteraciones como disrupción de algunas vías metabólicas, activación de vías de señalización implicadas en supervivencia así como el aumento en el consumo de nutrientes, pueden conducir no solo a una mayor producción de ROS sino a una disminución en la capacidad de neutralizarlos de manera efectiva (Nogueira & Hay, 2013).

Los resultados observados en el presente trabajo, también han sido descritos en otros modelos tumorales tales como células epiteliales de riñón de ratón (TMCK-1) y células mesangiales (MC) (M. A. Han et al., 2015). Por otra parte, también coinciden con los reportes realizados en el año 2016 en células de cáncer colorrectal, en donde a 5 μM de 6-shogaol se duplica la producción de ROS en comparación con el control y a 20 μM se obtienen una producción de ROS hasta 4 veces más alta que el control. En este reporte también se evaluó la activación de enzimas antioxidantes las cuales a medida que se aumentaba la concentración de 6-shogaol disminuían su activación (Annamalai et al., 2016).

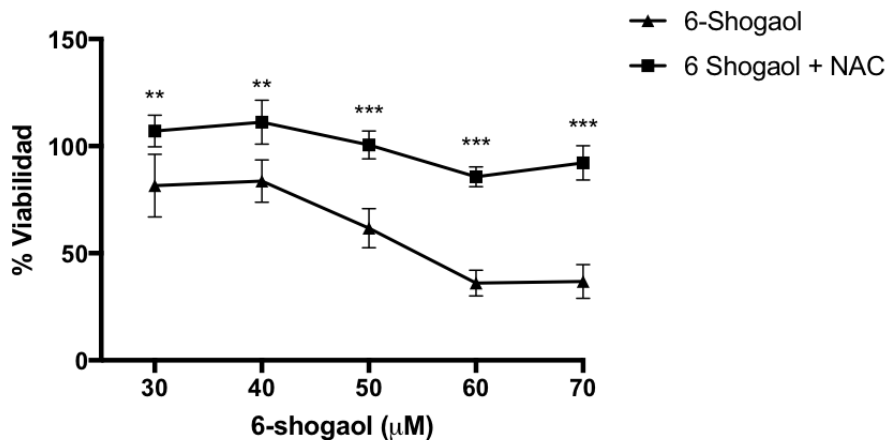
Al tratar ambos modelos celulares con 5mM de NAC en presencia de 70 μM 6-shogaol, se comprobó una disminución estadísticamente significativa de la producción de ROS ( $p = 0,001$  y  $p = 0,0029$  para las células HT1080 y HPdLF respectivamente), mostrando el efecto de su capacidad antioxidante (Rushworth &

Megson, 2014) sobre el 6-shogaol, demostrando que el incremento en la producción de ROS se debía al efecto del 6-shogaol (Figura 6).



**Figura 6. Producción de ROS de ambas líneas celulares tratadas con 6-shogaol y NAC.** Producción de ROS de células HT1080 y fibroblastos fueron co-tratados con 70  $\mu$ M de 6-shogaol y 5mM de NAC. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

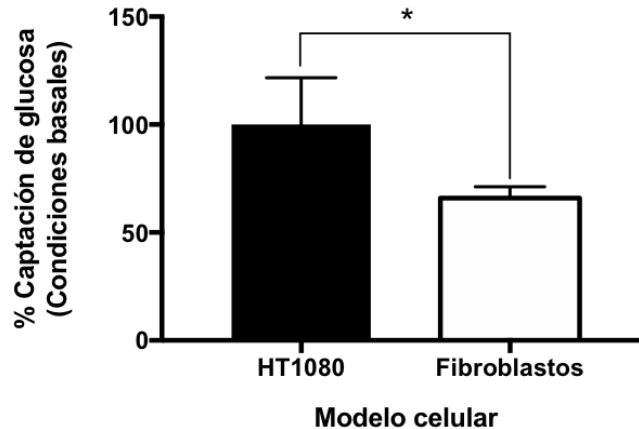
Finalmente, se evaluó la viabilidad celular del modelo tumoral una vez fue tratado con 6-shogaol (30 - 70  $\mu$ M) y NAC (5 mM), en donde se encontró, que las células tratadas únicamente con 6-shogaol presentaban disminución de la viabilidad en todas las concentraciones usadas (Figura 7), al contrario de las células que fueron tratadas simultáneamente con NAC, las cuales presentaron una atenuación del efecto citotóxico del 6-shogaol (p=0,0091). Lo anterior es evidencia que la muerte celular generada por el 6-Shogaol puede estar asociada al aumento en la producción de ROS. Akimoto et al., 2015, demostró que la capacidad prooxidante del 6-shogaol y su efecto en la reducción de la viabilidad celular logra ser rescatada con el tratamiento de 10 mM de NAC, en un modelo celular de PANC-1 (células de tumor pancreático).



**Figura 7. Reducción del efecto citotóxico del 6-shogaol.** La línea tumoral fue tratada con concentraciones de 30 a 70  $\mu$ M de 6-shogaol y co-tratadas con NAC por 24 horas. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

## 6-shogaol disminuye la captación de glucosa en el modelo tumoral y la aumenta en fibroblastos

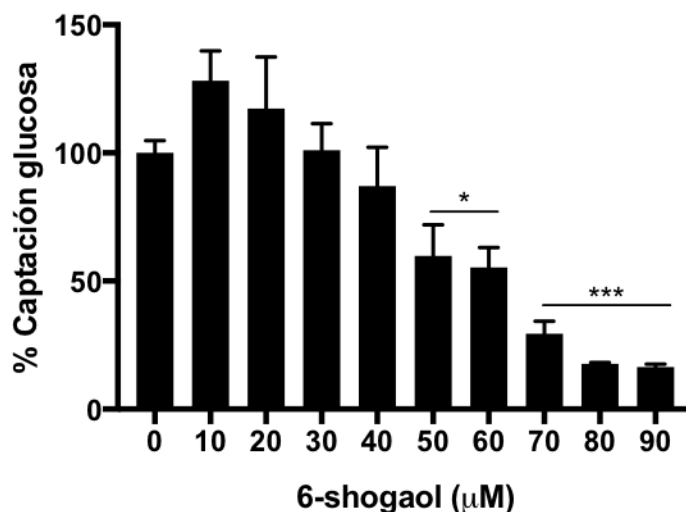
La captación de glucosa basal determinada en ambos modelos celulares, mostró que el modelo tumoral capta más glucosa que el modelo no tumoral ( $p=0,0114$ ; Figura 8); esto se puede explicar por su alta actividad metabólica y sus elevadas demandas energéticas para el mantenimiento de su tasa de proliferación (J. Han et al., 2015).



**Figura 8. Captación de glucosa basal de células HT1080 y fibroblastos.** Captación de glucosa en estado basal por ambos modelos celulares.  $*p<0,01$ .

Adicionalmente, el efecto resulta característico del llamado “efecto Warburg”, el cual, con sus modificaciones, ha sido descrito en los últimos reportes de literatura como lactato-génesis aeróbica, caracterizado por una reprogramación metabólica que conlleva a un aumento en la captación de glucosa, mayor producción de lactato y un aumento de la translocación de GLUT-1 a la membrana celular (Keating & Martel, 2018).

Una vez establecida la captación basal de las líneas celulares se decidió tratar ambas líneas celulares con 6-shogaol a diferentes concentraciones (desde 10 a 90  $\mu\text{M}$ , en intervalos de 10), puesto que los fibroblastos presentaron mayor resistencia a las altas concentraciones de este compuesto. A partir de lo anterior, se observó que la captación de glucosa de la línea tumoral disminuyó significativamente a partir de la concentración 50  $\mu\text{M}$  de 6-shogaol ( $p=0,0259$ ; Figura 9).

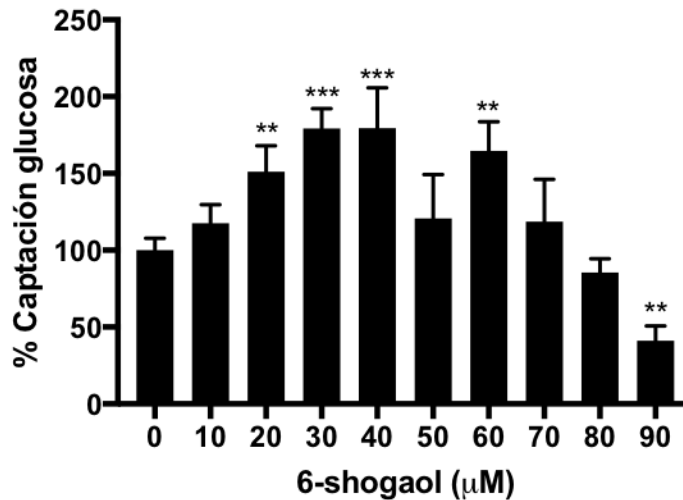


**Figura 9. Captación de glucosa células HT1080.** Evaluación de la captación de glucosa en células HT1080 con 10 μM hasta 90 μM de 6-shogaol por 24 horas. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Hasta el momento no existen reportes en la literatura acerca del efecto del 6-shogaol sobre la captación de glucosa en modelos tumorales; sin embargo, se sabe que el 6-gingerol –otro de los compuestos pungentes del Jengibre- tiene la capacidad de aumentar la captación de glucosa en células músculo liso y modelos de ratón obeso diabético a través del aumento en la translocación de GLUT-4 en la superficie de la membrana celular (Son, Miura, & Yagasaki, 2015) y en células de músculo esquelético (C2C12) incrementando la fosforilación de Akt (Lee et al., 2015).

Recientemente se ha descrito que ciertos compuestos fenólicos tienen la capacidad de irrumpir el complejo metabólico de la célula tumoral a través de disminuir la captación de glucosa. Dentro de los polifenoles descritos con estas características encontramos el resveratrol, quercetina, petiveria, phloretina, entre otros, los cuales han sido estudiados en diversas líneas celulares de cáncer de seno tales como T47D, MCF-7 y MDA-MB-231 (Keating & Martel, 2018). Los mecanismos descritos por los cuales los compuestos anteriormente mencionados ejercen su efecto sobre las diversas líneas celulares incluyen la disminución de la expresión de GLUT-1, disminución de la acumulación de HIF1- $\alpha$ , o por competencia con los transportadores de glucosa, respectivamente; otros mecanismos no han sido descritos aún. Por lo anterior, es claro que el efecto del 6-shogaol sobre la captación de glucosa podría ser atribuido a su característica fenólica, y podría relacionarse con la inducción de muerte por disminución en la captación de uno de los nutrientes principales de la célula tumoral. Resultados preliminares de nuestro laboratorio muestran que 30 μM de 6-shogaol reduce la actividad HIF1- $\alpha$  en células HT1080.

Al evaluar el efecto de diferentes concentraciones de 6-shogaol en los fibroblastos, se encontró que la captación de glucosa aumentó de forma significativa a partir de 20  $\mu\text{M}$  ( $p=0,0201$ ) hasta 60  $\mu\text{M}$ . El aumento en la concentración de 6-shogaol mostró una disminución progresiva de la captación, siendo significativa a 90  $\mu\text{M}$  ( $p=0,0065$ ; Figura 10).



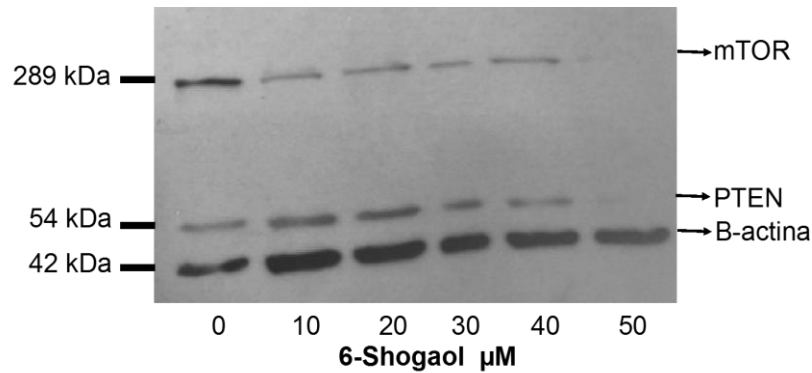
**Figura 10. Captación de glucosa de fibroblastos.**

Fibroblastos tratados con concentraciones incrementales de 6-shogaol a partir de 10  $\mu\text{M}$  y hasta 90  $\mu\text{M}$ . \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

El efecto del 6-shogaol sobre el aumento de la captación de glucosa en modelos celulares, fue descrita por primera vez, en adipocitos (3T3-L1) y miotúbulos (C2C12), demostrando que este compuesto generaba una mayor captación, en comparación con el 6-gingerol y la zingerona (Wei et al., 2017). Este efecto fue atribuido a al incremento en la fosforilación de AMPK, aunque es probable que existan mecanismos adicionales involucrados aún no estudiados.

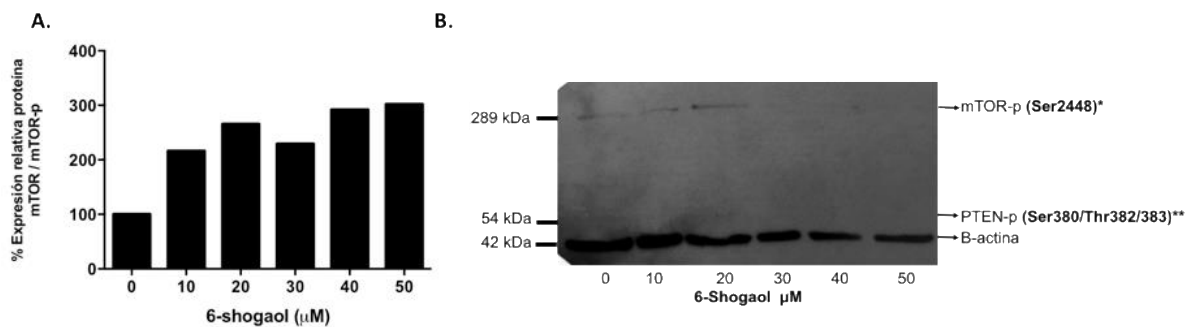
### **6-shogaol disminuye la supervivencia tumoral a través de la modulación de la vía PI3K/Akt/mTOR**

Con el fin de avanzar en el mecanismo de acción del 6-shogaol, se evaluó el efecto de este sobre la expresión y activación de las proteínas Akt, PTEN y mTOR por western blot y citometría de flujo. Se observó que la línea tumoral expuesta a 6-shogaol, mantiene la expresión de PTEN y mTOR hasta concentraciones de 40  $\mu\text{M}$ ; sin embargo, a concentraciones mayores se evidencia un efecto de disminución en la expresión proteica (Figura 11).



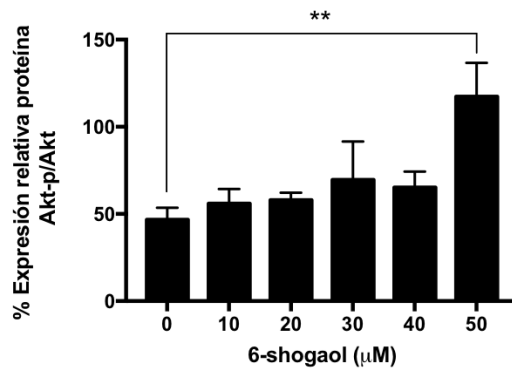
**Figura 11. Expresión proteica de PTEN y mTOR evaluada por western blot.**

En cuanto a la fosforilación de mTOR, se observó que 6-shogaol (concentraciones entre 10 y 50  $\mu\text{M}$ ) induce la fosforilación de esta proteína, lo cual se puede observar a través del análisis por densitometría, mientras que PTEN no se observó fosforilado en ninguno de sus tres sitios de activación; esto permite pensar, que PTEN pudiese estar en su forma activa (desfosforilado) (Figura 12).



**Figura 12. A.** Análisis por densitometría de cambios de activación de mTOR en células HT1080 tratadas con 6-shogaol. **B.** Niveles de expresión proteica de mTOR fosforilado, PTEN fosforilado y  $\beta$ -actina como control de carga en células HT1080 por western blot.

Por otra parte, al evaluar la expresión de Akt y Akt fosforilado por citometría, se encontró que al igual que con las proteínas mTOR y PTEN, el 6-shogaol no produce cambios significativos en la expresión de dicha proteína. La fosforilación de Akt, aumentó en respuesta al 6-shogaol con respecto a su estado basal de forma significativa a 50  $\mu\text{M}$  ( $p=0,0091$ ) (Figura 13) (Anexo 7 y 8).



**Figura 13. Análisis de expresión de Akt fosforilado/Akt de células HT1080 tratadas con 6-shogaol por citometría de flujo. \*\*p<0,001.**

El concepto canónico del rol de Akt como proteína que promueve la proliferación, supervivencia y crecimiento celular, se encuentra fundamentado en la base de que corriente abajo Akt induce la activación de proteínas tales como mTOR, que promueve el crecimiento celular, además de la inactivación de varios factores proapoptóticos tales como BAD, procaspasa-9 y factores de transcripción FKHR (Forkhead). Adicionalmente, la activación de Akt promueve el aumento de factores de transcripción que aumentan la expresión de genes anti-apoptóticos *CREB* y mediante fosforilación directa NF-KB y HIF-1 $\alpha$ .

Finalmente, otro de los mecanismos a través del cual Akt promueve la supervivencia es por medio de la inactivación del gen supresor de tumores p53, conocido como guardián del genoma (Pinzón et al., 2009). Es por esto, que la activación de Akt se ha visto involucrada en varios tipos de neoplasias, tales como cáncer de seno (W. Li et al., 2018), colorrectal y próstata (Al-Saffar et al., 2018), entre otros. No obstante, este concepto canónico está siendo reevaluado y ha surgido un nuevo concepto emergente, en donde se propone que Akt posee un rol dual entre el crecimiento tumoral y la promoción de la senescencia prematura (Chetram et al., 2013).

La senescencia celular prematura es un estado irreversible de detención del crecimiento celular, que se caracteriza por un conjunto de cambios fisicoquímicos y de funciones celulares (Kumar et al., 2018). Actualmente, se cree está mediado por la producción de ROS y la privación de los nutrientes necesarios para la supervivencia de la célula tumoral (Davalli, Mitic, Caporali, Lauriola, & D'Arca, 2016), en condiciones de activación de Akt, puesto que cuando se activa Akt y su principal modulador corriente abajo, mTOR, bajo éstas circunstancias ( $\uparrow$  ROS  $\downarrow$  Glucosa), se hace a las células más sensibles a la muerte celular inducida por privación o



disminución en la captación de glucosa y la sobreproducción de ROS (Graham et al., 2012).

Un grupo de investigación reportó, que pese a la activación de PTEN, la privación de glucosa incrementa la fosforilación de Akt en un modelo de cáncer de pulmón, lo cual les permitió concluir que la activación de ésta proteína varía de acuerdo al contexto, el modelo tumoral y múltiples factores de decisión celular (He et al., 2016).

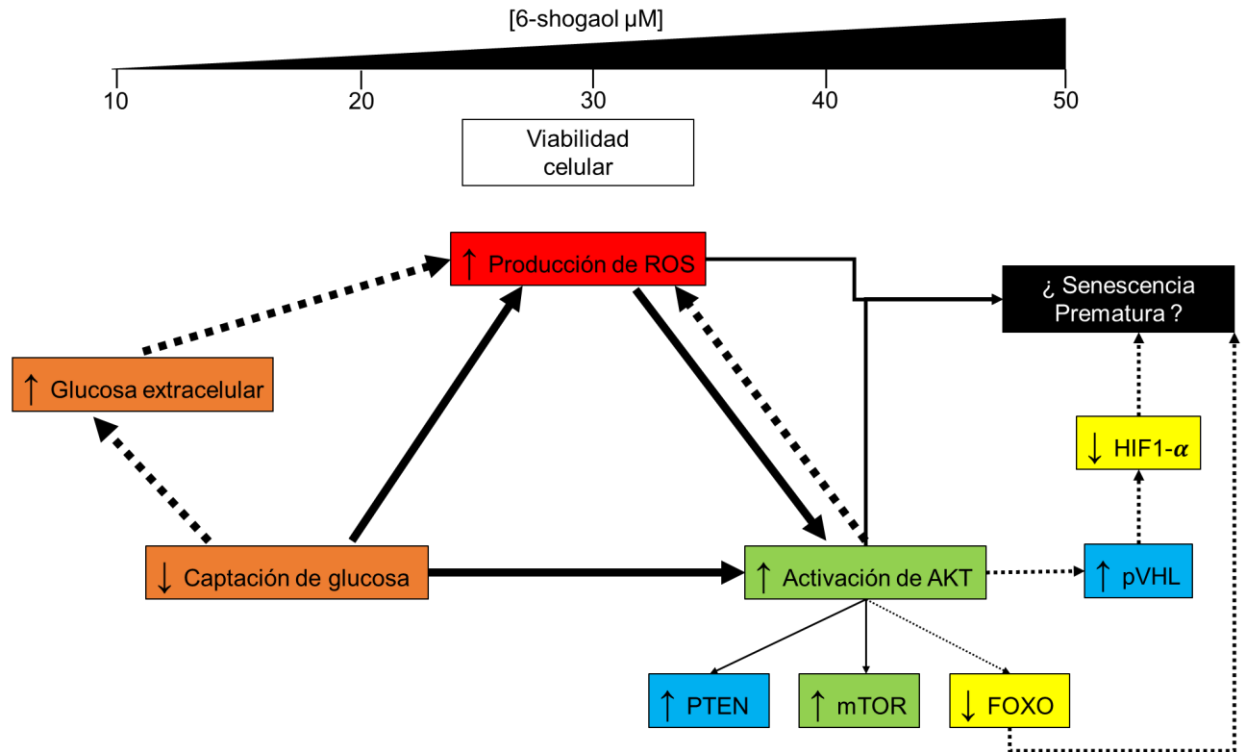
Otro de los mecanismos que permiten la inducción de la muerte celular por la activación de esta vía de señalización, pese a ser conocida como una vía de supervivencia, es la relación que tiene con la proteína pVHL; esta proteína junto con Akt poseen un dominio idéntico, que al ser fosforilado permite la unión de HIF-1 $\alpha$  a pVHL, lo cual conlleva a la degradación de HIF-1 $\alpha$  por el proteosoma, promoviendo así la apoptosis (Chetram et al., 2013).

A su vez, también recientemente se ha descrito que la activación de Akt puede estar relacionada con un aumento de la glucosa en el medio, proceso inductor de la producción de ROS y característico de los mecanismos de hiperglicemia, en donde si la glucosa es incapaz de entrar a la célula, bien sea por la disminución de la traslocación de GLUT-1 o por cualquier otro mecanismo, su acumulación extracelular permitirá la activación de Akt y la inducción de senescencia prematura (Huy et al., 2018).

Finalmente, un último mecanismo propuesto por el cual la activación de Akt es suficiente para promover la senescencia prematura, es la capacidad de ésta proteína de aumentar la producción de ROS, aumentar el consumo de oxígeno e inhibir factores de transcripción como FOXO (Nogueira et al., 2008).

Por todo lo anterior, es probable que el 6-shogaol esté induciendo senescencia prematura a través del aumento en la producción de ROS, lo cual puede estar relacionado con la activación de Akt; a la vez, que el efecto mostrado en la captación de glucosa haga que las células sean más sensibles a la inducción de la apoptosis mediada por ROS a través de mecanismos recientemente descritos, aunque no sea aún claro el orden en el que se desencadenan los mismos.

En consecuencia, considerando los resultados obtenidos en este trabajo, y los reportes sobre el efecto dual de Akt en modelos tumorales, se propone el siguiente modelo para tratar de explicar lo que sucede con HT1080, para lo cual por supuesto se deberán hacer más estudios. Las líneas sólidas corresponden a los resultados obtenidos en este trabajo; las líneas punteadas corresponden a hipótesis basados en los reportes de literatura anteriormente descritos (Figura 14).



### Convenciones

- Moléculas señalizadoras
- Proteínas de supervivencia
- Factores de transcripción
- Supresores tumorales
- Nutrientes

**Figura 14. Mecanismo propuesto de inducción de muerte producto del tratamiento por el 6-shogaol.**

## CONCLUSIONES

1. El 6-shogaol ejerce un efecto citotóxico diferencial entre la línea celular derivada de fibrosarcoma humano HT1080 y la línea celular de fibroblastos, siendo estos últimos, más resistentes a concentraciones superiores a 70  $\mu\text{M}$  de 6-shogaol.
2. La disminución de la viabilidad celular de la línea HT1080 puede estar relacionada con el aumento en la producción de ROS provocada por el 6-shogaol, la cual logra ser recuperada con el co-tratamiento con N-Acetilcisteína.
3. La producción de ROS en células tumorales HT1080 es significativamente mayor a 50  $\mu\text{M}$  de 6-shogaol por 24 horas en comparación con los fibroblastos los cuales no presentaron un aumento significativo en la producción de ROS a ninguna de las concentraciones de 6-shogaol (30-70  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas.
4. La captación de glucosa basal es significativamente mayor en células tumorales HT1080 que en fibroblastos. Adicionalmente, la captación de glucosa de las células tumorales HT1080 logra ser atenuada por el tratamiento con 6-shogaol a partir de 50  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Mientras que esta logra ser significativamente mayor en fibroblastos a partir de 24 horas de tratamiento con 20  $\mu\text{M}$  de 6-shogaol.
5. 6-shogaol induce la fosforilación de las proteínas Akt y mTOR en las células tumorales (HT1080) bajo tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  por 24 horas, a su vez que mantiene PTEN desfosforilado, forma en la cual se considera activo.

## PERSPECTIVAS

En conjunto con los reportes de literatura, en este trabajo probablemente se observe el rol dual emergente de la proteína Akt en la promoción de la apoptosis. Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para explicar la conexión que existe entre la producción de ROS y la activación de Akt, y ver las implicaciones de esta conexión en el metabolismo de la célula tumoral. Para ello sería importante evaluar el efecto del 6-shogaol sobre la expresión de GLUT-1 y la producción de lactato. Adicionalmente evaluar otras proteínas implicadas en esta vía de señalización que permitan dilucidar el efecto de la vía en la progresión de este modelo tumoral.

Además, sería interesante observar cuál es el efecto del extracto completo de Jengibre sobre estos mecanismos moleculares, para evaluar si los compuestos de este alimento actúan por separado o ejercen efectos de forma sinérgica.

En un futuro se hará necesario realizar estudios in vivo para evaluar la eficacia antitumoral y seguridad clínica de este compuesto.

## REFERENCIAS

- Akimoto, M., Iizuka, M., Kanematsu, R., Yoshida, M., & Takenaga, K. (2015). Anticancer effect of ginger extract against pancreatic cancer cells mainly through reactive oxygen species-mediated autotic cell death. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126605>
- Al-Saffar, N. M. S., Troy, H., Wong Te Fong, A.-C., Paravati, R., Jackson, L. E., Gowan, S., ... Chung, Y.-L. (2018). Metabolic biomarkers of response to the AKT inhibitor MK-2206 in pre-clinical models of human colorectal and prostate carcinoma. *British Journal of Cancer*, 119(9), 1118–1128. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0242-3>
- Annamalai, G., Kathiresan, S., & Kannappan, N. (2016). [6]-Shogaol, a dietary phenolic compound, induces oxidative stress mediated mitochondrial dependant apoptosis through activation of proapoptotic factors in Hep-2 cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.04.044>
- Catherine Sánchez, N. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(13\)70659-X](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70659-X)
- Chetram, M. A., Bethea, D. A., Odero-Marah, V. A., Don-Salu-Hewage, A. S., Jones, K. J., & Hinton, C. V. (2013). ROS-mediated activation of AKT induces apoptosis via pVHL in prostate cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1549-7>
- Choi, J. G., Kim, S. Y., Jeong, M., & Oh, M. S. (2018). Pharmacotherapeutic potential of ginger and its compounds in age-related neurological disorders. *Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.08.010>
- Costa, H. A., Leitner, M. G., Sos, M. L., Mavrantoni, A., Rychkova, A., Johnson, J. R., ... Bustamante, C. D. (2015). Discovery and functional characterization of a neomorphic PTEN mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422504112>
- Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A., & D'Arca, D. (2016). ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 3565127. <https://doi.org/10.1155/2016/3565127>
- Dosoky, N., & Setzer, W. (2018). Chemical Composition and Biological Activities of

Essential Oils of Curcuma Species. *Nutrients*, 10(9), 1196.  
<https://doi.org/10.3390/nu10091196>

Escobar, M; Marquez, A. (2014). Rol de mTOR/P70S6K en diafragma. *Revista de Estudios En Movimiento*, 1(ISSN 0719-4668), 5–13. Retrieved from [http://www.reem.cl/descargas/reem\\_v1n1.pdf](http://www.reem.cl/descargas/reem_v1n1.pdf)

Fang, P., Yu, M., Min, W., Wan, D., Han, S., Shan, Y., ... Bo, P. (2018). Effect of baicalin on GLUT4 expression and glucose uptake in myotubes of rats. *Life Sciences*, 196, 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.01.022>

Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E., Baghdadi, A., & Tayebi-Meigooni, A. (2018). Formation of 6-, 8- and 10-shogaol in ginger through application of different drying methods: Altered antioxidant and antimicrobial activity. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules23071646>

Giriraju, A., & Yunus, G. (2013). Assessment of antimicrobial potential of 10% ginger extract against *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and *Enterococcus faecalis*: An *in vitro* study. *Indian Journal of Dental Research*. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.118356>

Graham, N. A., Tahmasian, M., Kohli, B., Komisopoulou, E., Zhu, M., Vivanco, I., ... Graeber, T. G. (2012). Glucose deprivation activates a metabolic and signaling amplification loop leading to cell death. *Molecular Systems Biology*. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.20>

Ha, S. K., Moon, E., Ju, M. S., Kim, D. H., Ryu, J. H., Oh, M. S., & Kim, S. Y. (2012). 6-Shogaol, a ginger product, modulates neuroinflammation: A new approach to neuroprotection. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.03.016>

Han, J., Zhang, L., Guo, H., Wysham, W. Z., Roque, D. R., Willson, A. K., ... Bae-Jump, V. L. (2015). Glucose promotes cell proliferation, glucose uptake and invasion in endometrial cancer cells via AMPK/mTOR/S6 and MAPK signaling. *Gynecologic Oncology*. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.06.036>

Han, M. A., Woo, S. M., Min, K. J., Kim, S., Park, J. W., Kim, D. E., ... Kwon, T. K. (2015). 6-Shogaol enhances renal carcinoma Caki cells to TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated cytochrome c release and down-regulation of c-FLIP(L) expression. *Chemico-Biological Interactions*. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.01.020>

He, N., Kim, N., Jeong, E., Lu, Y., Mills, G. B., & Yoon, S. (2016). Glucose starvation induces mutation and lineage-dependent adaptive responses in a large collection of cancer cell lines. *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3242>

Huang, H., Li, H., Shi, K., Wang, L., Zhang, X., & Zhu, X. (2018). TREK-TRAAK two-pore domain potassium channels protect human retinal pigment epithelium cells

from oxidative stress. *International Journal of Molecular Medicine*.  
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3813>

Huy, H., Song, H. Y., Kim, M. J., Kim, W. S., Kim, D. O., Byun, J. E., ... Choi, I. (2018). TXNIP regulates AKT-mediated cellular senescence by direct interaction under glucose-mediated metabolic stress. *Aging Cell*.  
<https://doi.org/10.1111/acer.12836>

Keating, E., & Martel, F. (2018). Antimetabolic Effects of Polyphenols in Breast Cancer Cells: Focus on Glucose Uptake and Metabolism. *Frontiers in Nutrition*.  
<https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00025>

Khaliq, S., Haider, S., Siddiqui, M., Sherwani, S. K., Sajid, I., Mustafa, S., & Ejaz, T. (2017). Enhancement in spatial and recognition memory functions following long term oral administration of ginger extract in rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1002/jqs.1461>

Kim, M. O., Lee, M.-H., Oi, N., Kim, S.-H., Bae, K. B., Huang, Z., ... Dong, Z. (2014). [6]-shogaol inhibits growth and induces apoptosis of non-small cell lung cancer cells by directly regulating Akt1/2. *Carcinogenesis*, 35(3), 683–691.  
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgt365>

Kotowski, U., Kadletz, L., Schneider, S., Foki, E., Schmid, R., Seemann, R., ... Heiduschka, G. (2018). 6-shogaol induces apoptosis and enhances radiosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Phytotherapy Research*, 32(2), 340–347. <https://doi.org/10.1002/ptr.5982>

Kumar, R., Sharma, A., Kumari, A., Gulati, A., Padwad, Y., & Sharma, R. (2018). Epigallocatechin gallate suppresses premature senescence of preadipocytes by inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway and induces senescent cell death by regulation of Bax/Bcl-2 pathway. *Biogerontology*.  
<https://doi.org/10.1007/s10522-018-9785-1>

Kumari, S., Badana, A. K., G, M. M., G, S., & Malla, R. (2018). Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomarker Insights*.  
<https://doi.org/10.1177/1177271918755391>

Lee, J. O., Kim, N., Lee, H. J., Moon, J. W., Lee, S. K., Kim, S. J., ... Kim, H. S. (2015). -Gingerol affects glucose metabolism by dual regulation via the ampk $\alpha$ 2-mediated as160-rab5 pathway and ampk-mediated insulin sensitizing effects. *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.25100>

Li, T. Y., & Chiang, B. H. (2017). 6-shogaol induces autophagic cell death then triggered apoptosis in colorectal adenocarcinoma HT-29 cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.038>

Li, W., Hou, J.-Z., Niu, J., Xi, Z.-Q., Ma, C., Sun, H., ... Xie, S.-Q. (2018). Akt1 inhibition promotes breast cancer metastasis through EGFR-mediated  $\beta$ -catenin nuclear accumulation. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 16(1),

82. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0295-1>

Mohd Yusof, Y. A. (2016). Gingerol and Its Role in Chronic Diseases. In *Advances in experimental medicine and biology* (Vol. 929, pp. 177–207). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-41342-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41342-6_8)

Nedungadi, D., Binoy, A., Pandurangan, N., Pal, S., Nair, B. G., & Mishra, N. (2018). 6-Shogaol induces caspase-independent paraptosis in cancer cells via proteasomal inhibition. *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.02.018>

Nogueira, V., & Hay, N. (2013). Molecular pathways: Reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1424>

Nogueira, V., Park, Y., Chen, C. C., Xu, P. Z., Chen, M. L., Tonic, I., ... Hay, N. (2008). Akt Determines Replicative Senescence and Oxidative or Oncogenic Premature Senescence and Sensitizes Cells to Oxidative Apoptosis. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.11.003>

Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>

Pinzón, C., Serrano, M., & Sanabria, M. (2009). Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos Role of phosphatidylinositol 3-kinase pathway (PI3K/Akt) in humans. *Rev. Cienc. Salud. Bogotá (Colombia)*, 7(2), 47–66. <https://doi.org/10.12804/REVISTAS.UROSARIO.EDU.CO/REVSALUD/A.358>

Potter, M., Newport, E., & Morten, K. J. (2016). The Warburg effect: 80 years on. *Biochemical Society Transactions*. <https://doi.org/10.1042/BST20160094>

Qi, L.-W., Zhang, Z., Zhang, C.-F., Anderson, S., Liu, Q., Yuan, C.-S., & Wang, C.-Z. (2015). Anti-Colon Cancer Effects of 6-Shogaol Through G2/M Cell Cycle Arrest by p53/p21-cdc2/cdc25A Crosstalk. *The American Journal of Chinese Medicine*, 43(4), 743–756. <https://doi.org/10.1142/S0192415X15500469>

Ray, A., Vasudevan, S., & Sengupta, S. (2015). 6-shogaol inhibits breast cancer cells and stem cell-like spheroids by modulation of notch signaling pathway and induction of autophagic cell death. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137614>

Rios Arrabal, S., Roman Marinetto, E., Artacho Cordon, F., Leon, J., Exposito, J., Salinas, M., ... Nunez Torres, M. (2013). Radiotherapy outcome could be influenced by antioxidant capacity in breast cancer cell lines. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2013.03.110>

Romero, A., Forero, M., Sequeda-Castañeda, L. G., Grismaldo, A., Iglesias, J., Celis-Zambrano, C. A., ... Morales, L. (2018). Effect of ginger extract on membrane potential changes and AKT activation on a peroxide-induced

oxidative stress cell model. *Journal of King Saud University - Science*.  
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.09.015>

- Rushworth, G. F., & Megson, I. L. (2014). Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacology and Therapeutics*.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.09.006>
- Saha, A., Blando, J., Silver, E., Beltran, L., Sessler, J., & DiGiovanni, J. (2014). 6-Shogaol from dried ginger inhibits growth of prostate cancer cells both in vitro and in vivo through inhibition of STAT3 and NF- $\kappa$ B signaling. *Cancer Prevention Research*. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-13-0420>
- Sang, S., Hong, J., Wu, H., Liu, J., Yang, C. S., Pan, M. H., ... Ho, C. T. (2009). Increased growth inhibitory effects on human cancer cells and anti-inflammatory potency of shogaols from *Zingiber officinale* relative to gingerols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf9027443>
- Semwal, R. B., Semwal, D. K., Combrinck, S., & Viljoen, A. M. (2015). Gingerols and shogaols: Important nutraceutical principles from ginger. *Phytochemistry*.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.07.012>
- Shen, Y., Zhang, H., Cheng, L., Wang, L., Qian, H., & Qi, X. (2016). In vitro and in vivo antioxidant activity of polyphenols extracted from black highland barley. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.083>
- Son, M. J., Miura, Y., & Yagasaki, K. (2015). Mechanisms for antidiabetic effect of gingerol in cultured cells and obese diabetic model mice. *Cytotechnology*.  
<https://doi.org/10.1007/s10616-014-9730-3>
- Van Tonder, A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Research Notes*. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1000-8>
- Wang, S., Zhang, C., Yang, G., Product, Y. Y.-N., & 2014, U. (2014). Biological properties of 6-gingerol: a brief review. *Natural Product Communications*.
- Wei, C. K., Tsai, Y. H., Korinek, M., Hung, P. H., El-Shazly, M., Cheng, Y. Bin, ... Chang, F. R. (2017). 6-paradol and 6-shogaol, the pungent compounds of ginger, promote glucose utilization in adipocytes and myotubes, and 6-paradol reduces blood glucose in high-fat diet-fed mice. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms18010168>
- Weng, C. J., Chou, C. P., Ho, C. T., & Yen, G. C. (2012). Molecular mechanism inhibiting human hepatocarcinoma cell invasion by 6-shogaol and 6-gingerol. *Molecular Nutrition and Food Research*.  
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201200173>
- Wu, J. J., Omar, H. A., Lee, Y. R., Teng, Y. N., Chen, P. S., Chen, Y. C., ... Hung,



- J. H. (2015). 6-Shogaol induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatoma cells through pleiotropic mechanisms. *European Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.06.032>
- Zhao, Y., Hu, X., Liu, Y., Dong, S., Wen, Z., He, W., ... Shi, M. (2017). ROS signaling under metabolic stress: Cross-talk between AMPK and AKT pathway. *Molecular Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0648-1>
- Zhu, G., & Baker, S. J. (2016). Detecting PTEN and PI3K signaling in brain. In *Methods in Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3299-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3299-3_5)

## ANEXOS

### Anexo 1. Resultados de la viabilidad de células HT1080 y fibroblastos sometidos a 2.5 – 150 $\mu$ M de 6-shogaol por 24 horas.

[6-shogaol]	% Viabilidad								
	HT1080 (Fibrosarcoma humano)								
2.5	87.8	99.9	100.9	110.1	112.9	107.7	123.1	128.9	124.4
5	99.7	107.0	100.9	115.6	123.4	118.0	113.9	117.3	121.5
7.5	111.8	105.8	106.0	111.4	109.2	117.3	130.4	126.8	130.2
10	100.5	114.6	97.2	112.3	101.2	109.0	127.3	131.8	133.6
12.5	101.0	106.1	102.5	102.7	104.2	101.4	104.2	115.0	122.0
15	100.8	102.8	95.3	97.4	103.4	99.4	109.2	113.9	117.3
17.5	93.0	94.3	90.0	100.1	87.9	95.3	96.6	92.7	92.4
20	89.1	89.1	84.8	86.8	83.9	90.3	99.2	87.4	85.0
25	81.0	83.5	72.8	84.4	85.7	81.5	91.9	86.1	105.8
30	71.7	77.8	74.9	80.5	78.7	84.4	88.7	88.2	87.7
40	70.7	66.7	68.7	77.8	75.9	72.4	50.4	49.3	42.0
50	56.7	54.2	50.8	55.0	58.6	47.5	34.6	33.9	32.8
60	37.8	38.5	38.7	50.8	55.6	48.2	29.1	33.6	28.3
70	36.6	36.5	30.9	33.1	45.3	33.6	27.6	27.0	23.4
80	45.2	43.7	28.1	33.3	34.2	40.5	22.8	23.1	26.0
90	31.4	21.2	11.8	29.6	32.0	29.7	22.0	19.9	18.9
100	27.4	30.4	15.5	13.1	11.1	10.7	20.2	20.7	21.0
150	16.7	18.1	7.5	14.2	13.1	16.3	16.8	17.3	20.5
	HPdLF (Fibroblastos derivados de ligamento periodontal)								
2.5	100	92.8	96.4						
5	99.2	104.9	76.9						
7.5	86.7	98.3	98.4						
10	107.4	99.4	102.4						
12.5	94.5	108	103.5						
15	92.5	100.2	102.7						
17.5	91.2	119	101.4						
20	89.6	99.2	104.1						
25	87.4	95.4	99.1						
30	90.1	98.9	94.5						
40	95.6	82.9	89.3						
50	97.3	99.4	93.1						
60	86.5	92.2	90.9						
70	92	98.7	77.4						
80	91.4	89.6	76.5						
90	86.7	87.1	79.4						
100	84.1	89.3	65.3						
150	49.8	60.1	47.1						

**Anexo 2. Resultados de la producción de ROS de células HT1080 y fibroblastos sometidos a 30 – 70  $\mu$ M de 6-shogaol por 24 horas.**

[6-shogaol]	% Producción de ROS									
	HT1080 (Fibrosarcoma humano)									
0	0,93	1,06	1,01	0,91	1,07	1,02	0,95	0,99	1,06	
30	1,31	1,17	1,81	1,73	1,49	1,73	1,24	1,30	1,01	
40	1,76	1,55	2,52	1,86	1,95	2,48	1,36	1,62	1,55	
50	2,82	2,97	2,65	3,28	3,42	3,70	1,68	2,21	2,04	
60	3,07	3,07	3,52	4,71	4,81	4,96	2,32	2,87	2,55	
70	4,26	3,74	4,44	5,38	6,02	6,62	3,52	3,80	3,06	
	HPdLF (Fibroblastos derivados de ligamento periodontal)									
0	0,95	1,01	1,03	1,20	1,17	0,63	1,12	1,00	0,89	
30	0,97	1,07	0,87	0,63	0,76	1,04	0,83	0,58	0,93	
40	1,08	1,02	1,10	0,56	1,29	0,50	1,08	0,64	1,05	
50	1,00	1,16	1,01	1,18	0,49	0,84	1,24	1,35	1,70	
60	1,08	1,14	1,20	1,02	0,61	0,86	1,41	2,19	2,01	
70	1,21	1,22	1,25	1,11	1,03	1,31	1,64	1,77	2,05	

**Anexo 3. Producción de ROS de células HT1080 y fibroblastos sometidos a 70  $\mu$ M de 6-shogaol y atenuada por 5 mM de N-acetilcisteína.**

<b>Tratamientos</b>	<b>% Producción de ROS</b>			<b>Promedio</b>
<b>HT1080</b>				
<b>70 <math>\mu</math>M 6-Shogaol</b>	104	100	105	<b>103</b>
<b>5 mM NAC</b>	83	83	68	<b>78</b>
<b>HPdLF</b>				
<b>70 <math>\mu</math>M 6-Shogaol</b>	99	92	117	<b>103</b>
<b>5 mM NAC</b>	90	101	91	<b>94</b>

**Anexo 4. Viabilidad de células HT1080 sometidas a 30 – 70  $\mu$ M de 6-shogaol y 5 mM de N-acetilcisteína por 24 horas**

<b>% Viabilidad</b>						
<b>HT1080 (Fibrosarcoma humano)</b>						
	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>	<b>60</b>	<b>70</b>
<b>6-shogaol</b>	95	50	68	37	28	60
	106	49	77	47	26	61
	98	47	55	42	30	36
	102	113	75	73	64	19
	93	113	115	85	27	24
	105	117	112	86	41	21
<b>6-shogaol + NAC</b>	<b>0</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>	<b>60</b>	<b>70</b>
	114	81	96	79	70	112
	108	108	92	88	79	108
	107	89	95	94	104	106
	110	121	130	119	88	84
	111	116	154	117	85	62
	104	127	100	106	88	81

**Anexo 5. Captación de glucosa de células HT1080 y fibroblastos sometidos a 10 – 90  $\mu$ M de 6-shogaol por 24 horas.**

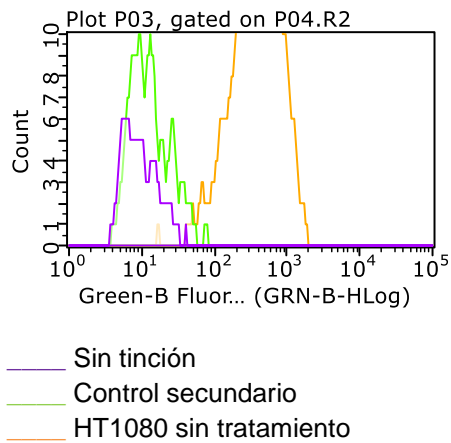
[6-shogaol]	% Captación de glucosa								
	HT1080 (Fibrosarcoma humano)								
0	91,4	102,95	105,66	108,24	79,78	111,98	125,03	86,89	88,08
10	100,31	113,04	100,31	97,61	124,63	100,94	189,12	159,1	168,37
20	101,1	89,66	69,8	63,7	91,44	71,46	214,88	219,59	134,1
30	93,44	91,42	70,87	70,98	76,39	85,19	127,36	156,93	136,6
40	146,32	122,74	95,97	39,65	34,95	30,87	117,22	131,61	64,09
50	114,93	110,86	88,36	27,09	22,55	29,21	50,22	34,24	60,31
60	86,13	86,57	73,8	29,68	36,67	27,6	53,33	63,41	40,48
70	52,09	45,13	43,23	18,22	21,7	18,94	15,75	35,84	14,41
80	19,15	18,71	14,24	18,38	16,74	17,35	19,1	18,97	16,33
90	13,7	13,75	10,82	17,45	19,22	18,31	17,05	15,44	22,18
	HPdLF (Fibroblastos derivados de ligamento periodontal)								
0	108,93	94,81	96,26						
10	131,43	112,23	109,43						
20	162,75	158,75	131,76						
30	194,17	171,13	172,6						
40	208,69	171,54	158,41						
50	124,37	147,28	90,6						
60	143,98	169,11	180,95						
70	147,6	92,71	115,52						
80	95,86	81,3	79,61						
90	49,79	30,88	42,85						

**Anexo 6. Análisis de expresión de Akt fosforilado/Akt en células HT1080 tratadas con 6-shogaol.**

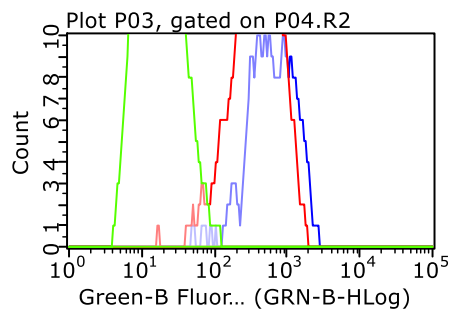
Expresión proteica AKT y AKT-P HT1080 (Fibrosarcoma humano)					
	0	10	20	30	40
AKT	84,1	104,6	119,1	154,2	95,1
	100,0	121,7	159,0	72,2	185,5
	115,9	146,4	110,8	113,2	137,8
AKT - P	4,8	7,6	7,3	6,2	7,8
	5,0	5,7	7,9	8,1	9,4
	3,9	7,1	6,9	6,3	8,7

**Anexo 7. Plots de citometría de expresión de Akt total en células HT1080 tratadas con 10 – 50 µM de 6-shogaol**

HT1080 sin tratamiento

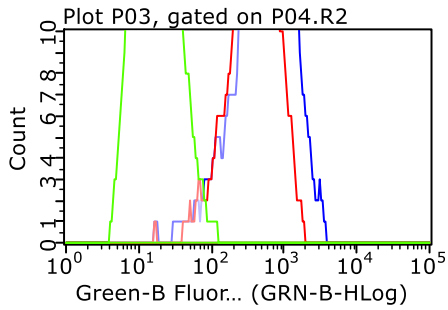


HT1080 tratadas con 10 µM de 6-shogaol por 24 horas



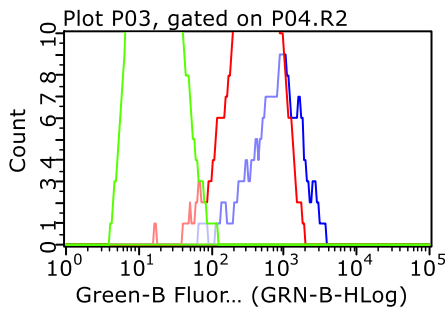
- Control secundario
- HT1080 sin tratamiento
- Expresión de Akt total de células HT1080 tratadas con 10  $\mu$ M de 6-shogaol

HT1080 tratadas con 20  $\mu$ M de 6-shogaol por 24 horas



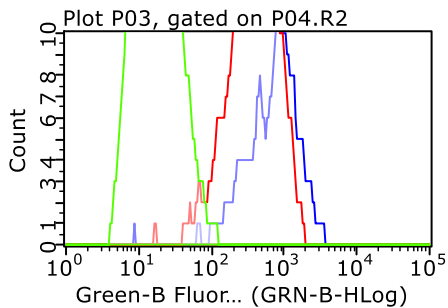
- Control secundario
- HT1080 sin tratamiento
- Expresión de Akt total de células HT1080 tratadas con 20  $\mu$ M de 6-shogaol

HT1080 tratadas con 30  $\mu$ M de 6-shogaol por 24 horas



- Control secundario
- HT1080 sin tratamiento
- Expresión de Akt total de células HT1080 tratadas con 30  $\mu$ M de 6-shogaol

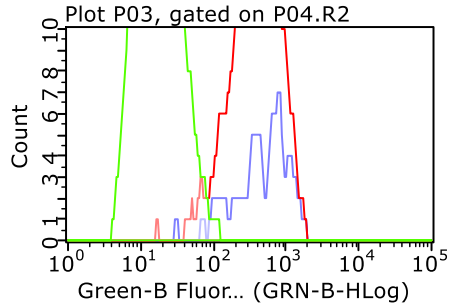
HT1080 tratadas con 40  $\mu$ M de 6-shogaol por 24 horas





- Control secundario
- HT1080 sin tratamiento
- Expresión de Akt total de células HT1080 tratadas con 40  $\mu\text{M}$  de 6-shogaol

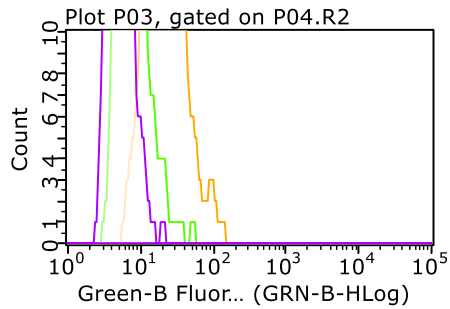
HT1080 tratadas con 50  $\mu\text{M}$  de 6-shogaol por 24 horas



- Control secundario
- HT1080 sin tratamiento
- Expresión de Akt total de células HT1080 tratadas con 50  $\mu\text{M}$  de 6-shogaol

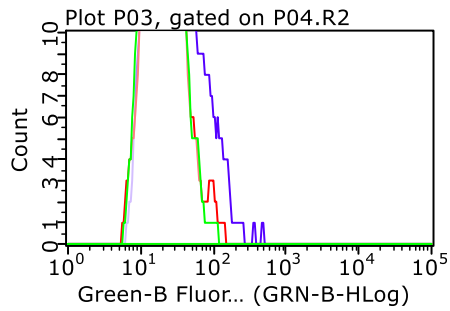
### Anexo 8. Plots de citometría de expresión de Akt fosforilado en células HT1080 tratadas con 10 – 50 $\mu\text{M}$ de 6-shogaol

HT1080 sin tratamiento



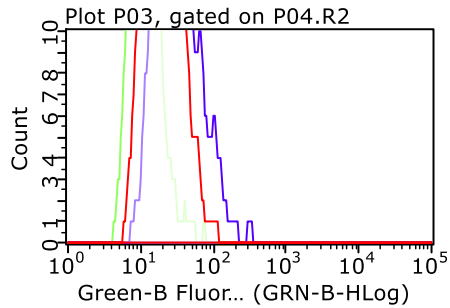
- Sin tinción
- Control secundario
- HT1080 sin tratamiento

HT1080 tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de 6-shogaol por 24 horas



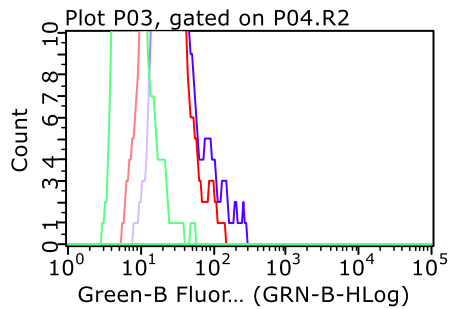
- Control secundario
- HT1080 sin tratamiento
- Expresión de Akt fosforilado de células HT1080 tratadas con 10  $\mu$ M de 6-shogaol

HT1080 tratadas con 20  $\mu$ M de 6-shogaol por 24 horas



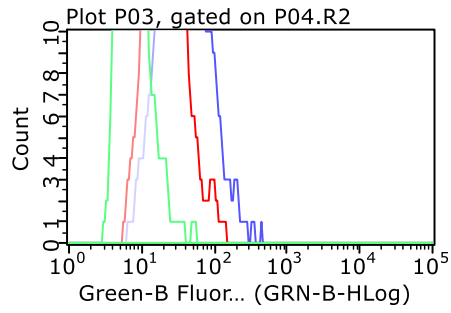
- Control secundario
- HT1080 sin tratamiento
- Expresión de Akt fosforilado de células HT1080 tratadas con 20  $\mu$ M de 6-shogaol

HT1080 tratadas con 30  $\mu$ M de 6-shogaol por 24 horas



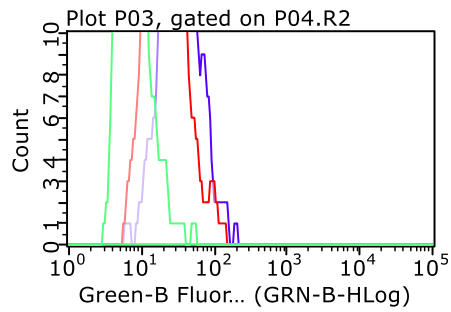
- Control secundario
- HT1080 sin tratamiento
- Expresión de Akt fosforilado de células HT1080 tratadas con 30  $\mu$ M de 6-shogaol

### HT1080 tratadas con 40 $\mu$ M de 6-shogaol por 24 horas



- Control secundario
- HT1080 sin tratamiento
- Expresión de Akt fosforilado de células HT1080 tratadas con 40  $\mu$ M de 6-shogaol

### HT1080 tratadas con 50 $\mu$ M de 6-shogaol por 24 horas



- Control secundario
- HT1080 sin tratamiento
- Expresión de Akt fosforilado de células HT1080 tratadas con 50  $\mu$ M de 6-shogaol