



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DEL FLAVONOIDE NOBILETINA EN LA VÍA DE
SEÑALIZACIÓN AKT/PI3K Y LA EXPRESIÓN DE VEGF
EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE FARINGE
*FADU.***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ALEJANDRA RUÍZ ROMERO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.

2017.



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Rosario Adelaida Muñoz Clares.
VOCAL: Gloria Gutiérrez Venegas.
SECRETARIO: Martha Patricia Coello Coutiño.
1er. SUPLENTE: Berenice Ovalle Magallanes.
2° SUPLENTE: Gerardo David Anaya Eugenio.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio de Bioquímica, División de estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

ASESOR DEL TEMA:

DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS

SUSTENTANTE :

ALEJANDRA RUÍZ ROMERO

ÍNDICE.

ABREVIATURAS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1 Cáncer.....	2
2.1.1 Carcinoma escamoso de cabeza y cuello.....	7
2.2 Vías de señalización	8
2.2.1 Vía de señalización Akt/PI3K.....	9
2.2.1.1 Akt en cáncer.....	13
2.2.1.2 PTEN.....	16
2.2.1.2.1 Regulación de PTEN.....	18
2.2.1.2.2 PTEN y cáncer.....	20
2.2.2 Glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3).....	20
2.2.2.1 Funciones bioquímicas/ procesos regulados por GSK3.....	22
2.2.2.2 Regulación de GSK3.....	24
2.2.2.3 GSK3 y el cáncer.....	24
2.3 Factores de crecimiento en carcinogénesis.....	28
2.3.1 Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).....	30
2.3.1.1 Receptores de VEGF y su internalización.....	31
2.3.1.2 VEGF y señalización autocrina.....	34
2.3.1.3 VEGF en angiogénesis.....	35
2.4 Vía de señalización PI3K/Akt, VEGF y angiogénesis.....	36
2.5 Terapias de uso clínico dirigidas a la vía de señalización PI3K/Akt.....	38
2.5.1 Inhibidores río arriba de PI3K/Akt.....	40
2.5.1.1 Inhibidores de PDK1.....	40
2.5.1.2 Inhibidores de PI3K.....	40
2.5.1.3 Inhibidores de receptores tirosina cinasa (RTK's).....	41
2.5.2 Inhibidores de Akt.....	42
2.5.3 Inhibidores análogos a fosfatidilinositol (PI).....	42
2.5.4 Inhibidores dirigidos contra moléculas río abajo de Akt.....	43
2.6 Flavonoides.....	43
2.6.1 Origen de los flavonoides.....	43
2.6.2 Química de los Flavonoides: estructura y clasificación.....	44
2.6.3 Síntesis.....	45
2.6.4 Metabolismo y absorción.....	45
2.6.5 Nobiletina.....	47
3. Antecedentes.....	48

3.1 Nobiletina y cáncer.....	48
4. Justificación.....	49
5. Objetivos.....	50
6. Hipótesis.....	51
7. Materiales y métodos.....	51
7.1. Reactivos y equipo.....	51
7.2 Programas empleados.....	51
7.3 Metodología.....	51
7.3.1 Cultivo celular.....	51
7.3.2 Ensayo de viabilidad celular (MTT).....	52
7.3.3 Tratamiento celular.....	52
7.3.4 Ensayo de <i>Western Blot</i>	53
7.3.5 Ensayo de migración celular.....	55
7.3.6 Ensayo de extracción de mRNA.....	55
7.3.7 Reacción en cadena de la polimerasa- transcripción reversa RT-PCR.....	56
7.3.8 Ensayo de ELISA para evaluar VEGF.....	56
7.4 Análisis Estadístico.....	57
8. Resultados.....	57
8.1 Efecto del flavonoide Nobiletina sobre la viabilidad celular de la línea FaDu.....	57
8.2 Efecto del flavonoide Nobiletina sobre la fosforilación de la cinasa Akt.....	58
8.3 Efecto del flavonoide Nobiletina sobre la fosforilación de la proteína GSK3- β	59
8.4 Efecto del flavonoide Nobiletina sobre la fosforilación de la proteína PI3K.....	60
8.5 Efecto del flavonoide Nobiletina sobre la migración de la línea celular FaDu.....	61
8.6 Efecto del flavonoide Nobiletina sobre la expresión del Factor decrecimiento endotelial vascular (VEGF).....	63
8.7 Efecto del suero fetal bovino (DMEM 2%) y del flavonoide nobiletina en la expresión de VEGF y su relación con la vía de señalización Akt/PI3K.....	64
9. Discusión.....	66
10. Conclusiones.....	70
11. Referencias bibliográficas.....	70

ABREVIATURAS.

AGC	Protein cinasa A/ protein cinasa G/ protein cinasa C
AKT/PKB	Proteín cinasa B
ALS	Esclerosis amiotrófica lateral
AP1	Proteína activadora 1
Bcl-2	B-Cell CLL/Lymphoma 2; proteína anti-apoptótica
ECD	Dominio extracelular
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal
EGR1	Proteína de crecimiento temprano
eIF4E	Eukaryotic initiation factor 4E
eNOS	Sintasa de óxido nítrico epitelial
ERBB2	Receptor tirosin cinasa 2 Erb-B2
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FAK	Cinasa focal de la adherencia
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
Flt-1	Receptor VEGFR-1
FOXO	Forkhead Box Class O.
GS	glucógeno sintasa
GSK3	Glucógeno sintasa cinasa 3
HIF- α	Factor inducible por hipoxia subunidad alfa
HNSCC	Carcinoma escamoso de cabeza y cuello.
IFN- β	Interferón β
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-1Ra	Receptor antagonista de IL 1
IL-8	Interleucina 8

KDR	Receptor VEGRF-2
KI	Inserto cinasa
MMAC1/TEP1	Mutated in Multiple Advanced Cancers
MMPs	Matriz metaloproteinasas
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NF- κ B	Factor Nuclear kB.
NO	Óxido nítrico
NRPs	Neutrofilinas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDK1	Cinasa phosphoinositide- dependent kinase-1.
PDK1	Phosphoinositide- dependent kinase-1
PGF	Factor de crecimiento de placenta
PH	Dominio homólogo a la pleckstrina
PI	Fosfatidilinositol
PI3Ks	Phosphoinositide 3-kinases.
PIA's	Análogos a fosfatidilinositol éter lipídicos
PIP2	Fosfatidilinositol 3,4-bifosfato.
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato.
PKB	Proteína cinasa B
PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RTKs	Receptores de citocina e integrinas.
Shb	SH2 Domain Containing Adaptor Protein B
SNAI1	factor de transcripción SNAIL
SNC	Sistema nervioso central
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TM	Dominio hidrofóbico membranal

TNF	Factor de necrosis tumoral
TNF	Factor de crecimiento tumoral
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VPH	Virus del papiloma humano.
XIAP	Inhibidor de proteínas ligado al cromosoma X

ÍNDICE DE FIGURAS.

1. Estructura de algunos agentes carcinógenos químicos.....	6
2. Mecanismo general de las vías de transducción de señales.....	9
3. Estructura de los dominios de las distintas isoformas de Akt/PKB, así como de la variante (<i>producto de splicing alternativo</i>),PKB γ 1.....	11
4. Mecanismo de activación de la vía de señalización Akt/PKB.....	13
5. La red PTEN/ PI3K y la patología del cáncer.....	17
6. Representación de GSK-3 β y las proteínas que provocan su inhibición....	23
7. La activación de GSK3 β induce una respuesta inflamatoria	28
8. VEGF, ligandos y receptores.....	32
9. Células que secretan VEGF y su función en tumores.....	34
10. Supervivencia celular y apoptosis mediadas por VEGF.....	37
11. <i>Vía de señalización</i> PI3K/AKT/mTOR en angiogénesis.....	38
12. Activación del eje PI3K-Akt en células endoteliales.....	38
13. Inhibidores terapéuticos dirigidos contra Akt así como reguladores río arriba y abajo de la vía de señalización	39
14. Estructura química base de un flavonoide.....	44
15. Estructura química de los grupos de flavonoides.....	45
16. Estructura química de un glicósido y una aglicona.....	46
17. Estructura química del flavonoide nobiletina.....	47
18. Efecto del flavonoide Nobiletina sobre la viabilidad de las células <i>FaDU</i> ...58	
19. Efecto de la Nobiletina en la fosforilación de la proteína cinasa (Akt)	59

20. Efecto del flavonoide Nobiletina sobre la fosforilación de la proteína río arriba de la vía de señalización de Akt, PI3K en la línea celular <i>FaDu</i>	60
21. Efecto del flavonoide nobiletina sobre la activación de la cinasa GSK3- β en la línea celular <i>FaDu</i>	61
22. Efecto del flavonoide Nobiletina en la migración de las células <i>FaDu</i>	62
23. Expresión del factor de crecimiento endotelial (VEGF) de la línea celular <i>FaDu</i> ante la exposición del flavonoide nobiletina.....	64
24. Expresión del factor de crecimiento VEGF de las células <i>FaDu</i> con medio DMEM 2% y con el flavonoide nobiletina	65

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Sustratos de PKB/Akt y los procesos celulares regulados por esta cinasa.	14
Tabla 2. Factores de crecimiento, receptores, funciones generales y ocurrencia en tumores. Tabla adaptada de <i>Halper J. Vet Pathol. 2010</i>	29

1. Resumen.

El cáncer escamoso de cabeza y cuello es el sexto cáncer más común a nivel mundial representando el 3% de todos los tipos de cáncer. El carcinoma escamoso se origina en múltiples sitios anatómicos en la región de la cabeza y cuello; los factores de riesgo incluyen exposición al tabaco, dependencia al alcohol, así como la infección con virus oncogénicos. En México, los carcinomas escamosos del tracto aerodigestivo superior representan el 12% del total de las neoplasias malignas en cabeza y cuello. Aún con los avances en el tratamiento, el índice de supervivencia sigue manteniéndose estático. Componentes de alimentos presentes en la dieta tienen un papel fundamental en la prevención y en el desarrollo de varias enfermedades incluido el cáncer. Dentro de estos compuestos están incluidos los flavonoides, polifenoles naturales producidos como metabolitos secundarios. A nivel celular y molecular tienen la capacidad de interactuar con receptores, enzimas y cinasas, lo cual contribuye a su actividad anti carcinogénica, anti proliferativa y quimiopreventiva. Nobiletina es una flavona polimetoxilada abundante en la cáscara de frutas cítricas; exhibe actividad antiinflamatoria, antitumoral, anti-metástica, anti-angiogénica, anti proliferativa y neuroprotectora. Muchas de estas actividades son mediadas por vías de señalización como Akt/PI3K, la cual es un participante central en la transducción de señales activadas en respuesta a factores de crecimiento contribuyendo a una gran diversidad de funciones celulares como el metabolismo de nutrientes, regulación transcripcional, crecimiento y supervivencia celular. La señalización aberrante de Akt contribuye a la malignidad del cáncer, por si sola o en cooperación con otras alteraciones genéticas. La migración celular es un proceso fundamental que controla la morfogénesis; su desregulación es la causa de muchas enfermedades, incluido el cáncer y es un proceso que requiere de la activación de vías de señalización. En el presente trabajo evaluamos el efecto del flavonoide nobiletina en la viabilidad celular, migración, y expresión de algunos componentes de la vía de señalización Akt/PI3K en la línea celular de cáncer de faringe *FaDu*. En conclusión, encontramos que este flavonoide presenta tanto un efecto citotóxico como inhibitorio en la migración de estas células a tiempos cortos, por medio de la regulación de las proteínas Akt, PI3K, y GSK3- β y no mediante la regulación de la expresión de VEGF lo que lo posiciona como un candidato para posteriores estudios en su uso terapéutico.

2. Introducción.

2.1 Cáncer.

En un estado fisiológico normal, las células se dividen y diferencian con la finalidad de repoblar órganos y tejidos; sin embargo, debe existir un control en la multiplicidad celular, el cual se logra mediante una red de mecanismos moleculares, los cuales incluyen proliferación celular por un lado, y muerte celular programada (apoptosis) por el otro. No obstante, existen factores que alteran este balance [1]; el cáncer es una enfermedad que involucra cambios dinámicos en el genoma; estos cambios genéticos confieren ciertas ventajas en el crecimiento celular, las cuales llevan a la conversión progresiva de células normales en células cancerígenas [2]. Estas células poseen modificaciones a nivel genético (mutaciones) que tienen dos funciones básicas; una es incrementar la actividad de las proteínas para las cuales codifican los oncogenes y la otra, inactivar la función de los genes supresores de tumores [1].

Las células que tienen la capacidad de dividirse y reabastecerse son denominadas células madre; estas células se dividen aproximadamente 10^{12} veces diariamente. Sin embargo, en una condición física normal, la multiplicidad celular es controlada por una compleja red de mecanismos moleculares que controlan la proliferación celular por un lado y la muerte celular programada por el otro [3].

Cualquier factor que altere el balance de la división y muerte celular tiene la capacidad de alterar el número total de células de un órgano o tejido si es que no funciona de manera adecuada. Después de muchas generaciones celulares, un aumento en la multiplicidad celular se detecta clínicamente como *neoplasia*, que significa nuevo crecimiento. Los genes son los encargados de alterar el índice de división y muerte de células individuales y son los implicados en el proceso de generación de cáncer [3]. Las mutaciones al azar en los genes encargados de controlar la proliferación o la apoptosis son los responsables de esta patología [4].

La gran mayoría de mutaciones que dan origen al cáncer no son heredadas, sino que surgen de manera espontánea y son la consecuencia de daño químico al DNA, lo cual resulta en una alteración de la función de genes cruciales en esta patología.

Las mutaciones más comunes son las puntuales (las cuales provocan la sustitución de aminoácidos); de cambio del marco de lectura y mutaciones en el codón de paro (estas dos últimas truncan la proteína). También puede suscitarse la inestabilidad cromosomal (lo que resulta en la sobreexpresión, amplificación o la expresión inadecuada de un gen en específico) y la pérdida de un gen o la fusión del mismo con otro (resultado del rompimiento cromosomal o rearreglo) lo que da como consecuencia una proteína con función alterada. Además las modificaciones epigenéticas al DNA, dentro de las cuales la más común es la metilación de citosina en las islas CpG, tienen como consecuencia el silenciamiento del gen involucrado [3,4].

Lo más importante de todo esto, es el hecho de que las células cancerígenas seleccionan aquellas mutaciones que aumentan la actividad de oncogenes y mutaciones que inactivan la función de genes supresores de tumores [3,4].

La principal anormalidad que da como lugar el cáncer, es la generación y acumulación de mutaciones que da lugar a la proliferación desregulada de células cancerígenas de forma continua [3]. Una célula cancerígena es aquella que funciona de manera no adecuada, en otras palabras, son células que ya no responden de forma correcta a las señales celulares que controlan el comportamiento celular normal, incluyendo el control del crecimiento celular y muerte; estas células se originan dentro de tejidos, y crecen y se dividen de manera descontrolada ya que se vuelven resistentes a los controles que mantienen un tejido en estado normal, invadiendo de esta manera otros órganos así como tejidos y esparciéndose a todo el cuerpo eventualmente. La pérdida de control en el crecimiento celular que presenta este tipo de células es el resultado de anormalidades acumuladas presentes en muchos sistemas regulatorios y se refleja en muchos aspectos del comportamiento celular que distinguen a las células cancerígenas de las células normales. Los progenitores de las células cancerígenas son menos independientes de la señalización dada por otras células; también, las células cancerígenas son capaces de evadir la muerte celular programada. En las etapas finales del cáncer, las células cancerígenas son capaces de atravesar y romper el tejido normal y hacer metástasis (esparcirse) a nuevos sitios del cuerpo [1,3].

Existen más de 100 tipos de cáncer debido a que es el resultado de la proliferación anormal de cualquiera de los distintos tipos celulares en el cuerpo; estos varían en su comportamiento así como en la respuesta al tratamiento. La cuestión más importante en la patología del cáncer es el distinguir entre un tumor benigno y uno maligno [3].

El proceso de tumorigénesis está conformado por muchos pasos y estos reflejan alteraciones de tipo genético que conducen a la transformación progresiva de células normales a células altamente malignas [1]. Los cambios genéticos consecutivos (cada uno confiriendo uno u otro tipo de ventaja en el crecimiento celular) da como consecuencia el cambio progresivo de célula normal a célula cancerígena [1]. Un tumor es cualquier proliferación anormal de células, el cual como se mencionó anteriormente, puede ser benigno o maligno. Un tumor benigno es aquel que se mantiene contenido o confinado en el sitio inicial de origen, sin invadir el tejido normal circundante y sin esparcirse a sitios distantes del cuerpo, como una verruga común y corriente. Un tumor maligno es aquel el cual es capaz tanto de invadir el tejido sano de alrededor, así como de expandirse en todo el cuerpo por medio de la circulación o del sistema linfático (metástasis) [3]. La metástasis significa *nuevo lugar*, y es una de las etapas terminales del cáncer. Aquí las células colonizan un nuevo sitio en el cuerpo, donde se dividen y da inicio la formación de tumores secundarios. Es importante recalcar que no todos los cánceres tienen la capacidad de hacer metástasis; esto es porque las células deben tener la habilidad de penetrar o atravesar las barreras normales y de esta manera pueden tanto entrar como salir de la sangre y sistema linfático [4]. Los tumores malignos son los que se denominan tumores cancerígenos, y lo que los hace tan peligrosos es precisamente su habilidad para invadir y generar metástasis. Aun cuando los tumores benignos pueden ser removidos fácilmente (por medio de cirugía), el esparcimiento de tumores malignos a sitios distantes hace que sean resistentes a tratamiento localizado [3].

Las células cancerígenas invasivas secretan proteasas que les permiten degradar la matriz extracelular en la barrera que separa a los diferentes tejidos. Estas moléculas (proteasas) también le confieren a las células cancerígenas la capacidad de formar

caminos o canales dentro de los tejidos, permitiendo que tengan acceso a nuevos territorios [4].

Los tumores malignos y benignos se clasifican de acuerdo al tipo de células del cual fueron originados en tres grupos principales: carcinomas, leucemias o linfomas y sarcomas. Los carcinomas abarcan los cánceres en células epiteliales y representan aproximadamente el 90% de los cánceres en seres humanos; las leucemias y linfomas con un porcentaje del 8% de los cánceres, se originan en las células que dan origen a la sangre y células del sistema inmunológico, respectivamente; los sarcomas son tumores sólidos originados en tejidos conectivos, como el músculo, cartílago, hueso y tejido fibroso. Cabe mencionar que los sarcomas son raros en los seres humanos. Los cánceres están clasificados de acuerdo al tejido de origen y el tipo de células involucradas [3].

A principios del año 2000 se reportó que existen 6 eventos cruciales presentes en las células cancerígenas los cuales son capacidades y características complementarias que permiten el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica: la autosuficiencia respecto a señales de crecimiento, insensibilidad de señales inhibitorias de crecimiento, evasión de muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, y por último invasión de tejidos y metástasis; estos son eventos en común presentes en casi todos (si no es que todos) los tumores cancerígenos [2]. Sin embargo, en el 2011 se reportaron 2 nuevas características de células cancerígenas: la reprogramación de la energía metabólica y la evasión de la destrucción mediada por el sistema inmune [5].

Las sustancias que generan cáncer son denominadas carcinógenos; debido a que esta patología es un proceso muy complejo que involucra muchos pasos, existen muchos factores los cuales generan cáncer y no se puede hablar de una sola causa [3]. Debido a que el DNA también está sujeto a daños provenientes de agentes exógenos (físicos y químicos) estos son agrupados como carcinógenos ambientales [1].

Existen agentes que actúan dañando el DNA e induciendo mutaciones. Estos dos carcinógenos son denominados *agentes de iniciación*, ya que como se mencionó anteriormente, la inducción de mutaciones en los genes clave es el evento inicial que da lugar al desarrollo del cáncer. Algunos de estos agentes de iniciación son la radiación ultravioleta (la causa principal de cáncer de piel) y químicos presentes en el tabaco (benzo(a)pireno, dimetilnitrosamina, compuestos derivados del níquel, entre otros). Fumar es la causa del 80-90% de cáncer de pulmón y también está involucrado en cánceres de la cavidad oral: laringe, esófago, faringe, entre otros. También está la aflatoxina, presente en maíz o cacahuates (carcinógeno de hígado), dimetilnitrosamina, por mencionar algunos [3]. Los agentes quimioterapéuticos también han sido reportados como causantes del cáncer, como agentes alquilantes (ciclofosfamida), o antibióticos como la doxorubicina [1]. En la Figura 1 se muestran algunos agentes químicos carcinógenos.

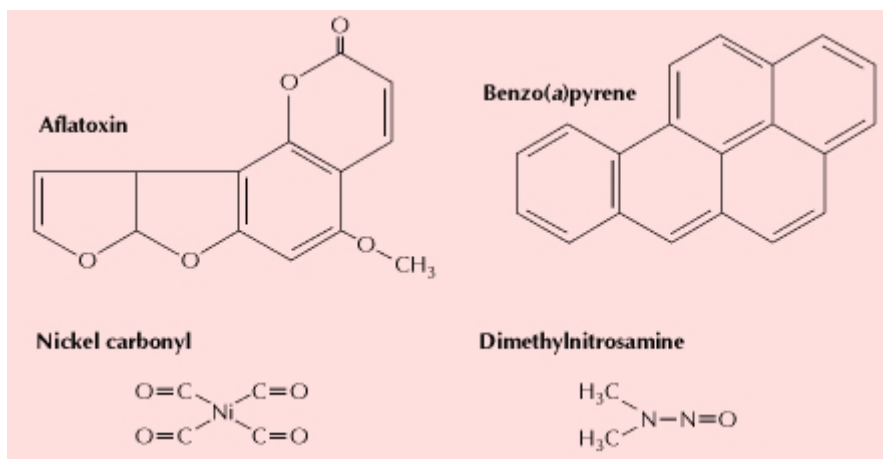


Figura 1. Estructura de algunos agentes carcinógenos químicos.

Imagen adaptada de Geoffrey M Cooper, The Cell: A molecular approach, Boston University.

La angiogénesis es el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos el cual es un proceso de suma importancia en la patogénesis de enfermedades malignas, inflamatorias e infecciosas [6]. Sin el suministro vascular adecuado, los tumores sólidos crecen únicamente a un tamaño de 1 a 2 mm; esto es debido a la falta de nutrientes y oxígeno [7]. Los tumores permanecen en un estado latente o de dormancia, en un estado avascular, en el que mantienen un estado de equilibrio entre la apoptosis y la proliferación celular antes de poder convertir su fenotipo a angiogénico. Esta conversión (*cambio angiogénico*) es el producto de una alteración precisamente del balance de factores inhibitorios y estimulatorios de tal forma que la

estimulación del crecimiento es favorecida [8]. Los principales pasos de la angiogénesis son los siguientes: permeabilidad vascular, proliferación celular endotelial, migración celular endotelial o invasión a los tejidos circundantes y finalmente, la formación de tubos capilares [6]. La habilidad de las células endoteliales de migrar y formar estructuras capilares es un proceso esencial para la angiogénesis *in vivo* [9].

2.1.1 Carcinoma escamoso de cabeza y cuello.

El carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC, *Head and neck squamous cell carcinoma* por sus siglas en inglés) es el sexto cáncer más común a nivel mundial [10], y surge en múltiples sitios anatómicos de la región de la cabeza y cuello [11] como cavidad oral, orofaringe, laringe, hipofaringe o nasofaringe [12]. La exposición constante al tabaco, productos relacionados con el mismo, dependencia al alcohol, así como infecciones con virus oncogénicos, como el virus del papiloma humano (VPH) particularmente en cáncer de orofaringe, son algunos de los principales factores de riesgo [11,12]. En Estados Unidos, aproximadamente 11 mil personas mueren anualmente debido a HNSCC [13] y en México las neoplasias malignas de vías aero-digestivas superiores representan aproximadamente 12% de las lesiones malignas en cabeza y cuello [14]; aun cuando existen avances en el tratamiento de este tipo de cáncer, el porcentaje de supervivencia se mantiene estático, ya que los pacientes siguen desarrollando frecuentemente recurrencias locorregionales, metástasis en sitios distantes y la reaparición de tumores primarios [12,13]. La presentación clínica varía dependiendo el sitio de origen; el diagnóstico difiere con base en el sitio en el que se encuentra el tumor, el tejido del tumor, la extensión del tumor, así como la presencia de metástasis en nodos linfáticos [11,12]. Alguno de los tratamientos contra este cáncer son la cirugía, radiación y quimioterapia en varias combinaciones, dependiendo del estado del tumor y el sitio primario [11]. En México, la letalidad estimada de este cáncer en vías aerodigestivas es de 62.4% en cavidad bucal, 93% en laringe, cerca del 100% en bucofaringe, 94% en hipofaringe y 83% en nasofaringe [14].

Por todas estas razones, es urgente el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

2.2 Vías de señalización.

La célula es altamente sensible a estímulos o sustancias específicas como las hormonas. Las cascadas de transducción de señales median la detección y procesamiento de un estímulo. Estos circuitos moleculares detectan, amplifican e integran una serie de señales externas diversas para generar respuestas, como cambios en la actividad enzimática, actividad de canales iónicos, o expresión génica. Los receptores de membrana transfieren información que proviene del ambiente al interior de la célula. Es decir, una señal química entra a la célula y altera directamente patrones de expresión génica. Un receptor asociado a membrana tiene como función transferir la información a través de esta barrera; y es una proteína intrínseca de membrana que tiene dominios intracelulares y extracelulares. El sitio de unión localizado en el dominio extracelular reconoce específicamente la molécula señal (ligando) [15].

La interacción ligando-receptor modifica la estructura terciaria o cuaternaria de dicho receptor, incluyendo el dominio intracelular. La información generada por la presencia del ligando, llamado frecuentemente primer mensajero, debe ser traducida a otras formas, para poder modificar la bioquímica de la célula. Los segundos mensajeros se encargan de transmitir la información del complejo ligando-receptor a otros organelos, y son liberados para poder ser difundidos a otros compartimentos celulares como el núcleo, donde pueden influenciar la expresión génica y otros procesos. Cambios en la concentración de estas moléculas pequeñas constituyen el siguiente paso en el circuito de información molecular [15].

Es importante mencionar que son las enzimas o canales de membrana los que son siempre activados cuando se generan los segundos mensajeros, y estos pueden estimular macromoléculas, lo que lleva a la generación de muchos segundos mensajeros dentro de la célula. Por lo tanto, una señal en el ambiente celular, aun cuando sea a una concentración tan pequeña como una molécula, puede generar una señal y respuesta intracelular muy amplia [15].

La fosforilación de proteínas es un medio de transferencia de información muy común. Muchos segundos mensajeros generan respuestas por medio de la

activación de proteínas cinasas. Estas enzimas se encargan de transferir grupos fosforilo a partir del ATP a residuos específicos de serina, treonina y tirosina en diversas proteínas. Una vez que el proceso de señalización ha comenzado, la información transducida con la finalidad de afectar algún proceso celular debe terminar. Si es que no termina, la célula involucrada pierde la capacidad de responder a nuevas señales ya que los procesos de señalización que no son terminados de manera adecuada pueden llevar a un crecimiento celular incontrolado y la posibilidad de desarrollar cáncer [15]. La Figura 2 explica de manera muy general cómo funciona una vía de señalización.

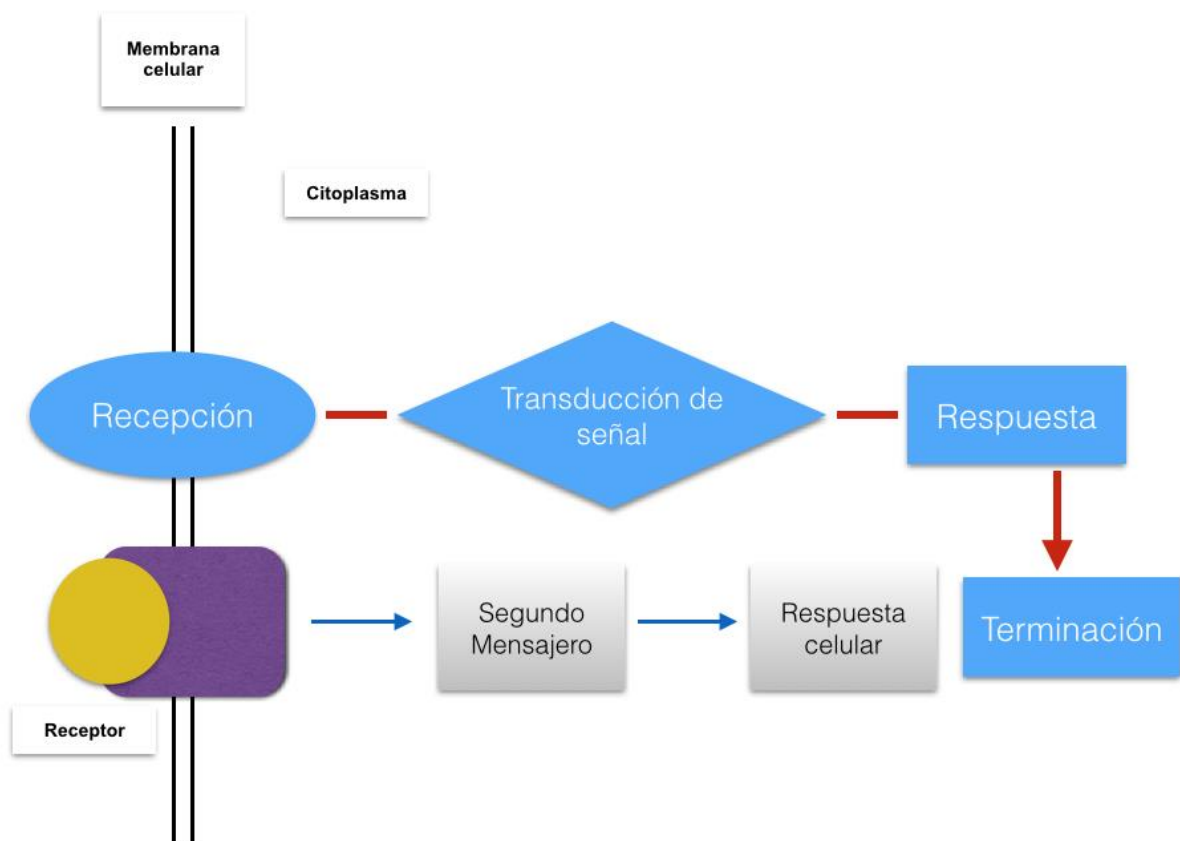


Figura 2. Mecanismo general de las vías de transducción de señales.
 Imagen adaptada de Asati V, et al. *Eur J Med Chem.* 2016

2.2.1 Vía de señalización Akt/PI3K.

Akt fue descubierto como un oncogen transducido por el retrovirus *acute transforming retrovirus* (Akt-8), el cual fue aislado de un ratón AKR (el cual es un ratón con una predisposición del 60-90% de leucemia) con linfoma de células T; posteriormente se encontró que este gen codifica una serina/treonina proteína cinasa. [16,17].

Por lo tanto, Akt/PKB es una proteína, específicamente una serina/treonina cinasa la cual pertenece a la familia de proteína cinasa A/G/C (AGC), las cuales son cAMP dependientes. Estas cinasas comparten una homología estructural dentro de su sitio catalítico y tienen un mecanismo de activación muy parecido [18]. Akt tiene tres isoformas, las cuales son altamente conservadas y están muy relacionadas: Akt1, Akt2 y Akt 3 [17] localizadas en los cromosomas 14q32, 19q13, and 1q44, respectivamente [18]. Estas serina/treonina cinasas (Akt 1, Akt 2 y Akt 3) pertenecientes a la familia proteína cinasa B (PKB) también son referidas como PKB α , PKB β y PKB γ , respectivamente [17].

Las cinasas Akt/PKB son intermediarios indispensables de vías de señalización que regulan procesos celulares los cuales controlan el crecimiento/tamaño celular, proliferación, supervivencia, metabolismo de glucosa, estabilidad genómica y neovascularización [19]. Se ha reportado la hiperactivación frecuente de las Akt cinasas en una amplia variedad de tumores sólidos de origen humano y también en patologías hematológicas; además se han utilizado ratones genéticamente modificados como modelos *in vivo* con la finalidad de demostrar que la señalización aberrante de Akt puede contribuir al desarrollo de neoplasias malignas ya sea por sí solo o en cooperación con otras alteraciones genéticas [19].

Las tres isoformas de Akt/PKB consisten en un dominio altamente conservado, el cual tiene la siguiente estructura: un dominio homólogo a la pleckstrina (PH), un dominio central cinasa y un dominio regulatorio C- terminal que contiene el motivo (*motif*) hidrofóbico [18]; La estructura de estas isoformas se muestra en la Figura 3.

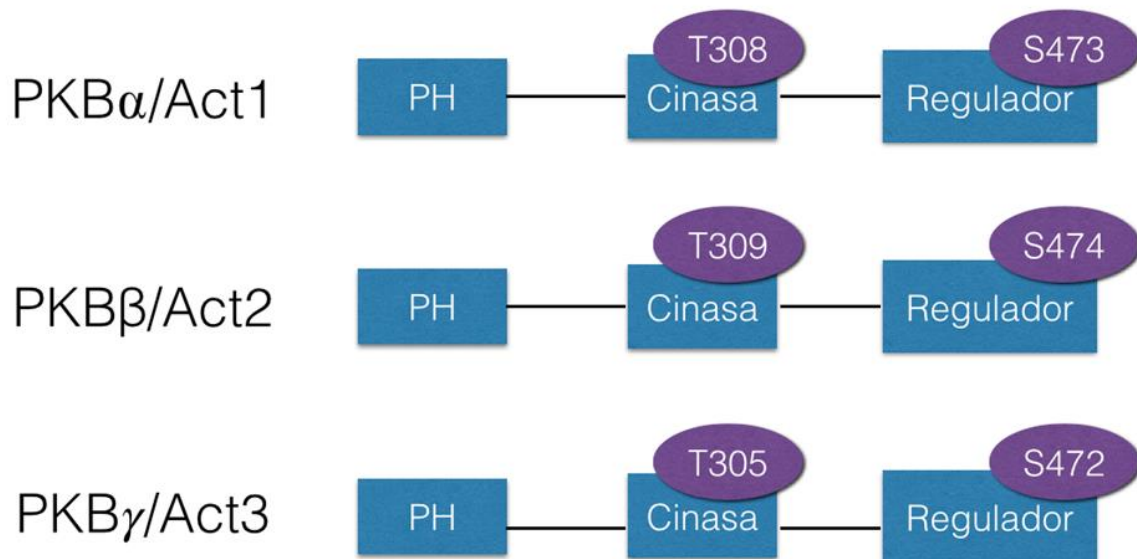


Figura 3. Estructura de los dominios de las distintas isoformas de Akt/PKB, así como de la variante (producto de splicing alternativo), PKB γ 1.

Imagen adaptada de Song G et al. T J Cell Mol Med. 2005

Akt/PKB se encuentra río abajo de PI3K y es activada por esta cinasa [16]; Fosfatidil-inositol-3 cinasa (PI3Ks, *Phosphoinositide 3-kinases*) es una familia de proteínas la cual está involucrada en la regulación de una serie de eventos, como: crecimiento celular, metabolismo, proliferación, tráfico vesicular y homeostasis de glucosa. La mayoría de los miembros de esta familia están unidos a subunidades reguladoras, las cuales se encargan de determinar las señales que modulan su actividad [20].

Existen 3 clases de PI3K, dentro de las cuales la clase I se divide en dos: Clase 1A, la cual es activada por receptores tirosina cinasa, y la Clase 1B, que se activa por medio de receptores acoplados a proteínas G. Una vez que estos receptores presentes en la membrana plasmática han sido activados y sufren un cambio conformacional, PI3K se activa y añade un grupo fosfato en la posición 3-OH de la molécula PIP2 (Fosfatidilinositol 3,4-bifosfato), generando el segundo mensajero fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). Este último se une al dominio PH de Akt/PKB con gran afinidad y permite su reclutamiento en la membrana plasmática. Es importante mencionar que PIP3 de ninguna manera activa directamente a Akt/PKB, sino que la recluta a la membrana plasmática y también altera su conformación con la finalidad de permitir su subsecuente fosforilación llevada a cabo por la cinasa

dependiente de fosfoinositol-1 (PDK1, *phosphoinositide- dependent kinase-1*) [16,18].

Por otro lado, PI3K clase II no requiere de una subunidad regulatoria para poder funcionar, y tiene 3 isoformas (alfa, beta y gamma) las cuales difieren en su estructura; esta clase está involucrada en el tráfico membranal y en la internalización de receptores. Puede ser activada en respuesta a receptores tirosina cinasa (RTKs), receptores de citocina e integrinas. La clase III de esta cinasa también está envuelta en el tráfico vesicular y en la señalización cruzada con la clase I de PI3K [20].

Asimismo, PI3K de clase I está compuesta por una subunidad reguladora (p85) y una subunidad catalítica (p110). La subunidad p85 se une y regula negativamente a la subunidad p110 hasta que el complejo es comprometido y activado por la señalización dada por algún factor de crecimiento. Después de la activación, la subunidad p85 permanece unida a la subunidad catalítica, pero cambia su conformación para poder colocar a la cinasa en la posición adecuada y permitir que entre en su estado activo [21].

Por lo tanto, la activación de Akt involucra a PI3K y depende de dos factores: la integridad del dominio PH, el cual media la translocación a la membrana de esta cinasa, y de la fosforilación de dos sitios de regulación: Thr308, en el *loop* de activación, dicha fosforilación mediada por PDK1 activa parcialmente a Akt/PKB y la fosforilación de Ser473, activa completamente a Akt [16,18]. La activación total de Akt está asociada con la fosforilación de Ser473 dentro del motivo hidrofóbico C-terminal característico de la familia AGC. El mecanismo de fosforilación de Thr308 está bien estudiado, sin embargo la fosforilación de Ser473 es controversial. Se cree que hay ciertas enzimas responsables de la fosforilación en el residuo de Ser, incluyendo una cinasa ligada a integrina, el mismo Akt por medio de autofosforilación, entre otros [16].

Los niveles de PIP3 están altamente regulados por la acción de algunas fosfatasa, como PTEN; esta proteína remueve un fosfato de la posición 3-OH, por lo tanto funciona como un regulador negativo de esta vía de señalización [18]. En la figura 4

se muestra cómo se da la activación de Akt/PKB por medio de PI3K.

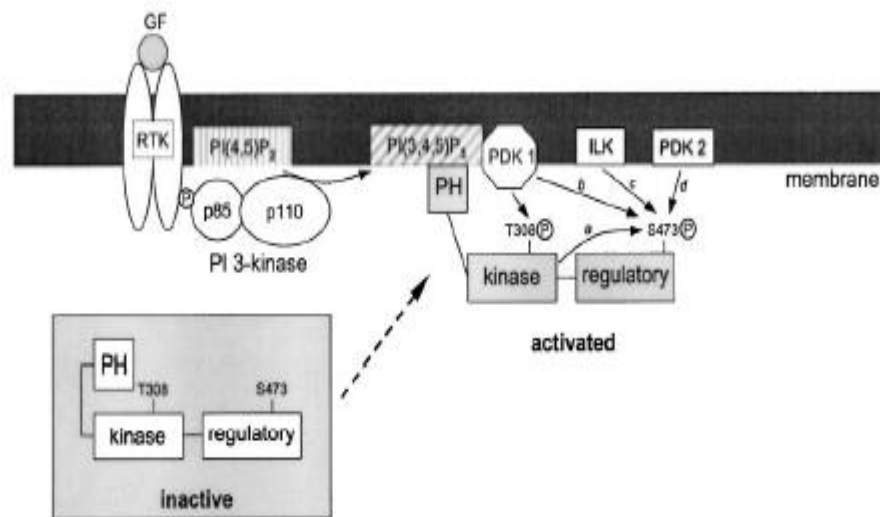


Figura 4. Mecanismo de activación de la vía de señalización Akt/PKB.
 Imagen adaptada de Fresno Vara JA et al. *Cancer Treat Rev.* 2004

2.2.1.1 Akt en cáncer.

La mayoría de los cambios genéticos/epigenéticos que están relacionados al fenotipo de los tumores, son representativos de una sucesión de perturbaciones fisiológicas, las cuales en conjunto generan que la célula se vuelva maligna. La vía de señalización de Akt tiene un papel muy importante en numerosos procesos que son conocidos por ser característicos de la patología del cáncer [8].

Akt es el nodo central en una vía de señalización que se compone de muchos componentes; estos están involucrados en el proceso de tumorigénesis incluyendo las moléculas río arriba PI3K, homólogo de la fosfatasa y tensina (PTEN), *Forkhead Box Class O* (FOXO) y factor de iniciación eucariota 4E (eIF4E). Algunas de estas moléculas actúan como oncoproteínas (eIF4E, PI3K, etc.) cuando se encuentran activadas o sobreexpresadas, mientras que existen otras (PTEN, FOXO) que cumplen el papel de supresores de tumores, los cuales se encuentran inactivados [17,19]. Estos mecanismos están presentes en una amplia variedad de cánceres [17]. Algunos de los sustratos sobre los que actúa Akt y el efecto que provocan se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Sustratos de PKB/Akt y los procesos celulares regulados por esta cinasa.

Sustrato Akt/PKB	Sitio de fosforilación	Efecto	Referencias
<u>Supervivencia</u>			
CREB	Ser133	Aumento en la transcripción de los genes de supervivencia regulados por CREB.	[8]
IKK	Thr23	Inducción de la actividad transcripcional de NF- κ B; activación de la transcripción de genes de supervivencia.	[8,22]
BAD	Ser136	Supresión de la actividad pro-apoptótica de BAD.	[8,22]
Forkhead family (FKHR, FKHL1, AFX)	Thr24, Ser256, Ser319 (FKHR). Thr32, Ser253, Ser315 (FKHL1). Thr28, Ser193, Ser258 (AFX).	Exclusión nuclear e inhibición de la transcripción de genes pro-apoptóticos.	[18,8]
Pro-caspasa 9	Ser196	Supresión de la muerte celular inducida por caspasa 9.	[8]
ASK1	Ser83	Inhibición de cinasas activadas por estrés.	[8,22]
Mdm2	Ser166, Ser186	Inducción de su importe nuclear o sobreexpresión de su actividad de ubiquitina ligasa; inhibición de procesos regulados por p53.	[18,22]
YAP	Ser127	Actúa como supresor de apoptosis.	[18]
<u>Crecimiento y progresión del ciclo celular.</u>			
GSK-3- α , - β	Ser21 (α), Ser9 (β)	Inhibición de la actividad catalítica de GSK3.	[8,22]
p21, p27	Thr145	Exclusión nuclear; prevención de su	[8,22]

		actividad anti-proliferativa; progresión del ciclo celular.	
mTOR	Thr2446, Ser2448	Modulación de la traducción de mRNA.	[8,22]
TSC2	Ser-939 and Thr-1462	Modulación de la actividad de mTOR.	[22]

AFX, Factor de transcripción de la familia *Forkhead* Box O4; ASK1, Cinasa reguladora de señal apoptótica 1; BAD, Promotor de muerte asociado a Bcl-2; CREB, proteína que responde al elemento que se une al AMP cíclico; eNOS, Óxido nítrico sintasa endotelial; FKHL1, Factor de transcripción *Forkhead* en rhabdomyosarcoma tipo 1; GSK3-B, Cinasa glucógeno sintasa 3; IKK, Cinasa IκB; Mdm2, Murino doble minuto 2; mTOR, Blanco mamario de rapamicina; NF-κB, Factor Nuclear κB. Ser, Serina; Thr, Treonina; TSC2, Proteína de esclerosis tuberosa 2; YAP, Proteína asociada a YES.

Como se mencionó anteriormente, varios mecanismos contribuyen a la activación de esta vía de señalización en tumores de origen humano, incluyendo la perturbación de las proteínas río arriba PTEN y PI3K [19]; PI3K es activada como resultado de la estimulación ligando-dependiente de receptores tirosina cinasa, receptores acoplados a proteínas G o integrinas. En cáncer, muchos de estos receptores de superficie están comúnmente sobreexpresados o activados constitutivamente, por lo que en respuesta, diferentes vías de señalización río abajo son comúnmente activadas [22].

Algunos otros mecanismos incluyen la sobreexpresión de receptores de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidermal en glioblastoma multiforme o cáncer de seno. En algunos casos, la activación de Akt puede resultar de la sobreexpresión de un receptor de factores de crecimiento *wild type*. En estos casos, la abundancia de algún receptor puede permitirle a una célula tumoral volverse hipersensible a ciertos niveles de factores de crecimiento en el ambiente. Por otro lado, los receptores mutados pueden aumentar la activación constitutiva de la vía de señalización Akt [19].

La mayor alteración descrita que ocurre en el gen de PI3K es la amplificación. Como ejemplo, el gen PI3KC, el cual codifica la subunidad catalítica p110a de PI3K, está localizado en el cromosoma 3q26 y es una región que se encuentra frecuentemente amplificada en muchos tipos de cáncer. Se ha encontrado en estudios recientes la amplificación de PI3KC en cáncer de ovario y cérvix. [8]. También se ha encontrado la amplificación del propio gen Akt, particularmente de Akt2 en distintos tipos de cáncer [8, 22].

El rol tan importante que juega Akt en la transformación y el cáncer fue reforzado con la clonación del gen Akt 2 en 1992, y el descubrimiento de que esta isoforma se encuentra frecuentemente amplificada y sobreexpresada en cánceres de origen humano [22]. Por lo tanto, debido a que la cascada de señalización de Akt se encuentra frecuentemente desregulada en muchos tipos de cáncer y en algunas otras enfermedades, se sabe que tiene implicaciones en relación a la agresividad de los tumores [19].

2.2.1.2 PTEN.

Homólogo de la fosfatasa y tensina (PTEN), también conocido como MMAC1/TEP1 (*Mutated in Multiple Advanced Cancers*), [23,24] fue identificado como un gen supresor de tumores el cual ejerce una regulación en la proliferación y supervivencia celular, particularmente en tejidos que son propensos a desarrollar tumores, como el endometrio y los senos [23,24]; está localizado en el cromosoma diez, en el locus 10q23 [23], el cual se encuentra mutado [23] y en algunos casos perdido en distintos cánceres como próstata, cerebro, y endometrio [20,24], así como en múltiples tipos de tumores [23]. La amplia red que involucra a PTEN va desde señales inducidas por receptores de factores de crecimiento en la superficie celular, hasta factores de transcripción que actúan a nivel nuclear; esta red también interactúa con otros supresores de tumores así como con otras vías de señalización oncogénicas (como p53), por lo que no trabaja de manera aislada, sino todo lo contrario [21].

PTEN es una fosfatasa que tiene una especificidad dual, la cual le permite desfosforilar PIP3 para formar PIP2 [24]; ha sido caracterizada como una proteína citosólica la cual es reclutada en la membrana, donde desfosforila a PIP3 [26]; sin embargo, existen resultados que demuestran que la localización de dicho gen está distribuida entre compartimentos nucleares y citoplasmáticos, o bien, en alguno de los dos compartimentos exclusivamente. La variación en su localización puede que sea debido al tipo celular, mutaciones, entre otros [26].

La regulación de la supervivencia celular mediada por este supresor de tumores, es llevada a cabo a través de la vía de señalización PI3K/Akt [24], por lo tanto la función principal de PTEN es controlar la señalización de PI3K [20]; En la membrana

plasmática, los receptores de factores de crecimiento tirosina cinasa, así como otras moléculas pueden activar a PI3K, la cual como se ha mencionado anteriormente, fosforila PIP2 para generar PIP3, antagonizando de esta manera a PTEN; el segundo mensajero PIP3 se une a moléculas las cuales contienen un dominio PH (como Akt), permitiendo su reclutamiento a la membrana y la subsecuente activación de distintas proteínas. Cuando se sufre la pérdida de PTEN, en la membrana plasmática se acumula de manera excesiva PIP3, lo que da como resultado el reclutamiento y activación de proteínas de la familia de AKT y PDK1; que como ya mencionamos, regulan muchos procesos críticos involucrados en cáncer, como la progresión celular, apoptosis, transcripción y crecimiento celular [21,23].

Una representación esquemática sencilla de la vía PTEN/PI3K se muestra en la Figura 5.

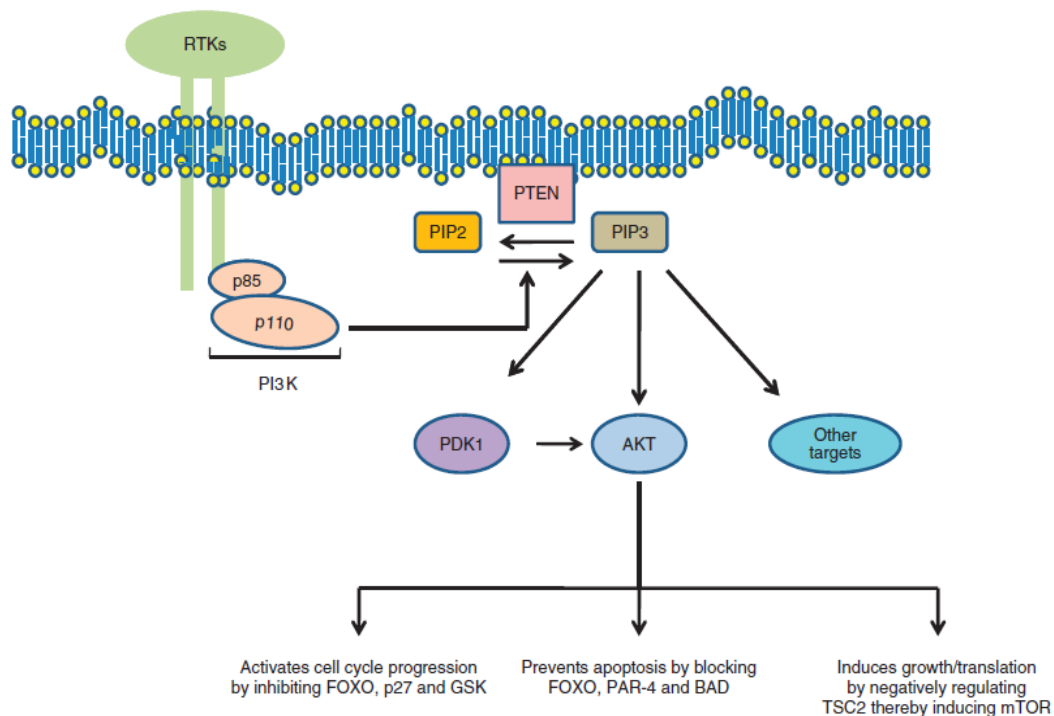


Figura 5. La red PTEN/ PI3K y la patología del cáncer.
 Imagen adaptada de M Keniry, R Parsons; *Oncogene* (2008).

La pérdida así como la mutación de este gen en distintos cánceres da como lugar una señalización hiperreactiva de PI3K [20]. Por ejemplo, PTEN se encuentra

mutado frecuentemente en el dominio fosfatasa [20]. Por lo tanto, la inducción de PIP3 da como consecuencia progresión del ciclo celular y un aumento en la supervivencia así como en el tamaño celular. En el caso contrario, la sobreexpresión de PTEN genera un arresto en el ciclo celular, una disminución en el tamaño de las células y apoptosis [21]. Se puede concluir entonces, que si PTEN desfosforila a PIP3 *in vivo*, este gen actúa como un regulador negativo de la vía de señalización PI3K/Akt [25].

La mutación de un alelo de PTEN y la pérdida del segundo, es el mecanismo más frecuente en la pérdida de función de este gen en tumores; sin embargo se han encontrado otros mecanismos como la metilación del promotor de PTEN [24].

Es importante mencionar, que en estudios recientes ha sido demostrado que la vía de señalización PTEN/PI3K se encarga del desarrollo normal de la vasculatura, así como de la angiogénesis [24]. En un reporte se encontró que, en células de cáncer de páncreas, el bloqueo específico de PTEN incrementó la secreción de VEGF, y moduló la migración y proliferación de células vasculares endoteliales por medio de un incremento en la angiogénesis. De esta manera, PTEN es capaz de modular la señalización mediada por VEGF, así como la angiogénesis a través de la vía PI3K/Akt/VEGF/eNOS [24].

La vasta cantidad de mutaciones asociadas a tumores las cuales ocurren en todos los dominios de PTEN, hablan de que cada región estructural de este gen es relevante fisiológicamente a la tumorigénesis asociada a este supresor de tumores [24].

2.2.1.2.1 Regulación de PTEN.

PTEN se encuentra expresado constitutivamente en tejidos normales; sin embargo esta expresión se ve alterada de manera importante en diversas patologías [23].

Este supresor de tumores puede ser regulado por medio de diversos mecanismos los cuales incluyen modificación transcripcional y post-transcripcional, mutaciones, patrones de unión, localización subcelular, silenciamiento epigenético, entre otros.

Todos estos contribuyen en los niveles y función de esta proteína así como en su regulación positiva o negativa [23,26]. Cabe mencionar que aun con mutaciones en este gen, se retiene la función catalítica de PTEN parcial o totalmente, lo que sugiere que existen mecanismos alternos que llevan a la inactivación completa de dicho gen [23].

PTEN también puede sufrir de silenciamiento epigenético; la metilación del promotor de PTEN está presente en distintos tipos de cáncer. A nivel transcripcional, PTEN puede ser regulado por el factor de transcripción SNAIL (o SNAI1), así como por el factor inhibidor de unión al DNA 1, el cual es oncogénico. Ambos inhiben su transcripción, ya que compiten con p53 (el cual es un activador transcripcional de PTEN) por el promotor de PTEN. También es inhibido por NF- κ B, o activado por algunos factores como PPAR γ y la proteína de crecimiento temprano (EGR1) [23].

PTEN es regulado por numerosas modificaciones post-transcripcionales que incluyen: miRNAs, fosforilación, acetilación, oxidación y ubiquitinación [23]. Se ha demostrado que distintos miRNAs tienen la capacidad de promover la tumorigénesis, así como desórdenes metabólicos por medio de una baja en la regulación de PTEN; actualmente se están identificando los mecanismos moleculares por medio de los cuales los miRNAs controlan la expresión de este supresor de tumores [23].

La estabilidad de PTEN es regulada por medio de la ubiquitinación [23]; esto a través de su localización subcelular. En algunos tumores, la localización subcelular de esta proteína media su actividad; la exclusión de PTEN del núcleo se correlaciona con el grado de transformación neoplásica, lo que sugiere que la localización nuclear de PTEN ejerce cierta función en la supresión tumoral [26], ya que la ausencia de PTEN nuclear está asociado a enfermedades más agresivas [23].

PTEN también se regula a través de interacciones proteína-proteína [23] por ejemplo, algunos estudios han encontrado la interacción entre PTEN y la subunidad regulatoria de PI3K, p85, como una forma de regular a la baja la vía de señalización PI3K/Akt, lo que evidencia que p85 puede regular dicha vía de señalización de

manera positiva y negativa: por medio de la unión directa a la subunidad catalítica de PI3K, p110 y por medio de PTEN respectivamente.

2.2.1.2.2 PTEN y cáncer.

La vía de supresión de tumores PTEN está comprometida en casi todos los tipos de cáncer. Hay puntos específicos dentro de la vía que son blancos de alteraciones dentro de las que se encuentran cambios en el estado de la regulación de PTEN y PI3K. Río arriba de la señalización PI3K/PTEN, la activación de algunos receptores de factores de crecimiento es amplificada y activada por mutaciones; de manera adicional, ciertos efectores de PI3K y PTEN sufren modificaciones en tipos particulares de cáncer, aunque no con tanta frecuencia [21].

La pérdida de función de PTEN se da en muchos tipos de tumores mediante los mecanismos antes mencionados: mutaciones, deleciones, silenciamiento transcripcional, inestabilidad proteica entre otros [21]. Aun cuando este gen tiene actividad de fosfatasa en residuos de serina, treonina y tirosina, su función sobre lípidos es la que juega el papel más importante en la supresión de tumores [26]. Estas alteraciones suceden en el desarrollo temprano o tardío de dicho tumor, dependiendo del tejido afectado, y pueden ocurrir a través de inactivación genética o bien, por medio de la regulación de la expresión de PTEN [27].

Las mutaciones somáticas en PTEN se dan en un alto porcentaje en distintos tipos de cáncer, principalmente en endometrio, piel, SNC y próstata [26].

2.2.2. Glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3).

Glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK-3, por sus siglas en inglés), es una serina treonina cinasa que fue aislada y purificada inicialmente del músculo esquelético de rata [28], y se encuentra expresada en tejidos de mamíferos; al inicio se le atribuyó como única función la fosforilación y por lo tanto la inactivación de la glucógeno sintasa (GS), última enzima en la biosíntesis del glucógeno, frenando de esta manera la síntesis de glucógeno a partir de glucosa; por lo que se consideró que esta cinasa desempeñaba un papel importante en el metabolismo [28,29]. Hoy en día, se conoce que tiene múltiples funciones como la división celular, renovación de

células madre, apoptosis, diferenciación celular, supervivencia celular, motilidad, transcripción, acción sobre la insulina, entre otros [29], gracias a que regula la actividad de factores de transcripción y la producción de mediadores de la inflamación [30].

GSK-3 es una importante enzima regulatoria en muchas patologías y desórdenes, como cáncer y envejecimiento celular (células madre cancerígenas, control de pluripotencia y diferenciación celular); desórdenes metabólicos (patologías del corazón, aterosclerosis, diabetes); desórdenes inmunológicos y neurológicos (desorden bipolar, Alzheimer, esquizofrenia, trastornos de estado de ánimo, Parkinson, esclerosis amiotrófica lateral (ALS)), entre otros [28]. Se encuentra abundantemente en el sistema nervioso central (SNC), particularmente en el hipocampo, y juega un papel importante en cánceres resistentes a radio, quimio o terapias dirigidas [29].

Existen principalmente, dos isoformas de GSK3, las cuales son codificadas por dos genes diferentes en humanos: GSK3A, que codifica a GSK-3 α , (51 kDa) y GSK3B, el cual codifica a GSK-3 β (47 kDa); estos genes están localizados en los cromosomas 19q13.2 y 3q13.3 respectivamente. Existe una tercer isoforma, producto del *splicing* alternativo de GSK-3 β , y que lleva por nombre GSK-3 β 2; esta isoforma contiene un inserto de 13 aminoácidos en el dominio catalítico [29,31].

GSK-3 α y GSK-3 β comparten 98% de la secuencia en sus dominios cinasa, pero 36% de identidad en el extremo carboxilo. Se considera que tanto GSK-3 α como GSK-3 β están activas en células no estimuladas y tienen preferencia por sustratos que han sido previamente fosforilados (por otras cinasas) *primed substrates* [28] y actúan sobre una serina o treonina localizada alrededor de una secuencia consenso de 5 aminoácidos de la forma “serina/treonina-X-X-X-serina/treonina-P”; la primer serina o treonina en este motivo es el residuo que puede ser fosforilado por GSK3, X puede ser cualquier aminoácido y la última serina o treonina-P es el residuo previamente fosforilado [30]. Las cinasas GSK-3 fosforilan más de 40 proteínas incluyendo aproximadamente 12 factores de transcripción [28].

A pesar de que estas isoformas son similares respecto a estructura y comparten algunas moléculas blanco, presentan diferentes funciones fisiológicas tejido-específicas, así como distintos patrones de expresión, especificidad y preferencia por ciertos sustratos [28,31]. Ambas isoformas se asocian con diferentes compartimentos celulares o complejos proteicos con la finalidad de desempeñar distintas funciones por medio de la integración de estímulos río arriba con sustratos específicos que varían en el sitio o la vía de señalización a la que pertenecen [31].

Cabe recalcar que una isoforma no puede compensar la pérdida de la otra, ya que ratones a los cuales se les hizo un *knock-out* de la isoforma GSK3- β murieron aproximadamente al día 15 del desarrollo embrional debido a apoptosis hepática; los ratones con un *knock-out* en la isoforma GSK3- α vivieron pero presentaron un aumento en la glucosa y también en la sensibilidad a insulina, así como anomalías en el desarrollo metabólico y neuronal [28].

2.2.2.1 Funciones bioquímicas/ procesos regulados por GSK-3.

GSK-3 se encarga de fosforilar una gran variedad de proteínas que están involucradas en distintos procesos celulares [32], a continuación se mencionan algunos. Además de inhibir a la glucógeno sintasa (GS), GSK-3 también inhibe la señalización de insulina por medio de la fosforilación de proteínas sustrato del receptor de insulina 1 y 2 (IRS-1, IRS-2 por sus siglas en inglés) [29].

La actividad apoptótica o pro-apoptótica de diversas moléculas también se ve influenciada por GSK3, ya que estabiliza la expresión de varios miembros de la familia antiapoptótica de Bcl-2. Por ejemplo, la expresión de Bcl-2 es inhibida de forma indirecta por GSK3- β por medio de la fosforilación [28].

También controla la diferenciación celular y la reproducción mediante su acción sobre la vía de señalización Wnt [29] por medio de la regulación de los niveles de β -catenina (molécula envuelta en el desarrollo normal así como en la progresión del cáncer) mediante su fosforilación [28] lo cual limita la translocación nuclear y por consiguiente su actividad promoviendo su degeneración por medio de la proteólisis dependiente de proteasoma [29,33]. GSK3 actúa como supresora de tumor conteniendo la señalización Wnt- β -catenina [29,33].

GSK-3 también tiene efectos de forma tanto directa como indirecta sobre la proliferación celular por medio de la regulación de la actividad de distintos factores de transcripción, lo que lleva a un control en el crecimiento celular. Muchas veces estos factores de transcripción están involucrados en cáncer, incluyendo la proteína activadora 1 (AP1), y c-Myc [28]. GSK-3 fosforila a c-Myc en residuos de serina y treonina [28], lo que causa la degradación de dicha proteína y la consecuente disminución en la transformación y crecimiento celular. Myc es una familia de factores de transcripción encargados de regular el crecimiento y diferenciación celular, incluyendo al integrante c-Myc. Estas proteínas se unen al DNA para poder modificar la transcripción de genes, un proceso que cuando se encuentra desregulado lleva al desarrollo de cáncer [32]. GSK3 también regula la actividad de otros factores de transcripción, como Snail (que también participa en la vía de señalización Wnt) y NF- κ B, entre otros. GSK3- β tiene la habilidad de fosforilar a NF- κ B promoviendo su degradación proteosómica [28].

GSK3 puede también modificar la actividad de proteínas relacionadas con la traducción de RNA. Debido a estos procesos y a muchos otros, GSK3 tiene la capacidad de actuar sobre muchas moléculas envueltas en una amplia variedad de eventos de regulación. En la mayoría de los casos, como se puede observar, GSK3 actúa como un inhibidor de la activación transcripcional [32]. Un breve resumen de la señalización GSK3 se muestra en la Figura 6.

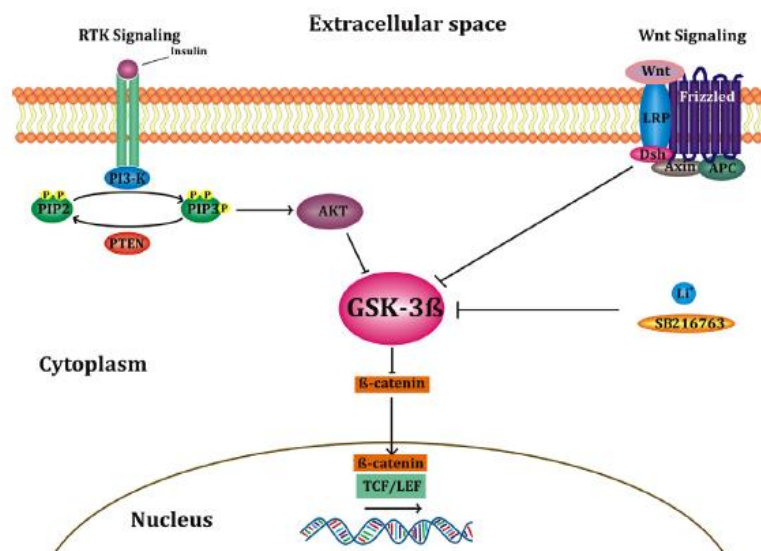


Figura 6. Representación de GSK-3 β y las proteínas que provocan su inhibición.
Imagen adaptada de Atkins, et al. Journal of Clinical Neuroscience, 2013.

2.2.2.2 Regulación de GSK-3.

GSK-3 alfa y beta son altamente conservadas y están expresadas constitutivamente en condiciones basales; su fosforilación da como lugar una disminución en su actividad [28,30]. Las isoformas de esta cinasa son reguladas por diversos estímulos y vías de señalización [28] a través de: 1) múltiples modificaciones post-traduccionales que incluyen fosforilaciones, y 2) su localización e interacción con proteínas reguladoras así como con complejos multiproteicos [30,31]. Como ejemplos se puede mencionar la fosforilación de la serina N-terminal (α -21/ β -9), la cual lleva a la inactivación de la cinasa o la fosforilación en tirosina (α -279/ β -216) dentro del dominio catalítico protagonizada por sí misma, que lleva a la activación de esta molécula [31]; dichas fosforilaciones pueden ser mediadas por cinasas como Akt, PKA y PKC [29].

Por ejemplo, la señalización generada por la insulina da como resultado la activación de Akt y como consecuencia la fosforilación e inactivación de GSK-3 β (S9) y GSK-3 α (S21) [29]. También otros factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidermal (EGF), y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), entre otros, inducen la fosforilación de ambas isoformas; por lo tanto, la actividad de GSK3 suele ser bloqueada después de la exposición a factores de crecimiento o mitógenos, así como receptores de interleucinas [28,30]. Es importante mencionar que la fosforilación de GSK3- β en el residuo S9 está asociada con muchas condiciones patológicas, incluido el cáncer [28].

La mayoría de los estudios se han centrado en GSK3- β , sin embargo algunos estudios han demostrado el papel que juega la isoforma GSK3- α en la resistencia a fármacos y en células madre cancerígenas [28].

2.2.2.3 GSK3 y el cáncer.

GSK3 es un punto de convergencia en muchas vías de señalización las cuales participan en procesos fisiológicos tales como ciclo celular, desarrollo, diferenciación, motilidad, adhesión, inflamación celular y función microtubular. Se ha demostrado que esta habilidad de afectar directa o indirectamente estos

procesos es debida a la capacidad de modificar post-transcripcionalmente a ciertos factores de transcripción por medio de la fosforilación de sitios específicos de consenso en residuos de treonina o serina; Por lo que la desregulación de esta proteína está involucrada en la iniciación y progresión de muchos tipos de cáncer [30].

Con base en una gran cantidad de evidencia, se sugiere que la actividad alternada de factores de transcripción y la expresión de una gran cantidad de mediadores de la inflamación, juega un papel crucial en la transformación neoplásica y en la tumorigénesis de varios tipos de cáncer; ya que la activación de diversos factores de transcripción tiene como consecuencia la expresión de genes anti o pro-tumorigénesis que están involucrados en las distintas etapas del desarrollo del cáncer, estos genes controlan el ciclo celular y la apoptosis. Los mediadores de la inflamación pueden ejercer sus efectos en la tumorigénesis de manera directa o por medio de la modificación de la actividad de factores de transcripción [30].

Debido a que GSK-3 tiene participación en la vía de señalización de Wnt, tiene un efecto directo en el control de la regulación del ciclo celular y por lo tanto de la proliferación celular [29].

Aun cuando GSK-3 tiene un papel importante en el desarrollo del cáncer, después de muchos años de investigación, la participación de esta cinasa en dicha patología sigue siendo controversial y compleja [28]. Existe evidencia de que GSK3- β tiene un papel ambiguo, ya que puede promover y también suprimir el desarrollo de tumores [29].

GSK-3 puede tener efectos positivos en la proliferación celular y puede encontrarse sobreexpresada en tumores de distintos cánceres, como colon, páncreas, ovarios e hígado [28]; por ejemplo, GSK-3 β está altamente expresada en cáncer colorrectal y también está involucrada en la supervivencia celular mediada por NF- κ B en cáncer de páncreas. Cuando la expresión de esta cinasa se inhibe, se observa una supresión en la angiogénesis y el crecimiento celular, así como una disminución en los niveles de Bcl-2 y de VEGF en células a las cuales se les indujo un *knock-down* de GSK3- β [28].

Sin embargo, GSK-3 también puede ser supresor de tumores. Esto debido a que, como se mencionó anteriormente, puede suprimir la vía de señalización Wnt- β catenina por medio de la fosforilación de dicha catenina, dando como resultado su degradación proteica. Se ha demostrado que la sobreexpresión de GSK3- β aumenta la quimiosensibilidad, promueve el arresto del ciclo celular y reduce la tumorigenicidad de cáncer de seno [28]. En algunos estudios de cáncer de próstata, se observó una disminución de tumores debido a que esta cinasa fue capaz de inhibir el receptor de andrógeno, el cual se encarga de estimular el crecimiento celular en dicho cáncer [29]. Con toda esta evidencia, se cree que debe existir un delicado equilibrio de GSK-3, el cual le permite funcionar como supresor o inductor de tumores [28].

Recordemos que GSK3 puede influir en el proceso de inflamación. La inflamación es un proceso fisiológico fundamental que consiste en una respuesta primaria del hospedero frente a agentes estresores, como una infección o daño a tejidos con la finalidad de mantener la homeostasis. Una larga cantidad de estudios han comprobado la relación que existe entre la inflamación y la tumorigénesis, reiterando la participación de la inflamación en la iniciación, el crecimiento y la metástasis de tumores [30].

La inflamación crónica es capaz de: 1) iniciar cáncer gracias a la generación de estrés genotóxico; 2) promover el cáncer por medio de la inducción de proliferación celular; y 3) acelerar el desarrollo del cáncer al aumentar la invasión de tejidos y angiogénesis. Aproximadamente, más del 25% de los cánceres en humanos son causados por inflamación; enfermedades inflamatorias dependiendo los órganos pueden predisponer a la iniciación y desarrollo de distintos tipos de cáncer [30]. Esta asociación entre carcinogénesis e inflamación ha sido observada en pulmón, ovarios, próstata, hígado, y especialmente en órganos gastroenterológicos, como el cáncer de esófago [28,30].

GSK3 juega un papel importante en la regulación de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa; la inhibición de GSK3- β es capaz de suprimir la respuesta inmunológica innata por medio de: a) la reducción en la producción de IL-1 β , IL-6,

factor de necrosis tumoral (TNF) e IL-12; y b) el aumento de IL-10, receptor antagonista de IL 1 (IL-1Ra), interferón β (IFN- β), entre otras. Respecto a la inmunidad adaptativa, GSK3 tiene la capacidad de regular la proliferación de células T [30].

Las citocinas, producidas por células inmunológicas que son estimuladas y activadas, son componentes importantes en la relación que existe entre el desarrollo del cáncer y la inflamación, ya que estos compuestos pueden activar una serie de cinasas intracelulares; en consecuencia se activan diferentes factores de transcripción (como NF- κ B, AP-1), lo cual promueve el desarrollo de tumores [30].

Es importante mencionar, que todas estas citocinas inflamatorias pueden actuar ya sea para promover la iniciación de tumores, o bien para suprimir el crecimiento del tumor. Este fenómeno puede que se deba al tipo de células que generan las citocinas, el estímulo que está recibiendo la célula, y el tiempo de producción de dichas sustancias respecto a la progresión del tumor [30].

Un ejemplo es el factor necrótico tumoral (TNF). Esta citocina es capaz de inducir la producción de otras moléculas (como IL-8, IL-1) y factores citotóxicos (como NO, ROS), las cuales pueden mediar la supresión de tumores; en contraste, también se ha reportado que TNF puede tener efectos de promoción de tumores [30]. Diferentes estudios han reportado que la supresión de GSK-3 inhibe la transcripción mediada por NF κ B. Ya que después de la estimulación del TNF α , GSK3- β es necesaria para la respuesta de supervivencia mediada por dicho factor de transcripción; en este caso, GSK3 aumenta la producción de moléculas inflamatorias y promueve la migración celular [29]. La concentración y el tiempo en el que se produce TNF durante el desarrollo del tumor, altera de manera crucial las propiedades de dicha citocina, para poder presentar un efecto pro- o anti-tumorogénesis [30]. Un resumen del efecto de GSK3 en la inflamación se muestra en la Figura 7.

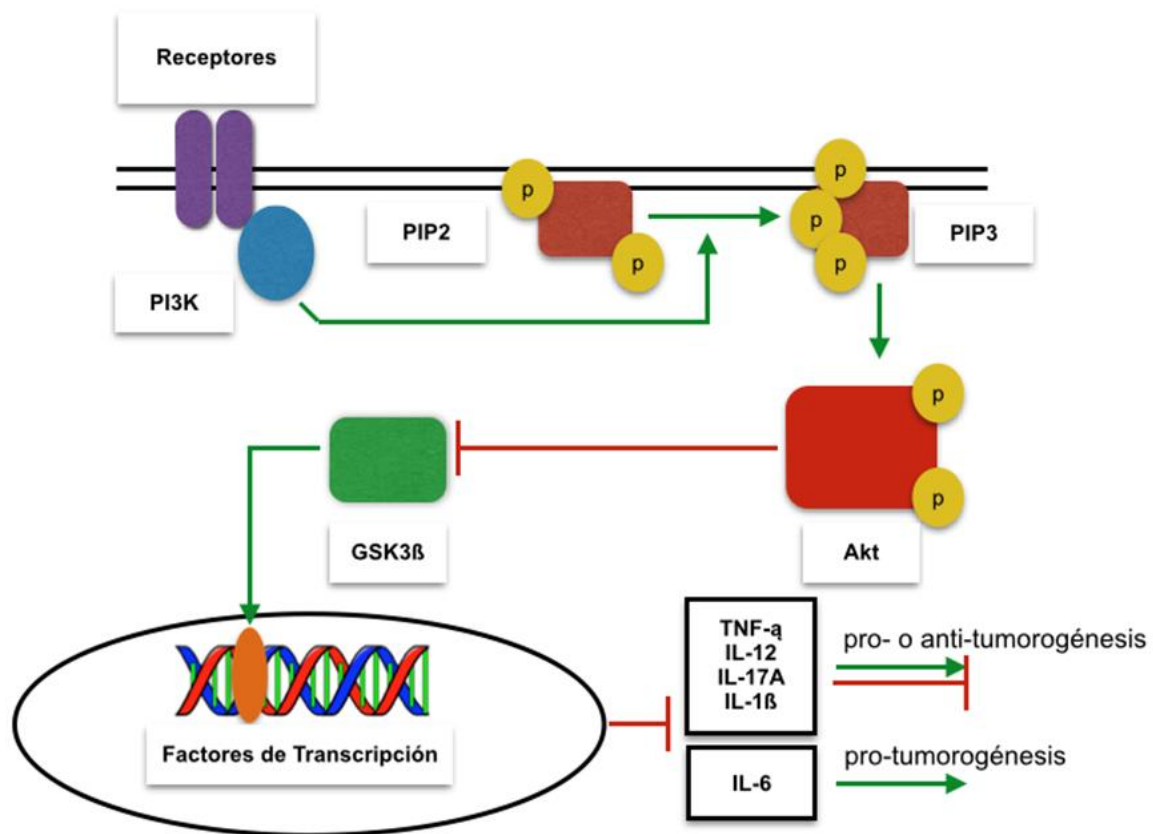


Figura 7. La activación de GSK3 β induce una respuesta inflamatoria.
 Imagen adaptada de Gao S, et al. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2014

1.3 Factores de crecimiento en carcinogénesis.

Los factores de crecimiento son polipéptidos de bajo peso molecular los cuales no sólo promueven la proliferación celular, sino también funcionan como reguladores de la diferenciación y división celular así como del desarrollo embrional [34,35] y la homeostasis de distintos tejidos por medio de mecanismos paracrinós y/o autocrinos. Sin embargo, también están involucrados en diferentes condiciones patológicas, como algunas infecciones, inflamación y tumorogénesis. La expresión de estos factores puede dar como consecuencia la progresión tumoral y metástasis a través de diversos mecanismos, en los cuales está incluida la proliferación celular, supervivencia e invasión [35].

Estas moléculas son producidas por aparentemente todas las células y se unen a distintos receptores expresados en las mismas. La unión altamente específica de

estos factores a receptores de membrana determinados (y en algunas ocasiones receptores nucleares) dispara la activación de numerosas señales de transducción complejas que dan como lugar la transcripción génica y la modulación de funciones celulares; debido a que son importantes reguladores del crecimiento y proliferación celular por medio de la activación de distintas vías de señalización, también son promotores del crecimiento tumoral [34].

Las células tumorales pueden liberar una variedad de factores de crecimiento, incluidos aquellos que promueven el crecimiento masivo, la proliferación, inducen la migración celular, aumentan la transformación, etcétera [36].

De manera muy general, los factores de crecimiento los cuales actúan como ligandos, se unen a receptores de membrana que normalmente tienen actividad de tirosina cinasa en su dominio intracitoplasmático; una vez unidos, los receptores forman homo y heterodímeros, lo que lleva a la activación de los dominios tirosina cinasa y a la autofosforilación de residuos específicos en la porción citoplasmática del receptor, lo que da lugar a la activación de diferentes componentes de vías de señalización para llevar a cabo funciones celulares específicas [34].

A continuación se enlistan en la siguiente tabla algunos de los factores de crecimiento involucrados en el proceso de cáncer (Tabla 2):

Tabla 2. Factores de crecimiento, receptores, funciones generales y ocurrencia en tumores. Tabla adaptada de Halper J. *Vet Pathol.* 2010 [34]

Familia	Factor de crecimiento	Receptor	Tipo de receptor	Algunas funciones	Tumores*
EGF	EGF	EGF-R, erbB2, HER2/neu	Tirosina cinasa	proliferación celular, angiogénesis.	Sobreexpresión de EGF-R en carcinomas
	TGF α		Tirosina cinasa	Promotor de tumores, proliferación celular y desarrollo embrional.	
TGF β	TGF β 1-3.	T β R-I a III	Serina-treonina cinasa, Sistema	Mitógenos, promotor de apoptosis (dependiendo	Sarcomas, carcinomas, la mayoría de los tumores

			Smad.	el tejido), inmunosupresor, formación ECM.	
	BMPs			Desarrollo de hueso.	
	Inhibina, activina			Pituitaria,desa rrollo genital.	
IGF	IGF-I	IGF-IR, <i>ros</i> , BPs.	Tirosina cinasa	Mitógeno, agente anti apoptótico.	Tumores de seno, colon, cerebro.
	IGF-II	IGF-IR, IGF- 2R.			
Granulinas	progranulina.	aún no definido.	Desconocido.	Mitógeno epitelial, reparación de tejidos, función cerebral.	Carcinomas.
FGF	FGF1, FGF2.	FGF-R1-4 (transmembra nales), FGF- R5 (soluble).	Tirosina cinasa, sitios nucleares.	Mitógenos, potentes inductores de angiogénesis, desarrollo embrional.	Carcinomas.
	FGF7.				
PDGF/VEGF	PDGF-AB,- AA, -BB, C y D.	PDGF-R α , PDGF-R β .	Tirosina cinasa.	Reparación del sistema vascular, mitógeno.	Leucemias, sarcomas, gliomas.
	VEGFA-E, PlGF.	VEGFR1,2,3.	Tirosina cinasa .	Angiogénesis.	Angiogénesis tumoral.

EGF, factor de crecimiento epidemal; TGF, factor de crecimiento transformante, ECM, matriz extracelular; BMP, proteína morfogenética de hueso; tor de crecimiento derivado de plaquetas; IGF, factor de crecimiento tipo insulina; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; BPs, proteínas de unión; PlGF, factor de crecimiento de placenta; *Tumores por familia, no por factor de crecimiento.

2.3.1. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

La angiogénesis, es el proceso por medio del cual los capilares surgen de vasos sanguíneos preexistentes; dicho proceso está altamente regulado por un gran número de factores pro y anti apoptóticos. Las células tumorales requieren necesariamente del suministro de nuevos vasos sanguíneos para promover su crecimiento y de esta manera, facilitar el proceso de metástasis [37].

La molécula pro-angiogénica mejor caracterizada es el Factor de crecimiento endotelial vascular, o VEGF (por sus siglas en inglés); el cual fue identificado y aislado como un mitógeno específico de células endoteliales que tiene la capacidad

de inducir angiogénesis fisiológica y patológica [38]. VEGF es una glicoproteína homodimérica con un peso molecular de 45 kDa. La familia de VEGF's está compuesta de 5 integrantes: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD y el factor de crecimiento de placenta (PGF) [39]. Estos son secretados como proteínas glicodiméricas [37], y difieren en su patrón de expresión, en la especificidad del receptor y en sus funciones biológicas. VEGFA, también llamado simplemente VEGF, tiene múltiples variantes, producto del *splicing* alternativo, y son distintos en la especificidad del receptor y en su función [38].

VEGF-A es considerada la isoforma de VEGF más relevante fisiológicamente en términos de angiogénesis y biología endotelial [40]. Los efectos fisiológicos de VEGF pueden darse gracias a la unión de este factor a dos receptores homólogos: receptor VEGFR-1 (también llamado Flt-1) y receptor VEGFR-2 (KDR); estos receptores son expresados en células vasculares endoteliales [7].

VEGF-B se une principalmente al receptor VEGFR1. Esta isoforma produce angiogénesis de forma muy leve en la mayoría de los tejidos, excepto en el corazón, donde tiene un papel importante en angiogénesis miocárdica. VEGF-B también tiene gran participación en la regulación de la captura de ácido graso endotelial, y como resultado puede ser un buen blanco terapéutico para el tratamiento de la diabetes. Las isoformas VEGF-C y VEGF-D se unen al receptor VEGFR3 y juegan un papel importante en la linfangiogénesis; VEGF-D puede también unirse al receptor VEGFR2 y activar las vías de señalización ERK y Akt para inducir angiogénesis. PGF activa al receptor VEGFR1, aunque todavía existen dudas de que esta isoforma pueda estimular la angiogénesis, existen estudios que muestran que PGF puede regular la efectividad de VEGF-A [40].

2.3.1.1 Receptores de VEGF y su internalización.

El hecho de que la señalización generada por VEGF contribuye a las funciones de las células tumorales implica que dichas células expresan receptores de VEGF específicos que median dicha señalización. Los receptores clásicos de este factor de crecimiento son los receptores tirosina cinasa VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3. Anteriormente se creía que la expresión de estos receptores era exclusiva de células endoteliales, sin embargo hoy en día se sabe que la mayoría de estos

receptores están expresados en muchos tipos de tumores y que su expresión está relacionada con parámetros clínicos. No obstante, es importante mencionar que VEGFR2 es el principal receptor que media la señalización de VEGF en células endoteliales y que genera angiogénesis [38].

Los receptores VEGF experimentan dimerización inducida por ligando; esto dispara la transducción de señales debido a la fosforilación de dicho receptor y el subsecuente reclutamiento de mediadores específicos río abajo de esta vía de transducción [7]. Los tres receptores poseen un dominio extracelular (ECD) el cual está conformado por 7 dominios tipo inmunoglobulina, un único dominio hidrofóbico membranal (TM) y un dominio citoplasmático el cual consta de un dominio catalítico; este último es interrumpido por una región no catalítica, llamada “inserto cinasa” (KI), como se muestra en la Figura 8 [41].

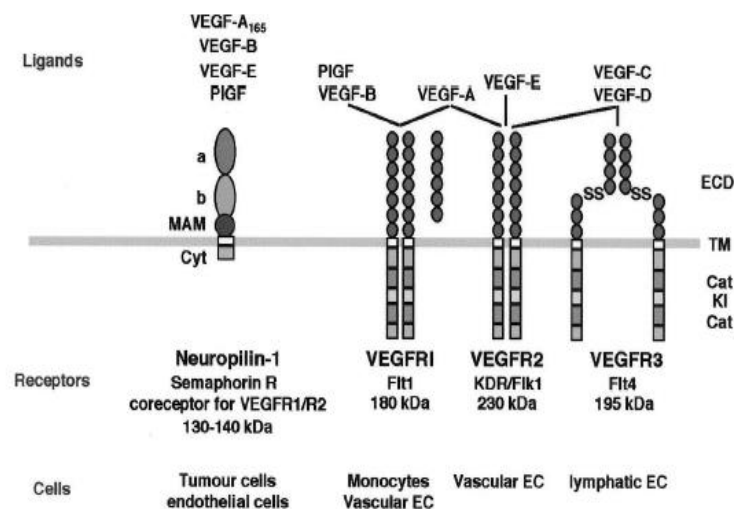


Figura 8. VEGF, ligandos y receptores.

Imagen adaptada de Zachary I, Gliki G. Cardiovasc Res. 2001.

Es importante mencionar que existe una forma alternativa del receptor VEGFR1 producto del *splicing* alternativo; dicho receptor se encuentra en forma soluble, y se sabe que es capaz de aislar VEGF y evitar que este se una a VEGFR2, regulando de esta manera la señalización del receptor VEGFR2 [38].

Debido a que algunas células tumorales carecen de la expresión de uno o más receptores tirosina cinasa (RTK's) pero responden a señales paracrinias o autocrinas, puede hacerse la suposición de que existen otros tipos de receptores

que de alguna manera contribuyen o median la señalización de VEGF en éstas células. Esto se sabe, porque se ha encontrado que la señalización río abajo de VEGF en células tumorales es mediada tanto por receptores RTK's como por neurofilinas (NRPs) [38].

La razón por la cual las NRP's juegan un papel tan importante, es porque tienen la habilidad de interactuar con los RTK's y por lo tanto pueden influenciar la función de estos receptores. Las neurofilinas son glicoproteínas transmembranales que pueden funcionar como receptores de VEGF, las cuales son expresadas en células tumorales. Estas glicoproteínas forman complejos con los RTK's de VEGF (principalmente con VEGFR1 y VEGFR2) aumentando su afinidad por VEGF [38], y funcionando como co-receptores ya que carecen de la capacidad de generar una señalización intrínseca. Las neurofilinas fueron identificadas inicialmente como receptores neuronales, participando en el desarrollo del sistema nervioso. En años recientes, se ha confirmado que las NRPs tienen un papel importante en la iniciación y progreso de un tumor [38].

Una vez que ha sido estimulado por VEGF, el receptor VEGFR2 se internaliza. Se cree que este acontecimiento sucede con la finalidad de terminar la señalización de dicho receptor; no obstante, recientes estudios sugieren que este es un proceso altamente controlado, el cual no solamente determina la sensibilidad de las células endoteliales a VEGF sino que también puede tener un impacto en la vía de señalización que sea activada. Los mecanismos encargados de regular la internalización de este receptor son ampliamente estudiados, pero aún siguen sin entenderse del todo, ya que el efecto que presenta VEGF respecto a la estabilidad del receptor sigue sin resolverse. Sin embargo, varios estudios han propuesto que la estimulación por un periodo largo (2h) con VEGF resulta principalmente en la degradación de la mayor parte del receptor VEGFR2. Se tiene reportado que la activación de la vía de señalización PI3K/Akt dada por VEGFR2 ocurre principalmente en la membrana celular [40].

2.3.1.2 VEGF y señalización autocrina.

En la mayoría de estudios que han evaluado la señalización de VEGF en células tumorales, han catalogado esta señalización como autocrina (la célula responde a sustancias que ella misma libera), aun cuando la señalización paracrina (las moléculas de señalización liberadas por una célula afectan únicamente a células blanco que están a una proximidad cercana) está presente. Este es uno de los descubrimientos más importantes de VEGF, ya que este tipo de señalización contribuye en muchos aspectos de la tumorigénesis, principalmente en la función de las células cancerígenas, independientemente de la angiogénesis [38].

Esta afirmación está basada en que VEGF y sus receptores son expresados en células tumorales; de esta manera VEGF puede funcionar como un factor tanto parácrino como autócrino, dando como resultado una retroalimentación positiva para un efecto directo en las células tumorales (Figura 9) [7]. Dichas células dependen de este tipo de señalización para mantener la autosuficiencia o la autonomía, ya que promueve la de-diferenciación con un aumento en la invasión y supervivencia tumoral, facilitando también las funciones de células cancerígenas, lo cual es de gran relevancia en cánceres que son bastante agresivos y en la biología de dichas células. De hecho, la señalización autocrina de VEGF es característica de los cánceres más agresivos incluyendo aquellos carcinomas que están pobremente diferenciados [38].

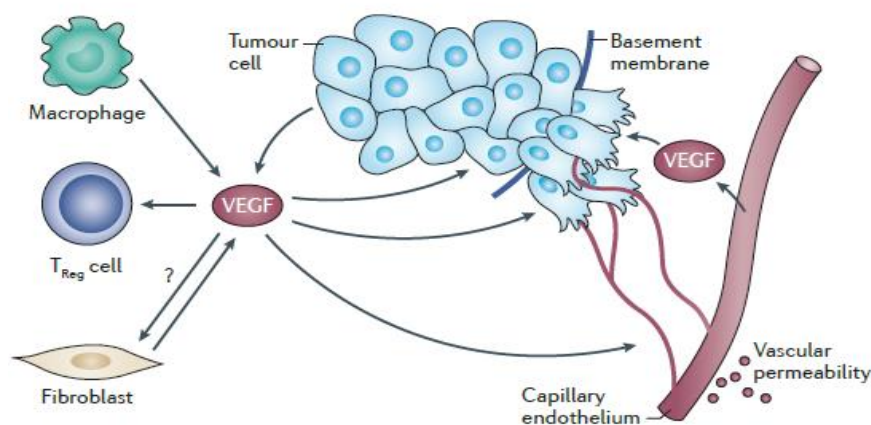


Figura 9. Células que secretan VEGF y su función en tumores.
Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. Nat Rev Cancer. 2013.

2.3.1.3 VEGF en angiogénesis.

La expresión del gen de VEGF es regulada positivamente por una serie de factores, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento tumoral (TNF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y la interleucina 1 (IL-1) [7].

Otro inductor importante de VEGF es la hipoxia [7]; la cual induce la dimerización del factor de transcripción "factor inducible por hipoxia subunidad alfa (HIF- α) y su unión al elemento de respuesta a hipoxia en el promotor del gen VEGF, estimulando la producción de dicho factor y consecuentemente la angiogénesis [7,41]. El fenómeno de hipoxia también promueve la señalización autocrina en células tumorales y se ha observado que las células tumorales agresivas presentan una transcripción sostenida de HIF [38].

El evento inicial de la transcripción y secreción de HIF- α que protagoniza el tumor creciente, da lugar a una regulación positiva y consecuente activación de receptores de factores de crecimiento. Esto da como resultado: germinación o brote endotelial; un aumento en la permeabilidad vascular; la expresión de matriz metaloproteinasas (MMPs) y posteriormente la digestión de la matriz, la cual es necesaria para que las células endoteliales y células de soporte puedan moverse. Este acontecimiento tiene como consecuencia la extensión de vasos sanguíneos, un aumento en la integridad capilar y la formación de una red vascular. El factor de crecimiento VEGF juega un papel fundamental en los primeros eventos de este proceso [37].

La vasculatura del tumor es aberrante, lo que da lugar a una heterogeneidad del microambiente del tumor, con una variación en la concentración de oxígeno, factores nutricionales y productos de desecho metabólicos. Por lo tanto, la angiogénesis tumoral es el resultado de un desbalance entre factores pro-angiogénicos, como VEGF, y factores anti-angiogénicos, como la angiostatina [39].

2.4 Vía de señalización PI3K/Akt, VEGF y angiogénesis.

Esta vía de señalización es el mecanismo principal por medio del cual VEGF presenta efectos anti-apoptóticos en células endoteliales. La activación de la molécula PI3K se da inmediatamente después de la unión de Shb (*SH2 Domain Containing Adaptor Protein B*, proteína adaptadora que interactúa con receptores tirosina cinasa iniciando una respuesta celular que depende del estímulo dado por algún factor de crecimiento (Genecards; Holmqvist et al.) con el residuo Tyr 1115 fosforilado de VEGFR2. Cabe recalcar que el mecanismo de activación de PI3K dado por Shb todavía no está claro, pero puede que involucre la activación a través de su fosforilación, en la subunidad reguladora de PI3K p85, lo que libera la subunidad catalítica de PI3K "p110", la cual como consecuencia fosforila a PIP2, para producir PIP3. Posteriormente la señalización continúa como se ha mencionado antes; PIP3 se une directamente a Akt provocando que se ancle a la membrana, donde es fosforilada por PDK1. Esto permite que Akt pueda activar diferentes vías de señalización en estas células endoteliales relacionadas principalmente con supervivencia celular y producción de óxido nítrico [40,41].

Dentro de las cascadas de señalización que son activadas por Akt se encuentran aquellas envueltas en supervivencia endotelial a corto o largo plazo; Akt fosforila de manera directa y por lo tanto inhibe las proteínas pro-apoptóticas Bad, caspasa 9 y el factor de transcripción FOXO (familia Forkhead). Cuando Bad es fosforilada, no puede unirse a Bcl-2 (*B-Cell CLL/Lymphoma 2*; proteína anti-apoptótica), la cual se une a Bax/Bak, previniendo la formación de poros en la membrana mitocondrial y la subsecuente difusión al exterior de citocromo C, que inicia la cascada de caspasas. Se especula que la supervivencia a largo plazo es mediada por una regulación positiva de proteínas encargadas de inhibir la apoptosis, principalmente Bcl-2, survivina y XIAP (inhibidor de proteínas ligado al cromosoma X) como se muestra en la Figura 10 [40,41].

También, PI3K/Akt induce angiogénesis ya que Akt tiene la capacidad de fosforilar la sintasa de óxido nítrico epitelial (eNOS), en el residuo de serina 1177 (Figura 12), lo que promueve la inducción de óxido nítrico (NO); esta fosforilación es requerida para la migración y adhesión endotelial inducida por VEGF [39,40] ya que dicho

óxido afecta la adhesión focal (un tipo de contacto adhesivo entre una célula y la matriz extracelular a través de la interacción de proteínas transmembranales con sus ligandos extracelulares; este contacto ancla a la célula al sustrato y media la señalización tanto bioquímica como mecánica) [9,40]. Es importante mencionar que la activación de Akt dada por VEGF en células endoteliales es dependiente de la unión e integridad de la matriz extracelular, ya que esta integridad es necesaria para que los factores de crecimiento activen Akt y mantengan la viabilidad celular [9].

Aun cuando la hipoxia es el estímulo primario para la regulación a la alta del factor de transcripción HIF-1 α , la activación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) así como la vía de señalización PI3K/Akt, pueden contribuir a un aumento en HIF-1 α , lo que tiene como consecuencia un aumento en la expresión de VEGF. Esta vía de señalización aumenta los niveles proteicos de HIF-1 α sin alterar los niveles de mRNA de dicho factor de transcripción, esto indica que lo que aumenta presuntamente son los niveles de traducción de HIF-1 α , promoviendo la angiogénesis (Figura 11) [39].

La señalización de VEGF afecta de manera considerable la función tumoral, esto es independiente de la angiogénesis y permeabilidad vascular promovidas por VEGF; se ha comprobado que la señal autocrina de VEGF en las células tumorales puede promover el crecimiento, supervivencia, migración e invasión de células cancerígenas; y que estos acontecimientos están mediados por vías de señalización como PI3K/Akt como se muestra en la Figura 12 [38].

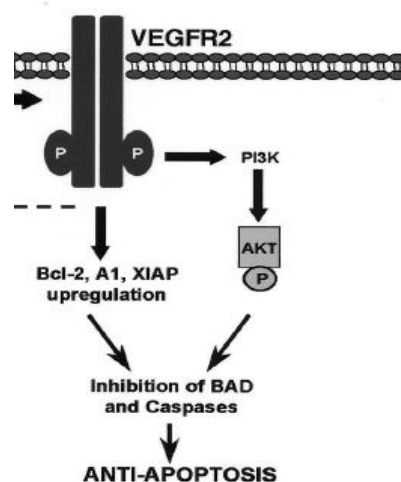


Figura 10. Supervivencia celular y apoptosis mediadas por VEGF.
 Imagen adaptada de Zachary I, Gliki G. *Cardiovasc Res.* 2001

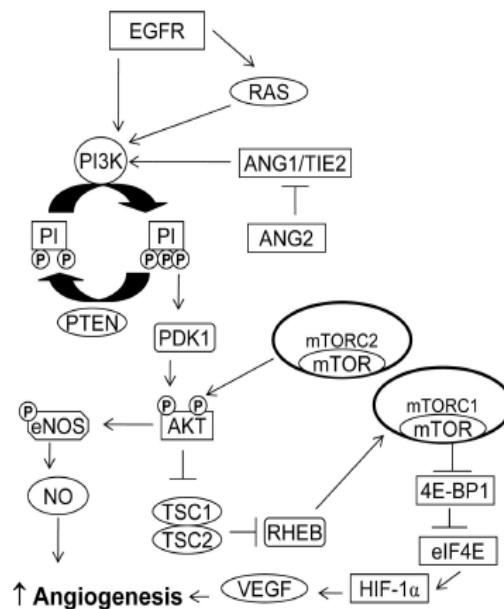


Figura 11. Vía de señalización PI3K/AKT/mTOR en angiogénesis. Imagen adaptada de Karar J1, Maity A. *Front Mol Neurosci.* 2011

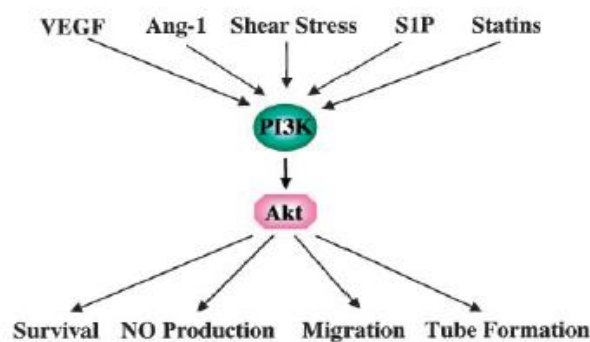


Figura 12. Activación del eje PI3K-Akt en células endoteliales. Imagen adaptada de Shiojima I, Walsh K. *Circ Res.* 2002

2.5 Terapias de uso clínico dirigidas a la vía de señalización PI3K/Akt.

Diversas alteraciones en las vías de señalización dan como resultado proliferación celular incontrolada, supervivencia, invasión y metástasis, las cuales son características y también son la base del proceso de carcinogénesis. La vía de señalización PI3K/Akt es crítica para la fisiología normal en los seres humanos, y la alteración en su regulación lleva a la generación de muchos tipos de cáncer; por esta razón, Akt es una molécula blanco bastante atractiva para la generación de fármacos dirigidos contra ella [15].

Inhibidores de proteínas que están involucradas en la vía de señalización PI3K/Akt han estado en desarrollo por algún tiempo, y algunas de estas moléculas se encuentran actualmente en ensayos clínicos. Estos inhibidores utilizados por sí solos o en combinación con terapias existentes, permiten explotar la activación de dicha vía de señalización dentro de las células cancerígenas y/o aumentar la eficacia de los agentes quimioterapéuticos [8].

La inhibición de Akt por sí sola, o bien, en combinación con quimioterapéuticos estándares puede reducir el evento de apoptosis y matar preferentemente a las células cancerígenas. El desarrollo de inhibidores específicos y potentes permite que esta hipótesis sea probada en animales. La mayoría de estas moléculas son inhibidores ATP competitivos, los cuales tienen poca especificidad; análogos de fosfatidilinositol (PI), los cuales aun cuando inhiben a Akt también pueden presentar problemas de especificidad (ya que otras proteínas también tienen el dominio PH), así como baja biodisponibilidad; existen de igual manera inhibidores los cuales tienen como blanco moléculas río arriba o río abajo de Akt, los cuales se ha demostrado que tienen la habilidad de revertir el fenotipo de las células cancerígenas que expresan una alteración en Akt [16]. Los distintos tipos de inhibidores clínicos se presentan en la Figura 13.

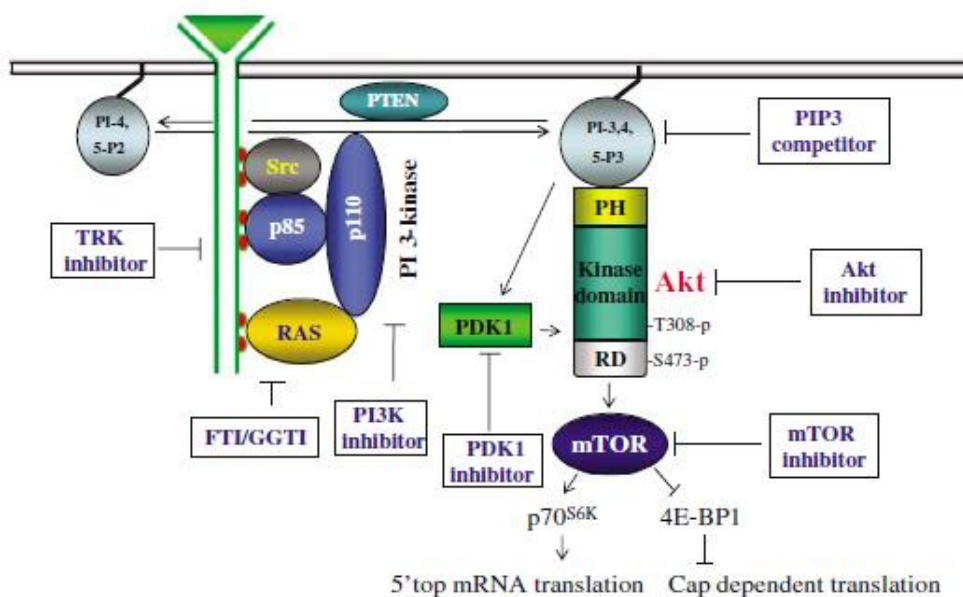


Figura 13. Inhibidores terapéuticos dirigidos contra Akt así como a reguladores río arriba y abajo de la vía de señalización.

Imagen adaptada de Cheng JQ et al. Oncogene. 2005.

2.5.1 Inhibidores río arriba de PI3K/Akt.

2.5.1.1 Inhibidores de PDK1.

PDK1 (*phosphoinositide- dependent kinase-1*, en inglés) es una serina treonina proteína cinasa capaz de fosforilar y activar un número considerable de proteínas pertenecientes a la superfamilia de cinasas AGC. Los tres miembros de Akt fueron los primeros sustratos de PDK1 identificados y caracterizados. PDK1 fosforila el “nudo” de activación de Akt (también llamado el *T-loop*) en el residuo Thr308, el cual es el que regula principalmente la activación de Akt; por esta razón, un inhibidor de PDK1 podría bloquear significativamente la activación de dicha cinasa [16].

Existen cuatro potentes inhibidores de PDK1: BX-795, BX-912 ,BX-320 (Feldman *et al.* 2005) y UCN-01 (Sato *et al.* 2002) que actúan a concentraciones nanomolares; se reportó que estos inhibidores bloquean la señalización Akt/PDK1 en una variedad de células tumorales, resultando en la inhibición de proliferación celular y la inducción de apoptosis [16].

2.5.1.2 Inhibidores de PI3K.

Fosfatidil-inositol-3 cinasa (PI3K) constituye una familia de lípido cinasas caracterizadas por su capacidad de fosforilar el grupo 3'-OH en los inositol fosfolípidos [15].

La disrupción de la vía de señalización PI3K/Akt ha sido blanco de dos inhibidores de PI3K: wortmanina y LY294002 [16]. La wortmanina es un metabolito fúngico y es un inhibidor dirigido a PI3K tipo I; tiene actividad antitumoral en estudios *in vitro* e *in vivo*; lo que hace esta molécula es inhibir la actividad de PI3K por medio de la unión covalente a residuos de lisina conservados en el sitio de unión de ATP de dicha enzima. La principal desventaja en el uso de este compuesto es que tiene poca estabilidad en ambientes acuosos, lo que puede limitar su uso en ensayos clínicos. LY294002 (Oncothyreon) es un derivado flavonoide el cual es un inhibidor competitivo y reversible del sitio de unión de ATP de PI3K [8,16].

Diferentes estudios han demostrado que tiene por sí solo efectos antiproliferativos y proapoptóticos. Aun cuando el uso de estos fármacos por sí solos da como lugar la inhibición de esta vía de señalización teniendo como consecuencia un bloqueo en la proliferación celular y el crecimiento tumoral así como promoción de la apoptosis, sus efectos pueden mejorar si se combinan con radiación o fármacos quimioterapéuticos tradicionales [8,16].

También Plamed ha reportado que derivados de la imidazopiridina presentan excelente actividad inhibitoria contra la subunidad catalítica p110 alfa de esta cinasa ; Novartis ha descrito que los derivados 5-feniltiazoles son inhibidores de PI3K, y la compañía Kinacia reporta a los inhibidores quinolona y piridopirimidina [16].

2.5.1.3 Inhibidores de receptores tirosina cinasa (RTK's).

Dentro de los RTK's, el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y el receptor tirosin cinasa 2 Erb-B2 (ERBB2), se encuentran frecuentemente alterados en cáncer, y activan principalmente la vía de señalización PI3K/Akt [16]; por esta razón, se han diseñado pequeñas moléculas que inhiben a las tirosin cinasas y anticuerpos humanizados (anticuerpo humano que contienen una pequeña porción de anticuerpo monoclonal de ratón o rata) contra los dominios extracelulares de este tipo de receptores [8,16]. De manera muy breve, los anticuerpos se unen al dominio extracelular de los RTK's, inhibiendo su activación por ligando y promoviendo la internalización del receptor así como su regulación a la baja; mientras que las pequeñas moléculas inhiben competitivamente la unión de ATP al receptor, evitando la consecuente autofosforilación y la activación de la cinasa PI3K [8].

Dentro de esta categoría, los compuestos más prometedores son el anticuerpo monoclonal anti-receptor IMC-C225 (cetuximab; Imclone), y las pequeñas moléculas inhibitorias de EGFR reversibles: ZD1839 (gefitinib;AstraZeneca) y OSI-774 (erlotinib; OSI Pharmaceuticals) [8]. En la clínica, los últimos dos han presentado actividad antitumoral en cáncer de próstata, de pulmón y en cáncer de cabeza y cuello [16].

Otras pequeñas moléculas dirigidas a EGFR incluyen a PKI116 (Novartis), GW2016 (GlaxoSmithKline), EKB-569 (Genetics Institute/Wyeth–Ayerst) y CI-1033 (Pfizer), y se encuentran en etapas tempranas de ensayos clínicos. También está el anticuerpo monoclonal anti-receptor trastuzumab (Herceptin), desarrollado por Genetech [8].

2.5.2 Inhibidores de Akt.

Algunas clases de inhibidores específicos de Akt incluyen agentes cuyo blanco es el dominio homólogo a la pleckstrina (PH) o al sitio de unión de ATP de dicha cinasa, así como inhibidores alostéricos. Estos inhibidores disminuyen el crecimiento de células tumorales e inducen la regresión de tumores Akt-dependientes *in vivo*. Perifosina (Keryx Biopharmaceuticals), inhibidor del dominio PH, es el más clínicamente estudiado y el que se encuentra en la etapa más avanzada del ensayo. Algunos inhibidores que se dirigen al sitio de unión de ATP son una serie de indazolpiridinas, de estas la más potente es A-443654, la cual es altamente selectiva para Akt; se ha reportado que aumenta su eficacia cuando se combina con el inhibidor de mTORC1 rapamicina. Merck identificó inhibidores de AKT que son selectivos a las distintas isoformas de esta cinasa, los más potentes son las pirazinonas AKTi-1 y AKTi-2 selectivas para AKT1 y AKT2 respectivamente [42].

2.5.3 Inhibidores análogos a fosfatidilinositol (PI).

Ya que PIP3 se une al dominio PH de Akt, este modo de inhibición previene la translocación de Akt a la membrana plasmática, y por lo tanto la subsecuente activación de esta cinasa protagonizada por PDK1. Se tiene reportado que los análogos a fosfatidilinositol éter lipídicos (PIA's) como PIA5, 6, 23, 24, y 25 disminuyen la fosforilación de moléculas río abajo de Akt sin afectar las cinasas río arriba PI3K o PDK1, induciendo apoptosis en distintas líneas celulares cancerígenas [16].

2.5.4 Inhibidores dirigidos contra moléculas río abajo de Akt.

La macrolida rapamicina y sus derivados CCI-779 y RAD001 (Novartis) inhiben al *mammalian target of rapamycin* (mTOR) [8]; el cual es una serina treonina cinasa que controla el crecimiento celular en respuesta a nutrientes y factores de crecimiento que está frecuentemente desregulada en cáncer [15]. Los inhibidores forman un complejo que interactúa con mTOR, evitando la activación de la fosfoproteína cinasa, y subsecuentemente la fosforilación de moléculas río abajo. Estas moléculas están bajo desarrollo clínico y presentan actividad antiproliferativa en tumores sólidos. CCI-779 es un éster soluble de rapamicina con actividad citostática *in vitro* e *in vivo*, lo que se traduce en que inhibe el crecimiento del tumor, más que la regresión del tumor [8].

2.6 Flavonoides.

Existe una vasta evidencia en la cual se documenta que dietas ricas en frutas y vegetales protegen a los seres humanos de enfermedades crónicas, como enfermedades cardiovasculares, hipertensión, diabetes y cáncer, debido a la presencia de compuestos biológicamente activos, como los compuestos fenólicos dentro de los cuales se encuentran los flavonoides [43,44].

2.6.1 Origen de los flavonoides.

Los flavonoides, compuestos hidroxilados que son metabolitos secundarios derivados de plantas producidos como mecanismo de defensa en respuesta a condiciones de estrés bióticas o abióticas principalmente, participan en la fase de la fotosíntesis dependiente de la luz en la que catalizan el transporte de electrones [45,46,47]; estos compuestos tienen estructuras fenólicas variables y se pueden encontrar principalmente en frutas, vegetales, cereales, raíces, cortezas, flores, tallos, té y vino [45], y presentan efectos benéficos en la prevención de enfermedades por medio de la regulación de inflamación, potenciales redox, desórdenes metabólicos, apoptosis, proliferación celular, entre otros [44].

2.6.2 Química de los flavonoides: estructura y clasificación.

Los flavonoides tienen una estructura química característica de tres anillos (C6–C3–C6), consistiendo por lo tanto en compuestos que tienen una estructura benzo- γ -pirona, ya que tienen un esqueleto de 15 carbonos el cual consiste en dos anillos benceno (A y B) unidos vía un anillo pirano heterocíclico (C) como se muestra en la Figura 14 [46,48]. Se dividen en flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianinas e isoflavonas, esta clasificación se basa en la naturaleza del anillo “C” [45] como se muestra en la Figura 15.

Las distintas clases de flavonoides difieren en el patrón de sustitución y nivel de oxidación del anillo C, mientras que los compuestos dentro de las diferentes clases varían en el patrón de sustitución de los anillos A y B. [46]

Es importante mencionar que, aunque la estructura base de un flavonoide es una aglicona como se muestra en la Figura 16, los flavonoides pueden existir en la naturaleza como agliconas, glicósidos y derivados metilados [46].

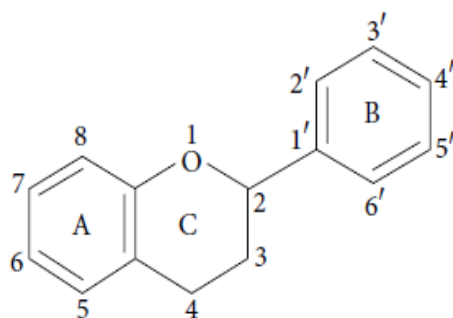


Figura 14. Estructura química base de un flavonoide.
Kumar S, Pandey AK. ScientificWorldJournal. 2013.

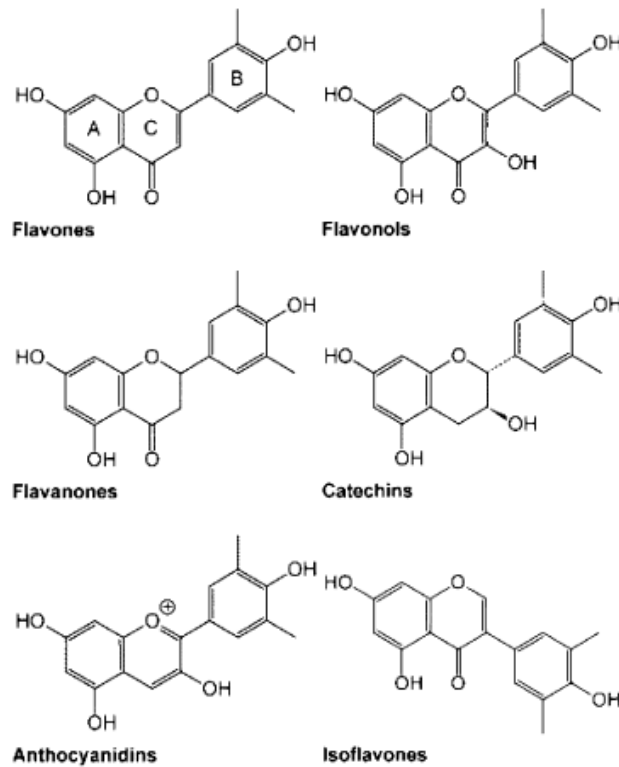


Figura 15. Estructura química de los grupos de flavonoides.
Priya Batra, et al. Biotech, 2013.

2.6.3 Síntesis.

Los flavonoides son sintetizados a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina, junto con unidades acetato. Estos aminoácidos aromáticos son convertidos en ácido cinámico y para-hidroxicinámico gracias a la acción de fenil y tirosin amonio liasas; el ácido cinámico se condensa con unidades acetato para formar la estructura cinamol de los flavonoides [45]. Las actividades de estos compuestos dependen de su estructura, grado de hidroxilación, otras sustituciones y conjugaciones, así como de su grado de polimerización [46]. La biotransformación de los flavonoides en el intestino puede liberar los derivados del ácido cinámico (ácidos fenólicos) [45].

2.6.4 Metabolismo y absorción.

La mayoría de los flavonoides en los alimentos (excepto las catequinas) existen como glicósidos, los cuales suelen ser menos bioactivos en comparación con sus

agliconas [43,45]. En la Figura 16 se puede observar la diferencia entre un glucósido y una aglicona.

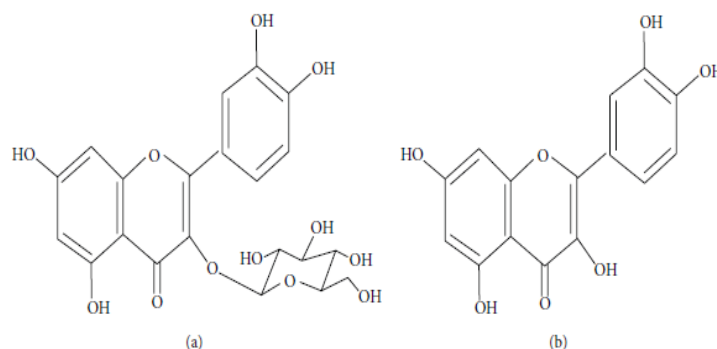


Figura 16. Estructura química de un glucósido y una aglicona.
Shashank Kumar, et al. The ScientificWorld Journal, 2013.

La absorción de los flavonoides presentes en la dieta los cuales son liberados al masticar, depende de sus propiedades fisicoquímicas como su tamaño molecular, configuración, lipofilidad, solubilidad y pKa [46].

La farmacocinética de los flavonoides es compleja [45], los flavonoides pueden ser absorbidos desde el intestino delgado, o bien tienen que llegar al colon antes de la absorción [46], esto dependerá de la estructura del flavonoide (si es un glucósido o una aglicona). Las agliconas pueden ser absorbidas fácilmente en el intestino delgado, mientras que los flavonoides que se encuentran en forma de glucósidos tienen que ser convertidos a la forma de aglicanos; los glucósidos que no pueden ser hidrolizados son transportados hacia el colon, donde se alojan bacterias que tienen la habilidad de hidrolizar los flavonoides glicosilados, pero simultáneamente también degradan las agliconas liberadas [46].

Una vez absorbidos, el metabolismo de los flavonoides ocurre a lo largo de tres caminos, los cuales son oxidación, glucuronidación y sulfonación; también pueden ser metilados o metabolizados a compuestos fenólicos más pequeños [46,49]. La fracción del azúcar que compone a los glucósidos es un determinante muy importante en su absorción, [49] por lo que la solubilidad juega un papel elemental en la eficacia terapéutica de los flavonoides [46]. Los flavonoides glicosídicos se absorben en menor proporción debido a su naturaleza hidrofílica [49].

Del 5-10% de la cantidad consumida es absorbida en el intestino delgado, y la mayor parte de este porcentaje absorbido en el duodeno entra a circulación en su forma metilada, o como conjugados sulfatados, glucurónidos o conjugados de glicina. El 90-95% restante ingerido es dirigido al colon, donde es metabolizado por la microflora. Puede que las transformaciones sean muchas e incluyen la remoción de azúcares, hidroxilos fenólicos, hidrogenación, entre otros [45].

Por lo tanto, los flavonoides que son secretados con la bilis en el intestino y aquellos que no pueden ser absorbidos en el intestino delgado son degradados en el colon por la microflora intestinal la cual también rompe la estructura de anillo de dichos compuestos [46]. La vida media varía mucho, y va desde 1h hasta valores que exceden las 20h, dependiendo de la estructura química del flavonoide [45]. La excreción se da después de que se forman estos conjugados y por dos salidas. Los no solubles en agua se excretan junto con la bilis al duodeno, y los solubles a las vías urinarias con la orina, siendo esta última la salida predominante [50].

2.6.5 Nobiletina.

Nobiletina (5,6,7,8,30,40-hexamethoxyflavona) es un polimetoxiflavonoide bioactivo (Figura 17), el cual se encuentra en la cáscara de cítricos como los limones y las naranjas [51,52]. Se ha reportado que este flavonoide tiene múltiples actividades biológicas [51], incluidas propiedades antitumorales, antiinflamatorias, anticancerígenas, antimetásticas, antidiabéticas y neuroprotectoras [51,52,53]. Se ha encontrado también que induce arresto del ciclo celular y apoptosis en líneas celulares tumorales [54].

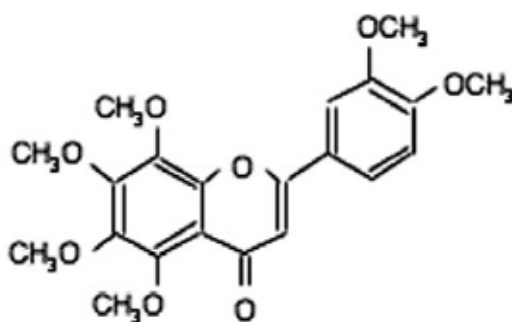


Figura 17. Estructura química del flavonoide nobiletina.
Yoshiki Miyata, et al. Elsevier 2008.

3. Antecedentes.

3.1 Nobiletina y cáncer.

La ingesta de frutos cítricos es considerada beneficiosa para la salud [45] debido a su alto contenido de metabolitos secundarios como los flavonoides. Dentro de las propiedades de estos compuestos presentes en los cítricos, existe un gran número que son beneficiosas para la salud incluyendo efectos biológicos como actividades anticarcinogénicas y antitumorales [55]; también tienen un efecto preventivo contra la inflamación e hipolipidemia; además de que regulan el síndrome metabólico y retrasan el inicio de Alzheimer [56]. Existen estudios epidemiológicos que señalan que el consumo de flavonoides está relacionado a una reducción en el riesgo de contracción de algunos tipos de cáncer así como de enfermedades crónicas [55]. Como mencionamos anteriormente, la nobiletina es una flavona polimetoxilada la cual se extrae de la cáscara de cítricos, principalmente la naranja y la mandarina [52]. Se ha reportado que este flavonoide tiene amplio potencial como agente anticancerígeno gracias a su actividad antiproliferativa contra líneas celulares humanas tumorales; algunas de estas líneas son HT-29 (células colorrectales), MCF-7 (cáncer de seno), y SMMC-7721 (células de carcinoma hepatocelular) [68], además de cánceres como carcinoma de células escamosas, gliosarcoma, leucemia, melanoma, carcinoma gástrico, de próstata y de pulmón [54].

Existen estudios en los cuales se demostró que nobiletina atenúa la metástasis en células de carcinoma nasofaríngeo por medio de la inhibición de la fosforilación de ERK (*extracellular signal-regulated kinase*); también tiene la capacidad de bloquear la proliferación celular por medio del arresto G0/G1 en células de cáncer de mama [54]. Asimismo, se ha reportado que nobiletina suprime la angiogénesis *in vitro* en células umbilicales endoteliales humanas, además de presentar una actividad moduladora en la diferenciación celular [51]. También se ha demostrado que posee la habilidad de suprimir altamente la expresión y producción de metaloproteinasas (MMP-7) [53]; así como la atenuación de la metástasis por medio de las vías de señalización ERK y PI3K/Akt en células de cáncer de hígado HepG2 [58].

Respecto a la relación que tiene Nobiletina con la regulación de la expresión de la vía AKT/PI3K en cáncer, existe una vasta cantidad de literatura; se ha reportado que el flavonoide es capaz de inhibir la viabilidad celular, crecimiento tumoral y angiogénesis de cáncer de ovario por medio de la regulación de Akt [51], además de provocar arresto en el ciclo celular, así como la inhibición de la migración en células de glioma lo que evidencia su actividad anti-metástica [52] y la supresión de la invasión y migración de células de adenocarcinoma por medio de la vía de señalización FAK/PI3K/AKT [53].

4. Justificación.

Como se mencionó anteriormente, el cáncer escamoso de cabeza y cuello es a nivel mundial el sexto carcinoma más común [10], y aun cuando existen alternativas para este tipo de cáncer, el porcentaje de personas que sobreviven es muy poco y no ha mejorado en los últimos años [12,13]. Las terapéuticas para este carcinoma son cirugía, radioterapia o quimiorradiación dependiendo el grado de avance del mismo [11]. Las células cancerígenas presentan mutaciones las cuales pueden incrementar la actividad de oncogenes o inactivar la función de los genes supresores de tumores. [1] Las mutaciones varían dependiendo el tipo de cáncer y de línea celular; en el caso del carcinoma de cabeza y cuello, existen mutaciones somáticas, así como cambios genéticos que indican que la vía de señalización Akt/PI3K está frecuentemente hiperactivada [12]. La serina/treonina proteína cinasa Akt, es un regulador crucial de una vasta cantidad de procesos celulares dentro de los que se encuentra la apoptosis, proliferación, diferenciación y metabolismo [22]. Además, investigaciones recientes muestran que esta vía de señalización juega un papel importante no solamente en el desarrollo de tumores, sino también en la respuesta que tiene el tumor al tratamiento de cáncer ya que la activación de esta vía de señalización provoca la resistencia a fármacos quimioterapéuticos [8,59]. Por lo que la identificación de inhibidores de esta vía es un campo muy atractivo y actualmente grupos de investigadores están prestando especial atención a productos naturales que pueden ser más seguros y menos tóxicos que los convencionales [59]. Existen muchos compuestos derivados de plantas que actualmente son utilizados como agentes anticancerígenos como el taxol, vinblastina o vincristina, por mencionar algunos; en la dieta existen una amplia variedad de flavonoides (metabolitos

secundarios) con un amplio espectro de actividades farmacológicas dentro de las cuales se encuentra su papel potencial como agentes anticancerígenos, además de ser agentes protectores en la prevención de enfermedades [43]. El flavonoide polimetoxilado nobiletina, el cual se encuentra en la cáscara de naranjas o mandarinas, tiene una gran variedad de propiedades dentro de las que destacan la supresión de la inflamación, así como un efecto anti-angiogénico, anti-proliferativo, antioxidante y neuroprotector [51]. Existe evidencia que demuestra que muchas de estas propiedades en células cancerígenas tienen relación con la regulación que ejerce este flavonoide en la vía de señalización Akt/PI3K [51,52 ,53 ,60].

5. Objetivos.

- Objetivo General.

Evaluar el efecto del flavonoide nobiletina sobre la regulación de la vía de señalización Akt/PI3K , así como en la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en la línea celular de cáncer de hipofaringe *FaDu*.

- Objetivos particulares.

Evaluar el efecto de nobiletina sobre la viabilidad celular de la línea celular *FaDu* por medio del ensayo MTT.

Evaluar el efecto del flavonoide nobiletina sobre la expresión de la cinasa central de la vía PI3K/AKT, así como de una proteína río arriba y río abajo de esta cascada de señalización por medio de *Western Blot*.

Evaluar si nobiletina tiene algún efecto inhibitorio sobre la fosforilación de estas cinasas utilizando *Western Blot*.

Evaluar si nobiletina presenta actividad anti-migratoria y anti-metastásica sobre estas células mediante la técnica de *Wound Healing*.

Evaluar el efecto de nobiletina sobre la expresión de VEGF mediante ELISA.

Evaluar si el flavonoide nobiletina presenta un efecto anti-angiogénico sobre las células *FaDu* por medio del análisis de los niveles de mRNA de VEGF utilizando la técnica de RT- PCR y determinar si este efecto tiene relación con la vía de señalización Akt/PI3K.

6. Hipótesis.

Si el flavonoide nobiletina presenta un efecto citotóxico, anti-metástico, y anti-angiogénico en la línea de células de cáncer de faringe *FaDu*, entonces se verá una disminución en la viabilidad y migración celular, lo cual podría estar relacionado con la expresión, activación o inhibición de proteínas involucradas en la vía de señalización Akt/PI3K, así como del factor de crecimiento endotelial VEGF.

7. Materiales y métodos.

7.1. Reactivos y equipo.

Agitador magnético.	Centrífuga (Thermo Scientific).
Balanza (Sartorius).	Espectrofotómetro (Farmacia Biothec).
Baño (Riossa).	Fuente de poder para cámara de transferencia (Bio-Rad).
Baño seco (Bio-dynamics).	Fuente de poder para cámara de electroforesis (OWL).
Cajas de cultivo celular de 6 pozos (Corning).	Incubadora (SANYO).
Cajas Falcon (Corning).	Lector de placas (BioTek).
Cámara (iDu LabCam) .	Microscopio de objetivos invertidos. (Olympus CK2).
Cámara de electroforesis vertical (Amersham Biosciences).	Micropipetas.
Cámara de transferencia (Bio-Rad).	Sonicador (Ultrasonic Processor).
Campana de flujo laminar. (The Baker Company).	Tubos clínicos.
	Tubos Eppendorf.

7.2 Programas empleados.

DIGI-DOC	GraphPad Prism
GEN 5	LabWorks
	ImageJ.

7.3 Metodología.

7.3.1 Cultivo celular.

El objeto de investigación de este estudio fue la línea celular de cáncer de faringe *FaDu*(ATCC® HTB-43) la cual se creció y mantuvo en el medio celular Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (SIGMA D-7777) que contiene rojo fenol. Las

células se cultivaron a 37°C en atmósfera humidificada de 5%CO₂. El medio de cultivo fue suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% (GIBCO BRL cat.no. 10099-141) inactivado por calor, y antibiótico-antimicótico (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina) de GIBCO BRL cat.no. 15240-096 el cual se cambió cada dos o tres días.

7.3.2 Ensayo de viabilidad celular (MTT).

Con la finalidad de evaluar la supervivencia celular frente a la exposición de nobiletina, se llevó a cabo el ensayo de citotoxicidad MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; azul de tiazolilo). Las células *FaDu* fueron tomadas de una caja falcon con la confluencia adecuada, se tripsinizaron (GIBCO BRL no. cat. 25200-072) y posteriormente sembradas en cajas de 96 pozos (20µL del medio) para después incubarse por 24h. Posteriormente, las células se trataron con el vehículo (DMSO 0.01%) o nobiletina a las siguientes concentraciones: 0,50,100,150 y 200 µM; a los tiempos de 24,48 y 72h por sextuplicado. Al finalizar el tratamiento, se midió la viabilidad celular adicionando 50 µL de la solución de MTT 1mM a cada uno de los pozos y se incubó por un periodo de 4h a 37°C. Una vez cumplido el tiempo, el medio se removió y los cristales formados (formazán) se solubilizaron en 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) midiéndose posteriormente espectrofotométricamente en el lector de placas a una longitud de onda de 550 nm. El porcentaje de células viables se estimó comparando con las células control (sin tratamiento). Cada experimento se realizó por duplicado.

7.3.3 Tratamiento celular.

-Curso temporal.

Las células *FaDu* se trataron con solución de trispisna (GIBCO BRL no. cat. 25200-072) y se colocó 80 µL en cajas de 6 pozos en medio DMEM 10% SFB. Después de 24h, cuando las cajas alcanzaron la confluencia adecuada, se sometieron a ayuno retirando el medio utilizando una bomba de vacío y se colocó la cantidad de DMEM al 2%SFB correspondiente por un periodo de 1h a 37°C. Cumplido el tiempo, se adicionó la cantidad del flavonoide nobiletina (llevando a una concentración de 100 µM) a 6 diferentes tiempos: 0 (basal), 15, 30, 60,90 y 120 minutos.

-Dosis respuesta.

Las células *FaDu* se crecieron en cajas de 6 pozos con medio DMEM 10% SFB. Después de 24 h, al alcanzar la confluencia adecuada, se sometieron a ayuno con medio DMEM sin suero toda la noche. Posteriormente, se les añadió medio DMEM 2% SFB (a excepción del blanco) y se incubaron con el flavonoide nobiletina a las siguientes concentraciones: 5, 10, 25 y 50 μM por 2 horas. Posteriormente se extrajo el RNA total.

-Inhibidores de PI3K.

Las células *FaDu* se crecieron en cajas de 6 pozos con medio DMEM 10% SFB por un periodo de 24 h para después someterlas a ayuno con medio DMEM sin suero durante toda la noche. Posteriormente, se incubaron con los inhibidores wortmanina y L294002 a una concentración de 0.1 μM y 100 μM con y sin DMEM 2% SFB por 2 horas. Finalizado el tiempo se procedió a extraer el RNA total.

7.3.4 Ensayo de Western Blot.

Después del tratamiento celular utilizando cajas de 6 pozos, el medio fue retirado utilizando una bomba de vacío, se añadió 1 μL de ortovanadato de sodio 1mM y se despegaron las células raspando cada uno de los pozos; el homogenizado se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm (6000 g) y 4°C. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se añadió a la pastilla celular se le añadió 30 μL de Buffer de Lisis (Tris-HCL 50 mM, NaCl 150 mM, 1% Nonidet P-40, leupeptina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, aprotinina 50 g/ml , Na_3VO_4 0.4 mM, NAF 10 mM y $\text{Na}_3\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM) con la finalidad de lisar las células. Las muestras fueron sonicadas en hielo por 30 s a pulsaciones continuas de 30 Watts. Se cuantificó la proteína total utilizando el Método de Bradford realizando una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA; 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a una longitud de onda de 595 nm. Se preparó 32 μg de las muestras utilizando Buffer de carga (Azul de Coomassie 5%, β - mercaptoetanol), se desnaturalizaron dichas muestras por medio de un baño seco a 65°C por 10 minutos, y se corrieron en geles SDS-PAGE al 10% en cámara de electroforesis (Amersham Biosciences) a 96 V durante 1 hora.

Las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF (GE Healthcare) 120V, 1h en una cámara semi-húmeda y bloqueadas con una solución TBS 1X (Tris-HCl 5M pH 7.5 y NaCl 1.5M) con leche libre de grasas al 5% y Tween-20 (0.1 %) por 1h con la finalidad de evitar uniones no específicas. Las membranas se lavaron con Buffer de lavado (TBS 1X con 500 μ L de Tween-20 (TBST)) tres veces, cada lavado de 10 minutos y posteriormente se incubaron con la dilución del anticuerpo primario específico en TBST en agitación, a 4°C toda la noche. Subsecuentemente, las membranas se lavaron de nuevo con TBST (2 lavados de 10 min cada uno) y se incubaron con la dilución (1:10000) del anticuerpo secundario (*horseradish peroxidase-conjugated*) correspondiente en TBST por 2h, en agitación y a temperatura ambiente. Después de lavar las membranas 3 veces por 10 minutos con TBST, se procedió a la detección de bandas utilizando un kit de quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotechnology) y se expuso en placas fotográficas (GE Healthcare). La cantidad de proteína se determinó cuantitativamente por medio de densitometría utilizando los programas DIGI-DOC y LabWorks. Cada uno de los resultados se comparó con su basal correspondiente, considerando al basal como el 100%. En los resultados se muestran las figuras de los experimentos representativos.

Los anticuerpos empleados en este estudio y sus diluciones correspondientes fueron los siguientes:

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Dilución
AKT/PKB (PH domain)	α -rabbit	1:1000
p-AKT 1/2/3 (Ser 473)	α -rabbit	1:1000
GSK3- β (Ser 9)	α -goat	1:1000
p-GSK3- β (Ser 9)	α -goat	1:1000
PI3Kinase (p85 α)	α -rabbit	1:1000
p-PI3Kinase (p85 α)	α -goat	1:1000

7.3.5 Ensayo de migración celular.

Con la finalidad de evaluar la motilidad celular, se realizó el ensayo de *Wound healing*; las células *FaDu* fueron cultivadas en medio DMEM 10% en cajas de 6 pozos hasta una confluencia del 80-90%. Sin retirar el medio, se realizó una incisión en el centro de la monocapa de células con una punta de 30 μL a lo largo de cada pozo, cuidando que se mantuviera el ancho a lo largo de dicha incisión. Los restos de las células que se despegaron al momento de realizar la herida fueron removidos con vacío y posteriormente se lavó cada pozo dos veces con PBS estéril con la finalidad de remover completamente las células que se despegaron. Las células fueron incubadas media hora con el inhibidor de proliferación AraC 10 μM en medio fresco y posteriormente fueron tratadas con o sin el flavonoide (nobiletina) a una concentración de 100 μM y el cierre de la herida se observó a través del microscopio invertido. Se tomaron fotografías utilizando el objetivo 10X en tres campos distintos a diferentes tiempos: 0, 6, 9, 12 y 24h y se midió el área libre de células con ayuda del software ImageJ, haciendo los cálculos correspondientes para obtener el porcentaje de migración.

7.3.6 Ensayo de extracción de mRNA.

Las células *FaDu* se sometieron al siguiente tratamiento: se crecieron en cajas de 6 pozos en medio DMEM 10% SFB hasta alcanzar una confluencia del 80% aproximadamente. Posteriormente, se succionó el medio con vacío y se colocó 1 μL de medio DMEM sin suero. Se añadió medio DMEM 2% SFB en cada pozo y se dejó incubar por los siguientes tiempos: 0, 1, 2, 4, 8 y 18h.

Se procedió a aislar el RNA total; para esto, se adicionaron 500 μL de trizol en hielo y se incubó por un periodo de 5 minutos con la finalidad de romper las células. Al término de la incubación el volumen se recuperó con una micropipeta y se colocó en tubos Eppendorf estériles. Se adicionaron 250 μL de cloroformo (1:49), se agitó e incubó por 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron (15 min; 10,000 rpm, 4°C). Se recuperó la fase acuosa y se colocó en otro tubo Eppendorf estéril. Se procedió a agregar 500 μL de isopropanol, se incubó por 10 min a

temperatura ambiente y se centrifugó (20 min, 10,000 rpm, 4°C) para precipitar los ácidos nucleicos. Se decantó el sobrenadante y se dejó evaporar hasta secar el *pellet*. El RNA obtenido se resuspendió en 20µL de agua tratada con dietilpircarbonato (DEPc) y se cuantificó el RNA por medio de espectrofotometría a 260 nm.

7.3.7 Reacción en cadena de la polimerasa- transcripción reversa RT-PCR.

La cantidad de 1µg de RNA obtenido previamente se transcribió de forma reversa (a cDNA) utilizando el reactivo One-step RT-PCR de Invitrogen. Los siguientes *primers* se utilizaron para llevar a cabo las amplificaciones de PCR. VEGF-S (sentido): 5'-GGAGGCTGGCAACATAACAG-3'; VEGF-A (antisentido):5' ACGTCTTGCTGAGG TAGCTC-3, el tamaño del producto es de 292 pb.; 5'-AGATCCACAACGGATAC ATT-3' (antisentido) derivado del gen gliceraldehido 3-fosfato deshidro- genasa (GADPH). Estos *primers* fueron diseñados a partir de secuencias publicadas en la base GenBank y posteriormente se obtuvo la secuencia de los mismos utilizando el programa Primer-Blast (NCBI) con la finalidad de mandarlos sintetizar a Biosearchtech (Petaluma, CA). Las condiciones de amplificación utilizadas en este proceso fueron las siguientes: 35 ciclos a 94°C por 1 min (desnaturalización), 55°C por 1 min (alineamiento) y 72°C por 1.5 min (amplificación). Los productos finales se corrieron en gel de agarosa al 2% y fueron detectados utilizando bromuro de etidio.

7.3.8 Ensayo de ELISA para evaluar VEGF.

Los niveles de VEGF en los sobrenadantes del cultivo celular fueron analizados por el VEGF (human) ELISA kit (ENZ-KIT156-0001, Enzo Life Sciences Farmingdale, NY). Las células se cultivaron en cajas de 6 pozos e incubaron por 24h. Posteriormente, las células *FaDu* se trataron con nobiletina a una concentración de 100 µM en los tiempos 0,15,30,60,90 y 120 minutos con medios DMEM al 2%. El sobrenadante se recolectó y almacenó en el Ultra a -69°C. La cantidad de VEGF presente en las muestras se midió conforme a lo establecido en las instrucciones del fabricante. Se realizó un total de 3 experimentos independientes, por duplicado y se utilizó la media del nivel de proteína de cada ensayo para realizar el análisis estadístico.

7.4 Análisis estadístico.

En el caso del ensayo de viabilidad celular, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía ($P < 0.05$) con el fin de comparar únicamente la viabilidad celular de las cinco concentraciones distintas (5 grupos). Este procedimiento se realizó en cada tiempo (24,48 y 72h) utilizando una comparación múltiple de Dunnet utilizando el programa GraphPad Prism.

Para el Western Blot y el ensayo de ELISA, se utilizó también una ANOVA de una vía ($P < 0.05$) para hacer el análisis estadístico de los duplicados de cada proteína analizada.

En el caso del ensayo de *Wound healing* el análisis fue diferente; se hizo un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, ya que el propósito era comparar las diferencias entre los dos grupos (control y tratamiento) en diferentes tiempos. El ensayo se realizó por triplicado utilizando la prueba post-hoc bonferroni en el programa GraphPad Prism.

8. Resultados.

8.1 Efecto del flavonoide Nobiletina sobre la viabilidad celular de la línea *FaDu*.

Con la finalidad de determinar si el flavonoide Nobiletina presenta un efecto citotóxico en la línea celular estudiada (*FaDu*), se realizó el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; azul de tiazolilo). Para esto, se incubaron las células en presencia o ausencia del flavonoide a diferentes dosis 0, 50, 100,150 y 200 μM por un periodo de 24,48 y 72h. Como se puede observar en la **Figura 18**, comparando con el grupo control, el flavonoide disminuyó de manera significativa la viabilidad celular de forma dosis dependiente y el efecto es más evidente a los tiempos 48 y 24h, a partir de la concentración de 50 μM .

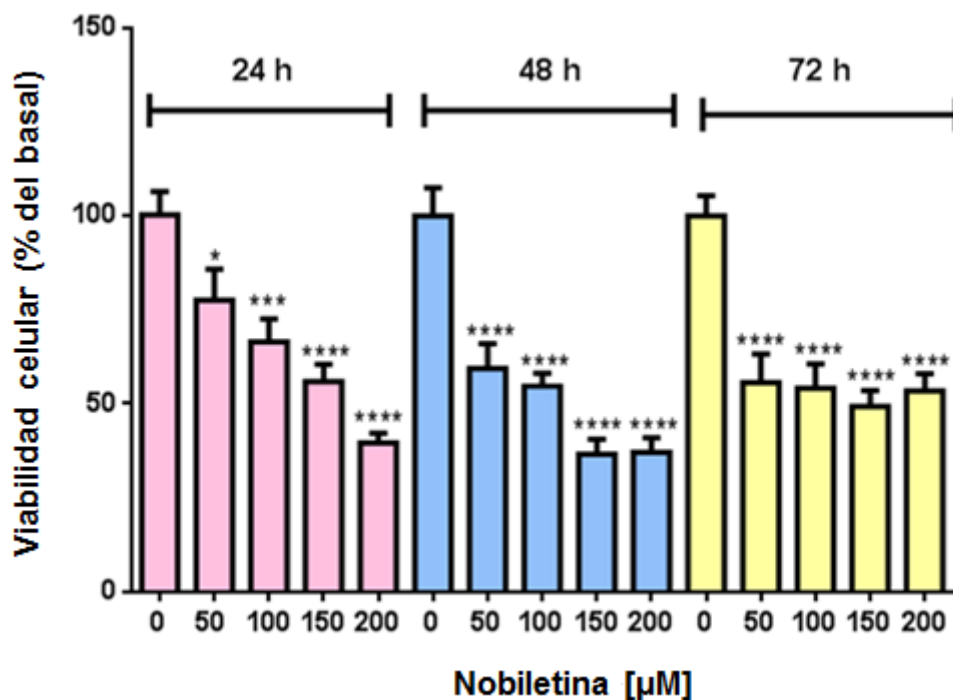


Figura 18. Efecto del flavonoide nobiletina sobre la viabilidad de las células *FaDu*. Las células se incubaron en cajas de 96 pozos por un periodo de 24h en medio de cultivo DMEM 10% SFB. Posteriormente, se expusieron a Nobiletina por un periodo de 24, 48 y 72h. Una vez completado el tiempo, se determinó la viabilidad celular por medio del ensayo de MTT. Los resultados representan 2 experimentos (cada uno por sextuplicado) independientes con la media \pm la desviación estándar. * $p < 0.05$.

8.2 Efecto del flavonoide nobiletina sobre la fosforilación de la cinasa Akt.

Debido a que ha sido reportado que el flavonoide Nobiletina ejerce un efecto inhibitorio sobre la fosforilación de la proteína Akt (proteína cinasa B) en diferentes líneas celulares [16,17,18] se determinó si los efectos anticancerígenos de este flavonoide se deben a que actúa sobre esta vía de señalización mediante el ensayo de Western Blot. Para esto, las células fueron tratadas con Nobiletina a una concentración de 100 μM en diferentes tiempos: 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. Como se observa en la **Figura 19**, en el panel A), Nobiletina inhibió de manera significativa la activación de Akt en el residuo Ser 473, lo cual se ve reflejado en su desfosforilación; este efecto fue tiempo dependiente. En el panel B) las gráficas muestran la media del análisis densitométrico del *immunoblotting* de 2 experimentos independientes.

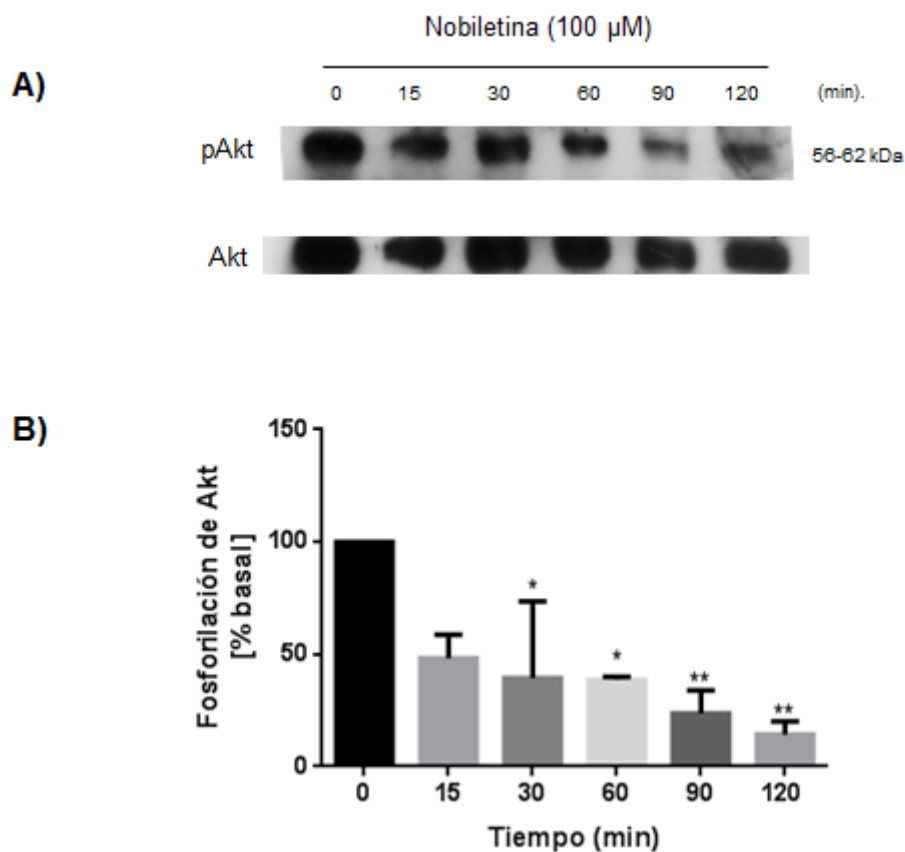


Figura 19. Efecto de la Nobiletina en la fosforilación de la proteína cinasa B (Akt). **A)** Las células fueron incubadas con el flavonoide a distintos tiempos: 0,15,30,60,90 y 120 minutos. Posteriormente, se extrajo la proteína total. Los niveles de la fosforilación de la proteína Akt fueron analizados por medio de Western Blot. Los niveles de Akt total no se ven afectados bajo el tratamiento de nobiletina **B)** La gráfica representa 2 experimentos independientes del análisis densitométrico de los datos de *Western Blot* con la media \pm la desviación estándar. * $p < 0.05$.

8.3 Efecto del flavonoide Nobiletina sobre la fosforilación de la proteína GSK3- β .

Las células *FaDu* fueron tratadas a diferentes tiempos (0,15,30,60,90 y 120 minutos) con una concentración fija de Nobiletina: 100 μ M, con el propósito de analizar si este flavonoide ejerce algún efecto sobre una de las proteínas reguladas río abajo de la vía de señalización PI3K/Akt, GSK3- β tanto de su forma basal como fosforilada, por medio de *immunoblotting*. Como se muestra en la **Figura 20**, en el panel A), comparando con el basal, el flavonoide aumentó la fosforilación a los 15 minutos, sin embargo disminuyó la fosforilación de GSK3- β en el residuo Ser 9 en los últimos tiempos sin afectar los niveles de la proteína total. El panel B) es la representación gráfica del análisis densitométrico del ensayo de WB.

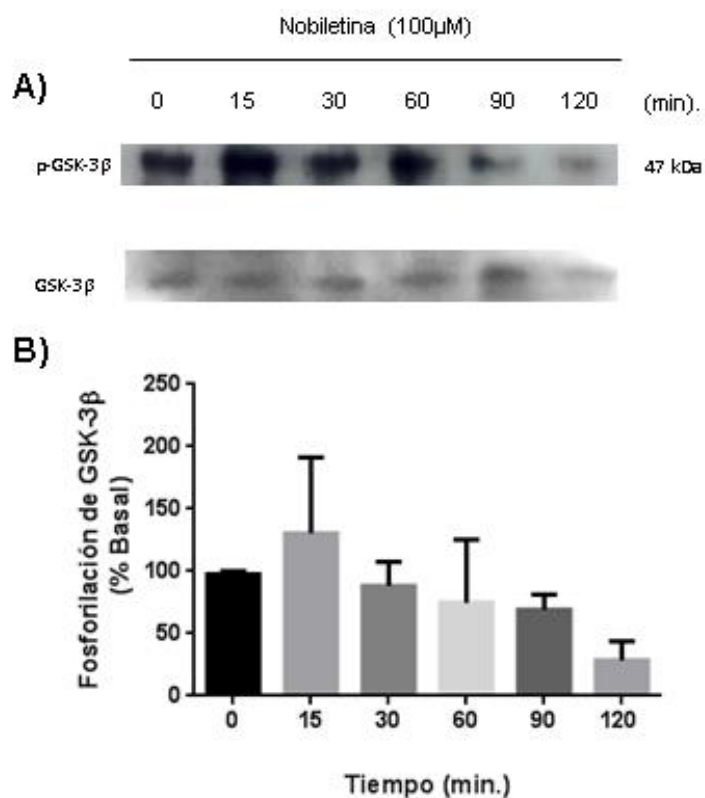


Figura 20. Efecto del flavonoide nobiletina sobre la activación de la cinasa GSK3- β en la línea celular *FaDu*. **A)** Se expusieron las células con Nobiletina (100 μ M) a seis diferentes tiempos: 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. Una vez completado el tiempo, los niveles de GSK3 β fosforilada y total fueron analizados de la proteína total por medio de Western Blot. Los niveles de GSK3 β total no se ven afectados con el tratamiento de nobiletina **B)** En la gráfica se presenta el análisis densitométrico (dos experimentos) de los datos de *Western Blot* con la media \pm la desviación estándar. * $p < 0.05$.

8.4 Efecto del flavonoide Nobiletina sobre la fosforilación de la proteína PI3K.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la Nobiletina río arriba de la vía de señalización Akt/PI3K, se midió la expresión de los niveles de p-PI3K en las células *FaDu* por medio de la técnica de Western Blot. Para su evaluación, las células se crecieron y se incubaron con el flavonoide a una concentración de 100 μ M en seis diferentes tiempos: 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. Como podemos apreciar en la **Figura 21**, en el panel A) Nobiletina suprimió de manera considerable la activación (mediante su fosforilación) de PI3K en la subunidad p85 α de manera tiempo-dependiente lo que está relacionado con una regulación a la baja de p-Akt. El flavonoide no presentó cambios en la expresión de la proteína basal. El panel B) muestra el gráfico del análisis densitométrico del ensayo de *immunoblotting*.

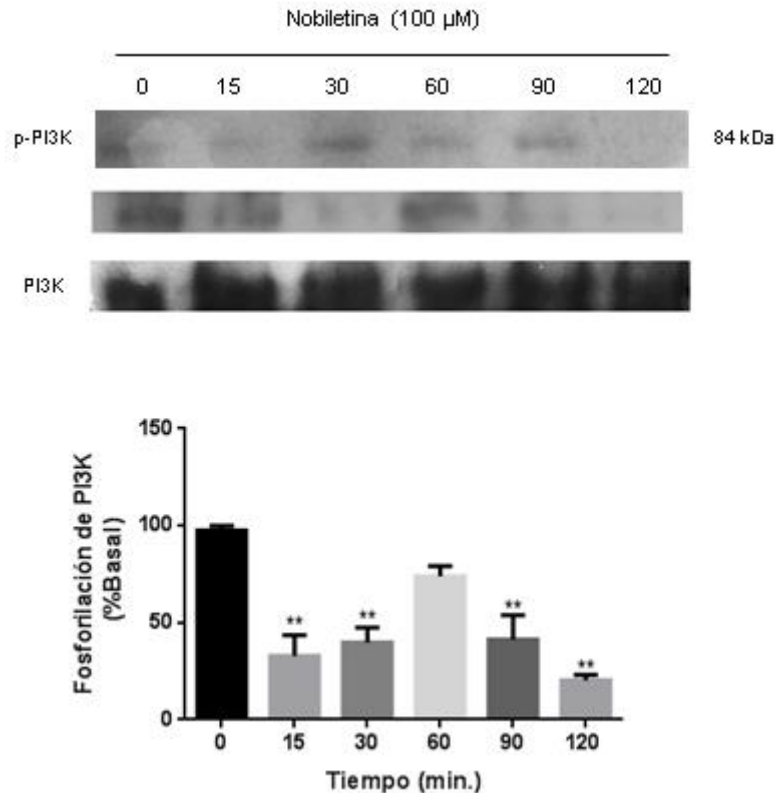
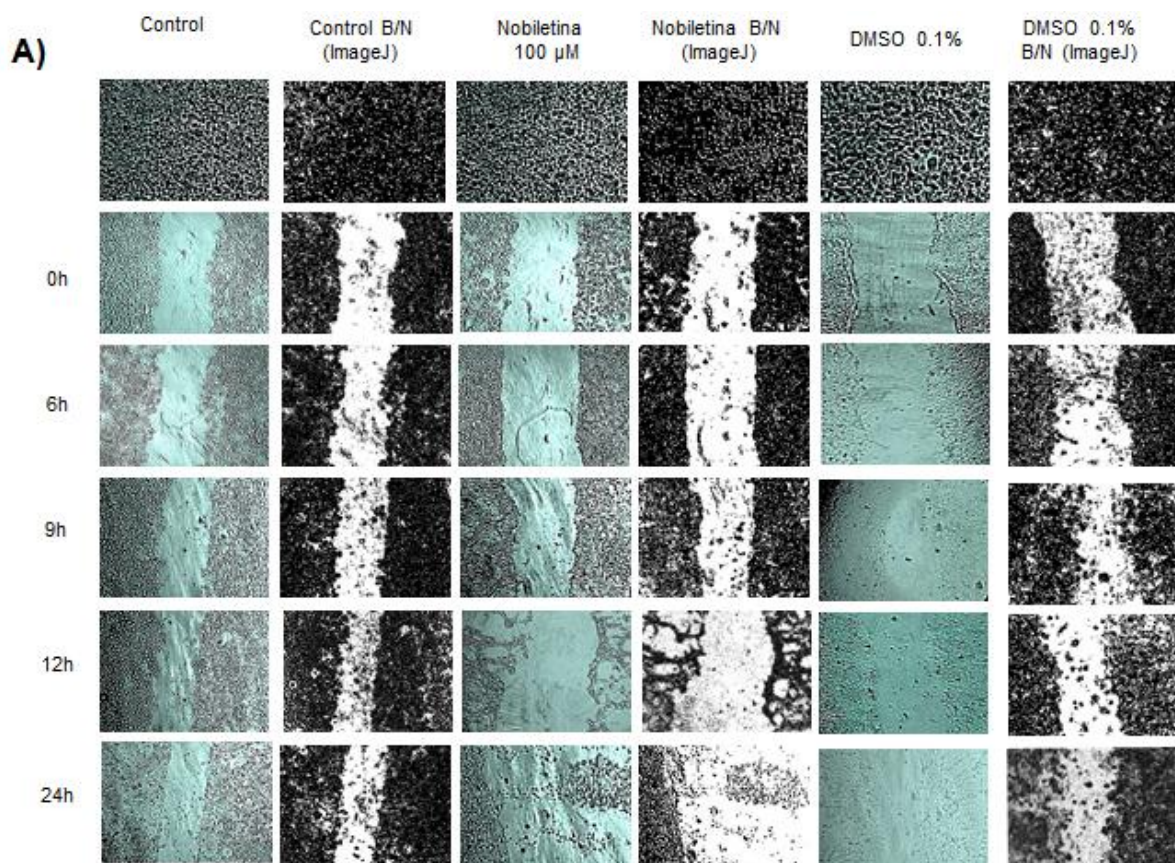


Figura 21. Efecto del flavonoide nobiletina sobre la fosforilación de la proteína río arriba de la vía de señalización de Akt, PI3K en la línea celular *FaDu*. **A)** Las células fueron incubadas con nobiletina a una concentración constante (100 μM) por 0,15,30,60,90 y 120 minutos. Los lisados totales se extrajeron y la activación de PI3K así como la expresión de la proteína total fueron analizados mediante Western Blot. **B)** Los resultados del análisis densitométrico están representados en la gráfica (tres experimentos) con la media ± la desviación estándar. *p<0.05.

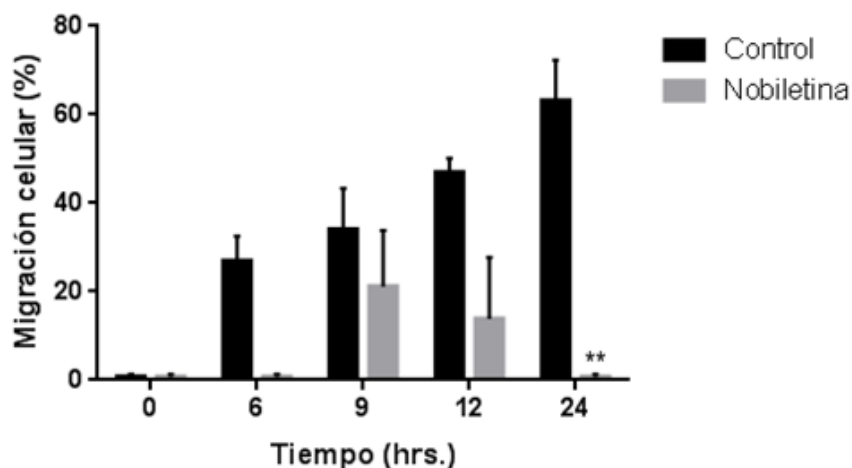
8.5 Efecto del flavonoide Nobiletina sobre la migración de la línea celular *FaDu*.

Es bien sabido que la metástasis y la invasión provocadas por el cáncer están altamente relacionados a procesos como adhesión intracelular, motilidad celular, entre otros [53]. Diversos estudios han demostrado que este flavonoide tiene la capacidad de inhibir la migración celular en distintas líneas celulares [52,53, 58,60]. El efecto que ejerce la Nobiletina sobre la migración celular fue determinado por medio del ensayo de *Wound healing*. Las células se crecieron en cajas de 6 pozos por 24h para posteriormente, realizar una incisión en la mitad de cada uno de los pozos. Una vez realizado, se incubó con o sin el flavonoide a una concentración de 100 μM y en presencia del inhibidor de proliferación y se observó en el microscopio invertido a las 0,6,9,12 y 24h de tratamiento. Es importante mencionar que a los tiempos largos (12 y 24h) las células comenzaron a desprenderse significativamente de los pozos. En la **Figura 22** panel A) observamos las imágenes de los controles de cada tiempo junto con el tratamiento del flavonoide, mientras que

en el panel B) se presenta el análisis cuantitativo de las áreas de migración (%) en forma de tabla y en el panel C) gráfica. Se puede apreciar en los grupos control como claramente la incisión es más angosta en comparación con el tratamiento en los tiempos 6 y 9h; esto puede sugerir que las células cancerígenas se desplazaron a través de la herida, presentando la propiedad de motilidad celular. Respecto a los pozos con Nobiletina, podemos observar un efecto inhibitorio de la migración a tiempos cortos (6h) donde la herida es mayor respecto al control de este mismo tiempo; a los tiempos más largos el flavonoide destruyó por completo el patrón de la incisión o herida, por lo que no fue posible hacer un análisis cuantitativo a las 24h



B)



C)

TIEMPO (h)	CONTROL	NOBILETINA (100µM)	Vehículo DMSO	
0	0	0	0	0
6	26.99	0	0	0
9	34.04	21.12	5.16	
12	46.89	13.86	10.65	
24	63.10	0	59.13	

Figura 22. Efecto del flavonoide nobiletina en la migración de las células *FaDu*. Las células se incubaron por un periodo de 24h hasta una confluencia aproximada del 80%. Se trazó una línea en medio de la monocapa de células, se lavó con PBS estéril los restos celulares que se desprendieron y se incubó con medio fresco con o sin el flavonoide (100 µM) por 0,6,9,12,y 24h. En el panel **A)** se muestran las fotografías de los controles y tratamientos a los tiempos indicados utilizando un microscopio de contraste de fases y el programa ImageJ para poder realizar el efecto blanco y negro. El panel **B)** nos muestra en una tabla y gráfica el análisis cuantitativo de las áreas en términos de porcentaje de migración celular (%). El ensayo se realizó con una n=2 con la media ± la desviación estándar. *p<0.05.

8.6 Efecto del flavonoide nobiletina sobre la expresión del Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Como se mencionó anteriormente, uno de los principales protagonistas en el proceso de angiogénesis es el factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF) [38]; por lo que procedimos a evaluar si nobiletina tiene influencia de alguna manera sobre este factor en la línea celular *FaDu*. La **Figura 23** muestra los niveles de expresión de VEGF ante la exposición del flavonoide a los tiempos 0,15,30,60,90 y 120 minutos. Contrario a lo esperado, el flavonoide en lugar de inhibir la expresión

de este factor de crecimiento, aumentó su expresión, sobre todo a tiempos cortos (15,30 y 60 minutos). Aun cuando en el tiempo 90 y 120 hay una notable disminución en la expresión, ésta nunca es menor al basal.

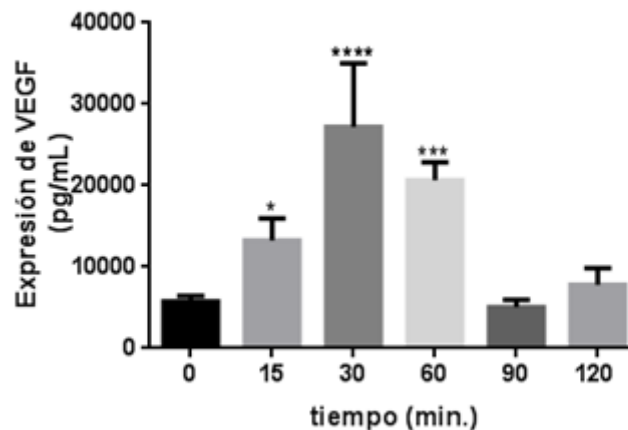


Figura 23. Expresión del factor de crecimiento endotelial (VEGF) de la línea celular *FaDu* ante la exposición del flavonoide nobiletina. Las células *FaDu* fueron cultivadas en cajas de 6 pozos en medio DMEM 10% por 24h. Posteriormente, se ayunaron en medio DMEM 2% por 1 h y se incubaron con nobiletina por 0,15,30,60,90 y 120 minutos. Se tomó el sobrenadante, y se midieron los niveles de VEGF por medio del ensayo ELISA. Se realizaron dos ensayos independientes, cada uno por duplicado y el promedio de los niveles de la proteína de cada duplicado fue utilizado para hacer el análisis estadístico. * $p < 0.05$.

8.7. Efecto del suero fetal bovino (DMEM 2%) y del flavonoide nobiletina en la expresión de VEGF y su relación con la vía de señalización Akt/PI3K.

Una vez obtenido el resultado anterior, quisimos determinar si el aumento en la expresión de VEGF se debía al flavonoide per sé o bien, a componentes presentes en el medio de cultivo celular como el suero fetal bovino, el cual dentro de sus componentes tiene diversos factores de crecimiento. Para esto, primero se quiso determinar cómo era el patrón de expresión de VEGF a nivel de mRNA ante la presencia del medio DMEM con 2% de SFB a distintos tiempos de incubación: 0,1,2,4,8 y 18h. En la **Figura 24**, panel A) podemos observar el ensayo de RT-PCR en el cual se distingue un aumento en la expresión de este factor principalmente en los tiempos más cortos (1 y 2 horas). Con este resultado, procedimos a evaluar si el flavonoide nobiletina a las concentraciones de 5,10, 25 y 50 μM tiene algún efecto sobre la expresión de VEGF a nivel transcripcional. El panel B) muestra que el flavonoide ejerce una disminución importante en los niveles de este factor de crecimiento a la concentración de 50 μM , sugiriendo que nobiletina puede presentar un efecto inhibitorio de VEGF a nivel transcripcional en células *FaDu*. Para finalizar, quisimos determinar si la producción de este factor está relacionado a la vía de

señalización Akt/PI3K. Con esta finalidad, las células *FaDu* fueron tratadas con los inhibidores de PI3K: wortmanina y LY294002. El panel C) muestra una clara inhibición en la expresión de mRNA de VEGF, lo que parece indicar que la producción de este factor de crecimiento tiene relación con esta vía de señalización. Se necesitan hacer más repeticiones de este ensayo, ya que se realizó solamente una vez.

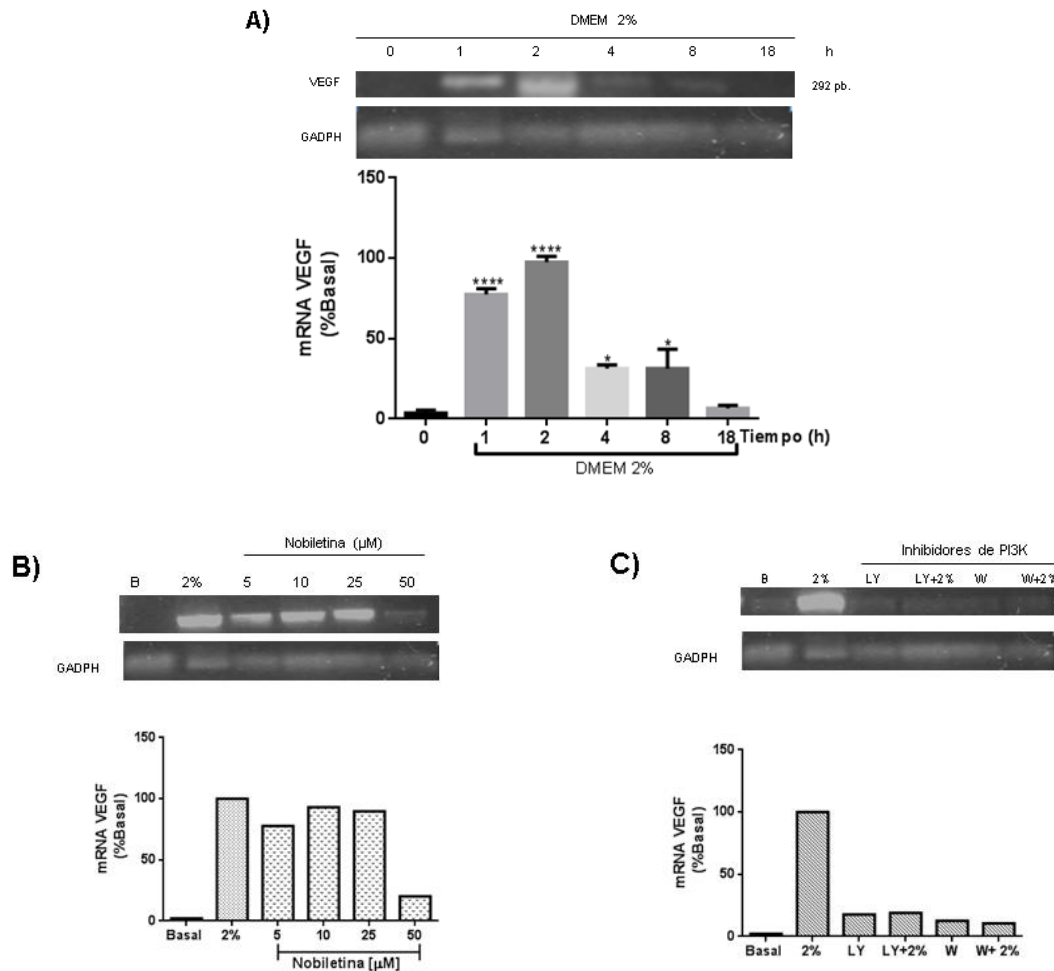


Figura 24. Expresión del factor de crecimiento VEGF de las células *FaDu* con medio DMEM 2% ,con el flavonoide nobiletina y con inhibidores de la vía Akt/PI3K. Las células fueron cultivadas en cajas de 6 pozos con medio DMEM 10% por 24h. Posteriormente se sometieron a ayuno con medio DMEM sin suero toda la noche y después se realizó el tratamiento mencionado a continuación en cada panel, para después extraer el RNA y realizar RT-PCR utilizando *primers* específicos para VEGF y GADPH. A) La células se incubaron por 0,1,2,4,8 y 18h con medio DMEM 2%; B) Las células se incubaron a las concentraciones 5,10,25 y 50 µM de Nobiletina por 2h; C) Las células se trataron con los inhibidores de PI3K: wortmanina y LY294002 a una concentración 0.1 µM y 100 µM respectivamente con y sin presencia de DMEM 2%. Se empleó GADPH como control de carga. W=wortmanina; LY= LY294002. Se realizó análisis densitométrico de un solo experimento.

9. Discusión.

En el presente trabajo evaluamos el efecto del flavonoide nobiletina en la vía de señalización Akt/PI3K en la línea celular de cáncer de faringe *FaDu*; de igual manera determinamos el efecto de este flavonoide en la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Nuestros resultados sugieren que nobiletina protagoniza un papel importante en la inhibición de la viabilidad de las células *FaDu* dependiente del tiempo y la concentración, así como una disminución en la migración celular; sugiriendo que estos efectos pueden ser debido a la modulación de componentes que forman parte de la vía de señalización Akt/PI3K, y de igual manera por medio de la expresión a nivel transcripcional del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Los compuestos naturales denominados flavonoides tienen la capacidad de inhibir una o más etapas del proceso carcinogénico, y tienen efectos tanto *in vivo* como *in vitro* en vías de señalización celulares que regulan la invasión y metástasis [60]. Recientemente, se ha encontrado que nobiletina, flavonoide polimetoxilado, exhibe actividad anti-invasiva, anti-inflamatoria, anti-tumoral, anti-carcinogénica, anti-proliferativa, anti-metastásica y neuroprotectora en distintos tipos de cáncer (Lien LM, et al. 2016; Shi MD et al. 2013) como osteosarcoma (Hsin-Lin Cheng, et al. 2016), fibrosarcoma (Yoshiki Miyata et al. 2007), cáncer de hígado (Ming-Der Shia, et al. 2013), adenocarcinoma (Yi-Chieh Lee et al. 2011), cáncer de colon (Karen L. Morley et al. 2007), glioblastoma (Li-Ming Lien et al. 2016), cáncer de ovario (Jianchu Chen et al. 2015), y cáncer de nasofaringe (Su-Yu Chien, et al. 2015). Sin embargo, su papel en la carcinoma faríngeo aún no sido esclarecido con certeza; por esta razón nos propusimos evaluar el efecto de nobiletina en la regulación de la vía Akt involucrada, entre otras cosas, en señales de supervivencia celular. El carcinoma escamoso de cabeza y cuello es la sexta causa de incidencia de cáncer a nivel mundial y puede generarse en la cavidad oral, orofaringe, hipofaringe o laringe [12]. A pesar de que el conocimiento sobre la epidemiología y patogénesis este cáncer ha incrementado en los últimos 40 años, la evidencia sobre su origen es muy escasa; esto impide mejorar el tratamiento y disminuir la mortandad. Sólo 40-50% de los pacientes con este tipo de cáncer podrá sobrevivir un máximo de 5 años [11]. A nivel molecular, las células normales adquieren características de células cancerígenas cuando las redes de señalización intracelulares transmiten señales aberrantes, lo cual resulta

en funciones celulares anormales [60]. Una de las vías de señalización que se encuentra frecuentemente alterada en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello es la vía Akt/PI3K [8,19].

Primero, determinamos si nobiletina ejerce un efecto citotóxico en las células, lo cual se refleja en su viabilidad celular; la **Figura 18** muestra que este flavonoide disminuye la viabilidad de manera dependiente a la concentración, siendo más evidente a tiempos cortos. Cuando algún factor de crecimiento se une a su receptor de membrana tirosina cinasa, se activa a PI3K, lo cual después de una serie de procesos celulares lleva a la activación (por medio de la fosforilación) de Akt; esta última es capaz de inactivar a GSK3- β cuando la fosforila y de esta manera Akt puede regular una gran cantidad de procesos celulares que promueven la carcinogénesis, dentro de los que se encuentra el crecimiento/tamaño celular, proliferación, migración, neurovascularización y supervivencia [16,17,21]. Nosotros evaluamos si la disminución en la viabilidad celular tiene relación con la red Akt/PI3K cuando las células son expuestas a nobiletina (100 μ M), esto a través de la medición de las formas activadas (formas fosforiladas) de tres proteínas clave en esta vía: Akt, PI3K y GSK3- β . La fosforilación de Akt disminuyó de manera tiempo-dependiente (**Figura 19**) siendo este resultado similar al obtenido por Li-Ming Lien et al. (2016), quienes reportaron que este flavonoide a la misma concentración disminuyó la fosforilación de Akt y MAPKs en la línea celular de glioma (U87) a partir de los 30 minutos de exposición. Asimismo, en la línea celular AGS (adenocarcinoma) se observó una inhibición en la activación de dicha proteína al tratar con nobiletina 2 μ M (Yi-Chieh Le, et al. 2011), teniendo un efecto directo en la proliferación, invasión y migración celular. Sin embargo este último grupo de investigadores disolvió el flavonoide en DMSO al 100%, mientras que nosotros disolvimos la nobiletina en una solución al 50% de DMSO. Observamos también una disminución en la fosforilación de GSK3- β tiempo-dependiente (**Figura 20**); no hay publicaciones del rol de nobiletina sobre esta proteína, sin embargo nuestro resultado concuerda con otros flavonoides: genisteina (Lee J, et al. 2012), luteolina (Pandurangan AK et al. 2013) y apigenina (Johnson JL et al. 2013), en diferentes líneas celulares cancerígenas como PC3 (próstata), HCT-15 (colon) y BxPC-3-PANC-1 (páncreas), respectivamente reportando una inhibición en la fosforilación de GSK3- β , lo que llevó a una disminución en la proliferación, arresto en el ciclo celular

y apoptosis. La disminución en la fosforilación de la cinasa PI3K (**Figura 21**) no tuvo un patrón específico; la literatura menciona que los hidroxilos en las posiciones 3' y 4' del anillo B de flavonas y flavonoles son un requisito para la inhibición de la actividad de PI3K, y que su ausencia puede ser la razón por la cual el efecto inhibitorio sobre p-PI3K no es claro (Agullo G, et al. 1997). Esto concuerda con algunas publicaciones: Xi-Jun Zhang, et al. (2016) reportaron que el flavonol fisetina (5-20 μM) en las líneas Hep-2, TU212 y M2e (carcinoma de laringe) fue capaz de reducir la expresión de PI3K y subsecuentemente de p-Akt; por otro lado, apigenina (25 μM) disminuyó la expresión de PI3K en la línea celular PC3 de cáncer de próstata (Suat Erdogan, et al. 2016). Es necesario hacer más repeticiones para determinar si nobiletina ejerce o no un efecto sobre la forma fosforilada de esta cinasa. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la disminución en la viabilidad celular provocada por este flavonoide puede ser por medio de la supresión de algunos de los componentes de la vía Akt. La habilidad que tienen las células endoteliales para migrar y formar estructuras tipo capilar es un proceso esencial en la angiogénesis [9]; las células tumorales adquieren motilidad y pueden atacar el tejido hospeder, lo cual genera metástasis [53]. Diversos estudios indican que la vía de señalización Akt/PI3K al estar desregulada provoca un aumento en la migración e invasión de diferentes células cancerígenas [8,12,19]. Por ello, analizamos si nobiletina (100 μM) puede interferir en la migración de células *FaDu* (**Figura 22**). El flavonoide inhibió la migración celular a tiempos cortos (6h) para después provocar huecos en la monocapa de células a las 12h, lo que puede sugerir que el flavonoide ejerce un efecto citotóxico, provocando que las células mueran y se desprendan. Nuestro resultado concuerda con Li-Ming Lien, et al. (2016), quienes reportaron que nobiletina (50 -100 μM) inhibió la migración de células de glioblastoma (U87 y Hs683) a partir de las 6h de incubación. Yi-Chieh Lee, et al. (2011) reportaron también la disminución en la invasión y migración celular en adenocarcinoma (AGS) por medio de la inhibición en la fosforilación de proteínas como Akt, PI3K y RhoA (molécula involucrada en motilidad celular) ante la exposición de nobiletina. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que este flavonoide puede exhibir actividad anti-metástásica, en parte, por medio de la supresión de la activación de componentes de la vía Akt/PI3K. El desarrollo de metástasis involucra procesos como la angiogénesis [68], caracterizada por la formación de vasos sanguíneos irregulares a partir de una red vascular preexistente

[69] la cual requiere la estimulación de células vasculares endoteliales por medio de la liberación de factores pro-angiogénicos, principalmente VEGF [68,69]. Es por esto que evaluamos si la exposición de las células *FaDu* a nobiletina tiene efecto sobre la expresión VEGF (**Figura 23**). Inesperadamente, la expresión de este factor no disminuyó aun cuando obtuvimos que nobiletina tuvo un efecto sobre la migración celular; algunos reportes en cáncer de ovario (Jianchu Chen, et al. 2015), y próstata (Jianchu Chen et al. 2014) demuestran el efecto anti-angiogénico de este flavonoide al disminuir VEGF, por lo que el efecto no solo depende del flavonoide, sino también del tipo celular. Posteriormente, analizamos si el medio de cultivo (el cual contiene factores de crecimiento) tuvo alguna influencia sobre la expresión de VEGF. La **Figura 24** muestra una elevada expresión en los niveles de mRNA a tiempos cortos, principalmente 2h. Con base en este resultado se realizó un ensayo dosis-respuesta para evaluar si nobiletina tiene efecto sobre la expresión de VEGF (**Figura 25**) obteniendo una disminución significativa dependiente de la concentración en la expresión, sugiriendo que nobiletina probablemente tiene un efecto anti-angiogénico a nivel transcripcional en células *FaDu*; este resultado fue contrario al presentado por Lam KH, et al. (2011) donde los niveles de mRNA VEGF incrementaron; sin embargo este fue un modelo *in vivo* por lo que el efecto puede deberse a que las condiciones del experimento son totalmente diferentes. Epigallocatequin-3 galato (EGCG) ha sido probado en la línea MCF-7 (cáncer de seno) por Luo HQ et al. (2014); el flavonol disminuyó la expresión de mRNA de VEGF de manera dosis dependiente. Los mismos efectos fueron reportados con apigenina en células de cáncer de páncreas (CD18 y S2-013) por Laleh G. Melstrom, et al (2011). Un estudio realizado en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello demostró que la vía Akt/PI3K induce la expresión de VEGF promoviendo angiogénesis (Luangdilok et al., 2011), por lo que evaluamos este comportamiento en células *FaDu* mediante su exposición a inhibidores específicos de PI3K: wortmanina y LY294002. La **Figura 26** muestra una clara inhibición en los niveles de mRNA de este factor pro-angiogénico con ambos inhibidores, lo cual sugiere que esta vía de señalización está involucrada en la expresión de VEGF y promoción de angiogénesis en estas células. Este es el primer trabajo que muestra una relación entre este factor de crecimiento y la vía Akt/PI3K en células *FaDu*.

10. Conclusiones

En el presente trabajo obtuvimos resultados que sugieren que el flavonoide polimetoxilado nobiletina inhibe la fosforilación de proteínas involucradas en la vía de señalización Akt/PI3K en la línea celular de cáncer de faringe *FaDu*, y que esto resulta en una inhibición en la viabilidad y migración celular. Por otro lado, nuestros resultados sugieren también, que nobiletina puede presentar un efecto anti-angiogénico en esta línea celular por medio de la inhibición de la expresión de VEGF a nivel transcripcional. Estos resultados ponen en evidencia que nobiletina es un inhibidor natural de la vía de señalización Akt/PI3K que exhibe actividad anti-migratoria en células *FaDu*, y abren paso a la realización de más experimentos que permitan determinar si este compuesto es candidato para el desarrollo de una alternativa terapéutica natural para el tratamiento de este tipo de cáncer.

11. Referencias bibliográficas.

- [1]Bertram JS. The molecular biology of cancer.Mol Aspects Med. 2000 Dec;21(6):167-223.
- [2]Hanahan D, Weinberg RA.The hallmarks of cancer. Cell. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- [3] [Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. The Development and Causes of Cancer.
- [4] Essentials of cell biology; Unit 5: How do cells know where to divide. Scitable, by Nature education.
- [5] Douglas Hanahan, et al. Hallmarks of Cancer: The Next Generation Volume 144, Issue 5, 4 March 2011, Pages 646–674
- [6] Gerald W. Prager et al. Angiogenesis in cancer: Anti-VEGF escape mechanisms.Transl Lung Cancer Res. 2012 Mar; 1(1): 14–25.
- [7]Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. Oncology. 2005;69 Suppl 3:4-10.
- [8] Fresno Vara JA et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer.Cancer Treat Rev. 2004 Apr;30(2):193-204.
- [9] Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. Circ Res. 2002 Jun 28;90(12):1243-50.
- [10] Takuji Tanaka,1, 2 Mayu Tanaka,3 and Takahiro Tanaka. Oral Carcinogenesis and Oral Cancer Chemoprevention: A Review. *J Pharmacol Sci* (2012)118, 55 – 64.
- [11]Shanthi Marur, MD, and Arlene A. Forastiere, MD. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc* (2016); 91(3):386-96.
- [12] Leemans CR et al. The molecular biology of head and neck cancer.Nat Rev Cancer. 2011 Jan;11(1):9-22.

- [13] Steven B. Chinn, MD, et al. Cancer stem cells mediate tumorigenesis and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* (2015); 37(3): 317–326.
- [14] Laura Tirado y Martín Granados. Epidemiología y Etiología del Cáncer de la Cabeza y el Cuello. *Cancerología 2* (2007): 9-17.
- [15] Asati V, et al. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *Eur J Med Chem*. 2016 Feb 15;109:314-41.
- [16] Cheng JQ et al. The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene*. 2005 Nov 14;24(50):7482-92.
- [17] Testa JR, et al. AKT signaling in normal and malignant cells. *Oncogene*. 2005 Nov 14;24(50):7391-3.
- [18] Song G et al. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*. 2005 Jan-Mar;9(1):59-71.
- [19] Altomare DA, et al. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*. 2005 Nov 14;24(50):7455-64.
- [20] Carracedo A et al. The PTEN–PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene*. 2008 Sep 18;27(41):5527-41
- [21] Keniry M, et al. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. *Oncogene*. 2008 Sep 18;27(41):5477-85
- [22] Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*. 2002 May;14(5):381-95.
- [23] Song MS, et al. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Apr 4;13(5):283-96.
- [24] Ma J, et al. PTEN regulate angiogenesis through PI3K/Akt/VEGF signaling pathway in human pancreatic cancer cells. *Mol Cell Biochem*. 2009 Nov;331(1-2):161-71.
- [25] Ramon Parsons , Laura Simpson. PTEN and Cancer. *Protocol Tumor Suppressor Genes Volume 222 of the series Methods in Molecular Biology™* pp 147-166.
- [26] Nader Chalhoub and Suzanne J. Baker. PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009; 4: 127–150.
- [27] Ramon Parsons , Laura Simpson. PTEN and Cancer. *Protocol Tumor Suppressor Genes Volume 222 of the series Methods in Molecular Biology™* pp 147-166.
- [28] McCubrey JA, et al. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget*. 2014 May 30;5(10):2881-911.
- [29] Maqbool M, et al. Pivotal role of glycogen synthase kinase-3: A therapeutic target for Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*. 2016 Jan 1;107:63-81.
- [30] Gao S, et al. The role of glycogen synthase kinase 3- β in immunity and cell cycle: implications in esophageal cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2014 Apr;62(2):131-44.
- [31] Li B, et al. Glycogen synthase kinase-3: A potential preventive target for prostate cancer management. *Urol Oncol*. 2015 Nov;33(11):456-63.
- [32] R.J. Atkins, et al. Glycogen synthase kinase-3b (GSK-3b) and its dysregulation in glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Neuroscience* 20 (2013) 1185–1192.
- [33] Benoit YD, et al. Molecular Pathways: Epigenetic Modulation of Wnt–Glycogen Synthase Kinase-3 Signaling to Target Human Cancer Stem Cells. *Clin Cancer Res*. 2014 Nov 1;20(21):5372-8.

- [34] Halper J. Growth factors as active participants in carcinogenesis: a perspective. *Vet Pathol.* 2010 Jan;47(1):77-97
- [35] A-Majid Khatib. Regulation of carcinogenesis, angiogenesis and metastasis by the pro protein convertases (PCs). Springer. 2006 pp. 120.
- [36] A Rizzino. Understanding the roles of growth factors in carcinogenesis: modulation of autocrine growth control by differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 37: 61 - 65 (1993)
- [37] McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist.* 2000;5 Suppl 1:3-10.
- [38] Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer.* 2013 Dec;13(12):871-82.
- [39] Karar J1, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci.* 2011 Dec 2;4:51.
- [40] Evans I. An Overview of VEGF-Mediated Signal Transduction. *Methods Mol Biol.* 2015;1332:91-120.
- [41] Zachary I, Glick G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res.* 2001 Feb 16;49(3):568-81.
- [42] Crowell JA et al. Targeting the AKT protein kinase for cancer chemoprevention. *Mol Cancer Ther.* 2007 Aug;6(8):2139-48.
- [43] Wang J et al. Biomarkers of Dietary Polyphenols in Cancer Studies: Current Evidence and Beyond. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:732302.
- [44] Upadhyay S, Dixit M. Role of Polyphenols and Other Phytochemicals on Molecular Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2015.
- [45] Priya Batra and Anil K. Sharma. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech.* 2013 Dec; 3(6): 439–459.
- [46] Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal.* 2013 Dec 29;2013:162750.
- [47] Leyva-López N et al. Flavonoids as Cytokine Modulators: A Possible Therapy for Inflammation-Related Diseases. *Int J Mol Sci.* 2016 Jun 9;17(6).
- [48] Elisa Petrusa et al. Plant Flavonoids—Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. *Int J Mol Sci.* 2013 Jul; 14(7): 14950–14973.
- [49] Rzepecka-Stojko A et al. Polyphenols from Bee Pollen: Structure, Absorption, Metabolism and Biological Activity. *Molecules.* 2015 Dec 4;20(12):21732-49.
- [50] Christopher Isaac Escamilla Jiménez et al. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM Vol. 52 No. 2 Marzo-Abril, 2009.*
- [51] Chen J et al. The flavonoid nobiletin inhibits tumor growth and angiogenesis of ovarian cancers via the Akt pathway. *Int J Oncol.* 2015;46(6):2629-38.
- [52] Lien LM, et al. Nobiletin, a Polymethoxylated Flavone, Inhibits Glioma Cell Growth and Migration via Arresting Cell Cycle and Suppressing MAPK and Akt Pathways. *Phytother Res.* 2016 Feb;30(2):214-21.
- [53] Lee YC, et al. Nobiletin, a citrus flavonoid, suppresses invasion and migration involving FAK/PI3K/Akt and small GTPase signals in human gastric adenocarcinoma AGS cells. *Mol Cell Biochem.* 2011 Jan;347(1-2):103-15.
- [54] Morley KL, et al. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer Lett.* 2007 Jun 18;251(1):168-78.
- [55] N. YOSHIMIZU et al. Anti-tumour effects of nobiletin, a citrus flavonoid, on gastric cancer include: antiproliferative effects, induction of apoptosis and cell cycle deregulation. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 (Suppl. 1): 95–101

- [56] Nancy E. Rawson et al. Efficacious anti-cancer property of flavonoids from citrus peels. *Food Science and Human Wellness* 3 (2014) 104–109.
- [57] CHEN CHEN, et al. Antiproliferative and Apoptosis-inducing Activity of Nobiletin Against Three Subtypes of Human Breast Cancer Cell Lines. *ANTICANCER RESEARCH* 34: 1785-1792 (2014).
- [58] Cheng HL, et al. Nobiletin inhibits human osteosarcoma cells metastasis by blocking ERK and JNK-mediated MMPs expression. *Oncotarget*. 2016 Apr 29.
- [59] Ma W, et al. Nobiletin enhances the efficacy of chemotherapeutic agents in ABCB1 overexpression cancer cells. *Sci Rep*. 2015 Dec 22;5:18789.
- [60] Shi MD et al. Nobiletin attenuates metastasis via both ERK and PI3K/Akt pathways in HGF-treated liver cancer HepG2 cells. *Phytomedicine*. 2013 Jun 15;20(8-9):743-52.
- [61] Mechanisms of carcinogenesis, Chapter 3, International Agency for research on cancer (IARC). 2008 pp. 190-260.
- [62] Georgy SR et al. Identification of a Novel Proto-oncogenic Network in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2015 Jun 10;107(9).
- [63] Shigeishi H et al. Maintenance of stem cell self-renewal in head and neck cancers requires actions of GSK3 β influenced by CD44 and RHAMM. *Stem Cells*. 2013 Oct;31(10):2073-83.
- [64] Beurel E et al. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol Ther*. 2015 Apr;148:114-31.
- [65] tMcCubrey JA et al. Diverse roles of GSK-3: tumor promoter-tumor suppressor, target in cancer therapy. *Adv Biol Regul*. 2014 Jan;54:176-96.
- [66] Laurent Lamalice et al. Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. *Circulation Research*. 2007;100:782-794
- [67] Xu HM et al. VEGFR2 Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cancer Cells Mediates Proliferation and Invasion. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(4):2217-21.
- [68] Chang CH et al. Nelumbo nucifera Gaertn leaves extract inhibits the angiogenesis and metastasis of breast cancer cells by downregulation connective tissue growth factor (CTGF) mediated PI3K/AKT/ERK signaling. *J Ethnopharmacol*. 2016 Jul 21;188:111-22.
- [69] YING GAO et al. Theaflavin-3, 3'-digallate decreases human ovarian carcinoma OVCAR-3 cell-induced angiogenesis via Akt and Notch-1 pathways, not via MAPK pathways. *Int J Oncol*. 2016 Jan; 48(1): 281–292.
- [70] Gong W, et al. Toward the use of precision medicine for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Dec 4.
- Forkhead*