



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
LOS EFECTOS CITOTÓXICO Y  
ANTITUMORAL DE LA KAEMPFERITRINA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A:**

**ANGEL JOSABAD ALONSO  
CASTRO**

Tutor: DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ



MÉXICO, D. F.

Octubre 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICO Y ANTITUMORAL DE LA KAEMPFERITRINA

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Alejandro García Carrancá en el laboratorio de Virus y Cáncer, de la Unidad de Investigación Biomédica en cáncer del Instituto Nacional de Cancerología.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Alejandro García Carrancá	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Marco Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Marco Cerbón Cervantes, de la Facultad de Química de la UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de marcaje con la tinción de TUNEL para la detección de apoptosis.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez, de la División de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología, en los experimentos de la detección de especies reactivas de oxígeno, apoptosis y ciclo celular por citometría de flujo.

Se reconoce la asesoría del Dr. Federico Zenteno, del Instituto Nacional de Medicina Genómica, en los experimentos de ciclo celular por citometría de flujo.

El proyecto fue apoyado parcialmente por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Gobierno del Distrito Federal (ICyT-GDF; GI/PIFUTP08-142) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 127822). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT con número de registro 174493 para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. María Luisa Villarreal Ortega	Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM
Secretario	Dr. Andrés Navarrete Castro	Facultad de Química, UNAM

## INDICE

	Pág.
Carátula	1
Reconocimientos	2
Índice	3
Índice de tablas y figuras	
Resumen	7
Abstract	8
Abreviaturas	9
<b>INTRODUCCIÓN</b>	10
<b>ANTECEDENTES</b>	11
Generalidades del cáncer	11
Epidemiología del cáncer	12
Tratamientos para el cáncer	12
Cirugía	13
Radioterapia	13
Quimioterapia	14
Inhibidores de los microtúbulos	14
Agentes alquilantes	15
Antibióticos con actividad antitumoral	16
Inhibidores de las topoisomerasas	16
Antimetabolitos	17
Ciclo celular	17
Fase G1	18
Fase S	18
Fase G2	18
Fase M	18
Regulación del ciclo celular	19

Desregulación del ciclo celular en el cáncer	20
Muerte celular	21
Necrosis	21
Apoptosis	21
Vía extrínseca	22
Vía intrínseca	22
Desregulación de la apoptosis en el cáncer	23
Vía PI3K/Akt	24
Desregulación de la vía PI3K/Akt en el cáncer	24
Uso de plantas medicinales	25
Uso de plantas medicinales como terapia alternativa para el cáncer	26
Metabolitos secundarios	27
Flavonoides	27
Antecedentes directos	29
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	31
<b>HIPOTESIS</b>	32
<b>OBJETIVOS</b>	32
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	33
Líneas celulares y condiciones de cultivo	33
Efecto de la KM sobre la viabilidad celular	33
Efecto de la KM sobre la apoptosis	33
Detección de la generación de especies reactivas de oxígeno	35
Análisis del contenido de ADN por citometría de flujo	35
Inmunodetección de proteínas (western blot)	36
Estudio de inmunofluorescencia para la detección de caspasa 3	37
Efecto quimioprotector de la kaempferitina	37
Efecto antitumoral de la kaempferitina	38
Análisis inmunohistoquímico	39
Cuantificación de VEGF	39

Análisis estadístico	39
<b>RESULTADOS</b>	41
La KM ejerce mayores efectos tóxicos en células HeLa	41
La KM induce la muerte en células HeLa por apoptosis	41
La KM induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en células HeLa	43
La KM induce el arresto en la fase G1 en células HeLa	44
La KM induce la expresión de proteínas asociadas con la vía intrínseca de apoptosis	44
La KM induce la activación de la caspasa 3	47
La KM induce efectos quimioprotectores	47
La KM induce efectos antitumorales	47
La KM carece de efectos tóxicos generales en ratones con tumor	50
La KM mejorado la supervivencia de ratones portadores del tumor	50
Estudio histológico	51
La KM inhibe la proliferación celular en los tumores xenotransplantados	52
La KM disminuye la producción de VEGF en ratones portadores del tumor	53
<b>DISCUSIÓN</b>	55
<b>CONCLUSIONES</b>	60
<b>PERSPECTIVAS</b>	61
<b>REFERENCIAS</b>	62
<b>ANEXOS</b>	69

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

	Pág.
Figura 1 Estructura básica de los flavonoides	28
Figura 2 Clasificación de flavonoides.	28
Figura 3 Fotografía de <i>Justicia spicigera</i>	29
Figura 4 Estructura química de la kaempferitrina	30
Figura 5 La kaempferitrina induce efectos apoptóticos en células HeLa	42
Figura 6 La KM induce apoptosis en células HeLa vía especies reactivas de oxígeno (ERO)	43
Figura 7 Efectos de la KM en la progresión del ciclo celular en las células HeLa	45
Figura 8 La KM induce la expresión de proteínas relacionadas con la vía intrínseca de apoptosis	46
Figura 9 La KM induce la activación de caspasa 3 en células HeLa	48
Figura 10 La KM induce efectos quimiopreventivos y antitumorales en ratones nu/nu portadores de tumor de células HeLa.	49
Figura 11 La KM carece de efectos tóxicos en ratones nu/nu.	50
Figura 12 La KM incremento el tiempo de supervivencia en ratones portadores de tumor	51
Figura 13 Examen histopatológico de tejido tumoral de células HeLa xenotransplantadas en ratones.	52
Figura 14 Tinción inmunohistoquímica para ciclina D1 pAkt, PCNA en tejido tumoral de células HeLa xenotransplantadas en ratones.	53
Figura 15 Efecto de la KM en los niveles séricos de VEGF en ratones nu/nu portadores del tumor.	54
Tabla 1 Actividad citotóxica de la kaempferitrina en células humanas de cáncer y no tumorigénicas	41

## RESUMEN

Las plantas son una buena fuente de compuestos antitumorales. Recientemente se demostró que extractos *Justicia spicigera* ejercieron efectos citotóxicos y antitumorales, y que el componente principal de este extracto fue la kaempferitina (KM). Sin embargo, los efectos citotóxicos y antitumorales de este compuesto aún no se han estudiado. En este trabajo, los efectos citotóxico y apoptótico de la KM en las células cancerosas y en células no tumorigénicas humanas se evaluaron mediante el ensayo de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil, bromuro de tetrazolio), el protocolo de TUNEL (marcaje mediado por la desoxinucleotidil transferasa terminal de los extremos 3'OH con dUTP conjugado con biotina) y la citometría de flujo con anexina-Alexa 488 y yoduro de propidio. El efecto de la KM en el ciclo celular se analizó por citometría de flujo con yoduro de propidio. Los efectos de KM en el ciclo celular y la apoptosis se evaluaron también mediante análisis de western blot de proteínas relacionadas con la vía intrínseca y proteínas involucradas en la transición de la fase G1 a la fase S. Los efectos quimiopreventivos y antitumorales de la KM se evaluaron en un modelo de xenotransplante de células HeLa en ratones inmunosuprimidos nu/nu. Para esto, se inyectaron diferentes dosis de la KM diariamente durante 32 días por vía intraperitoneal en ratones atímicos portadores de tumores de células HeLa. El crecimiento y el peso de los tumores se midieron. Los niveles séricos de Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) también se midieron por la técnica de ELISA. Este estudio demuestra, por primera vez, que la KM induce altos efectos tóxicos *in vitro* e *in vivo* contra las células HeLa. La KM induce una detención del ciclo celular en fase G1 y apoptosis a través de la vía intrínseca en células HeLa en una forma dependiente de caspasas. Además, la KM ejerce efectos quimiopreventivos y antitumorales y actividades antiangiogénicas. Por lo tanto, la KM puede ser una buena opción para el tratamiento del cáncer debido a su baja toxicidad en células no tumorales y sus efectos antitumorales.



## **ABSTRACT**

Plants are a good source of anti-tumor compounds. Recently, we showed that *Justicia spicigera* extracts possess cytotoxic and antitumoral effects and that the major component of this extract was kaempferitrina (KM). However, the cytotoxic and antitumoral effects of this compound remain to be performed. Herein, the cytotoxic and apoptotic effects of KM on human cancer cells and human non-tumorigenic cells were evaluated using MTT assay (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), the TUNEL protocol (terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT)-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling) and flow cytometry with annexin-Alexa 488 and propidium iodide. The effect of KM on cell cycle was analyzed by flow cytometry with propidium iodide. The apoptotic and cell cycle effects were also evaluated by western blot analysis with proteins involved in the intrinsic pathway and proteins involved the G1 to S phase transition. Also, different doses of KM were injected intraperitoneally daily into athymic mice bearing tumors of HeLa cells during 32 days. The growth and weight of tumors were measured. The serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels were also measured by ELISA technique. This study shows, for the first time, that KM induces high toxic effects *in vitro* and *in vivo* against HeLa cells. KM induces a cell cycle arrest in G1 phase and exerts apoptosis via intrinsic pathway in HeLa cells in a caspase dependent way. Also, KM exerts chemopreventive and antitumor effects and moderate antiangiogenic activities. Thus, KM could be a good option for cancer treatment due its low toxicity in non-tumorigenic cells and its antitumor effects.

## **ABREVIATURAS**

CDDP cisplatino

CM-H2DCFDA 5-(y-6)-carboxi-2', 7'-diclorodihidrofluoresceina diacetato

DMEM Medio de Eagle modificado por Dulbeco

DMSO Dimetil sulfóxido

EDTA ácido etilenediaminotetraacético

ERO Especies Reactivas de Oxígeno

KM kaempferitrina

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil, bromuro de tetrazolio)

PBS Solución de amortiguador de fosfatos

PCX paclitaxel

SFB Suero fetal de bovino

TUNEL marcaje mediado por la desoxinucleotidil transferasa terminal de los extremos 3'OH con dUTP conjugado con biotina

VEGF Factor de crecimiento endotelial vascular

## INTRODUCCIÓN

La naturaleza ha proporcionado muchos compuestos anticancerígenos que se usan actualmente, y que incluyen fármacos de origen microbiano y derivados de plantas; algunos de ellos han sido aceptados por la FDA (Food and Drug Administration) para su aplicación en clínica. Desde 1950 se empezaron a evaluar las propiedades citotóxicas de extractos de plantas, lo cual dio como resultado el descubrimiento de los alcaloides vincristina y vinblastina, obtenidos de *Catharanthus roseus* L (Apocynaceae). Los extractos de *Camptotheca acuminata* Decne (Nyssaceae) se investigaron en la década de los 50 como fuente de saponinas esteroidales para su posterior conversión en cortisona y fue al azar que se decidió evaluar su actividad antitumoral (Cragg et al., 1994). El primer reporte de actividad antitumoral fue generado por los estudios realizados en el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos (NCI), y el principio activo resultó ser la camptotecina (Mans et al., 2000). Los estudios clínicos de fase I empleando la sal sódica de la camptotecina se realizaron a inicios de 1970 pero se suspendieron debido a la severa toxicidad del compuesto (Newman et al., 2003). Alrededor de 1985 se revivió el interés debido al novedoso mecanismo de acción que involucra a la enzima topoisomerasa I (Cragg et al., 1997). A partir de estos estudios se realizaron modificaciones químicas a la camptotecina, con las cual se obtuvo el topotecan usado para el tratamiento de cáncer de ovario y el irinotecan usado para el tratamiento de los cánceres colorectal, de ovario, y de pulmón (Cragg et al., 1997). En 1964 se descubrió que un extracto de la corteza de *Taxus brevifolia* fue tóxico para los cultivos de células de leucemia. El aislamiento del compuesto responsable de la actividad se realizó en los laboratorios de Monroe Wall (Lenaz y De Furia, 1993) y en 1967 se obtuvo el compuesto responsable de la actividad citotóxica y lo nombraron taxol, dado que comparte similitudes químicas con la familia de taxanos, además de que se aisló de una planta del género *Taxus*.

La alta toxicidad de la quimioterapia en uso impulsa a la búsqueda constante de nuevos compuestos con similar o mayor eficacia que los fármacos usados actualmente, pero con menores efectos adversos. Una parte de la investigación en el desarrollo de nuevos fármacos se enfoca a encontrar medicamentos que sean específicos para las células tumorales, con lo cual se espera incrementar la eficacia del tratamiento y reducir los efectos secundarios.

## **ANTECEDENTES**

### **Generalidades del cáncer**

El cáncer es una enfermedad muy antigua, ya que se han detectado tumores óseos en los huesos fósiles de dinosaurios y de momias egipcias de la necrópolis de Gizeh (2700 a. C.) (Cortinas, 1995; Tannock y Hill, 1998). Los tumores fueron descritos en pinturas o escritos de algunas civilizaciones antiguas de la India, Egipto y Perú (Cortinas, 1995; Tannock y Hill, 1998) y datan de los años 2000 a 1500 a. C.

El cáncer es un conjunto de enfermedades en las cuales el organismo produce un exceso de células malignas con rasgos tales como: 1) señales de crecimiento muy activas, 2) evasión a la apoptosis, 3) proliferación descontrolada, 4) liberación de sustancias al medio para la vascularización de tejidos e 5) invasión de tejidos y órganos (Hanahan y Weinberg, 2000). La metástasis diferencia a los tumores malignos de los benignos; estos últimos son limitados y no invaden o producen metástasis. Con unas pocas excepciones, todos los cánceres pueden formar metástasis. Dichas excepciones las constituyen los neoplasmas malignos de las células gliales del sistema nervioso central y los carcinomas basales de la piel. La mayoría de los cánceres forman tumores, pero algunos como la leucemia no lo hacen.

El cáncer, considerado como una enfermedad multifactorial es producido por la predisposición genética del individuo y su exposición a agentes físicos (luz ultravioleta y la radiación ionizante), químicos (asbesto, humo del tabaco y algunos otros compuestos químicos) y biológicos (infecciones causadas por virus o bacterias). El envejecimiento, el tabaquismo, el alcoholismo, la desnutrición y las infecciones virales (hepatitis B y C, virus del papiloma humano) son los principales factores de riesgo de cáncer en los países subdesarrollados. En los países desarrollados, el tabaquismo, el alcoholismo y la obesidad son los principales cancerígenos (OMS, 2009). Existen más de 200 tipos de cáncer, los cuales poseen características particulares, y por ende su evolución y tratamiento son específicos. Los cánceres humanos se clasifican según su origen en tres grupos generales: sarcoma (proceden de tejidos conectivos), carcinomas (proceden de tejidos epiteliales) y leucemia y linfoma que proceden de los tejidos formadores de las células sanguíneas (Cortinas, 1995).

## **Epidemiología del cáncer**

El cáncer representa un grave problema de salud pública a nivel mundial debido a que implica gastos muy grandes para las instituciones de salud pública en el mundo (Zambrana et al., 2008; McKoll, 2009). El diagnóstico temprano es el primer paso para disminuir la incidencia del cáncer en el mundo.

Durante el 2007, se reportaron 11.3 millones de casos de cáncer en el mundo y se estima que esta cifra alcanzará los 15.5 millones de casos para el 2030 (OMS, 2009). Los cánceres que fueron más frecuentes son pulmón (1.60 millones), mama (1.38 millones) y colorectal (1.23 millones) (IARC, 2008). De los poco más de 10 millones anuales de casos nuevos de cáncer, 4.7 millones se registran en los países desarrollados y casi 5.5 millones en los países en vías de desarrollo (OMS, 2009). En México se han reportado 110 mil casos de cáncer durante el 2003 (RHNM, 2003). Los cánceres que fueron más frecuentes son próstata (14 mil), mama (13 mil) y cervicouterino (10 mil).

Durante el 2008, se reportaron 7.6 millones de muertes en el mundo debidas al cáncer, lo cual representa un 13% del total de muertes y se estima que esta cifra ascienda al doble para el 2030 (OMS, 2009). El 70% de las muertes por cáncer ocurren en países en vías de desarrollo (OMS, 2009). Esto se debe a las barreras culturales, los bajos recursos económicos y en algunos casos debido a que los programas de detección son escasos. Los cánceres que ocuparon los primeros lugares como causa de muerte fueron: pulmón (1.38 millones de muertes), cáncer de estómago (0.74 millones de muertes) y cáncer de hígado (0.69 millones de muertes) (IARC, 2008). En México, los tumores malignos ocupan el tercer lugar en la lista de principales causas de defunción en el país; por dicha causa fallecieron 63 888 personas durante el 2008. Esta cifra representa 12.9% del total de defunciones registradas en el año. Los cánceres que ocupan los primeros lugares como causa de muerte fueron: pulmón (8807 muertes); cáncer de estómago (6751 muertes) y cáncer de hígado (6153 muertes) (IARC, 2008).

## **Tratamientos para el cáncer**

Los tratamientos actuales para el cáncer se basan principalmente en la cirugía, la radiación y la quimioterapia. La selección de uno de ellos o su combinación depende de la etapa en que se encuentre el tumor

## **Cirugía**

La cirugía, la terapia anticancerígena más ancestral, permite extirpar totalmente el tumor sólo cuando este sea detectado en una etapa de desarrollo temprano. Galeno, el más famoso médico de la antigüedad (siglo II d.C) fue el primero en enfatizar uno de los principios básicos de la cirugía oncológica: la exéresis completa del tumor hasta tejido sano con bordes libres de enfermedad. Sin embargo, el éxito de este tratamiento varía dependiendo del sitio con cáncer. Hay dos tipos principales de tratamiento quirúrgico para el cáncer: la cirugía potencialmente curativa y la cirugía paliativa (Alison, 2002). La cirugía potencialmente curativa se realiza cuando los estudios por imágenes indican una buena probabilidad de que el cirujano podrá extirpar todo el cáncer, es posible desarrollar este método quirúrgico solo cuando no existe metástasis. Sin embargo, no es posible realizar esta cirugía cuando los tumores se localizan en lugares de difícil acceso. La cirugía paliativa se realiza para aliviar el dolor, para prevenir complicaciones o para evitar que el tumor se propague demasiado como para que se extirpe por completo. La cirugía preventiva puede ayudar a aliviar los síntomas para prolongar la vida de la persona (Alison, 2002). En algunas ocasiones los tumores presentan hacinamientos en estructuras vitales que no pueden ser removidas a través de procedimientos quirúrgicos. Quizás la limitación más importante de la cirugía es que ésta no puede emplearse en cánceres que han hecho metástasis en grandes áreas del cuerpo.

Los riesgos y los efectos secundarios de la cirugía dependen en gran manera de cuanto tejido se removió y de la salud general de la persona antes de la cirugía, ya que toda cirugía conlleva algunos riesgos incluyendo la posibilidad de hemorragia, infecciones, complicaciones de la anestesia y pulmonía. En muchas ocasiones la cirugía ocasiona defectos estéticos los cuales provocan depresión en el paciente.

## **Radioterapia**

La radioterapia consiste en la emisión de radiaciones ionizantes hacia tumores localizados en un sitio específico. Las radiaciones presentan la capacidad de producir radicales libres al interactuar con la materia y ceder la energía que vehiculizan, produciendo roturas de enlaces en el ADN (Alison, 2002). Las formas más comunes de administrar la radioterapia son la braquiterapia, en la que la fuente de radiación se coloca en la proximidad del tumor y la teleterapia, en la que la fuente de radiación se administra a determinada distancia del enfermo. La

mejor aplicación de este tratamiento es complementario con la cirugía. La radioterapia puede administrarse antes, durante o después de una cirugía, con el principal objetivo de disminuir el tamaño del tumor. El efecto biológico de las radiaciones ionizantes depende de la dosis, la frecuencia del tratamiento y del tipo de tejido que es irradiado. Dependiendo del tipo celular, las células pueden morir por muerte en interfase (usualmente asociada con morfología apoptótica) o por muerte relacionada con la mitosis (Alison, 2002). Los efectos adversos que este tratamiento ocasiona son la pérdida del cabello, eritema, cansancio, dolor, quemazón, diarrea, polaquiuria, disuria y hematuria (Alison, 2002). Si producen inactivación celular se denomina “daño letal”, y si producen lesiones más o menos reparables se denomina “daño subletal”.

### **Quimioterapia**

La quimioterapia consiste en administrar un fármaco que tenga la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral y/o provocar la muerte celular, inhibiendo procesos relacionados con el ciclo celular. Actualmente, el principio de acción de la mayoría de estos compuestos se basa en el mayor potencial replicativo de la célula cancerosa en comparación con el de las células sanas, por lo que estos compuestos también ocasionan la muerte de las células no cancerosas que crecen y se dividen rápidamente como las células hematopoyéticas (Alison, 2002). La quimioterapia es uno de los tratamientos de primera elección para algunos tipos de cáncer y en algunos otros se emplea en combinación con la radioterapia y/o cirugía. La quimioterapia puede dar una respuesta parcial objetiva entre el 10 y el 40% de los casos (Alison, 2002). Los efectos adversos que ocasiona la quimioterapia son la pérdida del cabello, náuseas, vómitos, diarrea, anemia, problemas de coagulación, susceptibilidad a infecciones y cansancio (Alison, 2002).

Entre los principales agentes usados en la quimioterapia se encuentran: a) inhibidores de microtúbulos, b) agentes alquilantes, c) antibióticos con actividad antitumoral, d) inhibidores de las topoisomerasas y e) antimetabolitos.

### **Inhibidores de los microtúbulos**

Los microtúbulos son polímeros de proteínas responsables de la formación del huso mitótico y el movimiento de los cromosomas durante la división celular. El componente principal de los microtúbulos es la tubulina, compuesta por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ). Los inhibidores de microtúbulos se dividen en dos grupos: a) agentes estabilizantes y b) agentes desestabilizantes de

microtúbulos (Baquiran y Gallagher, 2001). Los agentes estabilizantes de microtúbulos se unen a los monómeros de tubulina induciendo su polimerización. Entre estos agentes se encuentran el paclitaxel y docetaxel. El paclitaxel se lanzó al mercado en 1993 para el tratamiento de cáncer de ovario, cáncer de pulmón, sarcoma de Kaposi y cáncer de mama (Baquiran y Gallagher, 2001). Los agentes desestabilizantes de microtúbulos se unen a los microtúbulos e inducen el desmantelamiento del huso mitótico. Entre estos agentes se encuentran los alcaloides vincristina y vinblastina (Baquiran y Gallagher, 2001). La vincristina se emplea en combinación con otros medicamentos anticancerígenos en el tratamiento de leucemia linfocítica infantil aguda, cáncer cervicouterino, cáncer de colon, mama y otros carcinomas (Moura et al., 2002). La vinblastina se emplea para el tratamiento de linfoma de Hodgkin (Warber, 1999) y cáncer de ovario (Silva et al., 2003).

### **Agentes alquilantes**

Los agentes alquilantes pueden unirse covalentemente con macromoléculas que tienen centros nucleofílicos como átomos de azufre en proteínas y nitrógeno en el ADN. El efecto antitumoral inicial puede ser la inhibición de la síntesis del ADN y la división celular. Los agentes alquilantes bifuncionales pueden unirse covalentemente a dos sitios nucleofílicos en diferentes bases de ADN induciendo entrecruzamiento en la misma cadena o en diferentes cadenas de ADN (Baquiran y Gallagher, 2001). Estos compuestos interactúan con el ADN normalmente en la posición N7 de la guanina y su principal efecto adverso es la depresión de la médula ósea.

Los principales agentes alquilantes son las bases nitrogenadas, las nitrosoureas y los platinos. Entre las mostazas nitrogenadas se encuentra la ciclofosfamida, usado en el tratamiento de linfomas malignos, mieloma múltiple, leucemias, sarcomas, neuroblastoma, carcinoma mamario, entre otros (Baquiran y Gallagher, 2001). Entre las nitrosoureas se encuentra la carmustina también llamada BCNU, la cual es un agente relacionado a la mostaza nitrogenada y su uso actual se limita al tratamiento de los tumores del sistema nervioso central como glioblastoma multiforme, meduloblastoma y astrocitoma (Baquiran y Gallagher, 2001). Entre los platinos se encuentra el cisplatino, el cual es uno de los agentes antineoplásico más utilizados. El cisplatino se usa prácticamente en la mayoría de los tumores sólidos en combinación con otros agentes. Su uso principal y más efectivo por su capacidad de curativa es el carcinoma testicular (Baquiran y Gallagher, 2001).



### **Antibióticos con actividad antitumoral**

Su uso data desde 1930 con compuestos coloridos extraídos de cultivos de *Streptomyces spp.* y continuó con el diseño de nuevos compuestos semisintéticos y sintéticos. Estos fármacos pueden intercalarse al ADN, unirse al ARN, proteínas y lípidos interfiriendo directamente con la síntesis de ADN, transcripción y traducción (Alison, 2002). Como consecuencia se inhibirán también actividades enzimáticas y el funcionamiento adecuado de la membrana celular. El mecanismo por el cual las antraciclinas, los principales antibióticos con actividad antitumoral, ejercen su acción anticancerígena es múltiple y complejo. Algunos compuestos interactúan con la topoisomerasa II tanto en células procariontes como eucariontes (Alison, 2002). Otros compuestos generan especies reactivas de oxígeno (ERO) como consecuencia de las reacciones redox en el anillo de la quinona o en el anillo base de las antraciclinas (Alison, 2002). Las antraciclinas no exhiben alguna especificidad por alguna fase del ciclo celular. Entre los principales antibióticos antitumorales se encuentra la doxorubicina, la cual se utiliza en leucemias, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, cáncer de mama metastásico, entre otros (Alison, 2002). Los efectos adversos de este grupo de medicamentos son cardiovasculares, gastrointestinales y hematológicos.

### **Inhibidores de las topoisomerasas**

Las topoisomerasas participan en la relajación y superenrollamiento del ADN induciendo cortes transitorios de la cadena de ADN. Existen dos tipos de topoisomerasas en los eucariontes, cada una con isoformas. Las topoisomerasas de tipo I cortan una hebra del ADN, mientras que las topoisomerasas de tipo II cortan ambas hebras del ADN (Pommier et al., 1996). Los compuestos que inhiben a las topoisomerasas pueden intercalarse en el ADN perpendicularmente a la cadena de ADN entre las bases que forman. Otros compuestos pueden unirse a regiones cercanas al sitio activo de la enzima. Los compuestos que pueden inhibir a la topoisomerasa I están representados por los derivados de la camptotecina como el iriotecan y topotecan. El iriotecan se usa para el cáncer colorectal, mientras que el topotecan se usa para el cáncer de pulmón y cervicouterino principalmente (Pommier et al., 1996). Las reacciones adversas que producen estos compuestos se encuentran calambres abdominales, bradicardia e hipersalivación. Entre los compuestos que pueden inhibir la topoisomerasa II se encuentran el etoposido, el cual se usa en tumores testiculares, leucemias, cáncer de pulmón y linfoma tanto Hodgkin como no Hodgkin. Los

efectos adversos que ocasiona este compuesto se encuentra la mielodepresión, náuseas y vómitos (Pommier et al., 1996).

### **Antimetabolitos**

Los antimetabolitos son compuestos que están estructuralmente relacionados a compuestos que se encuentran en la célula, tales como las vitaminas, bases púricas y pirimídicas o aminoácidos. El principal efecto adverso de estos compuestos es la depresión en la medula ósea. En general, los antimetabolitos interactúan con enzimas para competir con los metabolitos por la ocupación del sitio catalítico en una enzima o se incorporan a los ácidos nucleicos bloqueando sus síntesis. Esto activa señales de muerte celular programada en las células (Skeel, 2007). La mayoría de los antimetabolitos tienen su actividad durante la fase S del ciclo celular. Los antimetabolitos se caracterizan por un umbral de concentración por debajo de la cual no son citotóxicos sin importar el tiempo de exposición (Skeel, 2007). Los principales antimetabolitos son: a) análogos de ácido fólico, b) análogos de pirimidina y c) análogos de purinas. El principal representante de los análogos del ácido fólico es el metotroxato, el cual inhibe a la enzima dihidrofolato reductasa bloqueando la síntesis de timidina. El metotroxato se usa para el tratamiento de leucemias linfoblásticas. El principal representante de los análogos de pirimidina es fluorouracilo, el cual inhibe la síntesis de ácidos nucleicos y pueden incorporarse al ADN y al ARN. El fluorouracilo se usa para cáncer de mama y del tracto gastrointestinal (Skeel, 2007). La mercaptopurina, el principal representante de los análogos de purinas, interfiere con la interconversión de purinas, se usa en distintos tipos de leucemia (Skeel, 2007).

### **Ciclo celular**

El estudio del ciclo celular nos permite entender las alteraciones que presentan las células tumorales en la regulación de la proliferación. El ciclo celular comprende una serie de procesos en secuencia ordenada que permiten que la célula se divida. En humanos, el tiempo que transcurre desde que ocurre una mitosis hasta que vuelva a presentarse la división de una célula varía mucho dependiendo del tipo celular.

En humanos, la progresión de un tejido normal a un cáncer invasivo puede ocurrir en un periodo de 5 a 20 años y está influenciado por factores genéticos, hereditarios y por cambios genéticos

somáticos (Alison, 2002). El cáncer presenta una alta proliferación celular debido a alteraciones que afectan el control del ciclo celular.

Para su estudio, el ciclo celular puede dividirse en distintas fases: G1, S, G2, M y eventualmente G0. Una célula se encuentra dividiéndose únicamente durante la fase M. Al periodo del ciclo celular en el que la célula no se está dividiendo se le llama interfase y comprende las fases G1, S, G2 y G0.

### **Fase G1**

En esta fase las células inician el proceso de proliferación, que puede ser desde una fase M o una fase quiescente (G0), donde permanecen con metabolismo activo y sin proliferar. Durante la fase G1, las células recolectan nutrientes y factores de crecimiento a partir del torrente sanguíneo.

### **Fase S**

Al inicio de esta fase se ha superado el punto de restricción R1, ya que la célula detecta que se encuentra en las condiciones apropiadas de temperatura, nutrientes, factores de crecimiento y tamaño necesario para iniciar la síntesis de ADN. En esta fase también aumentan las enzimas que participan en la replicación del ADN, las cuales se desplazan del citoplasma al núcleo para iniciar la replicación del genoma. A cada célula le toma entre 6-8 horas replicar cerca de 40 000 genes agrupados en 23 pares de cromosomas. En esta fase, si hay daño al ADN, la célula detiene la replicación hasta que dicho daño se ha reparado. En caso que el daño no se repare, la célula activa mecanismos de muerte celular programada.

### **Fase G2**

Esta fase puede durar varias horas, probablemente para producir más ARN, enzimas y proteínas necesarias para el final de la división celular. En promedio, en las células de mamífero esta fase dura 2 horas. Una célula que era diploide en este momento se observa tetraploide. La célula debe comprobar que ha replicado su ADN completamente y que lo ha hecho una sola vez.

### **Fase M**

La mitosis, denominada la fase M, tiene una duración menor a una hora y esta subdividida en varios estadios. En esta fase, los cromosomas duplicados se condensan, la membrana nuclear se

desintegra y los cromosomas se segregan en cantidades equivalentes mediante estructuras de tubulina (huso mitótico). Posteriormente, el huso mitótico se desensambla y se forman dos núcleos con sus respectivos cromosomas. Finalmente, se inicia la fase de citocinesis o división celular para formar dos células hijas con la misma información genética (Alison, 2002).

### **Regulación del ciclo celular**

El ciclo celular se encuentra regulado en las células normales por diferentes moléculas y vías de señalización, entre las cuales se encuentran:

I) Factores de crecimiento. Son moléculas de naturaleza proteica que poseen dominios específicos que son reconocidos por receptores transmembranales. La unión de los factores de crecimiento a sus receptores induce cambios en la fracción citoplasmática de estos últimos. De lo anterior, se activan vías de señalización específicas en las que participa un grupo heterogéneo de segundos mensajeros entre los que se encuentran las cinasas de proteínas como Ras, Fos, Myc, MAP cinasas, moléculas pequeñas como el inositol fosfato, AMP cíclico y iones como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ .

II) Ciclinas. La concentración de ciclinas varía según la fase del ciclo celular, la cual depende de la regulación en su transcripción, así como de su degradación. Existen cuatro tipos principales de ciclinas (D, E, A y B). Las ciclinas activan a varios tipos de cinasas dependientes de ciclinas (CDK), formando complejos capaces de fosforilar proteínas que participan en vías de proliferación (Harper y Brooks, 2005).

III) Protooncogenes y genes supresores de tumores. Los oncogenes tales como c-Myc, Ras, Abl, mdm-2, entre otros, presentan actividad de cinasa de tirosina, con lo cual regulan una cascada de señalización que regula la mitosis. Por ejemplo, Ras transduce señales de proliferación celular cuando se une a GTP o GDP. El protooncogen mejor caracterizado c-Myc, cuya expresión es elevada por varios mecanismos, induce la pérdida de regulación del ciclo celular. En 1989 Livingston y Harlow demostraron por primera vez que el producto del gen supresor Rb (retinoblastoma) funciona deteniendo el ciclo celular en la fase G1 y como esta actividad es inhibida por proteínas oncogénicas como el Antígeno T. Posteriormente se descubrió el papel del gen supresor p53 también monitoreando al progresión del ciclo celular deteniendo el ciclo en G1 o G2 dependiendo del daño a la célula y como su presencia en la ausencia de Rb conduce a la

célula a apoptosis, indicando así el papel tan crucial de estos dos genes supresores de tumores en la patogenia del cáncer (Harper y Brooks, 2005).

#### IV) Inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs)

Estas proteínas inhibidoras de las CDKs están implicadas en la parada del ciclo celular en respuesta a varias señales antiproliferativas, como pueden ser la privación de factores de crecimiento, citocinas, daño en el ADN, etc. En células animales se dividen en dos familias: la CIP/KIP y la INK4, que difieren en estructura, mecanismo de acción y especificidad

La familia CIP/KIP incluye tres proteínas estructuralmente relacionadas entre sí: p21, p27 y p57, y presenta una especificidad más amplia que la familia INK4, ya que sus miembros interactúan e inhiben la actividad quinasa de los complejos CDK2/ciclina E, CDK4/ciclina D, CDK6/ciclina D, CDK2/ciclina A y CDK1/ciclina B (Harper y Brooks, 2005).

La p21 bloquea el ciclo celular en la transición G1/S, uniéndose a los complejos CDK4/ciclina D y CDK2/ciclina E, responsables de dicha transición. Esta parada del ciclo celular permite a la célula reparar el ADN dañado antes de replicarse. Cuando se daña el ADN, se provoca un incremento de la concentración y de la actividad de la proteína p53. Cuando se activa p53 se estimula la traducción de p21 (Harper y Brooks, 2005).

La p27 regula señales inhibidoras del crecimiento y la inhibición por contacto (Harper y Brooks, 2005). La p57, a diferencia de la expresión ubicua de las proteínas p21 y p27, tiene una ruta de expresión tejido-específica, lo que sugiere un papel especializado en el control del ciclo celular (Harper y Brooks, 2005). La familia INK4 incluye cinco proteínas: p14, p15, p16, p18 y p19. A diferencia de las proteínas de la familia CIP/KIP, que se unen a complejos CDK/ciclina, la familia INK4 se une sólo a CDK en el sitio de unión de las ciclinas e inhiben específicamente CDK4 y CDK6, implicadas en el control de la fase G1 (Harper y Brooks, 2005).

#### **Desregulación del ciclo celular en el cáncer**

Sin embargo, cada una de las vías que limita la respuesta proliferativa en las células normales es alterada en la mayoría de los cánceres. Las alteraciones en la proliferación normal de las células son debidas a mutaciones que ocurren en moléculas transductoras de señales tales como Ras o mutaciones en puntos de control del ciclo celular tales como la proteína retinoblastoma (Rb) (Evan y Vousden, 2001). Las alteraciones en estas vías incluyen la delección del gen RB, lo cual origina una desregulación de las CDKs, que fosforilan a Rb e influyen en su

regulación. También se ha descrito que la desregulación del ciclo celular en el cáncer puede ser debido a una sobre activación de CDKs o una pérdida de función de sus inhibidores (p16, p21, entre otros). Otra manera en la cual se desregula el ciclo celular es por la sobrerregulación de la proteína Myc (Evan y Vousden, 2001).

### **Muerte celular**

El tamaño y la forma de un organismo pluricelular están determinados por procesos de proliferación y muerte celular. Existen dos tipos principales de muerte celular: la necrosis y la apoptosis.

### **Necrosis**

La necrosis es un tipo de muerte celular pasiva, que no requiere de la participación activa de la célula y puede afectar a una zona más o menos amplia de tejido. La necrosis se caracteriza principalmente por la ruptura osmótica de la célula, la dilatación de los organelos celulares y la pérdida de potencial de membrana debido a la alteración de la permeabilidad. Lo anterior permite la entrada masiva de  $Ca^{2+}$  y consecuentemente la entrada pasiva de agua, acompañada de un flujo anormal de iones. La necrosis también se distingue por la respuesta inflamatoria que se desencadena como consecuencia de esta citólisis. Estímulos tales como la hipoxia, isquemia, infecciones virales o bacterianas y la exposición a determinados agentes corrosivos, entre otros, ocasionan la necrosis (Kroemer et al., 2005).

### **Apoptosis**

La apoptosis es un proceso regulado a nivel genético y esencial en el desarrollo de un organismo, ya que está relacionado con el control de la homeostasis y envejecimiento celular. La apoptosis es también un mecanismo de defensa por el cual son eliminadas del organismo aquellas células infectadas, mutadas o dañadas, en respuesta a diferentes agentes externos. La apoptosis se caracteriza morfológicamente por la pérdida de asimetría de la membrana plasmática, fragmentación y condensación de la cromatina, fragmentación del ADN intranucleosomal y la formación de cuerpos apoptóticos como resultado de la desintegración celular (Gravieli et al., 1992). La apoptosis, al contrario de la necrosis, no produce respuesta inflamatoria, haciéndola por tanto más difícil de detectar desde el punto de vista histológico. Existen dos vías principales de

inducción de apoptosis: una vía extrínseca o vía de los receptores de muerte celular (TNF, Fas, TRAIL) y una vía intrínseca o mitocondrial. Las dos vías comparten la cascada de las caspasas, que son la vía efectora de la apoptosis, donde ambas vías convergen a nivel de la activación de la caspasa-3, la cual marca el punto sin retorno de la cascada, la que finaliza con la fragmentación de la cromatina y la muerte celular.

### **Vía extrínseca**

Los receptores de muerte, situados en la superficie de la célula, reconocen ligandos específicos para cada uno de ellos. Los receptores de muerte pertenecen a la superfamilia del receptor del factor necrosis tumoral (TNFR) cuyos miembros tienen en común un dominio extracelular rico en cisteína y la presencia de un dominio intra-citoplasmático para acoplar al receptor con el resto de la maquinaria apoptótica (Thorburn, 2004). Los receptores de la muerte y sus respectivos ligandos que han sido caracterizados son: el receptor Fas (CD95) y su ligando Fas L, TNF-R1 y su ligando TNF- $\alpha$  y linfotoxina, el receptor de muerte DR-3 y su ligando Apo3L (TWEAK), los receptores DR-4 y DR-5 y su ligando Apo2L (TRAIL) (Thorburn, 2004). La unión de los ligandos a sus receptores provoca la agregación del receptor y el reclutamiento de un gran complejo de proteínas adaptadoras, las cuales forman el complejo de señalización inducido por muerte (DISC) que conduce a la autoactivación y liberación de las caspasas-8 ó -10 activas, para a continuación promover la activación proteolítica de las caspasas efectoras (caspasas-3 y/ó -7) (Thorburn, 2004).

### **Vía intrínseca**

La apoptosis inducida por señales intrínsecas o apoptosis inducida por estrés se inicia en la mitocondria con la salida del citocromo c, un componente de la cadena de transporte electrónico. Como resultado se produce la ruptura de la cadena de transporte de electrones, la liberación de iones superóxido y la hiperpolarización de la membrana mitocondrial interna, la cual puede terminar con una expansión de la matriz y ruptura de la membrana mitocondrial externa de la mitocondria (Kroemer y Reed, 2000). La formación de poros en la mitocondria conduce a la entrada de agua y solutos en la matriz con el consiguiente choque osmótico y liberación del factor inductor de apoptosis (AIF), una flavoproteína que transloca al núcleo donde provoca la condensación y rotura de ADN en fragmentos de alto peso molecular (50Kb). También se

produce la activación de Bax, mediada por p53, la cual puede integrarse tanto en la membrana externa como en la membrana interna de la mitocondria, formando homo oligómeros o hetero oligómeros con Bak y desestabilizando la membrana de la mitocondria (Kroemer y Reed, 2000). La proteína p53 supresora tumoral es un factor de transcripción que controla el estado del ADN, e inhibe la progresión del ciclo celular si existe alguna lesión en esta molécula. De mantenerse la activación de p53, se desencadena la apoptosis por la inducción en la expresión de Bax y las proteínas Noxa y Puma (Kroemer et al., 1997). Bax y Bak son los miembros encargados de mediar directamente la liberación del citocromo c al citoplasma. Después que el citocromo c sale de la mitocondria se une a una molécula denominada Apaf-1 (factor activador de proteasas apoptóticas-1), que tras un cambio conformacional inducido por 2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato (dATP) se une a la procaspasa-9. Finalmente, el conjunto de múltiples moléculas de Apaf-1 y la caspasa-9 activa forman un complejo de más de 700 kDa denominado "apoptosoma" que induce la activación proteolítica de la caspasa-3. Entonces se inicia el desensamblaje celular y se provoca la muerte de la célula. Alternativamente, la unión de otras proteínas pro-apoptóticas como Noxa, Puma, Bad y Bim a las anti-apoptóticas Bcl2 y BclXL, origina la inactivación de las proteínas anti-apoptóticas y la subsecuente apoptosis. La liberación regulada de factores pro-apoptóticos de la mitocondria causa la inducción de las caspasas iniciadoras y efectoras o ejecutoras y una pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Kroemer et al., 1997).

### **Desregulación de apoptosis en cáncer**

La mutación de p53 se asocia con muchos cánceres humanos y los ratones knocked out en las dos copias de p53 desarrollan numerosas enfermedades malignas. En cáncer, se ha descrito que las proteínas anti-apoptóticas Bcl2 y Bcl XL se encuentran sobre expresadas. Algunas mutaciones en genes relacionados con la apoptosis se encuentran en Bax, Bak y Apaf1, entre otros (Evan y Vousden, 2001). Además una baja expresión de estas proteínas resulta en una baja respuesta a la quimioterapia y una baja esperanza de sobrevivencia en los pacientes con cáncer (Evan y Vousden, 2001). Asimismo la baja expresión en receptores de la muerte tales como CD95 y TRAIL es muy común en diversos tipos de cáncer, lo cual facilita la metástasis (Evan y Vousden, 2001). La disminución en la expresión de la caspasa 3 es también un factor importante para que las células cancerosas evadan la apoptosis (Evan y Vousden, 2001).



### **Vía PI3K/Akt**

La activación de la vía PI3K/Akt se inicia mediante el reclutamiento de PI3K a la membrana plasmática a través de la unión de su dominio SH2 a proteínas fosforiladas en tirosina.

PI3K es un heterodímero que consiste en una subunidad reguladora (p85) y una subunidad catalítica (p110) encargada de transferir el grupo fosfato del ATP al fosfatidil inositol, 4,5-bifosfato (PIP2), generando el fosfatidil inositol, 3, 4,5-trifosfato (PIP3) y ADP. PIP3 sirve como ligando para reclutar la serina/treonina cinasa Akt o también llamada proteína-cinasa B (PKB) a la membrana plasmática a través de la interacción directa con el dominio con homóloga con plecstrina (PH) de Akt.

La unión de Akt a PIP3 provoca un cambio conformacional en Akt que hace que sea fosforilada y, por tanto, activada por las cinasas dependientes de fosfatidilinositol (PDKs) (Nicholson y Anderson, 2002). Akt también promueve el ciclo celular mediante la inhibición de la regulación de los puntos de control, como la fosforilación e inhibición de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas p21Cip/WAF1 y p27Kip1 y glucogenosintasas (GSK3- $\alpha$  y  $\beta$ ), promoviendo la glicólisis en la célula y, por tanto, el desarrollo celular (Nicholson y Anderson, 2002).

### **Desregulación de la vía PI3K/Akt en cáncer**

La vía PI3K/Akt controla varias funciones clave relacionadas con la biología del cáncer entre las que se incluyen la proliferación, supervivencia celular, migración y angiogénesis (Nicholson y Anderson, 2002). En muchos tipos de cáncer esta vía está sobrerregulada por una pérdida en la función debido a una mutación en el gen supresor de tumores PTEN (Evan y Vousden, 2001). Lo anterior ocasiona que las células cancerígenas estén en continua proliferación y sean resistentes a la apoptosis.

En las células de cáncer, entre las dianas de Akt se incluyen múltiples factores de transcripción y proteínas de señalización, de manera que la activación de Akt deriva en la disminución de los niveles de expresión o actividad de diversas proteínas pro-apoptóticas, como FasL y Bim, y en el incremento de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL, XIAPs y de las proteínas de supervivencia como la propia Akt (Nicholson y Anderson, 2002).

## **Uso de plantas medicinales**

En la naturaleza existen entre 250 000 a 500 000 especies vegetales, de las cuales el hombre usa solo el 50% (Sarukhán, 1995).

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial. Los antiguos egipcios desarrollaron una rica tradición en herbolaria y el primer antecedente escrito pertenece a los sumerios (Schultes, 1981). En los textos antiguos encontrados en la antigua Mesopotamia se describen la preparación de pócimas y remedios para fines curativos a base de diversas partes vegetales (Schultes, 1981). También se encontraron plantas con uso medicinal en cuevas en Perú con una antigüedad de 45 000 años. En refugios en Coahuila, México, se encontraron restos de peyote, mezcal y otras especies vegetales con una antigüedad de 8000 años (Schultes, 1981).

Durante mucho tiempo los remedios naturales y sobre todo las plantas medicinales fueron el principal e incluso el único recurso de que disponían los médicos. Alrededor del 80% de la población mundial usa plantas medicinales para tratar diversas enfermedades (UICN, 1993).

Las plantas medicinales son una fuente importante de medicamentos. Se estima que aproximadamente el 25% de los fármacos actualmente en uso provienen de especies vegetales (Rates, 2001).

En México existen entre 20 y 30 mil especies vegetales (Rzedowski, 1998) de las cuales 5000 tienen algún uso medicinal reportado (Toledo, 1997). El uso de plantas medicinales se ha conservado a través de las generaciones. La herbolaria en México ha estado presente desde la época prehispánica como lo demuestran documentos tales como *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, escrito por Martín de la Cruz y Juan Badiano, e *Historia de las cosas de la Nueva España*, escrito por Bernardino de Sahagún, en los cuales se describe información sobre el uso medicinal de diversas plantas usadas por los Aztecas (Lozoya, 1984). En la actualidad, aproximadamente el 80% de los Mexicanos usa plantas medicinales para el tratamiento empírico de diversas enfermedades (Robles-Zepeda et al., 2011).

La población en general usa las plantas medicinales debido a que los servicios de salud son insuficientes, la falta de disponibilidad de medicamento y también porque consideran que son de nula toxicidad aunque no se haya comprado su efecto farmacológico (Robles-Zepeda et al., 2011).

## **Uso de plantas medicinales como terapia alternativa para el cáncer**

En medicina tradicional el término cáncer se utiliza para describir padecimientos relacionados con inflamación, úlceras y padecimientos dermatológicos como apóstemas, abscesos, callosidades, verrugas y pólipos (Alonso-Castro et al., 2011). Entre 1960 y 1970, científicos de Estados Unidos de Norteamérica iniciaron diversas investigaciones acerca de las plantas con actividad anticancerígena (Cragg et al., 1994). El Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América (NCI) desarrolló un programa de selección empleando la línea celular L1210 (leucemia linfocítica) en ratones y otros modelos animales para evaluar la capacidad antineoplásica de diversas plantas. Posteriormente, evaluaron la actividad de las plantas a través de pruebas *in vitro* usando las líneas celulares P388 (leucemia linfocítica murina) y KB (carcinoma nasofaríngeo humano). Para 1981 se habían evaluado 114,000 extractos procedentes de 35,000 plantas (Cragg et al., 1994).

Las plantas medicinales son usadas como una terapia alternativa para el cáncer en muchos países en el mundo (Gerson-Cwilich et al., 2006; Tascilar et al., 2006). Las plantas son una fuente importante de compuestos anticancerígenos, se estima que el 67% de medicamentos aprobados por la FDA son de origen natural (Newman et al., 2003). De 1983 a 1995, más del 60 % de los fármacos aprobados para el tratamiento del cáncer e infecciones se basaron en productos naturales (Cragg et al., 1997).

En el mundo se han descrito más de 3000 plantas medicinales con propiedades anti-cancerígenas (Graham et al., 2000), mientras que en México se reporta el uso de 300 plantas medicinales para el tratamiento del cáncer (Alonso-Castro et al., 2011). De estas plantas, solo 181 cuentan con estudios experimentales. Además, un total de 187 compuestos se han aislado de 51 plantas medicinales de México, pero solo el 41% de estos metabolitos han mostrado efectos citotóxicos activos en células de cáncer. Sin embargo, solo 5 compuestos han sido evaluados en modelos *in vivo* y 3 compuestos presentaron actividad antitumoral (Alonso-Castro et al., 2011).

Los pacientes con cáncer usan las plantas medicinales como un tratamiento alternativo para el cáncer debido a que consideran que esta terapia es eficiente y segura debido a su origen natural. A nivel mundial, entre el 10 y 40% de pacientes con cáncer usan productos derivados de plantas medicinales para el tratamiento del cáncer, en México esta cifra asciende entre el 30 al 70%, mientras que en Asia es del 50% (Cassileth y Deng, 2004; Gerson-Cwilich et al., 2006; Gómez-Martínez et al., 2007; Tascilar et al., 2006; Molassiotis et al., 2006). En Europa, se estima que la

venta por productos derivados de plantas medicinales para el tratamiento de cáncer es de 5 mil millones de dólares por año (Tascilar et al., 2006).

### **Metabolitos secundarios**

Las plantas producen una variedad de moléculas de bajo peso molecular denominadas metabolitos secundarios, entre los cuales se encuentran los fenoles, flavonoides, taninos, cumarinas, esteroides, alcaloides y otros compuestos. Se conocen aproximadamente 20 000 estructuras de metabolitos secundarios. La función de estos compuestos es actuar como segundos mensajeros. Es decir, interactúan con receptores o moléculas diana de otros sistemas biológicos para efectuar respuestas, principalmente, ante el estrés biótico o abiótico. Asimismo, estos compuestos actúan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y los frutos (Sepúlveda-Jiménez et al., 2003). Los metabolitos secundarios también son liberados para competir por el espacio de suelo, luz, y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas (Sepúlveda-Jiménez et al., 2003). En las últimas décadas se han aislado diversos metabolitos secundarios de plantas, los cuales han sido útiles en la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética y agroquímica, entre otros. Sin embargo, aun falta identificar y evaluar los efectos farmacológicos de miles de compuestos aislados de plantas.

### **Flavonoides**

Los flavonoides representan el grupo de polifenoles más ampliamente distribuido en las plantas y se han identificado más de 4000 compuestos diferentes (Ren et al., 2003). La estructura química común de los flavonoides es un difenilpropano (C6-C3-C6) y consta de dos anillos aromáticos unidos a través de tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado (Figura 1). El primer flavonoide fue identificado en 1930 por el premio Nobel de Fisiología y Medicina Szent-Györgyi, quien aisló de la cáscara de limón una sustancia, la citrina. Los flavonoides se encuentran presentes en muchas frutas y verduras. Se estima que el consumo aproximado de estos compuestos por el ser humano es de 200 mg/día (Ren et al., 2003).

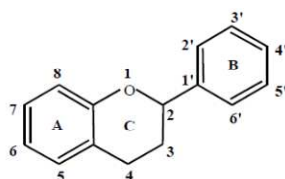


Figura 1 Estructura básica de los flavonoides

En función del grado de saturación y de la apertura o no del anillo central pirano, los flavonoides se clasifican en flavanoles, flavonas, isoflavonas, antocianidinas, chalconas, flavanonas y flavonoles (Figura 2). En las plantas los flavonoides se encuentran en estado libre o unido a azúcares formando heterósidos, que es lo más frecuente, debido a que les confiere mayor estabilidad química. Los azúcares que aparecen unidos con más frecuencia son la D-glucosa, la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa y el D-ácido glucurónico. Pueden aparecer como O-heterósidos (con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno) o como C-heterósidos (con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C). De todas estas formas naturales, los O glicósidos son los más comunes.

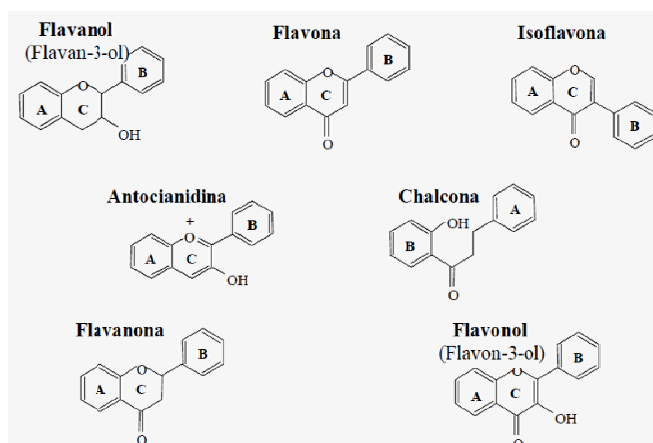


Figura 2 Clasificación de flavonoides

Los flavonoides desempeñan un amplio espectro de actividades biológicas, entre las cuales se encuentran los efectos citotóxicos y antitumorales (Ren et al., 2003). Asimismo se ha descrito que algunos flavonoides presentan efectos quimioprotectores en el desarrollo del cáncer (Ren et al., 2003). Por lo anterior, esta clase de metabolitos secundarios podrían ser una fuente promisoría de futuros medicamentos anticancerígenos.

### Antecedentes directos

El arbusto *Justicia spicigera* Schldl (Acanthaceae) alcanza los 5 m de altura y posee flores color naranja en forma tubular. Esta especie, comúnmente conocida como muicle o mohuite, es endémica de México hasta Argentina y Chile y se encuentra presente en climas cálido, semicálido, semiseco, seco y templado desde el nivel del mar hasta los 3000 m. En México, esta planta se encuentra distribuida en los estados de Chiapas, Nayarit, San Luís Potosí, Estado de México, Veracruz, Puebla, Morelos, Tlaxcala, Yucatán e Hidalgo (Hersch-Martínez, 1997). Dicha planta es cultivada en huertos familiares, crece a orillas de caminos, en matorrales y en bosques (Hersch-Martínez, 1997). En la medicina tradicional Mexicana, *Justicia spicigera* es usada, entre otras aplicaciones médicas, como un agente inmunomodulador (Herrera-Arellano et al., 2009) y para el tratamiento empírico del cáncer cervicouterino (Márquez et al., 1999). Previamente se reportó que extractos etanólicos de *Justicia spicigera* ejercieron efectos tóxicos contra células humanas de cáncer (Cáceres-Cortes et al., 2001; Vega-Ávila et al., 2009; Jacobo-Salcedo et al., 2011). Además, extractos etanólicos de *Justicia spicigera* ejercieron efectos apoptóticos en células HeLa y efectos antitumorales en ratones nu/nu xenotransplantados con células HeLa (Alonso-Castro et al., 2012). Asimismo, *Justicia spicigera* presentó efectos inmunomoduladores *in vitro* (Jacobo-Salcedo et al., 2011; Alonso-Castro et al., 2012).



Figura 3 *Justicia spicigera*

Estudios previos revelaron la presencia del flavonoide kaemferol-3,7- bisrhamnosido (kaempferitrina) en extractos de *Justicia spicigera* (Euler y Alam, 1982; Domínguez et al., 1990). Recientemente, mostramos que el componente mayoritario (90%) del extracto de *Justicia spicigera* fue la kaempferitrina (Alonso-Castro et al., 2012). Es muy probable que los efectos citotóxicos y antitumorales de *Justicia spicigera* pudieran deberse a la kaempferitrina.

La kaempferitrina ha sido aislado de diversas especies vegetales (Fang et al., 2005; Hamzah et al., 1994; Pinheiro et al., 2006; De Melo et al., 2009; Pereira et al., 2011; Alonso-Castro et al., 2012) y del hongo *Annulohypoxylon boveri* var. *microspora* (Cheng et al., 2011). Además, se ha descrito que la kaempferitrina ejerce efectos antibacterianos (Dalmarco et al., 2010), antinociceptivos y antiinflamatorios (De Melo et al., 2009), así como efectos antioxidantes e hipoglucemiantes en ratas diabéticas (de Sousa et al., 2004).

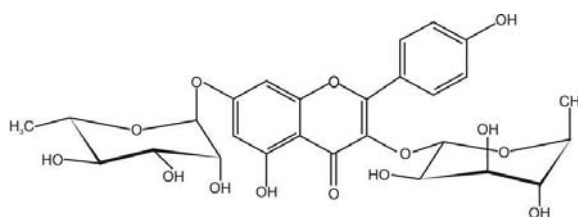


Figura 4 Estructura química de la kaempferitrina

Sin embargo, aún se desconoce si la kaempferitrina ejerce efecto citotóxicos y/o antitumorales. Por lo cual, en este trabajo se estudió los efectos citotóxicos y antitumorales de la kaempferitrina.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer, la principal causa de muerte en el mundo (13% del total de muertes), representa un grave problema de salud a nivel mundial (OMS, 2009). La incidencia y mortalidad causada por cáncer va en aumento. Los tratamientos actuales ocasionan graves efectos adversos. Por lo cual, es necesario la búsqueda de nuevas terapias de bajo costo, baja toxicidad y alta eficiencia. Además, un gran porcentaje de la población mundial no cuenta con acceso a los sistemas de salud pública, lo cual incrementa el enorme problema de salud de esta enfermedad.

La búsqueda de nuevos compuestos anticancerígenos a partir de fuentes naturales se ha incrementado notablemente en los últimos años (Graham et al., 2000). Las plantas son una fuente ancestral y actual de principios bioactivos. Existen evidencias clínicas de las propiedades anti-tumorales de plantas que presentan menor toxicidad e igual o mayor efectividad que los tratamientos empleados actualmente (Mans et al., 2000).

México cuenta con una extensa diversidad de plantas, las cuales podrán ser una fuente importante de nuevos compuestos anticancerígenos (Alonso-Castro et al., 2011). Sin embargo, solo un porcentaje muy pequeño de plantas ha sido estudiado. La mayor parte de compuestos aislados de plantas Mexicanas solo han sido evaluados sus efectos citotóxicos y son pocos los compuestos a los cuales se han evaluado su efecto antitumoral. Asimismo, los mecanismos de acción citotóxica de muchos compuestos aun no se han caracterizado. Por lo cual, es necesario estudiar con profundidad el efecto *in vivo* de compuestos con propiedades citotóxicas y evaluar el mecanismo molecular de su efecto citotóxico. Recientemente mostramos que extractos de *Justicia spicigera* ejercieron efectos tóxicos contra células HeLa de cáncer cervicouterino, y que el mayor componente de este extracto fue kaempferitrina (Alonso-Castro et al., 2012). Por lo cual, es probable que los efectos tóxicos de este extracto sean debidos a la kaempferitrina. Lo anterior podría indicar que *Justicia spicigera* es una fuente natural de un compuesto con gran potencial terapéutico para el cáncer cervicouterino.



## **HIPÓTESIS**

La kaempferitrina ejerce efectos tóxicos en células humanas de cáncer, induce la muerte celular por apoptosis y presenta efectos antitumorales

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto citotóxico de la kaempferitrina, el mecanismo de acción por el cual induce la muerte celular y su efecto antitumoral

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- a) Evaluar el efecto de la kaempferitrina (KM) sobre la viabilidad de células humanas de cáncer.
- b) Determinar si este compuesto presenta mayor toxicidad por algún(os) tipo de cáncer.
- c) Determinar el mecanismo molecular de la muerte celular inducido por la KM sobre células humanas de cáncer
- d) Evaluar el efecto anti-tumoral de la KM sobre ratones atímicos

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Líneas celulares y condiciones de cultivo**

Las células humanas derivadas de cáncer cervicouterino (HeLa), cáncer colorectal (SW-480), cáncer de mama (MDA-MB-231) y hepatocarcinoma (HepG2), así como células inmortalizadas de queratinocitos humanos (HaCaT) se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado 7% de suero fetal de bovino (SFB) y antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina). Las células humanas derivadas de cáncer de ovario (SKOV-3) y próstata (DU-145) se mantuvieron en medio RPMI suplementado con 7% SFB y antibióticos. Todas las líneas celulares se obtuvieron de la American Type Culture Condition (ATCC) (Manassas, VA) y se crecieron a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.

### **Efecto de la KM sobre la viabilidad celular**

Se sembraron 5000 células por pozo en placas de 96 pozos. Después de 24 h, las células se incubaron con la kaempferitrina (KM; ChromaDex, Laguna Hills, CA) a concentraciones entre 0.1 a 200 µM. Como controles positivos se usaron el cisplatino (CDDP; Accord Farma, Distrito Federal, México) o el paclitaxel (PCX; Sigma Chem, St. Louis, MO) a las mismas concentraciones que la KM. Como vehículo se usó DMSO a una concentración final por pozo de 0.01%. Como control negativo se usó a células que no recibieron ningún tratamiento. Después de 48 h, 10 µl de una solución de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil, bromuro de tetrazolio) a una concentración de 5 mg/ml se agregó a cada pozo y las placas se incubaron 2 h a 37 °C. Posteriormente las placas se leyeron en un lector de ELISA a una longitud de onda de 570 nm. La concentración de los compuestos probados que inhibió en 50% la viabilidad celular (CI<sub>50</sub>) se calculó por análisis de regresión (porcentaje de viabilidad celular contra logaritmo de la concentración).

### **Efecto de la KM sobre la apoptosis**

En el ensayo de TUNEL (del inglés TdT mediated dUTP Nick end labeling) se marcan los extremos 3'OH del ADN *in situ* por medio de una enzima transferasa de nucleótidos terminal (TdT). En el marcaje se pueden emplear nucleótidos marcados con fluoresceína. En procesos de muerte celular se produce fragmentación de ADN, generando extremos 3'OH susceptibles a ser marcados. El ensayo de TUNEL además de marcar ADN fragmentado, nos permite observar

otras características sugerentes de muerte por apoptosis como la condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo y la presencia de cuerpos apoptóticos (Gravieli et al., 1992).

Para analizar la fragmentación de ADN mediante el ensayo de TUNEL, se sembraron  $5 \times 10^5$  células HeLa en placas de 60 mm. Después de 24 h, las células se trataron con las  $CI_{50}$  de la KM o el PCX durante 24 y 48 h. Como control negativo se usó el vehículo (DMSO 0.1%). Terminado el tiempo de incubación, se colectó cada uno de los tratamientos por separado. Las células se lavaron con PBS frío y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 45 min. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS. Las laminillas se conservaron en 1.5 ml de PBS a 4 °C hasta su procesamiento posterior. Se tomó una laminilla de cada tratamiento y se colocó en una placa de 12 pozos. Cada laminilla se bloqueó con  $H_2O_2$  al 3% en metanol durante 5 min. Se realizaron dos lavados con PBS y las placas con las laminillas se colocaron sobre hielo antes de permeabilizar las células con 0.1% de Triton X-100 en citrato de sodio 0.1% durante 2 min. Las laminillas se lavaron nuevamente con PBS. Se adicionó a las muestras 30  $\mu$ l de la mezcla de reacción de TUNEL (Promega, Corporation, Madison, WI) y se incubaron 60 min a 37 °C en atmósfera húmeda a oscuridad. Las laminillas se lavaron con PBS y se dejaron secar. Posteriormente, las laminillas se montaron en portaobjetos con el medio de montaje Clarion Mounting Medium para su análisis por microscopía de fluorescencia. Se empleó una longitud de onda de excitación de 488 nm y se detectó la fluorescencia a 520 nm. Las fotografías se tomaron a un aumento de 40 x. La fosfatidilserina es un fosfolípido que normalmente se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y que se transloca a la cara externa de la membrana durante los estadios más tempranos de la apoptosis. La proteína Anexina V se une a fosfatidilserina en presencia de  $Ca^{2+}$  y permite detectar las células apoptóticas por citometría de flujo previa incubación de las células con Anexina V unida a un fluorocromo (FITC). Incubando las células simultáneamente con yoduro de propidio (entra sólo en las células muertas) y Anexina V se puede distinguir entre células necróticas (a las cuales se unirá también la Anexina, por tener la membrana permeabilizada) y células apoptóticas (excluyen el yoduro de propidio y unen Anexina V).

Las células HeLa o HaCaT se sembraron a una densidad  $1 \times 10^5$  en cajas de 35 mm. Después de 24 h de incubación, las células se trataron con la KM 45  $\mu$ M, el PCX 0.1  $\mu$ M o el vehículo (DMSO 0.01%) durante 48 h. Al término del tratamiento, las células se colectaron, se lavaron con PBS. Las células se tiñeron con Vybrant Apoptosis Assay Kit no.2 de Invitrogen (Carlsbad, CA). Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACScan (BD Bioscience, Mountain View, CA).

Los datos de 20 000 eventos adquiridos se analizaron con la ayuda del programa Weasel cytometry analysis v.2.6.1 (Walter y Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville, Victoria, Australia).

### **Detección de la generación de especies reactivas de oxígeno**

Las células HeLa se sembraron en placas de 60 mm de cultivo a  $8 \times 10^4$  células por placa. Después de 24 h de incubación, el vehículo, (DMSO 0.01%), la KM 45  $\mu\text{M}$  o el PCX 0.1 mM, con o sin 2000 U / ml de catalasa de hígado bovino, para bloquear las especies de oxígeno reactivo (ROS) de inducción, se añadieron a las células. Después de 48 h de tratamiento, las células se incubaron con 5 mM del colorante 5 - (y-6)-carboxi-2', 7'-dichlorodihydrofluoresceína diacetato (CM-H2DCFDA; Invitrogen, Carlsbad, CA) en medio libre de suero a 37 ° C durante 20 min. Como control positivo, una muestra de las células no tratadas se incubó con 100 mM de tert-butil hidroperóxido durante 30 min a 37 °C. Las células se lavaron y se analizaron por citometría de flujo utilizando FACScan citómetro de flujo analítico (BD Bioscience). La oxidación de CM-H2DCFDA es detectado por el aumento de la fluorescencia que es proporcional a la cantidad del total intracelular ERO generados. Se registraron en el citómetro un total de 30 000 eventos para cada corrida. El nivel de generación de ROS de las células tratadas con la KM o el PCX se calcula mediante la resta de la generación de ROS de las células no tratadas desde el porcentaje de la generación de ROS de las células tratadas con la KM o el PCX. Los datos de 20 000 eventos adquiridos se analizaron con la ayuda del programa Weasel cytometry analysis software v.2.6.1.

### **Análisis del contenido de ADN por citometría de flujo**

Dependiendo del contenido de ADN, es posible determinar si las células se encuentran en fase G1 o G0 (con contenido de ADN 2n), células en fase G2 o M (contenido de ADN 4n) y células en fase S (con contenido de ADN mayor a 2n y menor a 4n). La acumulación de toda la población en alguno de los estudios anteriores permite evidenciar arresto del ciclo celular.

Se sembraron células HeLa a una densidad de  $3 \times 10^5$  en cajas de 35 mm. Después de 24 h de incubación, las células se trataron por 12, 24 y 48 h con la KM 45  $\mu\text{M}$ , PCX 0.1  $\mu\text{M}$  o DMSO 0.01% (vehículo). Después de cada tiempo de tratamiento, se despegaron las células, se centrifugaron y se fijaron con 1 ml de etanol al 80% en frío. Para el análisis de citometría, se

eliminó el etanol de cada muestra centrifugando las células a 1200 x g por 5 min. El paquete celular se lavó con 1 ml de PBS frío y se centrifugó en las mismas condiciones. Las células se resuspendieron en PBS frío con 2  $\mu$ l de ribonucleasa A (RNasa A) 10 mg/ml libre de ADNsa y con 200  $\mu$ l de yoduro de propidio 50  $\mu$ g/ml y Tritón X-100 al 0.1%. Las muestras se incubaron por lo menos a una hora a temperatura ambiente en oscuridad y las células teñidas se analizaron en un citómetro de flujo FACScan (BD Bioscience, Mountain View, CA). Los datos de 20 000 eventos adquiridos se analizaron con la ayuda del programa ModFit LT (BD, New Jersey, NJ).

### **Inmunodetección de proteínas (western blot)**

Se sembraron células HeLa a una densidad de  $5 \times 10^5$  en cajas de 35 mm. Después de 24 h de incubación, las células se trataron por 24 y 48 h con la KM 45  $\mu$ M. Después de cada tiempo de tratamiento, las células se despegaron, se colocaron en hielo, se lavaron con PBS y se añadió 100  $\mu$ l de buffer de lisis [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM vanadato de sodio, 1 mM NaF, 10 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 1 mM fenil metil sulfonil fluoruro, 10  $\mu$ g/ml leupeptina y 10  $\mu$ g/ml aprotinina]. Los extractos celulares se hicieron pasar por una aguja de 22 G durante 8 veces y se centrifugaron a 14 000 rpm durante 15 min a 4 °C. La concentración de proteína en los extractos celulares se cuantificó con el ensayo de BCA (Pierce, Rockford, Illinois). Los lisados celulares se hirvieron en tampón de electroforesis-SDS con colorante [50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 15% sacarosa, 2 mM EDTA, 3% SDS, 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol] a 100°C durante 5 min. Aproximadamente 30  $\mu$ g de cada muestra se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida (del 7.5% al 15%, dependiendo de la proteína conteniendo 0.1% SDS y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon con 5% de leche desnatada en tampón TBST [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 137 mM NaCl, 0.1 % Tween-20] durante 1 h a temperatura ambiente, seguido por incubación con el anticuerpo primario para  $\beta$ -actina (1:5000), Puma (1:500), Akt (1:500), pAkt (1:500), Bcl-2 (1:500), Bad (1:500), p53 (1:1000), p21 (1:1000), ciclina D1 (1:1000) y p16 (1:1000) durante toda la noche a 4 °C con agitación suave. En todos los casos, los anticuerpos se diluyeron en TBST conteniendo 5% de leche desnatada. Posteriormente las membranas se lavaron con TBST tres veces durante 15 min cada vez y se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado, acoplado a la actividad peroxidasa, durante 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios (dilución 1:20 000) consistieron de anti conejo IgG-HRP (para

Puma, p-Akt y ciclina D1), anti cabra IgGHRP (para  $\beta$  actina), anti ratón IgG- HRP (para Bcl2, Bad, p53, p16, p21 y Akt). Todos los anticuerpos usados en este trabajo se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). La detección de las proteínas específicas se determinó por emisión de quimioluminiscencia utilizando el kit comercial immobilon western chemiluminiscent HRP substrate (Millipore, Darmstadt, Alemania) y posterior exposición de las membranas sobre películas de autoradiografía (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech). Como control de que se ha cargado y transferido la misma cantidad de proteínas, se realizó la determinación de  $\beta$ -actina mediante el uso de un anticuerpo específico anti- $\beta$ -actina. Las imágenes fueron capturadas con un escáner y analizadas con el programa Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD).

### **Estudio de inmunofluorescencia para la detección de caspasa 3**

Las células HeLa cultivadas en cubreobjetos fueron tratados con la KM 45  $\mu$ M. Después de 24 o 48 h de tratamiento, las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído (4%) en PBS durante 20 min. Los cubreobjetos se permeabilizaron con metanol (100%) y se lavaron con PBS. Las células se incubaron con el anticuerpo caspasa 3 durante 1 h a 37 ° C, se lavaron y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con FITC de cabra durante 45 min a temperatura ambiente. Después del lavado, las células se montaron en portaobjetos de cristal utilizando Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Las imágenes se adquirieron con un microscopio Axiovert 40 CFL epifluorescencia (Carl Zeiss, Thornwood, NY) con un aumento de 100 x.

### **Efecto quimioprotector de la kaempferitrina**

Se usaron ratones nu/nu de 6 semanas de edad y con un peso aproximado de 23 g, obtenidos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Los animales tuvieron libre acceso al agua y alimento. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo los protocolos establecidos por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (Guía para el tratamiento y cuidado de animales de laboratorio) y por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para el cuidado y manejo de animales de laboratorio. Los animales fueron alojados en cajas con filtros de aire en un ambiente controlado de temperatura y luz con ciclos de 12 h de luz/oscuridad. Los ratones se inyectaron subcutáneamente en el costado derecho con células HeLa

( $1.5 \times 10^6$ ). Cuatro horas después de la inoculación de células HeLa, grupos de 5 ratones recibieron dosis de la kaempferitrina entre 2.5 a 25 mg/kg/día, el CDDP 1 mg/kg/día o el PCX 1 mg/kg/día, disueltos en solución salina al 0.9%, inyectado intraperitonealmente durante 32 días. El grupo control se inyectaron 0.1 ml de solución salina. Los tumores se midieron con un vernier y el tamaño ( $\text{mm}^3$ ) se calculó como se describió anteriormente (Looney et al., 1971):

$$\text{Volumen del tumor} = \frac{\text{largo} \times \text{ancho} \times \text{altura}}{2}$$

Al final de los experimentos, los animales se sacrificaron y los tumores se extrajeron y se pesaron.

### **Efecto antitumoral de la kaempferitrina**

Se usaron ratones nu/nu de 6 semanas de edad. Los ratones se inyectaron subcutáneamente en el costado derecho con células HeLa ( $1.5 \times 10^6$ ). Ocho días después de la implantación del tumor, grupos de 8 ratones recibieron dosis de la kaempferitrina entre 2.5 a 25 mg/kg/día, el CDDP 1 mg/kg/día o el PCX 1 mg/kg/día, disueltos en solución salina al 0.9%, inyectado intraperitonealmente durante 32 días. El grupo control se inyectaron 0.1 ml de solución salina. Los tumores se midieron y se pesaron como se describió anteriormente. Al final de los experimentos, 5 animales de cada grupo se sacrificaron y se obtuvieron sus tumores y órganos vitales. Los tumores se lavaron 2 veces con PBS, se fijaron con formaldehído 37%, se embebieron en secciones de parafina de 5  $\mu\text{m}$  y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los cortes se analizaron en microscopio. El hígado, riñones, corazón y bazo de cada animal se peso individualmente. El peso relativo de cada órgano se calculó como se describe a continuación:

$$\text{Peso relativo del órgano} = \frac{\text{peso del órgano}}{\text{peso corporal}} \times 100$$

Los tres ratones restantes de cada grupo se usaron para calcular el tiempo de sobrevivencia, usando el método de Kaplan–Meier. El efecto de la KM en el incremento en la esperanza de vida (IEV) se calculó en base a la mortalidad observada en los animales de laboratorio como se describe a continuación

$$\%IEV = \frac{\text{tiempo de sobrevivencia media del grupo tratado}}{\text{tiempo de sobrevivencia media del grupo control}} \times 100$$

### **Análisis inmunohistoquímico**

Las muestras de tumor embebidos en bloques fijados en parafina se cortaron (3  $\mu\text{m}$  de espesor) y se montaron en portaobjetos de vidrio. La inmunohistoquímica se llevó a cabo utilizando un sistema automatizado de diapositivas de preparación del sistema de referencia XT (Ventana Medical Systems Inc., de Tucson, AZ). La desparafinización, la recuperación de epítipo y la inmunotinción se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante mediante el uso de soluciones móviles de acondicionamiento (CCL) y al sistema de detección BMK UltraView diaminobencidina (DAB) (Ventana Medical Systems). Las muestras de tumor se tiñeron con anticuerpos primarias para Akt fosforilada (pAkt; Ser473, 1:100), la ciclina D1 (1:100), anti-antígeno de proliferación celular (PCNA, 1:200). Las señales positivas se amplificaron mediante una técnica ultra-VIEW de cobre, y las secciones se contratiñeron con hematoxilina y eosina. En cada corrida de inmunohistoquímica, muestras de cuello uterino normal (PCNA), cáncer de mama (ciclina D1 y pAkt) se usaron como control negativo. Los controles positivos consistieron en muestras de linfoma (para pAkt, la ciclina D1) y cáncer de mucosa bucal (para PCNA). Para la cuantificación células positivas a la tinción de ciclina D1, pAkt y PCNA, se observaron un total de cuatro campos para cada tratamiento y el porcentaje de superficie ocupada por las células positivas en la superficie total ocupada por todas las células se analizaron mediante el NIH Image J software. Los resultados se expresan como la de células positivas (%) de tinción.

### **Cuantificación de VEGF**

Después de 32 días de tratamiento, los ratones se anestesiaron por inhalación de sevoflurano y se obtuvo sangre por punción cardiaca. Las muestras de suero se obtuvieron mediante la centrifugación de la sangre entera a 2000 x g a 4 °C durante 10 min. Los niveles séricos de VEGF se midieron utilizando un equipo comercialmente disponible de acuerdo con las instrucciones del fabricante (eBioscience, San Diego, CA). La densidad óptica se midió a 450 nm en un lector de microplacas.

### **Análisis estadístico**

Los valores experimentales se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar de al menos tres experimentos en hexaplicado. Cuando esté indicado, diferencias estadísticamente significativas en el grupo control se identificaron por la t de Student. En algunos casos, los datos se analizaron



mediante el análisis por ANOVA, seguido por a prueba de Tukey. El nivel de  $P \leq 0,05$  fue utilizado para determinar la significación estadística en todas las pruebas. Todos los cálculos se realizaron utilizando el sistema de Graph Pad Prisma de software V.3 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## RESULTADOS

### La KM ejerce efectos tóxicos en células HeLa

El ensayo con MTT se usó para evaluar la toxicidad de la kaempferitrina (KM) sobre líneas celulares humanas cancerígenas y no cancerígenas (HaCaT). Los controles positivos el CDDP o el PCX ejercieron fuertes efectos citotóxicos en todas las líneas celulares de cáncer y mostraron valores de  $CI_{50}$  entre 2.3 a 8.5  $\mu\text{M}$  (CDDP) y 0.1 a 0.45  $\mu\text{M}$  (PCX) (Tabla 1). La KM ejerció los efectos tóxicos más fuertes sobre células HeLa ( $CI_{50}=45 \mu\text{M}$ ) y células MDA-MB231 ( $CI_{50}=65 \mu\text{M}$ ) (Tabla 1). En células HaCaT, el CDDP y el PCX mostraron valores de  $CI_{50}$  de 8.9  $\mu\text{M}$  y 0.55  $\mu\text{M}$ , respectivamente, mientras que la KM indujo menores efectos tóxicos en células HaCaT ( $CI_{50}=177 \mu\text{M}$ ).

Tabla 1. Actividad citotóxica de la kaempferitrina en células humanas de cáncer y no tumorigénicas

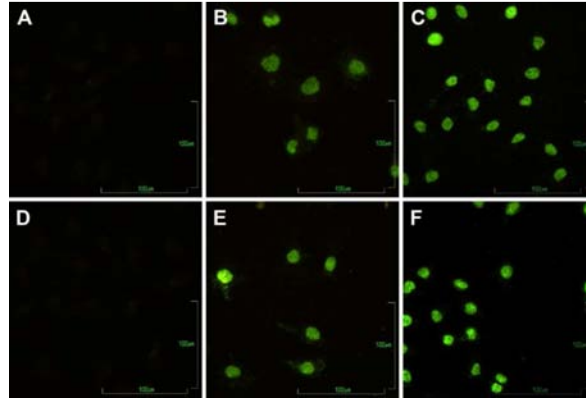
$CI_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )							
	MDA-MB-231	HeLa	SKOV-3	DU-145	HepG-2	SW-480	HaCaT
KM	65 $\pm$ 2.6	45 $\pm$ 2.6	80 $\pm$ 1.1	71 $\pm$ 5.6	65 $\pm$ 1.6	85 $\pm$ 6.4	177 $\pm$ 1.9
CDDP	8.5 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.1	3.1 $\pm$ 0.9	4.9 $\pm$ 0.7	6.4 $\pm$ 0.9	7.1 $\pm$ 2.5	8.9 $\pm$ 1.1
PCX	0.3 $\pm$ 0.01	0.1 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.07	0.41 $\pm$ 0.03	0.5 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.01	0.55 $\pm$ 0.1

### La KM induce la muerte en células HeLa por apoptosis

El ensayo de TUNEL se usó para analizar si la KM presenta la capacidad de inducir muerte celular por apoptosis en células HeLa. Los resultados indicaron que las células incubadas con el vehículo (DMSO 0.01%) a las 24 h y 48 h (Figura 5A, paneles A y C) carecieron de efectos tóxicos (TUNEL negativo). Por el contrario, células tratadas con el PCX 0.1  $\mu\text{M}$  fueron positivas a la reacción de TUNEL a las 24 h y 48 h (Fig. 5A, paneles B y E). Las células mostraron típicos signos de apoptosis tales como condensación de la cromatina y la aparición de cuerpos apoptóticos. Las células HeLa tratadas con la KM 45  $\mu\text{M}$  mostraron un incremento en la fragmentación del ADN y una condensación de la cromatina a las 12 y 24 h, lo cual fue evidente por un incremento en las células positivas a la reacción de TUNEL (Fig. 5A paneles C y F). Para caracterizar mejor la muerte celular inducida por la KM en células HeLa, las células HeLa se trataron con la KM y se analizaron por citometría de flujo. La KM indujo un 39% de la apoptosis (Anexina + / PI más Anexina + / PI +) en comparación con las células no tratadas, mientras que

el PCX indujo un 57% de apoptosis (Fig. 5B). En las células HaCaT, la KM y el PCX indujeron un 11% y 45%, respectivamente, de apoptosis (Fig. 5B).

(A)



(B)

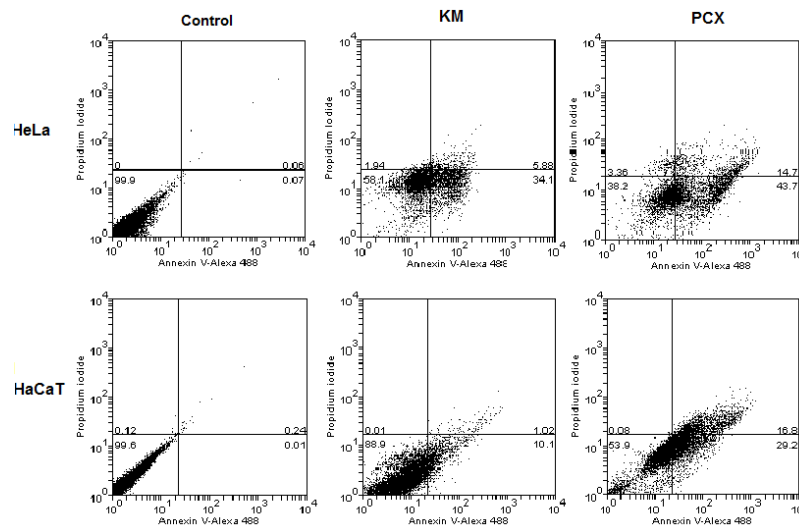


Figura 5. La kaempferitrina induce efectos apoptóticos en células HeLa. (A) Células HeLa se incubaron con DMSO 0.01% por 24 h (panel A) y 48 h (panel D) y se trataron con la tinción de TUNEL. Cultivos paralelos se alimentaron con el PCX 0.1  $\mu$ M por 24 h (panel B) y 48 h (panel E) o la KM 45  $\mu$ M por 24 h (panel C) y 48 h (panel F). Las fotografías se tomaron a un aumento de 40  $\times$ . (B) Células HeLa o HaCaT se trataron con el vehículo (DMSO 0.01%), la KM 45  $\mu$ M o el PCX 0.1  $\mu$ M durante 48 h. El ensayo de apoptosis con Anexina V y yoduro de propidio se llevó a cabo como se describe en materiales y métodos. Se adquirieron 10 000 eventos. El porcentaje de células se indica en la esquina de cada cuadrante. Las células en los cuadrantes del cuadrante inferior derecho se consideran como apoptótico (Anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). Los datos son representativos de cuatro experimentos realizados por duplicado.

## La KM induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en células HeLa

La inducción de la generación de ERO por compuestos citotóxicos, es un mecanismo de muerte en células cancerosas. Los resultados indicaron que la KM y el PCX indujeron la generación de ERO en células HeLa, mostrado por el incremento de la fluorescencia relativa comparado con las células no tratadas (Fig. 6A a 6C). La co-incubación de la KM o el PCX con catalasa disminuyó la generación de ERO generado por la KM (Fig. 6A) y el PCX (Fig. 6C). Además, la apoptosis inducida por la KM y el PCX fue parcialmente bloqueada por la co-incubación con catalasa (Fig. 6D).

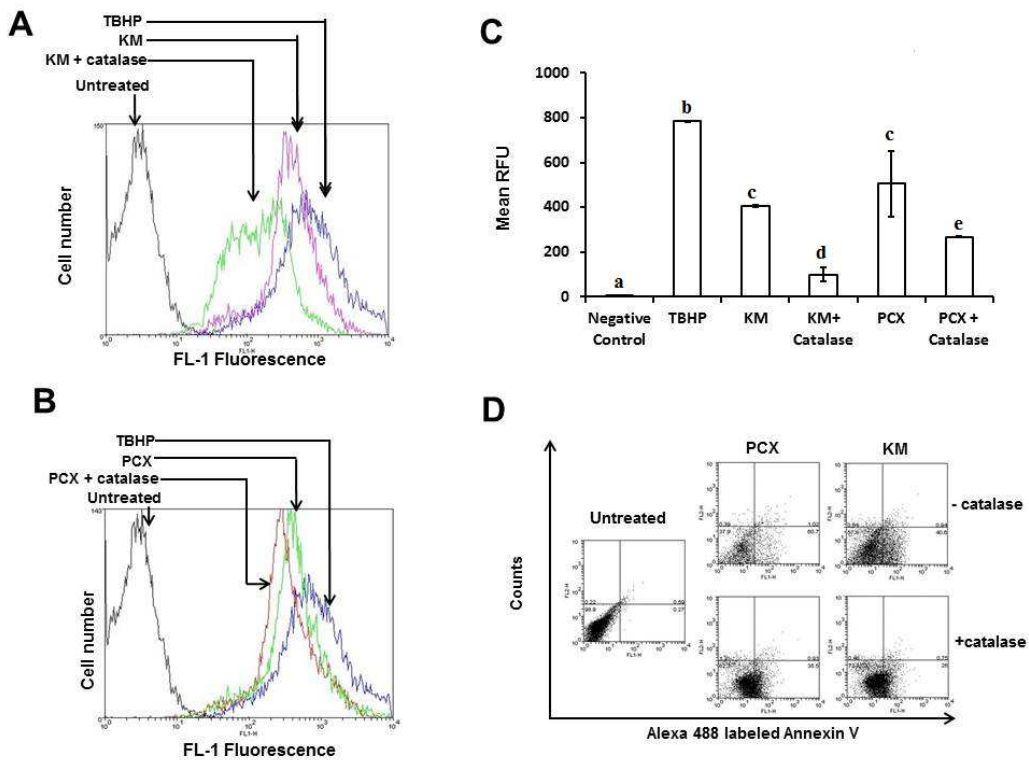


Figura 6. La KM induce apoptosis en células HeLa vía especies reactivas de oxígeno (ERO). Células HeLa se trataron con la KM 45  $\mu$ M (A) o el PCX 0.1  $\mu$ M (B) en la presencia o ausencia de catalasa 2000 U/ml por 48 h. Las células se colectaron, los niveles de ERO se determinaron tiñendo las células con CM-H<sub>2</sub>DCFDA 5 mM por citometría de flujo. Como control positivo de inducción de ERO se usó tert-butilhidroperóxido (TBHP) 100 mM. (C) Promedio de las unidades relativas de fluorescencia generadas por el efecto de la KM, el PCX y el TBHP (datos presentados en A y B). Detección de apoptosis, por Anexina V y yoduro de propidio, en células HeLa tratadas con la KM 45  $\mu$ M o el PCX 0.1  $\mu$ M en la presencia o ausencia de catalasa 200 U/ml (D). El porcentaje de células se indica en la esquina de cada cuadrante. Las células en los cuadrantes del cuadrante inferior derecho se consideran como apoptóticas (Anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>). Los datos son representativos de cuatro experimentos realizados por duplicado.

### **La KM induce el arresto en la fase G1 en células HeLa**

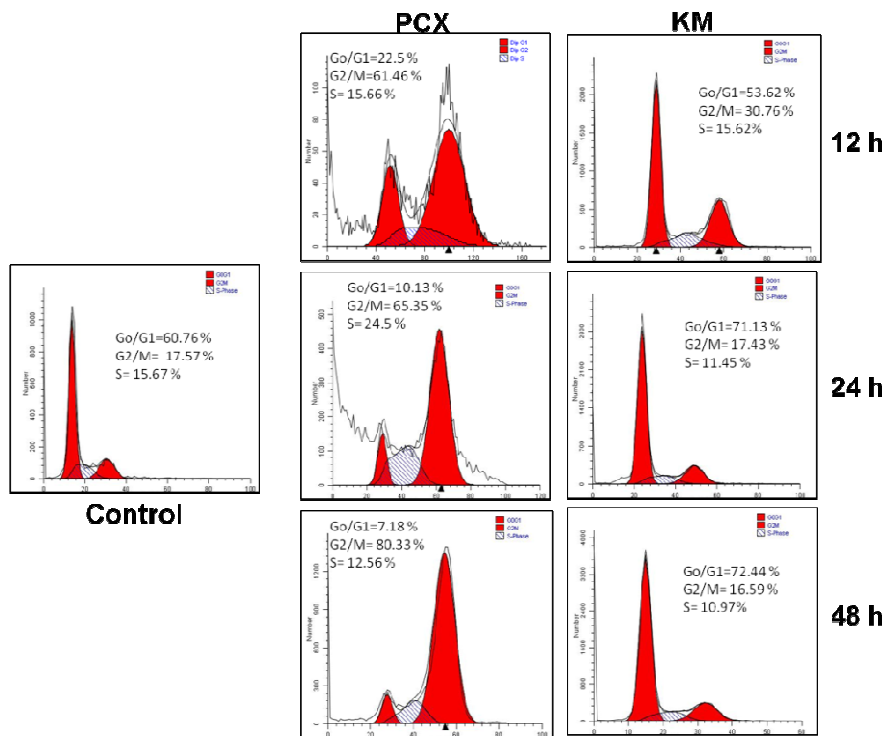
Diversos compuestos anticancerígenos inducen sus efectos antiproliferativos en células cancerígenas mediante el arresto en alguna fase del ciclo celular. El ensayo con ioduro de propidio en citometría de flujo evalúa si algún compuesto ejerce alguna alteración en el ciclo celular. Los resultados mostraron que aproximadamente, el 60.76% de las células HeLa sin tratamiento se encontraban en la fase G0/G1, mientras que el 17.57% en fase G2 / M y 15.67% en la fase S (Fig. 7A). Después de 12 h, 7.18% de las células HeLa tratadas con el PCX 0.1  $\mu$ M estaban en G0/G1, mientras que el porcentaje de células en fase S y G2 / M fueron de 12.56 y 80.33, respectivamente. A las 24 y 48 h, las células HeLa tratadas con el PCX 0.1  $\mu$ M parecían acumularse dramáticamente en la fase G2/M con una disminución concomitante en el porcentaje de células en la fase G1 (Fig. 7A). A las 12 h, el tratamiento con la KM 45  $\mu$ M causó una acumulación de las células en 53.62% en la fase G0/G1, 30.76% en la fase G2/M y 15.62% en la fase S (Fig. 7A). Un arresto de las células HeLa en la fase G1 del ciclo celular fue más evidente a partir de 24 h de tratamiento. A las 48 h, células tratadas con la KM parecían acumularse dramáticamente en la fase G1 con la disminución concomitante en el porcentaje de células en la fase G2 / M (Fig. 7A).

Para analizar el mecanismo molecular por el cual la KM induce el arresto en G1 en las células HeLa, se evaluó por medio de western blot el nivel de expresión de proteínas relacionadas con el control en la transición de la fase G1 a S. Los niveles de las proteínas p16 y p21 en células HeLa disminuyeron por el tratamiento con la KM, en comparación con las células no tratadas, mientras que los niveles de proteína de ciclina D1 disminuyeron (Fig. 7B).

### **La KM induce la expresión de proteínas asociadas con la vía intrínseca de apoptosis**

Para caracterizar el mecanismo molecular por el cual la KM ejerce sus efectos apoptóticos en células HeLa, se analizó por western blot la expresión de proteínas relacionadas con la vía intrínseca de la apoptosis. Los niveles de proteína de Akt no se modificaron con el tratamiento con la KM. Por el contrario, se incrementó los niveles de las proteínas Puma, Bad y p53 en células HeLa por el tratamiento con la KM, en comparación con las células no tratadas, mientras que los niveles de las proteínas anti-apoptóticas Bcl2 y pAkt disminuyeron (Fig. 8).

(A)



(B)

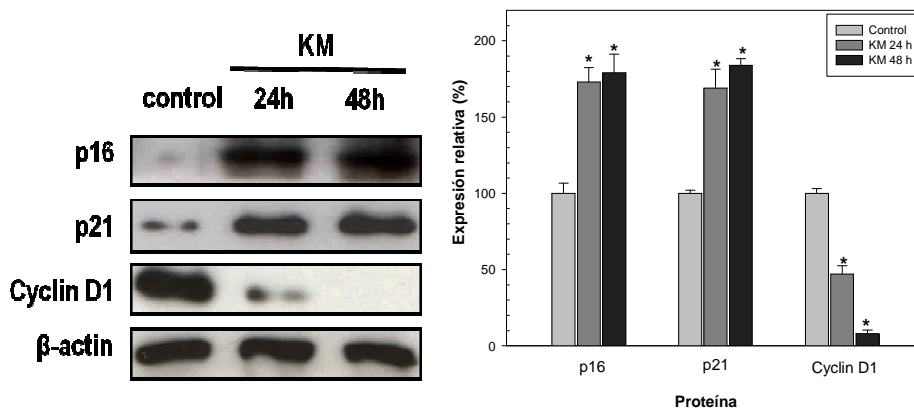
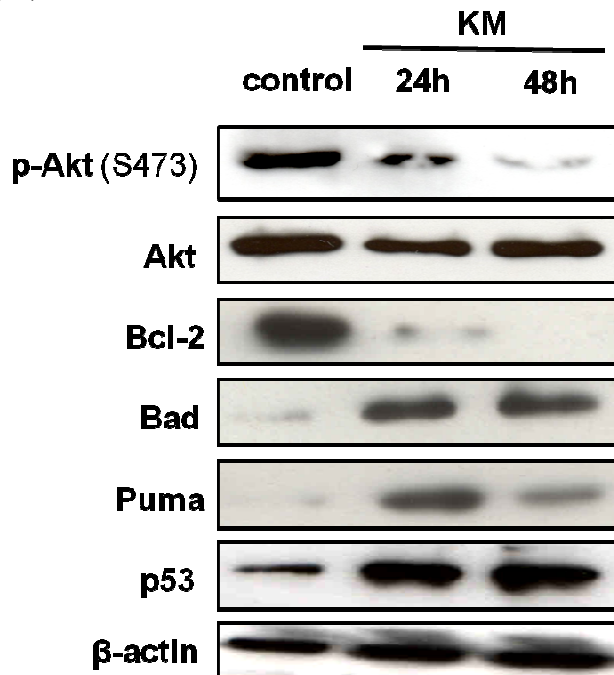


Figura 7. Efectos de la KM en la progresión del ciclo celular en las células HeLa. (A) Las células se trataron con el vehículo, la KM 45  $\mu$ M o el PCX 0.1  $\mu$ M durante 12, 24 y 48 h. Posteriormente, las células se tiñeron con IP 20  $\mu$ M y se analizaron por citometría de flujo. El porcentaje de células en G0/G1, S y G2 / M fase se calculó y se representa en el lado derecho de los histogramas. Un total de 30 000 eventos se registraron (B) Las transferencias resultantes se probaron para la p16, p21 y ciclina D1.  $\beta$ -actina sirvió como control de carga. Mediciones densitométricas de la banda en el análisis de western blot se realizaron utilizando el software Image J. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes. Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar. \* P <0.05, en comparación con los valores de control.

(A)



(B)

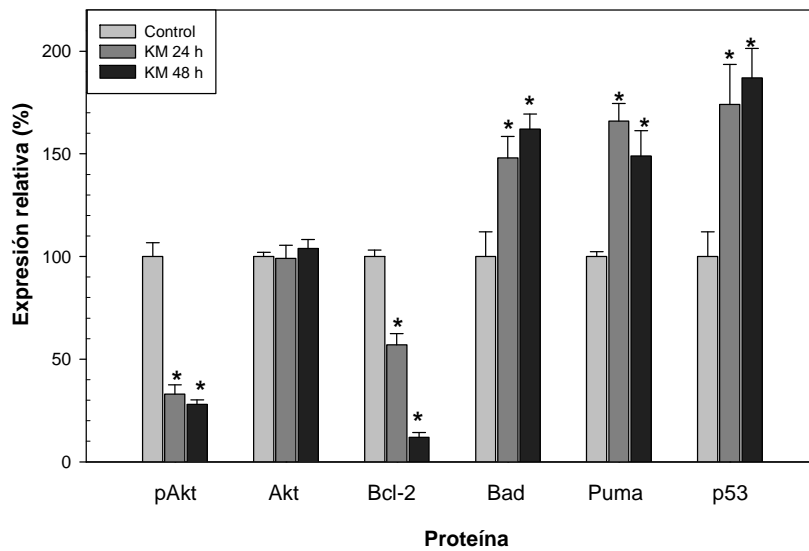


Figura 8. La KM induce la expresión de proteínas relacionadas con la vía intrínseca de apoptosis. (A) células HeLa se trataron con la KM 45 μM o el vehículo por 24 y 48 h. El lisado completo las de células se preparó y se sometió a western blot. Las transferencias resultantes se probaron para pAkt (S473), Akt, Bcl2, Bad, Puma y p53. β-actina sirvió como control de carga. (B) Las mediciones densitométricas de la banda en el análisis de western blot se realizaron utilizando el software Image J. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes. Los resultados representan la media ± desviación estándar. \* P < 0.05, en comparación con los valores de control.

### **La KM induce la activación de la caspasa 3**

Para determinar si los efectos apoptóticos de la KM inducidos en células HeLa son dependientes de caspasas, se incubó las células HeLa con un inhibidor general de caspasas (z-VAD FMK) y se realizó el ensayo con Annexina y Ioduro de propidio con citometría de flujo. Los resultados indican que la apoptosis inducida por la KM en células HeLa fue abolida en la presencia de z-VAD FMK (Fig. 9A). Además, el análisis de inmunofluorescencia indicó que la KM indujo la escisión proteolítica de la caspasa 3 a las 24 y 48 h en células HeLa, en comparación con las células no tratadas (Fig. 9B).

### **La KM induce efectos quimioprotectores**

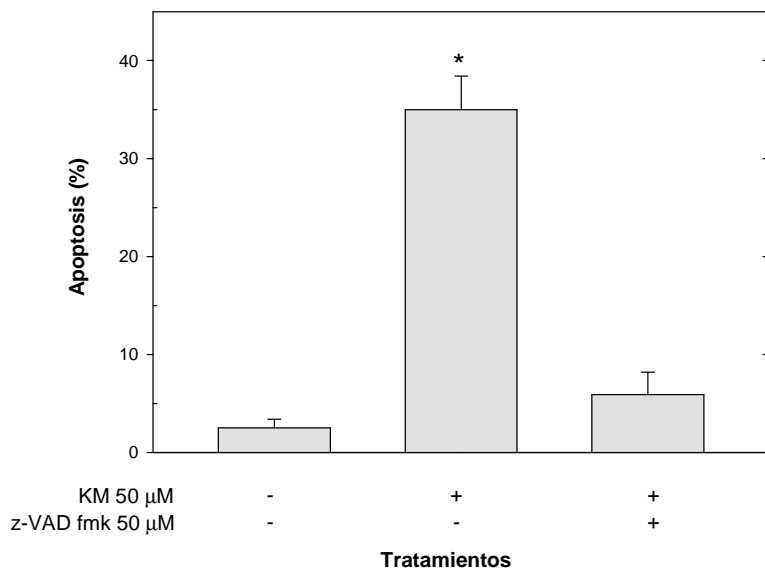
Se ha descrito que muchos flavonoides inducen efectos quimiopreventivos. En este estudio, la KM administrada a 2.5, 10 y 25 mg/kg inhibió el crecimiento tumoral de una forma estadísticamente significativa ( $P \leq 0.05$ ), con respecto a los ratones no tratados, en 40%, 87% y 97%, respectivamente (Fig. 10A). Por otro lado, el PCX y el CDDP administrados a 1 mg/kg, cada uno, inhibieron el crecimiento tumoral en 98% y 99%, respectivamente (Fig. 10A). La KM inhibió significativamente ( $P \leq 0.05$ ) el peso del tumor en 37% (2.5 mg/kg), 81% (10 mg/kg) y 95% (25 mg/kg), mientras que el PCX y el CDDP administrados a 1 mg/kg, cada uno, inhibieron el peso del tumor en 99% y 96%, respectivamente (Fig. 10B).

### **La KM induce efectos antitumorales**

Los efectos citotóxicos *in vitro* mostrados por la KM en células HeLa fueron corroborados *in vivo* usando un modelo de xenotransplante de células HeLa en ratones nu/nu. La KM indujo efectos antitumorales de una manera dependiente de la concentración. La KM administrada a 2.5, 10 y 25 mg/kg inhibió el crecimiento tumoral de una forma estadísticamente significativa ( $P \leq 0.05$ ), comparado con los ratones no tratados, en 28%, 63% y 78%, respectivamente, mientras que el PCX y el CDDP 1 mg/kg, cada uno, inhibieron el crecimiento tumoral en 88% y 79%, respectivamente (Fig. 10C). Además, la KM inhibió significativamente ( $P \leq 0.05$ ) el peso del tumor en 25% (2.5 mg/kg), 55% (10 mg/kg) y 75% (25 mg/kg), mientras que el PCX y el CDDP 1 mg/kg, cada uno, inhibió el peso tumoral en 90% y 77%, respectivamente (Fig. 10D).



(A)



(B)

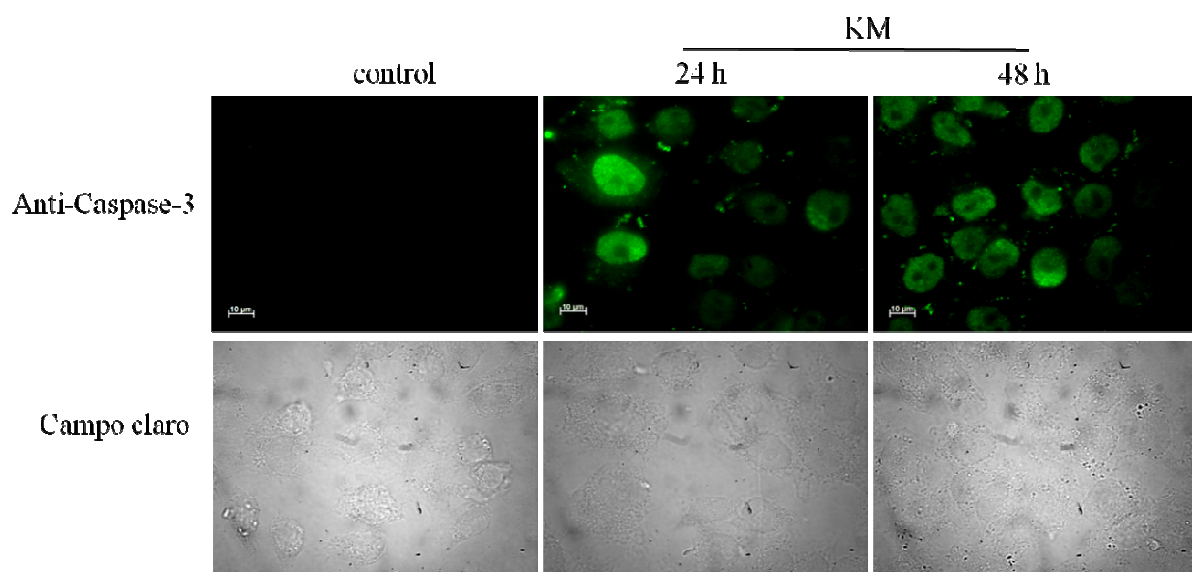


Figura 9. La KM induce la activación de caspasa 3 en células HeLa. (A) La detección de la apoptosis, utilizando Anexina V y PI, en las células HeLa tratadas con la KM 45  $\mu$ M en presencia o ausencia del inhibidor de caspasas zVAD Fmk 50  $\mu$ M. Los datos son representativos de tres experimentos independientes por triplicado. Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar. \*  $P < 0.05$ , en comparación con los valores de control.

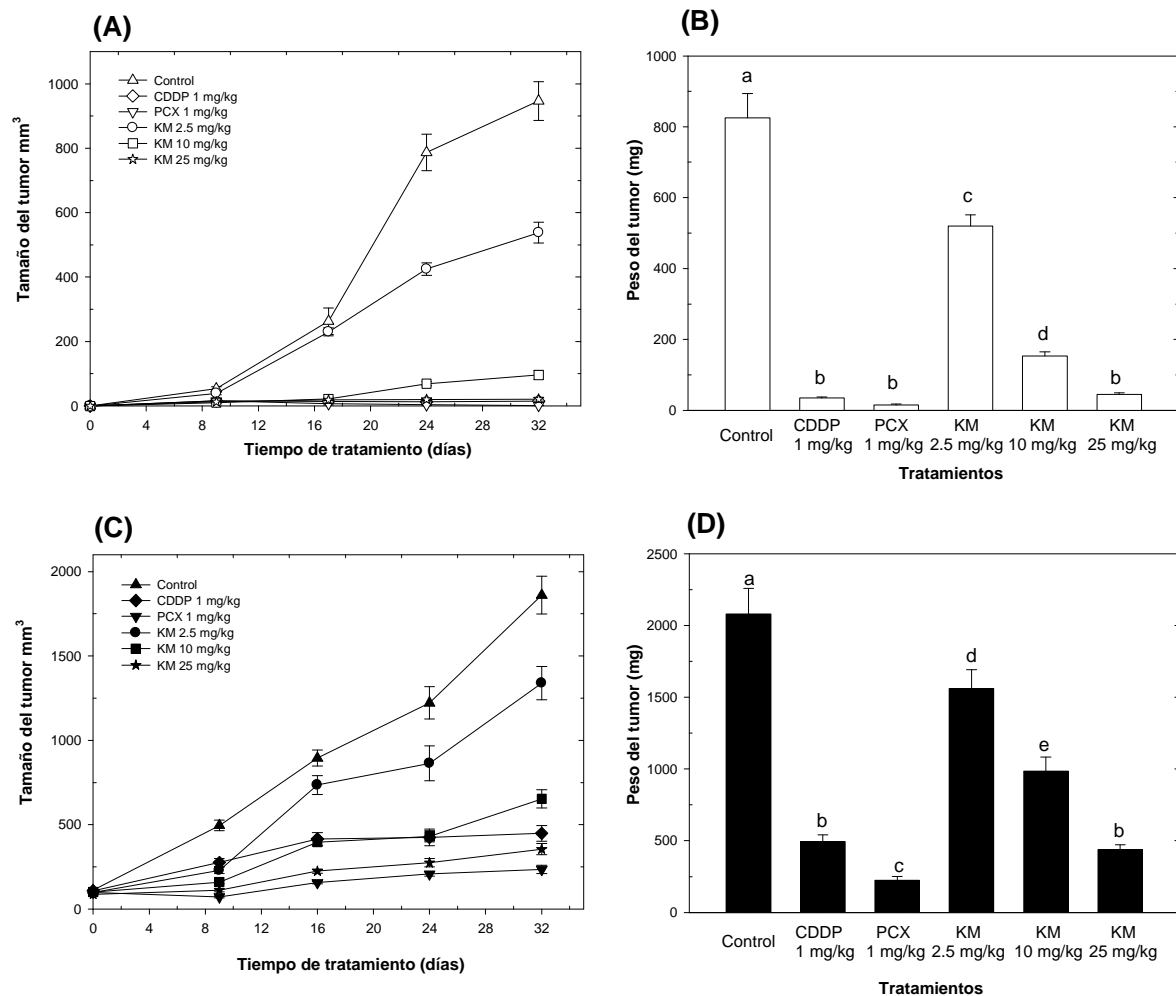


Figura 10. La KM induce efectos quimiopreventivos y antitumorales en ratones nu/nu portadores de tumor de células HeLa. Los ratones se inyectaron con células HeLa ( $1.5 \times 10^6$ ) y 4 h (A y B) u 8 días (C y D) después de la implantación del tumor, los ratones se trataron con dosis de la KM entre 2.5 a 25 mg/kg, el CDDP 1 mg/kg o el PCX 1mg/kg al día durante un período de 32 días. Los tumores se midieron (A y C) y se pesaron (B y D) como se describe en Materiales y Métodos. Los datos son representativos de tres experimentos independientes por quintuplicado. Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar (DE). Las letras minúsculas indican diferencias significativas según la prueba de ANOVA ( $p < 0.05$ ), seguido por la prueba post hoc de Tukey.

### La KM carece de efectos tóxicos generales en ratones con tumor

Es necesaria la búsqueda de nuevos agentes antitumorales con efectos mayores o similares a los fármacos en uso pero con menores efectos tóxicos. Los efectos tóxicos generales de la KM en ratones con tumor también se evaluaron. Los resultados indicaron que la KM en todas las dosis (2.5 a 25 mg / kg) no afectó el peso relativo de órganos o de peso corporal (Fig. 11A y 11B), en comparación con los ratones no tratados. Por el contrario, el PCX disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ) el peso de bazo, hígado, corazón y riñón y disminuyó el peso corporal en un 6% (Fig. 11A y 11B)

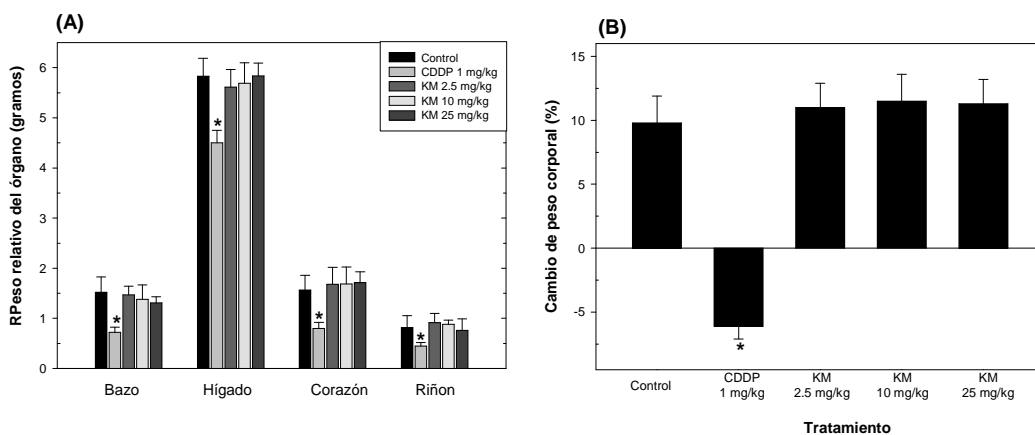


Figura 11. La KM carece de efectos tóxicos en ratones nu/nu. Peso relativo del órgano (A) y el peso corporal (B) de ratones no tratados y los ratones tratados con la KM o el PCX se calculó como se describe en Materiales y métodos. Los datos son representativos de tres experimentos independientes por triplicado. Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar. \*  $P < 0.05$ , en comparación con los valores de control.

### La KM mejora la supervivencia de ratones portadores del tumor

Los estudios de supervivencia son ampliamente usados para determinar si un compuesto presenta la capacidad de mejorar el pronóstico en el desarrollo del cáncer. Los datos indicaron que la KM incrementó significativamente la supervivencia de ratones con tumor en una forma dependiente de dosis en comparación con los controles no tratados (Fig. 12A). El tiempo de supervivencia media (TSM) de los ratones no tratados fue de 46 días, mientras que el TSM para los ratones tratados con el PCX fue de 83 días y el TSM para ratones tratados con la KM fue de 56 días (KM 2.5 mg/kg), 64 días (KM 10 mg/kg) y 73 días (KM 25 mg/kg) (Fig. 12B). Además, la KM indujo un aumento en la esperanza de vida en una forma dependiente de dosis por 108% (KM 2.5

mg/kg), 139% (10 mg/kg) y 159% (KM 25 mg/kg), en comparación con los ratones no tratados, mientras que el PCX lo hizo en un 180% (Fig. 12C).

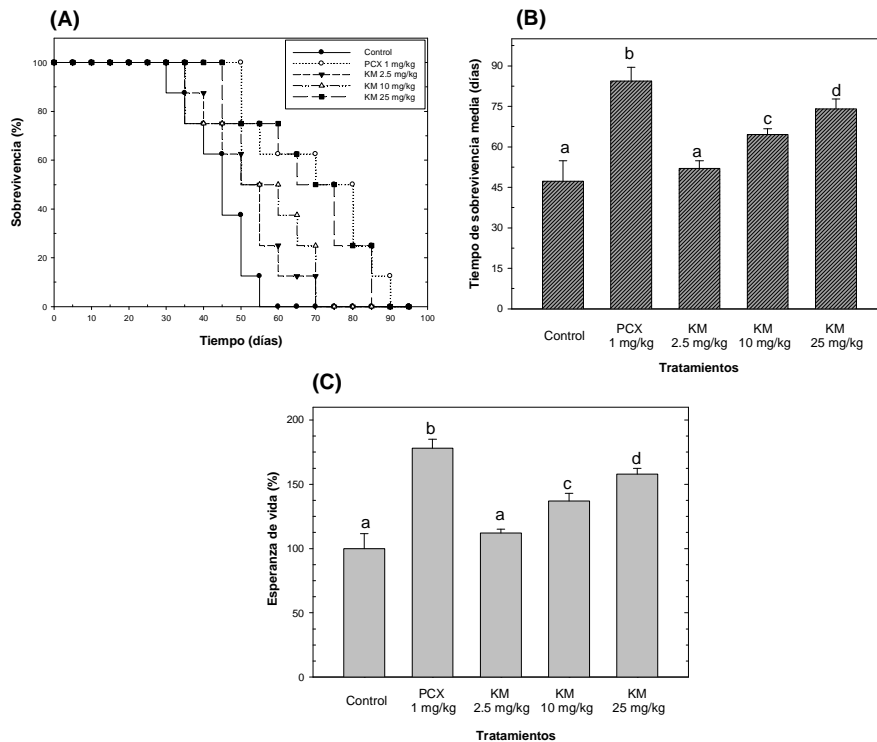


Figura 12. La KM incremento el tiempo de sobrevivencia en ratones portadores de tumor. El efecto de la KM o el PCX sobre la sobrevivencia (A), el tiempo medio de sobrevivencia (B) y la esperanza de vida (C) de ratones portadores del tumor se calculó como se describe en Materiales y métodos. Los datos son representativos de tres experimentos independientes por quintuplicado. Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar (DE). Las letras minúsculas indican diferencias significativas según la prueba de ANOVA ( $P < 0.05$ ), seguido por la prueba post hoc de Tukey.

### Estudio histológico

Los tumores se tiñeron con hematoxilina y eosina. En el tumor sin tratar, se observó mitosis atípica, patrón pseudopapilar y alta proliferación de las células (Fig. 13, paneles A y D). Observamos también en otras laminillas, la infiltración de células neoplásicas en las fibras musculares y el tejido conjuntivo entre las células de grasa. Por el contrario, los tumores tratados con el PCX 1 mg/kg presentó áreas necróticas (relación necrótico 20%) y células apoptóticas (Fig. 13, B paneles y E). Los tumores tratados con la KM 25 mg/kg mostraron una necrosis masiva (relación necrótica 50%) y células apoptóticas (Fig. 13, paneles C y F). Sin embargo, el

tumor de ratones no tratados mostraron más proliferación celular y células mitóticas (Fig. 13, panel D), mientras que en tumores tratados con el PCX y la KM las áreas de proliferación de células eran escasas o ausentes (Fig. 13, D y E paneles). Además, la permeabilidad vascular se observó más en los tumores no tratados en comparación con los tumores tratados con el PCX o la KM (Fig. 13, los paneles G-I).

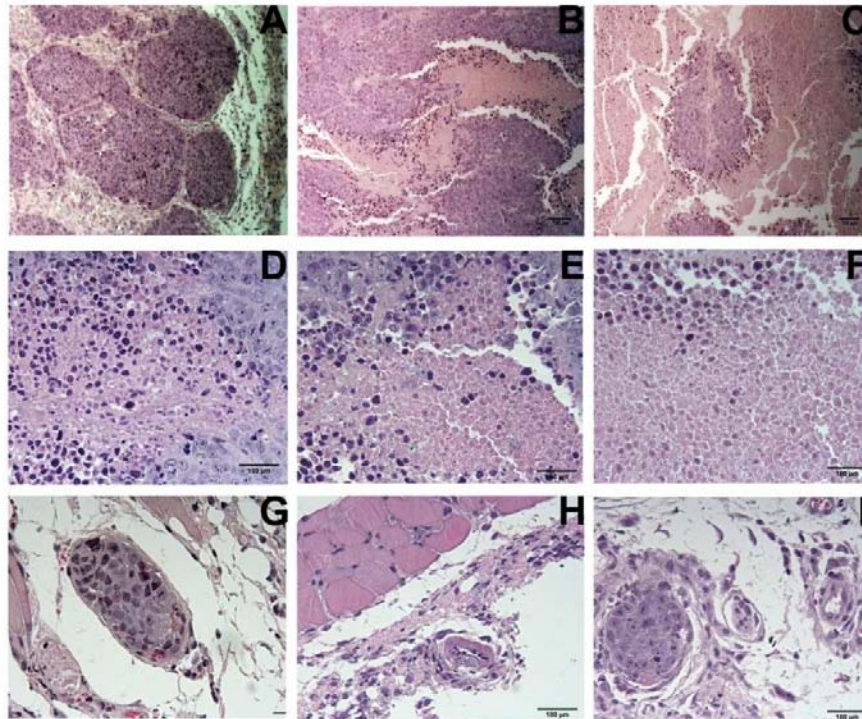


Figura 13. Examen histopatológico de tejido tumoral de células HeLa xenotransplantadas en ratones. Grupo no tratado a 100 x (A) y 200 x (D) de ampliación, tumores de ratones tratados con el PCX 1 mg/kg a 100 x (B) y 200 x (E) de ampliación y los ratones tratados con KM 25 mg/kg a 100 x (C) y ampliación 200 x (F). Los datos son representativos de tres experimentos independientes por triplicado.

### **La KM inhibe la proliferación celular en los tumores xenotransplantados**

Mediante el uso de la inmunohistoquímica se evaluó la expresión de marcadores de proliferación en tumores de ratón sin tratamiento y tratados con la KM. Los tumores de los ratones portadores del tumor sin tratar expresaron el 53.5% (ciclina D1), el 41.3% (pAkt) y el 37% (PCNA) de las células de tinción positiva. Por el contrario, la KM 25 mg / kg redujo significativamente ( $P \leq 0.05$ ) el número de células positivas para la ciclina D1, pAkt, y de PCNA en un 21.3%, 14.1%, y el 21%, respectivamente, en comparación con el control (Fig. 14).

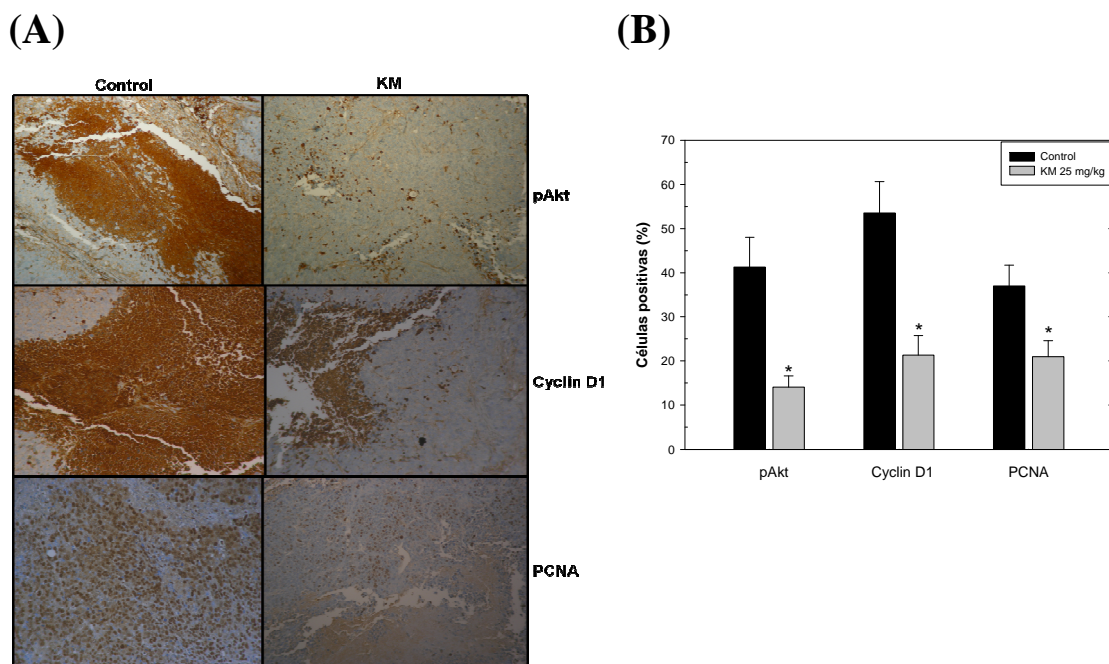


Figura 14. Tinción inmunohistoquímica para ciclina D1 pAkt, PCNA en tejido tumoral de células HeLa xenotransplantadas en ratones. Se realizó la tinción para pAkt, ciclina D1 y PCNA en los tumores de ratones control y tratados con la KM 25 mg/kg. Los tumores se contratiñeron contrastados con hematoxilina. Todas las imágenes de 200 × magnificación. Los datos son representativos de tres experimentos independientes por triplicado. La cuantificación de las células de la tinción de pAkt, la ciclina D1 y PCNA utilizando el software Image J. Los resultados representan la media ± desviación estándar. \* P < 0.05, en comparación con los valores de control.

### La KM disminuye la producción de VEGF en ratones portadores del tumor

En el cáncer el proceso de angiogénesis es sobrerregulado por lo cual las células evaden la apoptosis y pueden inducir metástasis. Mediante un ensayo de ELISA se evaluó los niveles de VEGF, la principal proteína inductora de angiogénesis, en sueros de ratones no tratados y tratados con diferentes dosis de la KM. El compuesto antitumoral CDDP 1 mg/kg disminuyó los niveles séricos de VEGF en un 52%, en comparación con los ratones no tratados (Fig. 15). Por otro lado, la KM disminuyó la producción de VEGF en una forma dependiente de dosis: 12.5% (KM 2.5 mg/kg), 26% (KM 10 mg/kg) y 36% (KM 25 mg/kg) (Fig. 15).

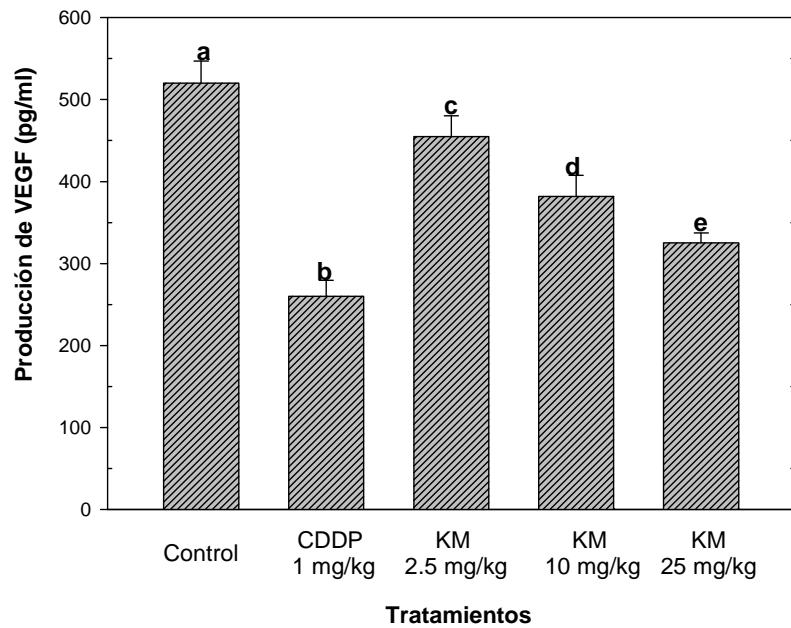


Figura 15. Efecto de la KM en los niveles séricos de VEGF en ratones nu/nu portadores del tumor. Después de 32 días de tratamiento, se obtuvo el suero de ratones portadores del tumor. Los niveles séricos de VEGF se midieron. Los datos son representativos de tres experimentos independientes por quintuplicado. Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar (DE). Las letras minúsculas indican diferencias significativas según la prueba de ANOVA ( $p \leq 0.05$ ), seguido por la prueba post hoc de Tukey.

## DISCUSIÓN

Las plantas son una buena fuente de compuestos antitumorales (Gordaliza, 2007). Recientemente, se demostró que extractos de *Justicia spicigera* ejercieron efectos citotóxicos y antitumorales. Además, hemos demostrado que el componente predominante en este extracto fue la kaempferitrina (Alonso-Castro et al., 2012). Sin embargo, se desconoce si la kaempferitrina (KM) ejerce efectos citotóxicos y antitumorales.

En primer lugar, se evaluaron los efectos citotóxicos y apoptóticos de la KM contra células de cáncer humano y células no tumorales. La apoptosis es un mecanismo importante homeostático que equilibra la división celular y la muerte celular, y mantiene el número apropiado de células en el cuerpo. La inducción de la apoptosis en células de cáncer es una de las estrategias para el desarrollo de fármacos contra el cáncer (Hu y Kavanagh, 2003). Los resultados indicaron que la KM ejerció los mayores efectos tóxicos contra las células HeLa de cáncer cervicouterino ( $IC_{50}$ = 45  $\mu$ M y 39% de apoptosis). Aunque la KM ejerció menor potencia citotóxica en las células HeLa en comparación con el cisplatino (CDDP) o el paclitaxel (PCX), la KM no ejerció efectos tóxicos en células no tumorales (HaCaT;  $IC_{50}$ = 177  $\mu$ M y 11% de apoptosis). Por el contrario, el PCX presentó altos efectos tóxicos sobre las células no tumorales ( $IC_{50}$  = 0.5  $\mu$ M y 45% de apoptosis). Los resultados sugieren que la kaempferitrina ejerce efectos citotóxicos y apoptóticos principalmente contra las células cancerosas HeLa con bajos efectos tóxicos en células humanas no tumorigénicas. Los compuestos naturales tales como wogonina y crisina también han mostrado efectos citotóxicos ( $IC_{50}$  entre 12.4 y 300  $\mu$ M) y apoptóticos contra las células cancerosas (Zhao et al., 2010; Zhao et al., 2012).

Posteriormente, se evaluó si la KM induce la apoptosis en células HeLa por la inducción de ERO. Se sabe que las ERO, incluyendo el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, participan en la muerte inducida por algunos agentes quimiopreventivos del cáncer y terapéuticos (Davis et al., 2001). Se ha sugerido que las ERO pueden interactuar con los lípidos de membrana celulares, proteínas y ADN, causando la pérdida de la integridad de la membrana en las células cancerosas (Tang et al., 2005). Los resultados indicaron que la KM induce la generación de ERO en células HeLa. Para confirmar la generación de ERO inducida por la KM, las células HeLa fueron co-incubadas con catalasa, una enzima que protege las células de estrés oxidativo al degradar el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua y oxígeno. Los resultados indicaron que, en presencia de catalasa, la inducción de ERO por la KM fue suprimido. Además,



la muerte inducida por la KM se suprimió también en presencia de catalasa. Esto indica que la inducción de ERO es uno de los mecanismos de muerte por el cual la KM ejerce sus efectos citotóxicos en células HeLa. Previamente se encontraron resultados similares en células cancerosas con trans-3-phenylpropenal, el compuesto clave en el sabor del aceite esencial extraído de la corteza de la canela *Cinnamomum zeylanicum* y *Cinnamomum cassia* (Cabello et al., 2009).

En los últimos años, se ha demostrado una asociación entre la regulación del ciclo celular y el cáncer. Por lo cual, la inhibición del ciclo celular se ha convertido en un procedimiento importante para el tratamiento del cáncer (Schwartz y Shah, 2005). Para explorar el mecanismo por el cual la KM ejerce sus efectos citotóxicos, se realizó un análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo en células tratadas con la KM. Los resultados demuestran que la KM indujo efectos inhibitorios en el crecimiento de las células HeLa por la perturbación en la fase G1 del ciclo celular. Para analizar más a fondo los acontecimientos moleculares por los cuales la kaempferitrina induce la detención fase G1 en células HeLa, se llevaron a cabo análisis de western blot para p16, p21 y ciclina D1. Los resultados indicaron que se incrementó los niveles de proteína de p16 y p21 en células HeLa por el tratamiento con la KM, en comparación con las células no tratadas, mientras que se disminuyó los niveles de ciclina D1. Las proteínas ciclina D1, p16 y p21 son reguladores del ciclo celular. La inducción de la detención del ciclo celular en la fase G0/G1 se debe principalmente a la inducción de las proteínas inhibidoras del ciclo celular p16, p21, p27 asociadas con disminución de expresión de ciclina A, ciclina D, CDK4 y CDK2, requerido para la transición de G1 a S (Opalka et al., 2002). Se ha descrito que una sobreexpresión de p16 y p21 inducida por agentes quimioterapéuticos se asocia con la detención en el crecimiento celular y la posterior inducción de apoptosis (Opalka et al., 2002). Otros compuestos naturales extraídos de plantas medicinales como el monoterpeno perílico alcohol, galato de epigalocatequina, cinamaldehído trans-3 y J-fenilpropenal kuguacin han provocado la detención en G1 en células cancerosas (Yuri et al., 2004; Thangapazham, 2007; Cabello et al., 2009; Pitchakarn et al., 2011).

Para analizar más a fondo los eventos moleculares asociados a la apoptosis inducida por la kaempferitrina, se realizaron análisis de western blot para pAkt, Akt, Bcl-2, Bad Puma, y p53. Los resultados indicaron que la KM incrementó los niveles de proteína de Puma, Bad y p53 en las células HeLa, en comparación con las células no tratadas. Asimismo, la KM disminuyó los

niveles de las proteínas anti-apoptóticas Bcl2 y pAkt. Además, la KM ocasiono un aumento en la vía de Bad e inhibición de la expresión de Akt fosforilada y Bcl-2. Akt juega un papel importante en la sobrevivencia, crecimiento y proliferación de las células. Por otra parte, miembros de la familia Bcl-2, tales como Bcl-2 y Bcl-XL están involucrados en el mantenimiento de la viabilidad celular (Lee et al., 2001). En las células cancerosas, la activación de pAkt conduce a la disminución en la expresión de proteínas pro-apoptóticas como Bax, Bad y Bim y el aumento en la expresión de las proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-XL (Nicholson y Anderson, 2002). La proteína p53 es el objetivo más frecuente de las alteraciones genéticas en los cánceres humanos, con casi el 50% de las mutaciones que ocurren en todos los tumores humanos (Cariello et al., 1994). Por otra parte, p53 regula la apoptosis a través de ambos mecanismos dependientes e independientes de la transcripción. A través de las vías dependientes de la transcripción, las funciones de p53 son como un transactivador de elementos río debajo de proteínas pro-apoptóticas (por ejemplo, Bax, Noxa y Puma) y funciona como un represor de proteínas anti-apoptóticas (por ejemplo, Bcl-2 (Kroemmer et al., 1997). A través de la vías independientes de transcripción, p53 tiene un papel apoptótico directo cuando se transloca a la mitocondria en respuesta a estrés celular, dando lugar a la apoptosis a través de la interacción con Bcl-2 y Bcl-XL, lo cual ocasiona una alteración en el potencial de membrana mitocondrial y se induce la liberación del citocromo c y Smac / DIABLO en el citosol, con la consiguiente activación de las caspasas (Kroemmer et al., 1997). Los resultados indican que la KM induce la transcripción independiente y dependiente de las vías de p53, ya que regula las proteínas pro-apoptóticas y regula las proteínas anti-apoptóticas.

La activación de las caspasas es un punto crucial cuando las células se comprometen a la apoptosis. Para saber si la KM activa la cascada de caspasas, se investigó el efecto de la KM en la apoptosis de las células HeLa en presencia del inhibidor de caspasas z-VAD FMK. Los resultados indican que la apoptosis inducida por la KM en células HeLa fue abolida en la presencia de z-VAD FMK. Por lo tanto, la KM induce la apoptosis en células HeLa en una manera dependiente de caspasas. Asimismo, observamos una activación de la caspasa 3, por el ensayo de inmunofluorescencia, el cual ocurrió a las 24 y 48 h de tratamiento.

Por otro lado, las dosis de KM utilizadas para evaluar los efectos quimiopreventivos y antitumoral se seleccionaron en base a estudios preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio. Los resultados indicaron que la kaempferitrina es un buen agente quimioprotector.

Por lo tanto, los extractos de plantas como *Cinnamomum osmophloeum*, *Hedyotis verticillata*, *Sedum dendroideum*, *Bauhinia forficata*, *Lotus corniculatus* y *Justicia spicigera* (Fang et al., 2005; Hamzah et al., 1994; Pinheiro et al., 2006; De Melo et al., 2009; Pereira et al., 2011; Alonso de Castro et al., 2012) que contienen kaempferitrina y se preparan en forma de té, podrían ser buenas opciones para la prevención del cáncer.

Es altamente deseable encontrar nuevos agentes antitumorales con mayor o similar potencia que los fármacos actualmente utilizados en la quimioterapia, pero con menores efectos tóxicos. Además, es necesario realizar estudios toxicológicos con compuestos aislados de plantas medicinales para corroborar su seguridad y su uso para el cuidado de la salud primaria. La capacidad de la KM 25 mg/kg para disminuir el peso del tumor fue similar en comparación con el CDDP 1 mg / kg. Sin embargo, la KM no presentó ningún efecto sobre el peso relativo de órganos o del peso corporal en ratones. Por lo tanto, los resultados podrían sugerir que la KM no afecta el metabolismo en los ratones. Por el contrario, el CDDP disminuyó el peso relativo en el bazo, el hígado, el corazón y el riñón, y disminuyó el peso corporal en un 6%.

La esperanza de vida es un criterio para el establecimiento de la eficacia y la calidad de cualquier medicamento contra el cáncer (Oberling y Guerin, 1954). La administración de la KM a 25 mg/kg ocasionó un efecto antitumoral eficaz con 159% de aumento en esperanza de vida. El tratamiento de ratones portadores de tumor con KM 25 mg/kg se asoció con una reducción significativa en el volumen tumoral. Por lo cual, se examinó el efecto de la KM sobre el crecimiento del tumor mediante la medición de pAkt, ciclina D1 y PCNA, los marcadores de proliferación celular, en muestras de tumor. Los resultados *in vivo* indicaron que la KM disminuyó la expresión de pAkt, ciclina D1 y PCNA, analizados por análisis inmunohistoquímico, en muestras de tumor. Por lo tanto los resultados *in vivo* corroboran los resultados *in vitro*, lo cual indica que la KM induce efectos antiproliferativos en células HeLa *in vitro* e *in vivo*. Posiblemente la KM actúa como un agente potencial quimiopreventivo inhibiendo el crecimiento de células humanas de cáncer de cuello uterino a través de la inducción del arresto del ciclo celular en fase G1.

Finalmente, la angiogénesis, un proceso necesario para el crecimiento del tumor y la metástasis, es estimulada por los factores de crecimiento entre los que el VEGF juega un papel fundamental. En los cánceres humanos, las células producen una cantidad excesiva de VEGF, que se ha relacionado con un fenotipo más agresivo y metastásico (Carmeliet y Jain, 2000). Por lo tanto, la

inhibición de la producción de VEGF es un enfoque terapéutico prometedor para el cáncer. Los resultados indicaron que la KM indujo una reducción moderada en la producción de VEGF en el suero de ratones con tumor. Otros flavonoides tales como wogonina y crisina han ejercido efectos antitumorales y antiangiogénicos (Zhao et al., 2010;.. Zhao et al., 2012). Esto indica que los flavonoides podría ser una fuente prometedora de nuevos agentes antitumorales, debido a su baja toxicidad en células no tumorigénicas y su potencial citotóxico y antitumoral.

Anteriormente, hemos demostrado que *Justicia spicigera* ejerce efectos citotóxicos y antitumorales en células HeLa (Alonso-Castro et al., 2012). En este estudio, indicamos que la KM ejerce efectos citotóxicos y antitumorales en células HeLa. Esto podría sugerir que la kaempferitrina podría ser el componente activo de *Justicia spicigera*.

En resumen, este estudio demuestra, por primera vez, que la KM induce altos efectos tóxicos *in vitro* e *in vivo* contra las células HeLa. Además, la KM induce un arresto del ciclo celular en fase G1 y apoptosis a través de la vía intrínseca en células HeLa en una forma dependiente de caspasas. Además, la KM ejerce efectos quimiopreventivos y antitumorales, y actividades antiangiogénicas. Por lo tanto, la KM puede ser una buena opción para el tratamiento del cáncer debido a su baja toxicidad en células no tumorales y sus efectos antitumorales.

## CONCLUSIONES

- a) La kaempferitrina ejerce mayores efectos tóxicos sobre células HeLa, induce apoptosis por la producción de ROS y vía caspasa-dependiente mediante la vía mitocondrial asociado a p53
- b) La kaempferitrina induce el arresto de células HeLa en la fase G1 del ciclo celular
- c) La kaempferitrina presenta efectos quimiopreventivos y antitumorales en ratones atímicos portadores de tumor de células HeLa y carece de efectos tóxicos *in vivo*
- d) La kaempferitrina ejerce propiedades antiangiogénicas

## **PERSPECTIVAS**

- a) Evaluar la toxicidad aguda y crónica de la kaempferitrina en modelos animales.
- b) Estudiar el efecto citotóxico y antitumoral de la kaempferitrina en combinación con compuestos antitumorales, como por ejemplo el paclitaxel.
- c) Evaluar el efecto citotóxico y antitumoral de la kaempferitrina en modelos de células resistentes a fármacos antitumorales.
- d) Estudiar los mecanismos moleculares por los cuales la kaempferitrina ejerce sus efectos antiangiogénicos

## REFERENCIAS

- Alison, M.R., 2002. The cancer handbook. NPG. London pp 1271-1346.
- Alonso-Castro, A.J., Villarreal, M.L., Salazar-Olivo, L.A., Gómez-Sánchez, M., Domínguez, F., García-Carranca, A., 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology* 133, 945-972.
- Alonso-Castro, A.J., Ortiz-Sánchez, E., Domínguez, F., Arana-Argáez, V., Juárez-Vázquez MdC, Chávez, M., Carranza-Álvarez, C., Gaspar-Ramírez, O., Espinosa-Reyes, G., López-Toledo, G., Ortiz-Andrade, R., García-Carranca, A., 2012. Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 141, 888-894.
- Baquiran, D.C., Gallagher, J., 2001. Lippincott's cancer chemotherapy handbook. 2<sup>nd</sup> edition. Lippincott and Wilkins. Philadelphia, USA.
- Cabello, C.M., Bair, W.B. 3rd, Lamore, S.D., Ley, S., Bause, A.S., Azimian, S., Wondrak, G.T., 2009. The cinnamon-derived Michael acceptor cinnamic aldehyde impairs melanoma cell proliferation, invasiveness, and tumor growth. *Free Radical Biology and Medicine* 46, 220-31.
- Caceres-Cortes, J.R., Cantu-Garza, F.A., Mendoza-Mata, M.T., Chavez-Gonzalez, M.A., Ramos-Mandujano, G., Zambrano-Ramirez, I.R., 2001. Cytotoxic activity of *Justicia spicigera* is inhibited by bcl-2 proto-oncogene and induces apoptosis in cell cycle dependent fashion. *Phytotherapy Research* 15, 691-697.
- Carmeliet, P., Jain, R.K., 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.
- Cariello, N.F., Beroud, C., Soussi, T., 1994. Database and software for the analysis of mutations at the human p53 gene. *Nucleic Acids Research* 22, 3450-3459.
- Cassileth, B.R., Deng, G., 2004. Complementary and alternative therapies for cancer. *Oncologist* 9, 80-89.
- Cortinas, C. 1995. Cáncer: Herencia y Ambiente. La Ciencia desde México. Fondo de Cultura Económica. 96. México.
- Cragg, G.G., Boyd, M.R., Cardellina II, J.H., Newman, D.J., Snader, K.M., McCloud, T.G. 1994. Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US National Cancer Institute. In "Ethnobotany and the Search for New Drugs". *Ciba Foundation Symposium* 185. Chadwick, D.J. & Marsh, J. eds. Chichester, United Kingdom, Wiley & Sons. pp 178-196.

- Cragg, G.M., Newman, D.J., Snader, K.M., 1997. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products* 60, 52-60.
- Cheng, M.J., Wu, M.D., Hsieh, S.Y., Su, Y.S., Chen, I.S., Yuan G.F., 2011. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Annulohyphoxylon boveri* var. *microspora* BCRC 34012. *Chemistry of Natural Products* 47, 536-540.
- Dalmarco, J., Dalmarco, E., Koelzer, J., Pizzolatti, M., Fröde, T., 2010. Isolation and identification of bioactive compounds responsible for the anti-bacterial efficacy of *Lotus corniculatus* var. *So Gabriel*. *International Journal of Green Pharmacy* 4, 108-114.
- Davis, W. Jr, Ronai, Z., Tew, K.D., 2001. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 296, 1-6.
- De Melo, G.O., Malvar, D.do C., Vanderlinde, F.A., Rocha, F.F., Pires, P.A., Costa, E.A., de Matos, L.G., Kaiser, C.R., Costa, S.S., 2009. Antinociceptive and anti-inflammatory kaempferol glycosides from *Sedum dendroideum*. *Journal of Ethnopharmacology* 124, 228-232.
- de Sousa, E., Zanatta, L., Seifriz, I., Creczynski-Pasa, T.B., Pizzolatti, M.G., Szpoganicz, B., Silva, F.R., 2004. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(alpha)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. *Journal of Natural Products* 67, 829-832.
- Domínguez, X., Achenbach, H., González, C.C., Ferré-D'Amare, A.R., 1990. Estudio químico del muítle (*Justicia spicigera*). *Revista Latinoamericana de Química* 21, 142-143.
- Euler, K.L., Alam, M., 1982. Isolation of kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *Journal of Natural Products* 45, 220-221.
- Evan, G.I., Vousden, K.H., 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-348.
- Fang, S.H., Rao, Y.K., Tzeng, Y.M., 2005. Inhibitory effects of flavonol glycosides from *Cinnamomum osmophloeum* on inflammatory mediators in LPS/IFN-gamma activated murine macrophages. *Bioorganic Medicinal Chemistry* 13, 2381-2388.
- Gerson-Cwilich, R., Serrano-Olvera, A., Villalobos-Prieto, A., 2006. Complementary and alternative medicine (CAM) in Mexican patients with cancer. *Clinical and Translational Oncology* 8, 200-207.



- Gomez-Martinez, R., Tlacuilo-Parra, A., Garibaldi-Covarrubias, R., 2007. Use of complementary and alternative medicine in children with cancer in Occidental Mexico. *Pediatric Blood and Cancer* 49, 820–823.
- Gordaliza, M., 2007. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical Translational Oncology* 9, 767–776.
- Graham, J.G., Quinn, M.L., Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R., 2000. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 347–377.
- Gravieli, R.M.R., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A., 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology* 119, 493–501.
- Hamzah, A.S., Lajis, N.H., Sargent, M.V., 1994. Kaempferitrin from the leaves of *Hedyotis verticillata* and its biological activity. *Planta Medica* 60, 388–389.
- Hanahan, D., Weinberg, A. R., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Harper, J.V., Brooks, G., 2005. The mammalian cell cycle: An overview. In: Humphrey T, Brooks, G. (Editors). *Methods in Molecular biology*, volume 296. Cell cycle control. Mechanisms and protocols. Human Press. Totowa, New Jersey pp 120-160.
- Herrera-Arellano, A., Jaime-Delgado, M., Herrera-Alvarez, S., Oaxaca-Navarro, J., Salazar-Martinez, E., 2009. Uso de terapia alternativa/complementaria en pacientes seropositivos a VIH. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 47, 651–658.
- Hersch-Martinez, P., 1997. Medicinal plants and regional traders in Mexico: Physiographic differences and conservational challenge. *Economy Botany* 51, 107-120 The New York Botanical Garden, Bronx, NY 10458 U.S.A
- Hu, W., Kavanagh, J.J., 2003. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *Lancet Oncology* 4, 721–729.
- International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2008. Geneva: WHO, 2008  
Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/>
- Jacobo-Salcedo, M.d.R., Alonso-Castro, A.J., Salazar-Olivo, L.A., Carranza-Álvarez, C., Gonzalez-Espindola, L.A., Dominguez, F., Maciel-Torres, S.P., Garcia-Lujan, C., Gonzalez-Martinez M.d.R., Gomez-Sanchez, M., Estrada-Castillon, E., Zapata- Bustos, R., Medellin-Milan, P., Garcia-Carranca, A., 2011. Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican medicinal plants. *Natural Product Communications* 6, 1925–1928.

- Kroemer, G., Zamzami, N., Susin, S.A., 1997. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today* 18, 44-51.
- Kroemer, G, Reed, J.C., 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine* 6, 513-519.
- Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Glostein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., Piacentini, M., Nagata, S., Melino G., 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on cell death. *Cell Death Differentiation* 12, 1463-1467.
- Lee, Y.J., Chen, J.C., Amoscato, A.A., Bennouna, J., Spitz, D.R., Suntharalingam, M., Rhee, J.G., 2001. Protective role of Bcl2 in metabolic oxidative stress-induced cell death. *Journal of Cell Science* 114, 677-684.
- Lenaz, L., De Furia, M. D., 1993. Taxol®: a novel natural product with significant anticancer activity. *Fitoterapia* 64, 27-35.
- Looney, W.B., Mayo, A.A., Janners, M.Y., Mellon, J.G., Allen, P., Salak, D., Morris, H.P., 1971. Cell proliferation and tumor growth in hepatomas 3924A. *Cancer Research* 31, 821-825.
- Lozoya, X. 1984. Bibliografía básica sobre herbolaria medicinal en México. Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología. Pp 84.
- Mans, D.R.A., da Rocha, A.B., Schwartzmann, G., 2000. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: Targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *The Oncologist* 5, 185-198.
- Márquez, A., Lara-Ochoa, F., Esquivel-Rodriguez, B., Mata, R., 1999. Plantas Medicinales de México II Composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México, p. 178.
- McKoll, K., 2009. Billions of dollars needed to close global spending gap on cancer care. *British Medical Journal* 339, b3499.
- Molassiotis, A., Panteli, V., Patiraki, E., Ozden, G., Platin, N., Madsen, E., Browall, M., Fernandez-Ortega, P., Pud, D., Margulies, A., 2006. Complementary and alternative medicine use in lung cancer patients in eight European countries. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 12, 34-39.
- Moura, M.D., Silva, J. S., Oliveira, R. A. G., Diniz, M. F. F. M., Barbosa- Filho, J. M., 2002. Natural products reported as potential inhibitors of uterine cervical neoplasia. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 21, 67-74.

- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2003. Natural products as a source of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products* 66, 1022-1037.
- Nicholson, K.M., Anderson, N.G., 2002. The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy. *Cell Signaling* 14, 381-395.
- Oberling, C., Guerin, M., 1954. The role of viruses in the production of cancer. *Advances in Cancer Research* 2, 353-423.
- Opalka, B., Dickopp, A., Kirch, H.C., 2002. Apoptotic genes in cancer therapy. *Cell Tissues Organs* 172, 126-132.
- Organización Mundial de la Salud, 2009. Prevalence data of cancer worldwide. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>, Visitado el 29 de mayo de 2010.
- Pereira, D.A., Dalmarco, J.B., Wisniewski, A. Jr, Simionatto, E.L., Pizzolatti, M.G., Fröde, T.S., 2011. *Lotus corniculatus* regulates the inflammation induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 2291-2298.
- Pinheiro, T.S., Johansson, L.A., Pizzolatti, M.G., Biavatti, M.W., 2006. Comparative assessment of kaempferitrin from medicinal extracts of *Bauhinia forficata* Link. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 431-436.
- Pitchakarn, P., Suzuki, S., Ogawa, K., Pompimon, W., Takahashi, S., Asamoto, M., Limtrakul, P., Shirai, T., 2011. Induction of G1 arrest and apoptosis in androgen-dependent human prostate cancer by Kuguacin J, a triterpenoid from *Momordica charantia* leaf. *Cancer Letters* 306, 142-150.
- Pommier, Y.G., Goldwasser, F., Strumberg, D., 1996. Topoisomerase II inhibitors: epipodophyllotoxins, acridines, ellipticines and bisdioxopiperazines. In: Chabner BA, Longo DL (editors). *Cancer chemotherapy and biotherapy*
- Rates, S.M., 2001. Plants source of drugs. *Toxicon* 39, 603-613.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L., 2003. Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medical Research Reviews* 23, 519-534.
- Robles-Zepeda, R.E., Valenzuela-Antelo, O., Garibay-Escobar, A., Velázquez-Contreras, C., Navarro-Navarro, M., Contreras, L.R., Corral, O.L., Lozano-Taylor, J., 2011. Use of complementary and alternative medicine in a region of northwest Mexico. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 17, 787-788.

- Rzedowski, J., 1998. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. En: Ramamoorthy TP, Byer R, Lot A. Diversidad biológica de México: orígenes y distribución. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF pp 129-145.
- Sarukhán, J., 1995. Diversidad biológica. Revista de la Universidad Nacional Autónoma de México 536-537.
- Schwartz, G.K., Shah, M.A., 2005. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology* 23, 9408–9421.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H., Rocha-Sosa, M., 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de la planta. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21, 355-363.
- Schultes, R., 1981. El legado de la medicina popular Blume editorial. Madrid 249 p
- Silva, J.S., Moura, M.D., Oliveira, R.A.G., Diniz, M.F.F., Barbosa-Filho, J. M. 2003. Natural product inhibitors of ovarian neoplasia. *Phytomedicine* 10, 221-232.
- Skeel, R.T., 2007. Handbook of cancer chemotherapy. 7<sup>th</sup> edition. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA.
- Tang, X.Q., Feng, J.Q., Chen, J., Chen, P.X., Zhi, J.L., Cui, Y., Guo, R.X., Yu, H.M., 2005. Protection of oxidative preconditioning against apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PC12 cells: Mechanisms via MMP, ROS, and Bcl-2. *Brain Research* 1057, 57–64.
- Tannock, I. F., Hill, R. P., 1998. The Basic Science of Oncology. 3rd edition. McGraw-Hill. USA.
- Tascilar, M., De Jong, F.A., Verweij, J., Mathijssen, R.H., 2006. Complementary and alternative medicine during cancer treatment: beyond innocence. *Oncologist* 11, 732–741.
- Thangapazham, R.L., Passi, N., Maheshwari, R.K., 2007. Green tea polyphenol and epigallocatechin gallate induce apoptosis and inhibit invasion in human breast cancer cells. *Cancer Biology Therapy* 6, 1938-1943.
- Thorburn, A., 2004. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signaling* 16, 139-144
- Toledo, V.M., 1997. New paradigms for new ethnobotany: reflections on the case of Mexico. In: Schultes RE, Von Reis S (Eds). *Ethnobotany. Evolution of a discipline*. Dioscorides Press. Portland pp 75-88.

- UICN- OMS -WWF. 1993. Directrices sobre conservación de plantas medicinales. Organización Mundial de la Salud (OMS). Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) and World Wildlife Fund (WWF), Gland. 55 p.
- Vega-Avila, E., Espejo-Serna, A., Alarcon-Aguilar, F., Velazco-Lesama, R., 2009. Cyto-toxic activity of four Mexican medicinal plants. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 52, 78–82.
- Warber, S. 1999. Models of action at target sites. In "Natural Products from Plants". Kaufman, P., Cseke, L.J., Warber, S., Duke, J.A. & Brielmann, H.L. eds. CRC Press. pp 158-181.
- Yuri, T., Danbara, N., Tsujita-Kyutoku, M., Kiyozuka, Y., Senzaki, H., Shikata, N., Kanzaki, H., Tsubura, A., 2004. Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Research Treatment* 84, 251-60.
- Zambrana, M., Zurita, B., Ramírez, T.de J., Coria, I., 2008. Hospital expenditures for five diseases of high economic impact. *Revista Medica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 46, 43-50.
- Zhao, Q., Wang, J., Zou, M.J., Hu, R., Zhao, L., Qiang, L., Rong, J.J., You, Q.D., Guo, Q.L., 2010. Wogonin potentiates the antitumor effects of low dose 5-fluorouracil against gastric cancer through induction of apoptosis by down-regulation of NF-kappa B and regulation of its metabolism. *Toxicology Letters* 197, 201-210
- Zhao, X., Shu, G., Chen, L., Mi, X., Mei, Z., Deng, X., 2012 A flavonoid component from *Docynia delavayi* (Franch.) Schneid represses transplanted H22 hepatoma growth and exhibits low toxic effect on tumor-bearing mice. *Food Chemistry and Toxicology* 50, 3166-3173.

## ANEXOS

Mi trabajo doctoral y esta tesis dieron origen a las siguientes publicaciones:

1. Jacobo-Salcedo, M.R., **Alonso-Castro, A.J.**, Zarate-Martinez, A., 2011. Folk medicinal use of fauna in Mapimi, Durango, México. *Journal of Ethnopharmacology* 133, 902-906
2. **Alonso-Castro, A.J.**, Villarreal, M.L., Salazar-Olivo, L.A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., Garcia-Carranca, A., 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology* 133, 945-972.
3. **Alonso-Castro, A.J.**, Zapata-Bustos, R., Dominguez, F., Garcia-Carranca, A., Salazar-Olivo, L.A., 2011. *Magnolia dealbata* Zucc and its active principles honokiol and magnolol stimulate glucose uptake in murine and human adipocytes using the insulin-signaling pathway. *Phytomedicine* 18, 926-933.
4. Jacobo-Salcedo, M.R., Gonzalez-Espindola, L.A., **Alonso-Castro, A.J.**, Gonzalez-Martinez, M.R., Dominguez, F., Garcia-Carranca, A., 2011. Antimicrobial activity and cytotoxic effects of *Magnolia dealbata* Zucc and its active compounds. *Natural Product Communications* 6, 1121-1124.
5. **Alonso-Castro, A.J.**, Carranza-Álvarez, C., Maldonado-Miranda, J.J., Jacobo-Salcedo, M.R., Quezada-Rivera, D.A., Lorenzo-Marquez, H., Figueroa-Zuñiga, L.A., Fernandez-Galicia, C., Rios-Reyes, N.A., de León-Rubio, M.A., Rodríguez-Gallegos, V., Medellín-Milán, P., 2011. Zootherapeutic practices in Aquismón, San Luis Potosí, México. *Journal of Ethnopharmacology* 138, 233-237.
6. Jacobo-Salcedo, M.d.R., **Alonso-Castro, A.J.**, Salazar-Olivo, L.A., Carranza-Álvarez, C., Gonzalez-Espindola, L.A., Dominguez, F., Maciel-Torres, S.P., Garcia-Lujan, C., Gonzalez-Martinez, M.d.R., Gomez-Sanchez, M., Estrada-Castillon, E., Zapata-Bustos, R., Medellin-Milan, P., Garcia-Carranca A., 2011. Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican medicinal plants. *Natural Product Communications* 6, 1925-1928.
7. **Alonso-Castro, A.J.**, Ortiz-Sanchez, E., Dominguez, F., López-Toledo, G., Chavez M, Ortiz-Tello, A.d.J., Garcia-Carranca, A., 2012. Antitumor effect of *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 140, 438-442.

8. **Alonso-Castro, A.J.**, Ortiz-Sanchez, E., Dominguez, F., Arana-Argáez, V., Juárez-Vázquez M.dC., Chávez, M., Carranza-Álvarez, C., Gaspar-Ramírez, O., Espinosa-Reyes, G., López-Toledo, G., Ortiz-Andrade, R., García-Carrancá, A., 2012. Antitumor and immunomodulatory effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 141, 888-894.
9. **Alonso-Castro, A.J.**, Juárez-Vázquez, M.dC., González-Sánchez, I., Dominguez, F., Estrada-Castillón, E., López-Toledo, G., Chávez, M., Cerbón, M.A., García-Carrancá, A., 2012. The antitumoral effect of the American mistletoe *Phoradendron serotinum* (Raf.) M. C. Johnst. (Viscaceae) is associated with the release of immunity-related cytokines. *Journal of Ethnopharmacology* 142: 857-864.
10. **Alonso-Castro, A.J.**, Maldonado-Miranda, J.J., Zarate-Martínez, A., Jacobo-Salcedo, M.dR., Fernandez-Galicia, C., Figueroa-Zuñiga, L.A, Rios-Reyes, N.A., de León-Rubio, M.A., Medellín-Castillo, N.A., Reyes-Munguia, A., Mendez-Martinez, R., Carranza-Álvarez, C., 2012. Medicinal plants used in the Huasteca Potosina. *Journal of Ethnopharmacology* 143, 292-298.
11. Ortiz-Andrade, R., Cabañas-Wuan, A., Arana-Argáez, V.F., **Alonso-Castro, A.J.**, Zapata-Bustos, R., Salazar-Olivo, L.A., Domínguez, F., Chávez, M., Carranza-Álvarez, C., García-Carrancá, A., 2012. Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 143, 455-462.