

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer  
Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL  
ZARAGOZA

**Evaluación de la actividad antiproliferativa, necrótica y  
apoptótica del flavonoide Patuletina en células tumorales CaSki,  
SK-LU-1 y MDA-MB-231**

## T E S I S

Que para obtener el título de:

## BIÓLOGO

Presenta

**Karina Suárez Hernández**

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Luis Sánchez Sánchez



CDMX. MARZO 2018.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**“ZARAGOZA”**

**DIRECCIÓN**

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **SUÁREZ HERNÁNDEZ KARINA**, con número de cuenta **413008815**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **20 de marzo de 2018** a las **13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** M. en C. **MARÍA CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ**

**VOCAL** Dr. **LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ**

**SECRETARIO** Dra. **LUCILA ÁLVAREZ BARRERA**

**SUPLENTE** Dr. **HUGO LÓPEZ MUÑOZ**

**SUPLENTE** M. en C. **JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ**

El título de la tesis que presenta es: **Evaluación de la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del flavonoide Patuletina en células tumorales CaSki, SK-LU-1 y MDA-MB-231.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad de México, a 14 de febrero de 2018

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
**DIRECTOR**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
  
ZARAGOZA  
DIRECCION

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. **ARMANDO CERVANTES SANDOVAL**  
JEFE DE CARRERA

*“Haz lo necesario para lograr tu más ardiente deseo, y acabarás lográndolo.”  
-Ludwig van Beethoven*

*Si una persona es perseverante, aunque sea dura de entendimiento,  
se hará inteligente; y aunque sea débil se transformará en fuerte.  
-Leonardo da Vinci*

*“La mejor vida no es la más larga, sino la más rica en buenas acciones.”  
-Marie Curie*

*Aprender a dudar es aprender a pensar. -Octavio Paz*

*Excelente maestro es aquel que, enseñando poco, hace nacer en el alumno un  
deseo grande de aprender.  
-Arturo Graf*

**A veces las personas más importantes en tu vida deben de partir antes de tiempo, ¿para qué?...**

**Mi mamá Juanita y mi hermana Maricela, se convirtieron en mi mayor motivo para alcanzar mis sueños.**

**A pesar de no poder compartir este logro con ustedes, estoy agradecida con la vida, por todo lo que me ha brindado después de su partida...**

## AGRADECIMIENTOS

**A mi mamá,** Virginia, por cuidarme desde pequeña, y estar siempre a mi lado, compartiendo alegrías y tristezas. Gracias, por todo el esfuerzo que has hecho para que yo pudiera llegar hasta donde ahora me encuentro. Este logro es gracias a ti, tu apoyo para mí ha sido muy importante en el transcurso de mi formación académica.

**A mi papá,** Arnulfo, sin duda el mejor papá que la vida me pudo otorgar, gracias por estar siempre a mi lado, por ser mi mano derecha y sobre todo por ser mi amigo. Tú me has enseñado a no rendirme y luchar por mis sueños me llena de satisfacción poder compartir este logro contigo, pues siempre me has brindado tú apoyo y las herramientas para lograr mis metas.

**A mis tías,** María, Elena y Celina, las palabras se quedan cortas para expresar lo agradecida que estoy por apoyarme en todos mis proyectos y sueños, por creer en mí, gracias por enseñarme tantas cosas, por su apoyo incondicional y por no dejarme sola en los momentos más difíciles.

**A mis tíos,** Luisa y Margarito, gracias por siempre alegrar mis días, ustedes me han ensañado que al mal tiempo buena cara. Su motivación ha sido importante durante mi trayectoria académica.

**A mis primos,** Roxana, Sergio, Arturo y Diego, por todo el apoyo y amor que me brindan, gracias por estar siempre a mi lado en los buenos pero sobre todo en los peores momentos. Gracias por todas las experiencias que hemos compartido, han sido las mejores.

**A mi familia,** Suárez Felipe, me alegra que finalmente podamos convivir tanto, gracias por las lecciones que me brindan, y enseñarme qué para conseguir un sueño se debe luchar hasta lograrlo. Gracias por su apoyo para poder culminar esta meta.

**A mis amigos,** Fanny, Pako, Carmí, Patty, David, Alfonso, Betty, Andrea, Viri, Vale, Ale, Russel, Ángel y Laura, siempre me han apoyado y han sido parte importante de mi vida, ustedes me han demostrado el valor de la amistad y han sido seres tan extraordinarios conmigo. Me siento afortunada de tener a amigos como ustedes, pues siempre me han motivado y apoyado en todo momento.

**A mis amigos de laboratorio,** Iván, Sergio, Brian, Karen, Elena y Amanda, el mejor equipo sin duda, me agrado poder compartir esta etapa con cada uno de ustedes, todo lo que compartimos fue increíble, sobre todo las risas, que momentos tan divertidos y agradables pase con todos ustedes. Gracias por su apoyo dentro y fuera de laboratorio y su paciencia para compartir sus conocimientos.

**Al equipo CODECU,** (Lety, Erick, Daniel, Luciano, David, Jerry, Arnol y Francisco), sin duda este proyecto me permitió conocer a personas increíbles, de las cuales he aprendido muchas cosas que han permitido mejorar varios aspectos de mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Luis Sánchez Sánchez**, por brindarme la oportunidad de ser parte del equipo de trabajo del laboratorio, por la paciencia y disposición para guiarme en el desarrollo y culminación de esta tesis. Agradezco el apoyo que me brindo y sobre todo gracias por los consejos y motivación para mejorar y continuar con mi trabajo.

Al **M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez**, por su apoyo y disposición para llevar a cabo la parte experimental, por brindarme su tiempo y culminar esta tesis. Gracias por los consejos que me brindo y compartir sus conocimientos.

Al **Dr. Hugo López Muñoz** por brindarme las herramientas necesarias para llevar a cabo esta tesis, además de las observaciones para fortalecer mi trabajo.

Al **Dr. Manuel Jiménez Estrada** del Instituto de Química por donar el compuesto para llevar a cabo esta tesis.

A la **M. en C. María Cristina Alvaro Domínguez** y a la **Dra. Lucila Álvarez Barrera**, por su colaboración crítica durante la revisión de mi tesis, gracias por las observaciones y correcciones para mejorar mi trabajo y sobre todo gracias por su atenta amabilidad y disposición para atender mis dudas.

Este trabajo fue realizado con el apoyo de los proyectos SEP-CONACYT 253979, CONACyT 255881 y los Proyectos PAPIIT IN216718 y PAPIIT IN220916.

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer (Laboratorio N° 6, 2do Piso, Edificio de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ)).

## ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Marco Teórico .....	2
2.1 Ciclo celular .....	2
Puntos de Control.....	4
2.2 Muerte Celular .....	6
2.2.1 Muerte Celular Necrótica .....	6
2.2.2 Muerte Celular Apoptótica.....	6
2.3 Cáncer.....	10
2.3.1 Factores de riesgo del cáncer.....	10
2.4 Cáncer Cervicouterino.....	11
2.4.1 Factores de Riesgo .....	12
2.5 Cáncer de Mama .....	13
2.5.1 Factores de Riesgo .....	15
2.6 Cáncer de Pulmón .....	16
2.6.1 Factores de Riesgo .....	17
2.7 Tratamientos .....	18
2.8 Flavonoides .....	21
2.8.1 Biodisponibilidad.....	23
2.9 Patuletina .....	25
2.10 Principales mecanismos moleculares de acción de los flavonoides .....	26
3. Planteamiento del problema .....	28
4. Justificación .....	29
5. Hipótesis.....	30
6. Objetivos .....	31
6.1 General.....	31
6.2 Particulares.....	31
7. Método.....	32
8. Resultados .....	36
9. Discusión .....	47
10. Conclusiones.....	51
11. Bibliografía .....	52
12. Apéndice.....	58



## 1. Resumen

El cáncer, es una de las enfermedades con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial, el cáncer de mama, pulmón y cuello uterino se encuentran en primer, tercer y quinto lugar respectivamente. En México, las mayores tasas de mortalidad en hombres se deben al cáncer de pulmón, próstata y gástrico, en cuanto a la población femenina, las tasas de mortalidad se deben al cáncer de mama, cervicouterino y gástrico.

Actualmente los tratamientos más utilizados contra el cáncer son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia y son efectivos cuando el cáncer es detectado en etapas tempranas, sin embargo, resultan ser ineficientes cuando la enfermedad se encuentra en estadios avanzados o en pacientes metastásicos. Los fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer presentan una actividad antiproliferativa cuyo mecanismo de acción está basado en inducir un daño en el ADN celular o componentes que participan en el mecanismo que regula la división celular, generando en las células una muerte necrótica, así como, una respuesta inflamatoria que produce efectos secundarios que ponen en riesgo la vida del paciente. Ante esta situación, surge la necesidad de buscar nuevos compuestos de origen natural que sean selectivos y presenten baja citotoxicidad para combatir el cáncer. Al respecto, los flavonoides han generado un fuerte interés debido a sus diversas actividades biológicas, destacando la actividad antitumoral. No obstante que los flavonoides han sido fuertemente estudiados, aún existen flavonoides cuya actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica aún no ha sido evaluada. Al respecto, la Patuletina es un flavonoide extraído del género *Tagetes* (flor de cempasúchil) del cual existe poca evidencia de sus propiedades biológicas, por tal motivo, en el presente trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del flavonol Patuletina sobre la línea de cáncer cervicouterino (CaSki), mama (MDA-MB-231 y pulmón (SK-LU-1), con el fin de aportar información acerca de este compuesto. Los resultados obtenidos, mostraron que la Patuletina afecta la proliferación celular de las tres líneas tumorales de manera dependiente de la dosis, con una  $IC_{50}$  de 18, 37 y 86  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. El efecto necrótico del compuesto fue evaluado cuantificando la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos celulares, obteniendo que la Patuletina induce una baja o nula actividad necrótica en las tres líneas celulares, indicando que el decremento en el número celular inducido por la Patuletina es debido a una causa diferente a la muerte necrótica. Al respecto, las células tratadas con la Patuletina generaron cuerpos apoptóticos, presentaron una condensación de la cromatina nuclear, mostraron una contracción celular y una pérdida de las prolongaciones citoplasmáticas, que en conjunto con la positividad a la caspasa-3 activa, indican que la Patuletina induce a las células CaSki, MDA-MB-231 y SK-LU-1 a una muerte apoptótica. Respecto a las células no tumorales, la Patuletina afectó la proliferación de las células linfocíticas a las concentraciones de 18, 37 y 86  $\mu\text{g/ml}$  de manera significativa, sugiriendo que la actividad antiproliferativa de la Patuletina no es selectiva, sin embargo, la nula o baja actividad de LDH registrada en los cultivos de linfocitos tratados con la Patuletina, indican que el decremento en el número celular es debido a una muerte diferente a la necrótica, indicando que la Patuletina no induce muerte necrótica en células tumorales ni en células no tumorales y que los efectos colaterales relacionados con la actividad necrótica serían menores. Estos resultados permiten establecer que la Patuletina podría ser un digno candidato para ser evaluado como un agente con potencial terapéutico contra el cáncer.

## 2. Marco Teórico

La célula es la unidad más pequeña capaz de manifestar las propiedades del ser vivo. Todos los organismos vivos están compuestos por una o más células que se originan de otras células preexistentes. La célula crece y se multiplica, sintetizando sus constituyentes, utilizando elementos del medio extracelular (Curtis & Schnek, 2006; Maillet, 2002).

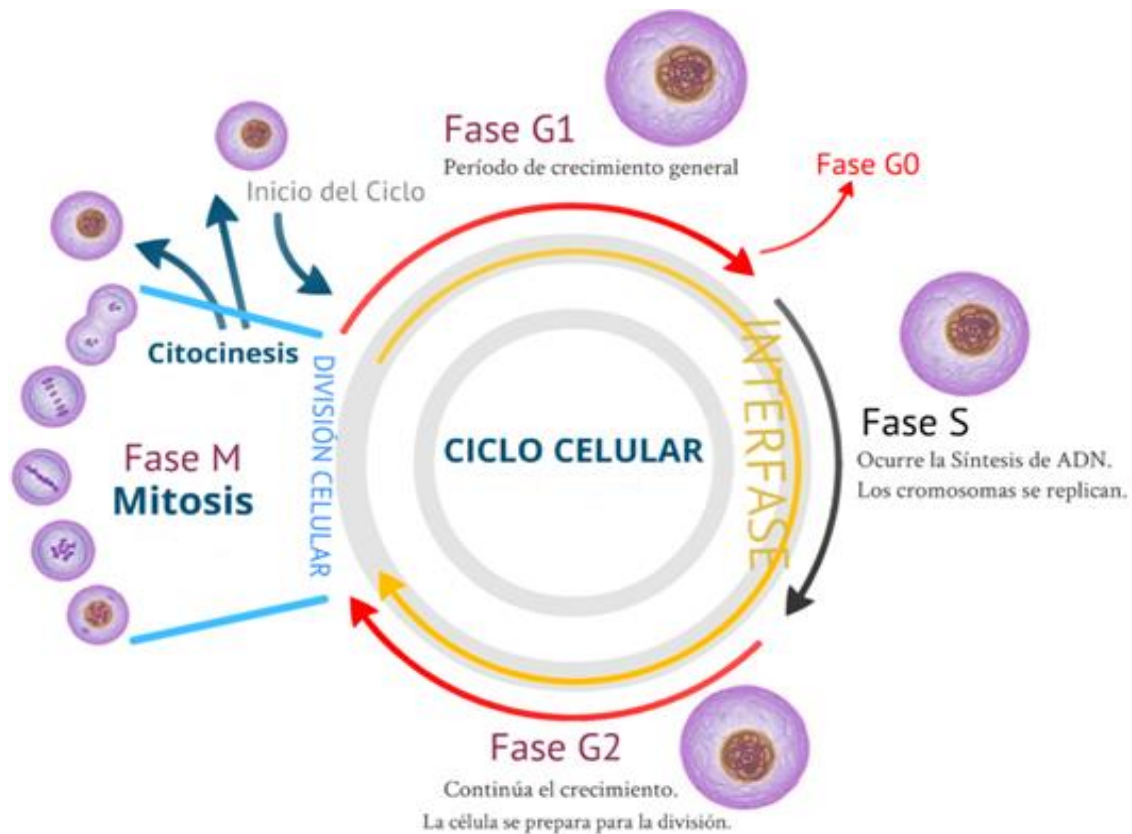
La división celular es esencial para la vida ya que mantiene relativamente constante el número de células totales en un organismo. Las células en división pasan por un ciclo celular, una secuencia ordenada de eventos que van desde el momento en que la célula se divide para formar dos células hijas hasta el momento en que dichas células hijas se dividen otra vez. Antes de que ocurra la división celular, la célula duplica de un modo general, todo lo contenido en el citoplasma y duplica de manera precisa su ADN cromosómico preparándose para la división (Campbell *et al.*, 2001). La decisión de una célula normal de replicar el ADN y duplicarse se ve influida por la señalización extracelular (Blagosklonny & Pardee, 2002).

### 2.1 Ciclo celular

El ciclo celular es un conjunto de eventos ordenados que coordinan la duplicación del material genético y citoplásmico de una generación celular a la siguiente que culmina con el crecimiento de la célula y su división. Para que el ciclo celular progrese de forma apropiada, toda célula eucariota debe seguir un correcto programa genético, el cual hace que pase por diferentes fases y culmine en la división y proliferación celular (Alvarado & Mayani, 2006; Rodríguez *et al.*, 2004).

La secuencia de eventos que se producen cuando se estimula una célula para crecer y dividirse constituye el ciclo celular. Inicia con células en reposo (fase G<sub>0</sub>), las cuales tienen que ser estimuladas por factores de crecimiento con el fin de entrar en el ciclo celular (Lagunas *et al.*, 2014).

Un ciclo celular típico se da en cuatro fases, para su estudio se divide en interfase (G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>) y fase M (mitosis) que se divide en profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis. (Fig.1). En la fase G<sub>1</sub>, la célula es metabólicamente activa, se produce la acumulación del ATP necesario para el proceso de división y crece continuamente debido a la síntesis de proteínas y de ARN. La fase S (síntesis) es la segunda fase del ciclo celular; donde se lleva a cabo la duplicación del ADN, y cromosomas. La fase S, es seguida por la fase G<sub>2</sub>, durante la cual el crecimiento celular continúa al igual que la síntesis de proteínas y ARN en preparación para la mitosis. La fase M (mitosis) es la división celular en la que una célula progenitora se divide en dos células idénticas, de tal modo que cada célula hija obtenga una copia del material genético. Esta fase se subdivide en profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis. El final de la mitosis da cabida a un nuevo ciclo en G<sub>1</sub> o puede que la célula entre en fase G<sub>0</sub> que corresponde a un estado de reposo especial característico de algunas células, en el cual puede permanecer por días, meses y a veces años (Lomanto *et al.*, 2003; Lagunas *et al.*, 2014; Cooper, 2000).



**Fig.1.** Ciclo Celular. Se observan un conjunto de cambios en la célula desde que se ha formado por división celular de otra célula hasta que se divide nuevamente para dar lugar a nuevas células hijas. El ciclo comprende las etapas G1, S, G2 y M. (tomado y modificado de: [http://biologiacampmorvedre.blogspot.mx/2013/02/bloque-ij\\_4750.html](http://biologiacampmorvedre.blogspot.mx/2013/02/bloque-ij_4750.html)).

Para que se puedan llevar a cabo los diferentes eventos de la progresión del ciclo celular que alterna procesos de proliferación y procesos de diferenciación, es necesaria la participación de diversas moléculas que, junto con las condiciones del medio, controlan la duplicación celular. Tal es el caso de las cinasas dependientes de ciclinas (Cdk) (Alvarado & Mayani, 2006). Estas proteínas desempeñan una función reguladora clave en la transición del ciclo celular. Cabe aclarar que en realidad tanto la ciclina como la cinasa constituyen una sola macromolécula con actividad enzimática de cinasa, sin embargo, ninguna de las dos son funcionales cuando están separadas. Todas las cinasas que dependen de las ciclinas se encuentran relacionadas, unas con otras, desde el punto de vista estructural, y todas requieren mantenerse asociadas con sus respectivas ciclinas para ejercer su actividad. La regulación de la actividad cinasa se lleva a cabo principalmente por dos mecanismos: fosforilación y desfosforilación (Aguirre & Sotelo, 2008).

Las ciclinas, con sus CDK unidas y activadas, funcionan durante distintas etapas del ciclo celular. Como sugiere su nombre, el nivel de cada ciclina aumenta o disminuye independientemente dentro de las fases del ciclo (Israels & Israels, 2001).

Se sabe que CDK4, CDK2 y CDK5 se expresan conjuntamente con las ciclinas D1, D2, D3, E, A y B, durante la progresión de la fase G1 a la fase M (mitosis). El complejo CDK4-D funciona tempranamente en respuesta a factores de crecimiento. Los complejos CDK2-E y CDK2-A son esenciales para la replicación del ADN, y los complejos CDK2-A y CDK2-B son importantes para la mitosis.

Cuando existe algún daño genético, los mecanismos de control transcripcional de los complejos CDK-ciclina inducen la interrupción del ciclo celular hasta que el daño se corrige (Peralta *et al*, 1997).

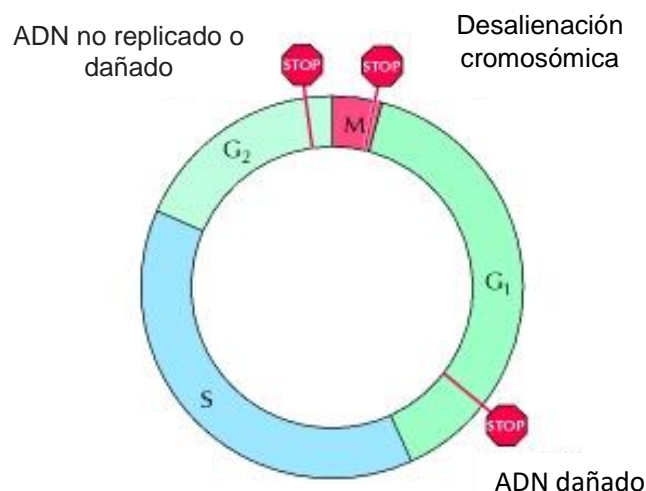
Los puntos de control evitan la progresión del ciclo celular en presencia del ADN dañado, dando tiempo para que la reparación se produzca al mismo tiempo y se prevengan alteraciones genéticas capaces de propagarse en las generaciones posteriores. Consistentemente, los puntos de control proporcionan una barrera para el desarrollo del cáncer (Lagunas *et al.*, 2014).

## Puntos de Control

Se conocen dos estadios donde operan los puntos de control en el ciclo celular: uno al final de la fase G1 y la entrada a la fase S, y el otro, en la transición de la fase G2 a la fase M. De manera general, en la mayoría de los casos, la interrupción de la proliferación celular ocurre cuando la integridad del genoma ha sido comprometida (Peralta *et al*, 1997).

Uno de los más claramente definidos de estos puntos de control se produce en G2 y evita la iniciación de la mitosis hasta que la replicación del ADN se ha completado. Este punto de control de G2 detecta ADN dañado y sin replicar, que genera una señal que conduce al paro del ciclo celular. Este arresto permite tiempo para que el daño sea reparado, en lugar de ser pasado a las células hijas. El daño del ADN también retarda la progresión de las células a través de la fase S y detiene la progresión del ciclo celular en un punto de control en G1 (Fig. 2). Este arresto de G1 puede permitir la reparación del daño que tiene lugar antes de que la célula entre en fase S, donde el ADN dañado sería replicado.

La detención en el punto de control G1 está mediada por la acción de una proteína conocida como p53, que se induce rápidamente en respuesta al ADN dañado. Curiosamente, el gen que codifica p53 es frecuentemente mutado en cánceres humanos (Cooper, 2000).



**Fig.2.** Puntos de control del ciclo celular. Un punto importante detiene las células en G<sub>2</sub> en respuesta a ADN dañado o sin replicar. La presencia de ADN dañado también conduce al paro del ciclo celular en en G<sub>1</sub>. Otro punto de control, en fase M, detiene la mitosis si los cromosomas no están correctamente alineados en el huso mitótico. Tomado y modificado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/figure/A2444/?report=objectonly>.

## Transición G1/S

La progresión a través de G1 es regulada por un mecanismo complejo que involucra tres Cdk's (Cdk2, Cdk4 y Cdk6) (Fig.3).

La CDK4 y CDK6 en asociación con ciclinas de tipo D se activan para la transición de la fase G1 a S. El complejo ciclina E-CDK2 es importante durante la transición de la fase G<sub>1</sub>-S, la ciclina A-CDK2 y ciclina A-CDK1 son importantes durante la progresión de la fase S-G<sub>2</sub>, respectivamente. (Aguirre & Sotelo, 2008; Suryadinata *et al.*, 2010; Alvarado & Mayani, 2006)

En células de mamíferos, la progresión de la fase G1 a S también está regulada por la proteína de retinoblastoma (Rb), una proteína supresora de tumor que desempeña un papel fundamental en el control negativo de ciclo celular y en la progresión tumoral (Lagunas *et al.*, 2014).

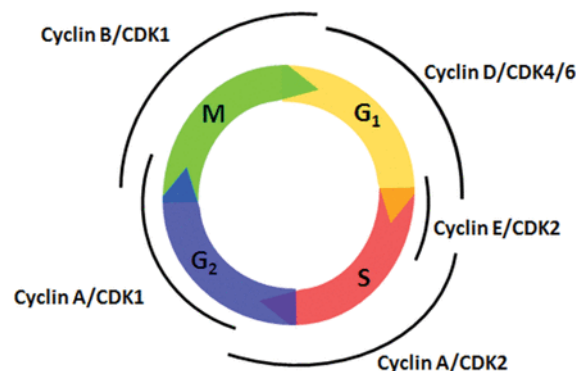
## Transición G2/M

Respecto a la transición de la fase G2 a la fase M, ésta es inhibida por el daño y replicación alterada del ADN. Los puntos de control evitan la segregación de cromosomas alterados.

La transición G2-M y la progresión de M son influidas principalmente, por el complejo ciclina B/CDC2 y ciclina B/CDK2. En esta fase también actúa el complejo ciclina B/CDK1 o MPF (promotor de la fase M) (Fig.3).

Entre los inhibidores de esta transición se encuentra la proteína p21 que se une al complejo Ciclina B/CDC2 (CDK1) para bloquear la entrada a la mitosis. Otra proteína es GADD45 de la vía de p53, que también se puede unir al complejo Ciclina B/CDC2 (CDK1) para inhibirlo.

Las proteínas pRb y p53 desempeñan un papel importante en la regulación del ciclo celular e interviene en la toma de decisiones para llevar a la célula hacia la progresión del ciclo, detención temporal, quiescencia, diferenciación, senescencia o muerte celular (Lagunas *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2004; Peralta *et al.*, 1997).



**Fig.3.** En células de mamíferos diferentes complejos ciclina-CDK regulan la progresión de las células a través de las diferentes fases del ciclo celular. Tomado y Modificado de: <http://www.bioscirep.org/content/30/4/243>.

Las células de un organismo multicelular son miembros de una comunidad altamente organizada. El número de células en esta comunidad está estrechamente regulado, no simplemente controlando la tasa de división celular, sino también controlando la tasa de muerte celular (Alberts *et al.*, 2002).

El número de células que componen un tejido en un organismo adulto permanece, dentro de ciertos límites, constante; las células que mueren se sustituyen por otras, proceso que está regulado y que asegura el mantenimiento de un balance adecuado entre la pérdida, la renovación y la diferenciación celular. Se calcula que el cuerpo humano produce y erradica cada día miles de millones de células. El recambio celular en los tejidos de un organismo se fundamenta en el mantenimiento de un equilibrio (homeostasis) entre proliferación y muerte celular a fin de garantizar la población adecuada en cada momento (Lizarbe, 2007).

## **2.2 Muerte Celular**

El estado normal o fisiológico de un organismo se consigue con respuestas celulares que permiten a las células y a los tejidos adaptarse y sobrevivir en las condiciones de su entorno y responder adecuadamente a estímulos. Para ello, una variedad de sistemas y procesos están implicados en el mantenimiento de la integridad celular, desde la membrana celular (procesos de endocitosis y exocitosis), a cambios metabólicos y de expresión génica, o a los mecanismos de defensa y a los sistemas de reparación. Sin embargo, un daño irreversible puede hacer que se alcance un punto sin retorno; cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos irreversibles impiden a las células realizar sus funciones vitales y las arrastran a la muerte. La muerte de las células puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes (Lizarbe, 2007).

### **2.2.1 Muerte Celular Necrótica**

Las células que mueren como consecuencia de una agresión aguda en general aumentan de volumen y estallan, lo cual implica que su contenido se derrama sobre las células vecinas; este proceso se conoce con el nombre de necrosis celular (Figura 4) (Alberts *et al.*, 2006).

En los seres humanos, la muerte celular necrótica generalmente ocurre en respuesta a los cambios severos en condiciones fisiológicas, incluyendo la hipoxia, isquemia, hipoglucemia, exposición a toxinas, la exposición a los metabolitos reactivos de oxígeno, los cambios extremos de temperatura, la privación de nutrientes y cualquier otra condición que genere caída de ATP. Esto crea cambios que, histológicamente, están representados por desorganización y lisis del citoplasma, con dilatación del retículo endoplasmático y las mitocondrias, disolución de la cromatina y pérdida de la continuidad de la membrana citoplasmática (proceso de oncosis). El ADN es partido en fragmentos irregulares al azar. Debido a la pérdida de la integridad de la membrana celular, el contenido del citoplasma es volcado al espacio extracelular, produciéndose la atracción de células inmunes en el área, lo que genera el proceso de inflamación (Adolfo, 2002; Syntichaki & Tavernarakis, 2002).

### **2.2.2 Muerte Celular Apoptótica**

El segundo tipo de muerte celular es conocido como muerte celular programada o apoptosis, la célula muere sin provocar daños en las células adyacentes. Una célula en vía de apoptosis se retrae y condensa, el citoesqueleto se colapsa, la envoltura nuclear se desensambla y el ADN nuclear se fragmenta. Lo más importante es que la superficie celular se altera, mostrando propiedades que hacen que la célula moribunda sea fagocitada rápidamente, ya sea por una célula vecina o por un macrófago, antes

de que se produzca una fuga de su contenido, permitiendo que los componentes orgánicos de la célula muerta sean reciclados por la célula que la ingiere (Figura 4) (Alberts *et al.*, 2006).

En este proceso las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación ni dejar cicatrices en los tejidos. La apoptosis es por tanto considerada como una muerte natural fisiológica; eliminación de células no deseadas y de estructuras innecesarias. Resultando en un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas (Jordán, 2003; Jacobson & Raff, 1997).

Los procesos apoptóticos se caracterizan por cambios bioquímicos y morfológicos como: incremento moderado, pero sostenido, de la concentración de calcio libre citoplasmático ( $[Ca^{+2}]$ ), diferencia clara frente a los procesos de necrosis, donde su aumento es drástico, alteración en la conformación de elementos del citoesqueleto, condensación y fragmentación de la cromatina, translocación de la fosfatidilserina, fosfolípido que se encuentra en la cara interna de la membrana, se expone en la superficie y se une a receptores de las células fagocíticas (macrófagos y células dendríticas) que fagocitan los cuerpos apoptóticos, las células fagocíticas segregan citoquinas que inhiben la inflamación (Jordán, 2003; Guido & Joris, 1995; Cascales, 2003).

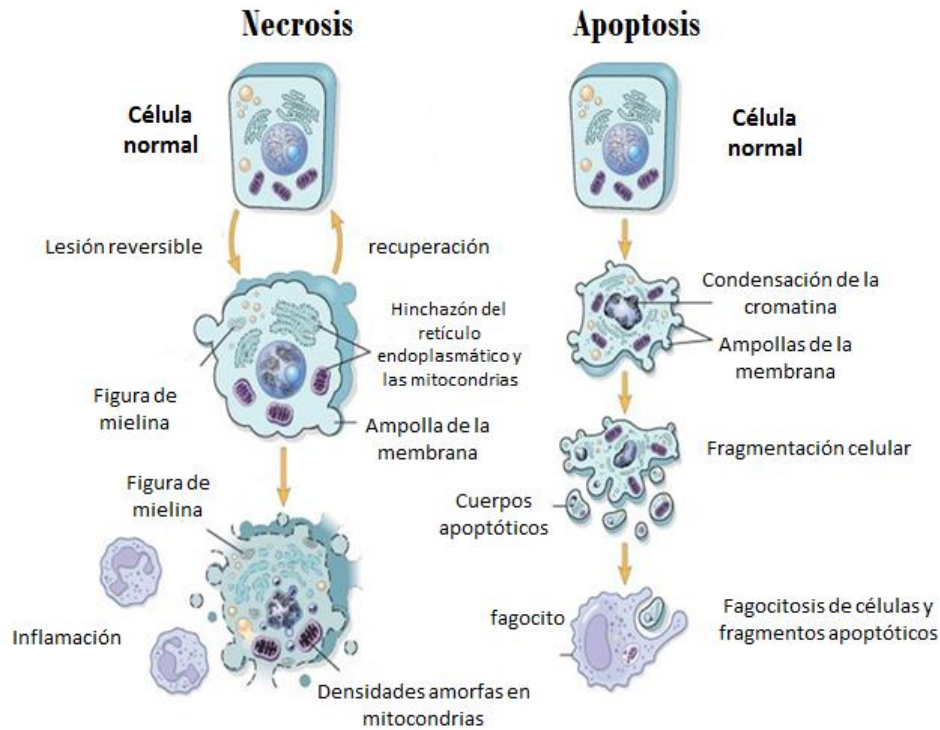
La muerte apoptótica puede ser desencadenada por diferentes señales intra o extracelulares. Las primeras son, en muchos casos, originadas por estrés biológico, el cual provoca la liberación de citocromo C de la mitocondria (vía intrínseca), mientras que algunas de las señales extracelulares desencadenan el proceso apoptótico al unirse a su ligando presente en la membrana plasmática de la célula blanco (vía extrínseca). La naturaleza de los inductores puede ser fisiológica (hormonas, citocinas), biológica (bacterias, virus, parásitos), química (fármacos) o física (radiaciones) (Sánchez & Diosdado, 2003).

La maquinaria de transmisión de las señales apoptóticas es compleja. Se puede iniciar a través de distintas vías dependiendo del estímulo recibido por la célula. Una vez iniciada la señal, ésta se transmite a través de distintas proteínas adaptadoras. Sin embargo, todas las señales convergen al final en la activación de una familia de cisteín-proteasas, denominadas caspasas, que cortan a la proteína diana detrás de un residuo de aspártico, de ahí el nombre que reciben (*cystein-dependent aspartate-directed proteases*) (Lizarbe, 2003).

Existen descritas 14 caspasas diferentes en mamíferos, de las cuales 12 se han descrito ya en humanos. Tanto la apoptosis inducida por unión del receptor con su ligando (vía extrínseca), como la desencadenada por la liberación del citocromo C al citoplasma (vía intrínseca), provoca la activación de estas enzimas. Las caspasas son sintetizadas como zimógenos, por lo que requieren de un procesamiento proteolítico para volverse activas. En su forma nativa las caspasas constan de tres dominios: un prodominio N-terminal, un dominio que genera una subunidad grande (p20) y un dominio que da lugar a una subunidad enzimática pequeña (p10). La enzima madura es un heterodímero que contiene dos heterodímeros p20/p10, por lo que la forma activa cuenta con dos sitios activos independientes. Las caspasas participan en la destrucción de la lámina nuclear, en la activación de CAD (caspase activated Dnase) e inducen a la célula a expresar señales que las marcan para ser fagocitadas (Sánchez & Diosdado, 2003).

Se han identificado diez caspasas principales que intervienen en la apoptosis y se han categorizado ampliamente en iniciadoras (2, 8, 9,10), efectoras o ejecutoras (3, 6, 7) y caspasas inflamatorias (1, 4, 5) (Arias *et al.*, 1999; Elmore, 2007).

En general, son dos las vías que conducen a la activación de las caspasas. Una es la mediada por ligandos que se unen a receptores en la superficie celular; y la otra es la mediada por estrés celular o por lesión en el ADN. Estas dos vías, también denominadas extrínseca e intrínseca, respectivamente (Cascales, 2003).



**Fig. 4.** Tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis. Durante la necrosis la célula aumenta su tamaño provocando lisis, vertiendo su contenido citoplasmático al medio exterior, lo que genera inflamación. En cuanto a la apoptosis, presenta una condensación de la cromatina, fragmentación celular y formación de cuerpos apoptóticos los cuales son eliminados por células fagocíticas. (Tomado y modificado de: <http://patologiabcom6.blogspot.mx/2014/05/blog-post.html>).

#### • Vía Extrínseca

Las vías de señalización extrínseca que inician la apoptosis implican interacciones mediadas por receptor transmembrana. Estos implican receptores de muerte que son miembros de la superfamilia del gen del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF), recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. Dos familias de receptores se han identificado con estas características: la proteína Fas y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Elmore, 2007; Pérez & Lie, 2012).

La vía extrínseca es mediada por la activación de receptores, como la unión de un ligando de muerte (FasL) a su receptor específico (Fas) en la superficie celular. La unión ligando receptor conduce a la formación de un complejo homotrimérico, que seguidamente recluta factores citosólicos, tales como FADD y caspasa 8, formando el complejo DISC. La formación de DISC conduce a la activación de caspasas iniciadoras tales como caspasa 8, la cual posteriormente rompe y activa a la caspasa efectora, caspasa 3 (Rojas *et al.*, 2009).

Además de lo antes citado, la caspasa 8 puede activar a Bid (miembro proapoptótico de la familia Bcl-2) e inducir la liberación del citocromo C y Apaf-1 de la mitocondria para formar el apoptosoma y activar también la vía intrínseca (Sanchez & Diosdado, 2003).



Otro grupo de receptores de muerte se ha caracterizado y muestran diferentes ligandos de muerte conocidos como Apo2L, y los TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF). Las células cancerígenas, pueden mostrar una sensibilidad relativa hacia la apoptosis mediada por TRAIL (Rojas *et al.*, 2009).

- **Vía intrínseca o mitocondrial**

Como su nombre lo indica, la vía intrínseca se inicia dentro de la célula. Los estímulos internos, tales como un daño genético irreparable, la hipoxia, concentraciones extremadamente altas de calcio citosólico y un stress oxidativo severo, son todos disparadores de la iniciación de la vía mitocondrial intrínseca (Sosa, 2012).

Todos estos estímulos causan cambios en la membrana mitocondrial interna que da lugar a una apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPT), la pérdida del MPT provoca la liberación de proteínas proapoptóticas normalmente secuestradas desde el espacio intermembranal hacia el citosol (citocromo c, smac/DIABLO y serina proteasa HtrA2 / Omi) (Elmore, 2007).

En el citosol, el citocromo C liberado de la mitocondria se une a Apaf-1 y una vez unido y en presencia de dATP o ATP se forma el complejo conocido como apoptosoma, el cual recluta y activa a la procaspasa 9, la cual puede a su vez activar a las caspasas 3, 6 y 7, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis. Por otro lado, la salida de la proteína llamada SMAC/DIABLO la cual es un inhibidor de los inhibidores de caspasas (IAPS) también sale de la mitocondria permitiendo que la apoptosis continúe de forma natural (Sánchez & Diosdado, 2003; Pérez & Lie, 2012).

Esta vía está estrechamente regulada por un grupo de proteínas que pertenecen a la familia Bcl-2 (Sosa, 2012).

Las proteínas de la familia de Bcl-2 se agrupan en proteínas antiapoptóticas que incluyen Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG, Mcl-1 y proteínas proapoptóticas incluyen Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik y Blk. Estas proteínas tienen una importancia especial, ya que pueden determinar si la célula se compromete a la apoptosis o aborta el proceso. Se cree que el principal mecanismo de acción de la familia de proteínas Bcl-2 es la regulación de la liberación del citocromo c de las mitocondrias a través de la alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Elmore, 2007; Pérez & Lie, 2012).

La vía mitocondrial puede conectarse también con la vía de receptores de muerte, ya que una vez activada la caspasa-8 por dichos receptores, esta caspasa activa a la proteína Bid, lo que provoca la apertura del poro mitocondrial y la activación de la caspasa-9 (Pérez & Lie, 2012).

La apoptosis es un proceso celular ordenado y orquestado que ocurre en condiciones fisiológicas y patológicas. Una comprensión de la apoptosis es importante, ya que desempeña un papel fundamental en la patogénesis de muchas enfermedades. En algunos, el problema se debe a una apoptosis excesiva, como en el caso de enfermedades degenerativas, mientras que en otros, muy poca apoptosis es el culpable. El cáncer es uno de los escenarios donde se produce muy poca apoptosis, dando lugar a células malignas que no mueren y la resistencia a los fármacos contra el cáncer. Según Kerr *et al.*, los mecanismos por los cuales se produce la evasión de la apoptosis pueden ser divididos en: 1) equilibrio interrumpido de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas, 2) función de caspasa reducida y 3) alteración de la señalización del receptor de muerte (Wong, 2011).

## 2.3 Cáncer

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Muchos tipos de cáncer se podrían prevenir evitando la exposición a factores de riesgo comunes como el humo de tabaco. Además, un porcentaje importante de cánceres pueden curarse mediante cirugía, radioterapia o quimioterapia, especialmente si se detectan en una fase temprana (OMS, 2017).

### 2.3.1 Factores de riesgo del cáncer

Los mecanismos por los que se produce y desarrolla el cáncer no se conocen con exactitud. Se piensa que puede ser debido a mutaciones espontáneas de los genes o por la acción de algún factor externo. A los agentes externos se les denomina factores de riesgo o agentes carcinógenos. Son las sustancias que, en contacto con un organismo, son capaces de generar en él enfermedades cancerosas. Su naturaleza es variada, habiéndose encontrado factores físicos, químicos y biológicos (ACCE, 2017).

Para que el cáncer se origine deben producirse de cuatro a seis mutaciones o alteraciones genéticas celulares, por lo que todo apunta a que los factores de riesgo deben estar en contacto con el organismo durante un considerable periodo de tiempo (años). En algunos casos, las personas presentan una predisposición genética al desarrollo de ciertos cánceres. Esto ocurre porque se heredan genes ya alterados (ACCE, 2017).

La mayoría de los carcinógenos químicos están relacionados con actividades industriales. Además, independientemente de su composición, la capacidad de una sustancia para producir cáncer va a depender de la cantidad de dosis recibida y del tiempo de exposición a la sustancia. El amianto, arsénico, benceno, cadmio, mercurio, níquel, plomo, hidrocarburos clorados, naftilamina, son algunos de los agentes con actividad carcinogénica más usuales.

Entre los agentes físicos destacan las radiaciones ionizantes (rayos X), las radiaciones no ionizantes (rayos ultravioleta del sol) y las radiaciones que emite la propia corteza terrestre (radón). Otra fuente de agentes físicos cancerígenos es la provocada por accidentes nucleares (ACCE, 2017).

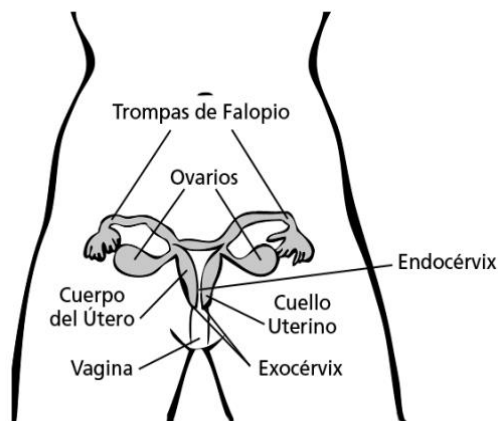
En los últimos años los agentes biológicos están tomando cada vez más protagonismo en la carcinogénesis humana. Hoy día sabemos que el 18% de los cánceres son atribuibles a infecciones persistentes provocadas por virus, bacterias o parásitos, entre los que destacan el virus del papiloma humano (cáncer de cuello uterino), el virus de la hepatitis B (cáncer de hígado) y el *Helicobacter pylori* (cáncer de estómago) (ACCE, 2017).

El consumo de tabaco y alcohol, la dieta malsana y la inactividad física son también factores de riesgo de cáncer en todo el mundo. Algunas infecciones crónicas también constituyen factores de riesgo, y son más importantes en los países de ingresos medios y bajos (OMS, 2014).

## 2.4 Cáncer Cervicouterino

El cáncer cervicouterino es el cuarto cáncer más común en las mujeres y el séptimo en general, con 528,000 casos nuevos estimados en 2012 (GLOBOCAN, 2012). En México el CaCu es la primera causa de muerte por neoplasias en mujeres mayores de 25 años (Chavaro *et al.*, 2009).

El cáncer cervicouterino se origina en las células que revisten el cuello del útero. El cuello del útero es la parte inferior del útero (la matriz). Algunas veces se le llama *cérvix uterino*. El cuerpo del útero (parte superior) es el lugar donde se desarrolla el feto. El cuello uterino conecta el cuerpo del útero con la vagina. La parte del cuello uterino más cercana al cuerpo del útero se llama *endocérvix*. La parte próxima a la vagina, es el *exocérvix* (o *ectocérvix*). Los dos tipos principales de células que cubren el cuello del útero son las células escamosas (en el *exocérvix*) y las células glandulares (en el *endocérvix*). El punto en el que estos tipos de células se encuentran se llama *zona de transformación* (Fig.5). La ubicación exacta de la zona de transformación cambia a medida que envejece y al dar a luz. La mayoría de los cánceres de cuello uterino se origina en las células de la zona de transformación (ACS, 2016).



**Fig.5.** Zona de transformación. La parte del cuello uterino más cercana al cuerpo del útero se llama *endocérvix*. La parte próxima a la vagina, es el *exocérvix*. Los dos tipos principales de células que cubren el cuello del útero son las células escamosas (en el *exocérvix*) y las *células glandulares* (en el *endocérvix*). Estos dos tipos de células se encuentran en un lugar llamado *zona de transformación*. (Tomado y modificado de: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/acerca/que-es-cancer-de-cuello-uterino.html>).

Existen dos tipos principales de cáncer de cuello uterino: el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma. Aproximadamente un 80% a 90% de los cánceres de cuello uterino son carcinomas de células escamosas. Estos cánceres se originan de células en el *exocérvix*. La mayoría de los tipos de cáncer de cuello uterino (cervicales) restantes son adenocarcinomas. Los adenocarcinomas son cánceres que se originan de células glandulares. El adenocarcinoma cervical se origina en las células de las glándulas productoras de mucosidad del *endocérvix*. Con menor frecuencia, el cáncer de cuello uterino tiene características tanto de los carcinomas de células escamosas como de los adenocarcinomas. Estos tumores se llaman *carcinomas adenoescamosos* o *carcinomas mixtos* (ACS, 2016).

### 2.4.1 Factores de Riesgo

Los factores de riesgo para el cáncer cervical incluyen:

- **Numero de compañeros sexuales.** Existe una relación directamente proporcional entre el riesgo de lesión intraepitelial y el número de parejas sexuales. Esta exposición se ha relacionado básicamente con la probabilidad de exposición al VPH (Mayo Clinic, 2017: Ortiz *et al.*, 2004).
- **Actividad sexual temprana.** Tener relaciones sexuales a una edad temprana (17 años o menos), implica la aparición de múltiples compañeros sexuales, con el consiguiente riesgo dado por dichos compañeros. Se ha demostrado también que en la adolescencia los tejidos cervicouterinos son más susceptibles a la acción de los carcinógenos (Mayo Clinic, 2017: Ortiz *et al.*, 2004).
- **Otras infecciones de transmisión sexual (ITS).** El tener otras ITS - como la clamidia, la gonorrea, la sífilis y el VIH/SIDA - aumenta el riesgo de VPH. Adicionalmente, la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) facilita el desarrollo de la neoplasia (Mayo Clinic, 2017: Ortiz *et al.*, 2004).
- **Sistema inmunológico débil.** Se puede ser más propenso a desarrollar cáncer de cuello uterino si el sistema inmunológico se debilita. Las mujeres con sistemas inmunológicos débiles (como los que tienen VIH / SIDA) son más susceptibles a adquirir VPH. Los pacientes inmunocomprometidos también están en mayor riesgo de tener un precáncer cervical que se desarrolla rápidamente en cáncer invasivo (Mayo Clinic, 2017: Health Guide, 2013).
- **Uso de anticonceptivos.** Las mujeres que toman anticonceptivos orales durante más de cinco años tienen un mayor riesgo de cáncer de cuello uterino, pero este riesgo vuelve a la normalidad dentro de unos años después de que se detienen las píldoras. Se propone por ejemplo, que el estradiol, en cooperación con el virus del papiloma humano, puede activar genes de respuesta temprana en las células infectadas y aumentan la transcripción de las oncoproteínas virales E6 y E7 (CTCA, 2017: Tirado *et al.*, 2005: Castro *et al.*, 2011).
- **Fumar.** El tabaquismo se asocia con cáncer cervical de células escamosas. En cuanto al tabaquismo, las personas que le rodean están expuestas a muchas sustancias químicas cancerígenas que afectan otros órganos, además de los pulmones. Estas sustancias dañinas son absorbidas a través de los pulmones y conducidas al torrente sanguíneo por todo el cuerpo. Las fumadoras tienen aproximadamente el doble de probabilidades respecto a las no fumadoras de padecer cáncer de cuello uterino. Se han detectado subproductos del tabaco en la mucosidad cervical de mujeres fumadoras (ACS, 2016).
- **VPH.** El factor de riesgo más importante para el cáncer de cuello uterino es la infección con el virus del papiloma humano (VPH) en las mujeres. También es un factor de riesgo para el cáncer de pene en los hombres y anal en hombres y mujeres. Los mismos tipos de VPH que infectan las áreas genitales pueden infectar la boca y la garganta (OPS-OMS, 2016).

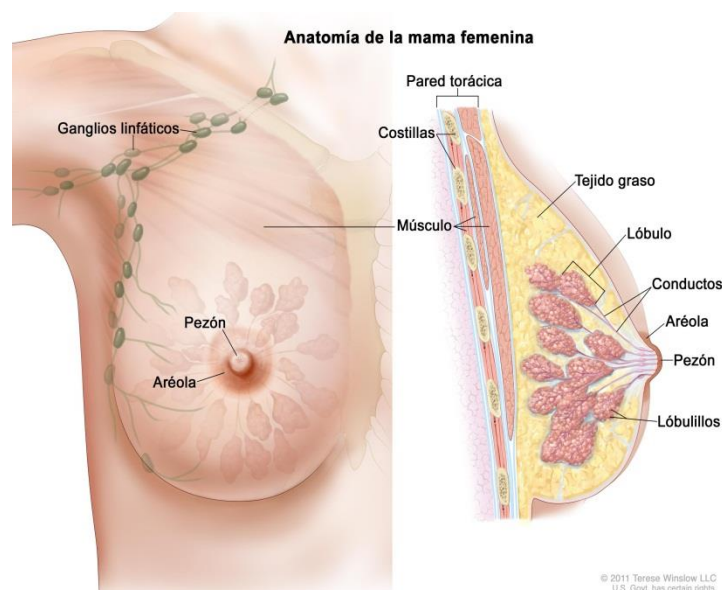
El virus del papiloma humano (VPH) es un virus de ADN de doble cadena de la familia de los Papovaviridae. Está constituido por aproximadamente 8,000 nucleótidos (Chavaro *et al.*, 2009).

Ciertos tipos de VPH pueden causar verrugas que pueden aparecer en o alrededor de los órganos genitales y en el área del ano. Estas verrugas pueden ser apenas visibles o pueden tener varias pulgadas de diámetro. Los dos tipos de VPH que causan la mayoría de los casos de verrugas genitales son el VPH 6 y el VPH 11. A estos tipos se les llama VPH de bajo riesgo porque rara vez están asociados al cáncer del cuello uterino. A otros tipos de VPH se les llama tipos de alto riesgo porque están fuertemente vinculados con cánceres, incluyendo cánceres de cuello uterino, vulva y vagina en mujeres, cáncer de pene en los hombres, y cáncer anal y oral tanto en hombres como en mujeres. Los tipos de alto riesgo incluyen VPH 16, VPH 18, VPH 31, VPH 33 y VPH 45, entre otros. Puede que no se presenten signos visibles de infección por un VPH de alto riesgo hasta que se originen cambios precancerosos o cáncer. Alrededor de dos tercios de todos los cánceres de cuello uterino son causados por VPH 16 y 18 (ACS, 2016).

## 2.5 Cáncer de Mama

El cáncer de mama es el segundo cáncer más común en el mundo y, con mucho, el cáncer más frecuente entre las mujeres con un estimado de 1.67 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados en 2012 (25% de todos los cánceres). El cáncer de mama es la quinta causa de muerte por cáncer en general (522,000 muertes) (GLOBOCAN, 2012).

La mama está constituida por múltiples lóbulos y lobulillos donde se produce la leche. Los lóbulos y lobulillos están unidos por una serie de tubos denominados conductos que conducen la leche hacia el pezón. También contiene vasos sanguíneos cuya función es proporcionar sangre a la glándula y vasos linfáticos, que son los encargados de recoger la linfa. Los vasos linfáticos confluyen en pequeñas formaciones redondeadas denominadas ganglios linfáticos. Los ganglios linfáticos más cercanos a la mama se encuentran en la axila y a ambos lados del esternón. La glándula está rodeada de tejido graso que proporciona consistencia y volumen a la mama (Figura. 6) (AECC, 2011).



**Figura.6.** Anatomía de la mama femenina. Se muestran los ganglios linfáticos, los lóbulos, los lobulillos, los conductos y otras partes internas de la mama. Tomado y modificado de: <https://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR710874.jpg>

El cáncer de mama se origina cuando las células en el seno comienzan a crecer en forma descontrolada. El cáncer de seno se forma en los tejidos de la mama, por lo general en los conductos (tubos que llevan la leche al pezón) y los lobulillos (glándulas que producen la leche). Puede darse tanto en hombres como en mujeres, aunque el cáncer de mama masculino es poco común. También hay otros tipos menos comunes de cáncer de seno (ACS, 2016: ESMO, 2011).

El cáncer de seno se puede propagar cuando las células cancerosas alcanzan la sangre o el sistema linfático y llegan a otras partes del cuerpo (ACS, 2016).

Este cáncer puede crecer de tres maneras:

- **Crecimiento local:** el cáncer de mama crece por invasión directa, infiltrando otras estructuras vecinas como la pared torácica (músculos y huesos) y la piel.
- **Diseminación linfática:** la red de vasos linfáticos que posee la mama permite que el drenaje de la linfa se efectúe a varios grupos ganglionares. Los ganglios situados en la axila (axilares) son los más frecuentemente afectados, seguidos de los situados en la arteria mamaria interna (zona central del tórax) y los ganglios supraclaviculares (encima de la clavícula) (AECC, 2013).
- **Diseminación hematógena:** se realiza a través de los vasos sanguíneos preferentemente hacia los huesos, pulmón, hígado y piel (AECC, 2013).

El cáncer de seno se puede dividir en diferentes tipos en función de la forma en que las células cancerosas se ven con un microscopio.

La mayoría de los cánceres de seno son carcinomas, un tipo de cáncer que comienza en las células (células epiteliales) que revisten los órganos y los tejidos como el seno. De hecho, los cánceres de seno son a menudo un tipo de carcinoma llamado *adenocarcinoma*, que es el carcinoma que comienza en el tejido glandular. Otros tipos de cáncer también pueden ocurrir en el seno, como los sarcomas, que empiezan en las células del músculo, grasa o tejido conectivo (ACS, 2015).

### Subtipos de cáncer de mama.

A menudo, la enfermedad está conformada por tres subtipos principales.

- **Receptor de hormonas positivo:** Las células normales y algunas células cancerosas del seno tienen receptores que se unen al estrógeno y a la progesterona. Estas dos hormonas a menudo fomentan el crecimiento de las células cancerosas del seno. Los cánceres de mama que expresan estos receptores se denominan cánceres con receptor de hormonas positivo. Estos cánceres pueden depender de las hormonas estrógeno y/o progesterona para su proliferación. Los cánceres con receptor de hormonas positivo pueden aparecer a cualquier edad, pero es posible que sean más frecuentes en mujeres posmenopáusicas. Aproximadamente, del 60 % al 75 % de los casos de cáncer de mama presentan receptores de estrógeno y/o progesterona (ACS, 2015: ASCO, 2014).
- **HER2 positivo.** Aproximadamente uno de cada cinco cánceres de seno contiene una cantidad muy elevada de una proteína promotora del crecimiento llamada HER2. El gen HER2 instruye a las células a producir esta proteína. A los tumores con niveles aumentados de HER2 se les conoce como *positivos para HER2*. Los cánceres que son positivos para HER2 tienen demasiadas copias del gen HER2, lo que resulta en mayores cantidades de proteína HER2

de lo normal. Estos cánceres tienden a ser más agresivos, es decir, crecen y se propagan con más rapidez que los otros cánceres de seno (ACS, 2015).

- **Triple negativo.** Si las células cancerosas del seno no contienen receptores de estrógeno ni de progesterona y no tienen exceso de HER2, se les llama triple negativos. Estos cánceres tienden a presentarse con más frecuencia en mujeres más jóvenes y en mujeres hispanas o de la raza negra. El cáncer de seno triple negativo tiende a crecer y a propagarse más rápidamente que la mayoría de los otros tipos de cáncer de seno. Debido a que las células tumorales no tienen receptores hormonales, la terapia hormonal no es útil en el tratamiento de estos cánceres. Tampoco son útiles los medicamentos dirigidos a HER2, pues estos cánceres no tienen exceso de HER2. No obstante, la quimioterapia sigue siendo útil. Los cánceres de mama triple negativos constituyen, aproximadamente, el 15 % de los cánceres de mama invasivos (ACS, 2015; ASCO, 2014).

### 2.5.1 Factores de Riesgo

- **Envejecimiento:** La edad avanzada es el principal factor de riesgo para la mayoría de cánceres. La probabilidad de presentar cáncer aumenta a medida que envejece (NCI, 2017; ESMO, 2011).
- **Genes:** Algunas mutaciones, sobre todo en los genes BRCA1, BRCA2 y p53, se asocian a un riesgo muy elevado de ese tipo de cáncer. El conocimiento actual sugiere que estos genes anormales causan menos del 10 % de los cánceres de mama. Otros genes que presentan mutaciones son CHEK2, PTEN, CDH1, STK11 entre otros (OMS, 2017; ESMO, 2011; ACS, 2015).
- **Antecedentes familiares de cáncer de mama:** El riesgo de cáncer de seno es mayor entre las mujeres cuyos parientes consanguíneos cercanos desarrollaron esta enfermedad. Si un familiar de primer grado (madre, hermana o hija) padece cáncer de seno, el riesgo de la mujer casi se duplica. El riesgo aumenta aproximadamente tres veces, si dos familiares de primer grado padecen la enfermedad.  
Los principales genes implicados en las formas familiares del cáncer de mama son BRCA1 y BRCA2. El riesgo de que una persona portadora de la mutación BRCA1 tenga cáncer de mama en algún momento de su vida es de un 80–85%, con un 60 % de posibilidades de que el cáncer sea bilateral (ESMO, 2011; ACS, 2015).
- **Antecedentes personales de cáncer de mama:** Haber tenido un cáncer de mama aumenta el riesgo de tener un nuevo cáncer de mama en una parte diferente del seno o en el otro seno (ESMO, 2011).
- **Exposición a estrógenos y progesterona a lo largo de la vida:** Las mujeres que han tenido períodos menstruales que comenzaron antes de los 12 años y que terminaron después de los 55 años o haber presentado el inicio de la menopausia a una edad tardía tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama. Las mujeres que no han tenido hijos o que tuvieron su primer hijo después de los 30 años aumentan el riesgo (ESMO, 2011; NCI, 2017).
- **Factores geográficos y sociales:** La diferente incidencia del cáncer de mama en los países desarrollados y los países en desarrollo puede explicarse en parte por los efectos de la alimentación, edad del primer embarazo y número de partos (OMS, 2017).
- **Uso de fármacos que contienen estrógenos y progesterona:** El uso de la píldora anticonceptiva oral, especialmente antes del primer embarazo aumenta

el riesgo de cáncer de mama. Si una mujer ha dejado de tomar la píldora durante diez años, el riesgo disminuye. El uso de la terapia hormonal de reemplazo después de la menopausia aumenta el riesgo de cáncer de mama (terapia que combina estrógenos y progesterona o en menor grado solo con estrógenos). El riesgo se observa en mujeres que estén usando terapia hormonal o que la hayan usado recientemente (WCRFI, 2015: ESMO, 2011: ACS, 2015).

- **Radioterapia:** Haber recibido radioterapia en la infancia o la adolescencia (generalmente para el tratamiento de linfomas) aumenta el riesgo de cáncer de mama en la adultez (ESMO, 2011).
- **Sobrepeso y obesidad:** Tener sobrepeso u obesidad aumenta el riesgo de tener cáncer de mama. Esto es probablemente debido a la producción de estrógenos en los tejidos grasos.
- **Tejido mamario denso:** Los senos están formados por tejido adiposo, tejido fibroso y tejido glandular. Se dice que una mujer tiene el tejido mamario denso cuando tiene más tejido glandular y fibroso y menos tejido adiposo y es de 1.2 a 2 veces mayor que las mujeres con una densidad promedio en sus senos. (ESMO, 2011: ACS, 2015).
- **Consumo de alcohol y tabaquismo:** El consumo de bebidas alcohólicas está claramente asociado a un aumento en el riesgo de padecer cáncer de seno. El riesgo aumenta con la cantidad de alcohol consumido. Se sabe también que el consumo excesivo de bebidas que contienen alcohol incrementa el riesgo de desarrollar otros tipos de cáncer, pero los mecanismos no están claros. Aún existe controversia entre la asociación del tabaquismo y el cáncer de mama, pues algunos autores señalan que los derivados del tabaco, como el benzopireno, las aminas aromáticas y las nitrosaminas están implicados en la carcinogénesis de la mama; otros autores, sin embargo, no han encontrado asociación alguna (Aguilar *et al.*, 2012: ESMO, 2011: ACS, 2015).

## 2.6 Cáncer de Pulmón

El cáncer de pulmón es la causa más frecuente de muerte por cáncer en hombres y la cuarta en mujeres en todo el mundo. En México, el cáncer de pulmón es la segunda causa de muerte por tumores malignos en el hombre y la octava en mujeres y es la enfermedad más importante atribuible al tabaquismo. Por lo general, los cánceres de pulmón comienzan en las células que revisten los bronquios y en otras partes del pulmón, como los bronquiolos o los alvéolos (SMEO, 2016: INCAN, 2015).

Las células cancerosas del pulmón se pueden diseminar al separarse de un tumor pulmonar. Pueden viajar a través de los vasos sanguíneos o vasos linfáticos para llegar a otras partes del cuerpo. Después de la propagación, las células cancerosas pueden adherirse a otros tejidos y crecer para formar nuevos tumores que pueden dañar esos tejidos (NHI, 2012).

Existen dos categorías de cáncer pulmonar clínicamente importantes considerando el origen y el comportamiento de las células cancerosas: cáncer pulmonar de células pequeñas (CPCP) y el cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP).

El primero representa aproximadamente el 25% de los cánceres pulmonares y es de comportamiento muy agresivo, proliferando rápidamente. Muestra la mayor relación con el tabaquismo. Por su parte, el segundo constituye, aproximadamente, el 75% de los tipos de cáncer pulmonar y se subdivide en tres subtipos (Moctezuma & Patiño, 2009).



**Adenocarcinoma:** Alrededor del 40% de los cánceres de pulmón son adenocarcinomas. Este tipo de cáncer de pulmón ocurre principalmente en personas que fuman o que han fumado, pero también es el tipo más común de cáncer de pulmón observado en las personas que no fuman. Este cáncer es más común en las mujeres que en los hombres. En comparación con otros tipos de cáncer de pulmón, es más probable que ocurra en personas jóvenes. Por lo general, el adenocarcinoma se encuentra en partes externas del pulmón. Aunque suele crecer más lentamente que otros tipos de cáncer de pulmón (SMeO, 2016).

**Carcinoma de células escamosas (epidermoide):** Aproximadamente un 25% a 30% de todos los cánceres de pulmón son carcinomas de células escamosas. Estos cánceres se originan de células que cubren el interior de las vías respiratorias y tienden a crecer cerca del centro del pulmón, cerca de una vía respiratoria principal (bronquio). A menudo están relacionados con antecedentes de tabaquismo (SMeO, 2016: CR-UK, 2017).

**Carcinoma (indiferenciado) de células grandes:** Este tipo representa aproximadamente del 10% al 15% de los cánceres de pulmón. El cáncer puede aparecer en cualquier parte del pulmón, y tiende a crecer y a propagarse rápidamente, lo que puede hacer más difícil tratarlo (SMeO, 2015).

### 2.6.1 Factores de Riesgo

- **Fumar:** Es definitivamente el factor de riesgo más importante. Se cree que aproximadamente el 80% de las muertes por cáncer de pulmón se debe al hábito de fumar. El riesgo de cáncer de pulmón entre los fumadores es muchas veces mayor que entre los no fumadores. Se sabe que deben transcurrir unos 10 años para la recuperación del epitelio pulmonar normal, pero abandonar el hábito reduce el riesgo de desarrollar la enfermedad. Además el papel del cigarro contiene alquitranes con hidrocarburos carcinógenos. (Ramos *et al.*, 2012: ACS, 2016).
- **Humo secundario del cigarrillo:** El humo del cigarrillo, las pipas o los puros que fuman otras personas (humo secundario) también causa cáncer de pulmón. Cuando una persona no fuma, pero respira el humo que otros producen puede aumentar su riesgo de cáncer de pulmón. Se cree que el humo de segunda mano causa más de 7,000 muertes por cáncer de pulmón cada año (ACS, 2016: CDC, 2017).
- **Radón:** Es un gas natural que viene de las rocas y la tierra y que puede quedar atrapado en las casas y otras edificaciones. No tiene olor, sabor ni color. De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental, el radón causa unos 20,000 casos anuales de cáncer de pulmón, lo que lo convierte en la segunda causa principal de esta enfermedad.  
En el ambiente exterior hay tan poco radón que probablemente no sea peligroso. Respirarlo, expone los pulmones a pequeñas cantidades de radiación. Esto puede aumentar el riesgo individual de padecer cáncer de pulmón (ACS, 2016: CDC, 2017).
- **Otras sustancias:** Otros cancerígenos que se encuentran en algunos lugares de trabajo y que pueden aumentar el riesgo de cáncer de pulmón incluyen: minerales radiactivos como el uranio, sustancias químicas o minerales inhalados tales como asbestos, arsénico, berilio, cadmio, sílice, cloruro de vinilo, componentes de níquel, componentes de cromo, productos de carbón, gas mostaza y éteres de clorometilo y productos de la combustión del diesel,

sin olvidar la influencia de la contaminación urbana y atmosférica (ACS, 2016; Moctezuma & Patiño, 2009).

- **Antecedentes personales o familiares del cáncer de pulmón:** Si ha padecido cáncer de pulmón, tiene un mayor riesgo de padecer otro cáncer de pulmón. Su riesgo de padecer cáncer de pulmón puede ser mayor si sus padres, hermanos o hijos tuvieron la enfermedad. Esto puede ser así porque también fuman, o viven o trabajan en el mismo lugar donde están expuestos al radón y a otras sustancias que pueden causar cáncer de pulmón (ACS, 2016; CDC, 2017).
- **Genética:** en cuanto a los factores genéticos, existe un factor ligado a la enzima anhidrocarbonhidrolasa que tiene la posibilidad de convertir los hidrocarburos policíclicos en sustancias cancerígenas. Los oncogenes Myc están sobreexpresados en los cánceres de células pequeñas, y el ras y k-ras en los adenocarcinomas. El gen 9P se ha visto alterado y está presente en más del 50% de los carcinomas de pulmón. Otros factores determinantes son las cicatrizaciones por patologías bronquiales previas, como bronquitis crónica, bronquiectasias y tuberculosis (Ramos *et al.*, 2012).

## 2.7 Tratamientos

El diagnóstico correcto del cáncer es esencial para un tratamiento adecuado y eficaz, porque cada tipo de cáncer necesita un tratamiento específico que puede abarcar una o más modalidades, tales como la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia. El objetivo principal es curar el cáncer o prolongar en lo posible la vida del paciente. Otro objetivo importante es mejorar la calidad de vida del enfermo (OMS, 2017).

### Cirugía

Si el cáncer parece estar restringido a una zona (localizado). Se puede utilizar la cirugía para extirparlo junto con cualquier tejido alrededor que pudiera contener células cancerosas. La cirugía es más efectiva cuando el tumor no se ha propagado hacia otras áreas. La cirugía ofrece la mayor probabilidad de cura para muchos tipos de cáncer, especialmente aquellos que aún no se han propagado a otras partes del cuerpo. Otros tratamientos, como la radioterapia y la quimioterapia, se pueden utilizar junto con la cirugía, o bien, puede que se administren antes o después de ésta (ACS, 2017).

La cirugía tiene varios propósitos diferentes:

- **Tratamiento primario:** Para los tumores localizados (que se encuentran en un lugar) y no muestran evidencia de diseminación, la cirugía suele ser el tratamiento primario. El objetivo de esta cirugía es eliminar completamente todos los signos visibles del cáncer (CSC, 2009).
- **Cirugía preventiva (profiláctica):** La cirugía se realiza para eliminar el tejido corporal que es probable que se convierta en cáncer - a pesar de que no hay signos de cáncer en el momento de la cirugía. A veces un órgano entero se elimina cuando una persona tiene una condición que los pone en un riesgo muy alto de tener cáncer allí. La cirugía se hace para reducir el riesgo de cáncer y ayudar a prevenir la posibilidad de cáncer, pero no garantiza la prevención del cáncer (ACS, 2017).

- **Debulking:** Un procedimiento quirúrgico se puede utilizar para reducir el tamaño de un tumor que no se puede eliminar por completo, permitiendo que la quimioterapia o la radioterapia funcionen más eficazmente (CSC, 2009; ACS, 2017).
- **Paliación:** Este tipo de cirugía se utiliza para tratar problemas causados por cáncer avanzado. Esta cirugía es realizada para aliviar los síntomas mediante la extirpación de parte de un tumor que está presionando sobre un nervio o causando una obstrucción (ACS, 2017; CSC, 2009).
- **Reconstrucción:** la cirugía reconstructiva ayuda a restaurar la función o aspecto de un área del cuerpo donde se localizó un tumor (CSC, 2009).

## Radioterapia

Al igual que la cirugía, la terapia de radiación se usa principalmente para tratar cánceres localizados (los que se encuentran en un área). La radioterapia utiliza partículas u ondas de alta energía, como rayos X, rayos gamma, haces de electrones o protones para destruir o dañar las células cancerosas e impedir su crecimiento. Puede usarse por sí sola o en conjunto con la cirugía o quimioterapia (ACS, 2017). La radiación se aplica de dos maneras:

- **Radiación externa:** La radioterapia externa es suministrada por una máquina que apunta los rayos de alta energía en el área específica del cuerpo que se va a tratar, recibir radiación externa no causa dolor, ya que es similar a tomarse radiografías. Por lo general se lleva a cabo de manera ambulatoria (no requiere hospitalización) y las sesiones de tratamiento toman muy poco tiempo. Con mayor frecuencia, el tratamiento se administra 5 días a la semana durante 5 a 8 semanas, dependiendo del tamaño, la ubicación y el tipo de cáncer que se está tratando (CSC, 2009; ACS, 2017).
- **Implantes radiactivos:** En ciertos casos, la radiación se puede administrar a través de implantes que se colocan en el interior del cuerpo. Otro nombre para la radiación que se administra como un implante es braquiterapia. En este tipo de radiación se usan pequeños contenedores de radiación que se colocan dentro o cerca del tumor. A través de los implantes, el paciente puede recibir una mayor dosis total de radiación en un área más pequeña y en un periodo de tiempo más breve que con la radiación externa (ACS, 2017; CSC, 2009).
- **Radiación sistémica :** Los medicamentos radiactivos administrados por vía oral o colocados en una vena se utilizan para tratar ciertos tipos de cáncer. Estos medicamentos luego viajan por todo el cuerpo (ACS, 2017).

## Quimioterapia

Consiste en tratar el cáncer con medicamentos de acción fuerte que por lo general se inyectan a través de una vena o se administran oralmente. En la mayoría de los casos se emplea más de un medicamento. A diferencia de la radioterapia o la cirugía, los medicamentos quimioterapéuticos pueden tratar el cáncer que se ha propagado, ya que viajan por todo el torrente sanguíneo. La quimioterapia se administra en ciclos, cada uno de ellos seguido por un periodo de recuperación. Un ciclo podría consistir en una dosis seguida de días o semanas sin tratamiento. El periodo de descanso da tiempo a las células normales del cuerpo para recuperarse (ACS, 2017).

La quimioterapia es un tratamiento sistémico (cuerpo entero). Esto significa que puede destruir las células cancerosas casi en cualquier parte del cuerpo. La quimioterapia es

más eficaz contra las células que se dividen rápidamente, como el cáncer. Sin embargo, algunas células sanas normales también pueden ser dañadas por este tratamiento. Debido a que la quimioterapia es un tratamiento sistémico, los efectos secundarios asociados con la quimioterapia a menudo resultan del daño de las células sanas, incluso en áreas que no son sitios de cáncer (CSC, 2009).

### **Inmunoterapia**

Es un tipo de tratamiento que ayuda al sistema inmunitario a combatir el cáncer. La inmunoterapia es un tipo de terapia biológica. La terapia biológica puede ser un tratamiento contra el cáncer que restaura o estimula el propio sistema inmunológico del cuerpo para detener o ralentizar el crecimiento de las células cancerosas y evitar que el cáncer se propague. La bioterapia se administra de la misma manera que se administra la quimioterapia: por vía oral, por vena o por inyección. La bioterapia se puede administrar en combinación con quimioterapia (ACS, 2017: CSC, 2009).

Los principales tipos de inmunoterapia que se utilizan actualmente para tratar el cáncer son:

- Anticuerpos monoclonales : Son versiones hechas por el hombre de las proteínas del sistema inmunológico. Los anticuerpos pueden ser muy útiles en el tratamiento del cáncer porque pueden ser diseñados para atacar una parte muy específica de una célula cancerosa (ACS, 2017).
- Otras inmunoterapias no específicas : Estos tratamientos aumentan el sistema inmunológico de una manera general, esto puede ayudar al sistema inmunológico a atacar las células cancerosas (ACS, 2017).

### **Medicina de precisión y Terapia Dirigida**

La medicina de precisión usa la información sobre genes, proteínas y otras características del cáncer de una persona a fin de determinar el diagnóstico o el tratamiento de la enfermedad. La terapia dirigida es la base de la medicina de precisión. Se trata de un tipo de tratamiento del cáncer que actúa sobre los cambios que promueven el crecimiento, la división y diseminación de las células cancerosas. La mayoría de las terapias dirigidas ayudan a tratar el cáncer al interferir con las proteínas específicas que promueven el crecimiento y la diseminación de los tumores en el cuerpo (NIH, 2017).

### **Terapia hormonal**

La terapia hormonal es un tratamiento contra el cáncer que frena o detiene el crecimiento de un cáncer que usa hormonas para crecer. La terapia hormonal también se llama terapia endocrina (NIH, 2017). La terapia hormonal se usa para:

- Tratamiento del cáncer  
La terapia hormonal puede hacer que disminuya la posibilidad de que regrese el cáncer o que se detenga o sea más lento su crecimiento (NIH, 2017).
- Alivio de los síntomas del cáncer  
La terapia hormonal puede usarse para reducir los síntomas o evitarlos en hombres con cáncer de próstata que no pueden tener cirugía o radioterapia (NIH, 2017).

La terapia hormonal se divide en dos grandes grupos, los que bloquean la capacidad del cuerpo para producir hormonas y los que interfieren con la forma en que las hormonas se comportan en el cuerpo. (NIH, 2017).

La radioterapia y quimioterapia son los tratamientos más comunes sin embargo, resultan ser citotóxicos y poco selectivos es decir atacan a las células cancerosas como a las células sanas, además de ser agresivos y presentar efectos secundarios en los pacientes poniendo en riesgo la calidad de vida. Por lo que ha surgido la necesidad de buscar otras alternativas más eficaces para tratar el cáncer.

En los últimos años ha habido un creciente interés en el uso de las medicinas complementarias y alternativas, debido a las desventajas asociadas con las quimioterapias convencionales contra el cáncer y las supuestas ventajas de opciones de tratamiento más naturales. Los compuestos fitoquímicos de extractos de raíces de plantas, bulbos, cortezas, hojas, tallos y otros han mostrado potencial prometedor como fármacos contra el cáncer. (Chinembiri *et al.*, 2014).

El cáncer, es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo. La toxicidad asociada con los quimioterapéuticos actuales ha aumentado la demanda para el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos. Muchos fármacos establecidos clínicamente son productos naturales. Entre los diversos productos naturales, los flavonoides han atraído mucha atención debido a su notable espectro de actividades farmacológicas tales como antioxidantes, antimutagénicos, antibacterianos, antiangiogénicos, antiinflamatorios, antialérgicos, moduladores de actividades enzimáticas y actividad anticancerígena (Ravishanka *et al.*, 2013).

Existe una abundancia de recursos naturales para uso medicinal en todo el mundo, muchos de los cuales aún no han sido explotados para su posible aplicación en la industria farmacéutica. Las plantas son el recurso natural más utilizado para aplicaciones en la ciencia farmacéutica. Los fitoquímicos que tienen propiedades antioxidantes están siendo considerados como una indicación de una posible actividad contra el cáncer. Los carotenoides, flavonoides y terpenoides son algunos de los grupos de fitoquímicos con alto potencial anticancerígeno (Chinembiri *et al.*, 2014).

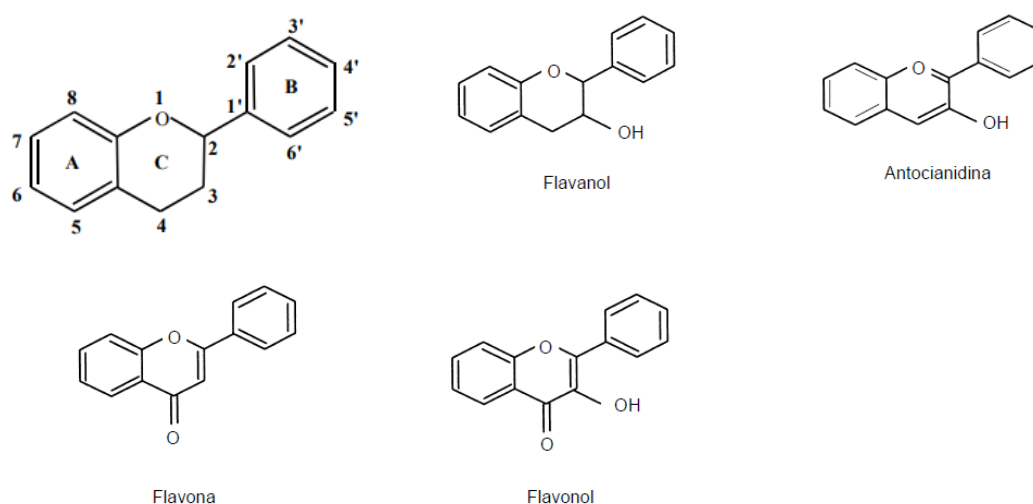
## 2.8 Flavonoides

Los flavonoides representan un amplio grupo de compuestos de origen natural que tienen gran valor como prometedores agentes antitumorales. Su amplia bioactividad y su elevada presencia en la dieta humana los hace merecedores de la atención de la investigación farmacológica. Actualmente, los campos en los que más estudios se realizan con flavonoides son el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Kumar & Pandey, 2013; Rubio, 2009).

La búsqueda de principios activos dentro de los flavonoides tiene, desde el punto de vista farmacológico, algunas ventajas respecto a otros grupos de compuestos naturales. La más importante es la uniformidad de la configuración química de toda la familia, de modo que las relaciones entre estructura y actividad son más fáciles de establecer. Por otro lado, la disponibilidad de las moléculas flavónicas y la relativa facilidad de su obtención por síntesis favorecen la evaluación de sus propiedades (Rubio, 2009).

El primer flavonoide fue identificado en 1930 por el premio Nobel de Fisiología y Medicina Szent-Györgyi, quien aisló de la cáscara de limón una sustancia, la citrina, que probó regular la permeabilidad de los capilares al ser consumida, aunque probablemente la primera vez que se describió a los flavonoides fue cuando Robert Boyle en 1664 hizo una primera descripción de los efectos de los pigmentos de las flores en medio ácido y en medio básico (Quiñones & Aleixandre, 2012; Manthey & Buslig, 1998; Rubio, 2009).

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 1 al 8, y los del anillo B desde el 1' al 6' (Fig.7). (Quiñones & Aleixandre, 2012; Martínez *et al.*, 2002).

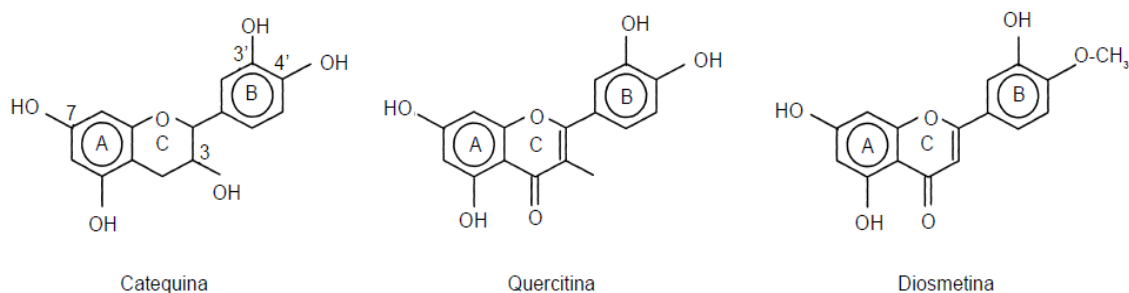


**Fig.7.** Flavonoides. Estructura básica y tipos. (Tomado y modificado de <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>).

Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo OH en posición 3 del anillo C (Martínez *et al.*, 2002).
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C (Martínez *et al.*, 2002).

Tres características estructurales son importantes para su función: a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi; b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3; c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5. La quercetina presenta las tres características, mientras que la catequina solo presenta la primera y la diosmetina solo la segunda. (Martínez *et al.*, 2002; López, 2002) (Fig.8).



**Fig.8.** Características estructurales de los principales tipos de flavonoides. Se observan las distintas posiciones de los grupos OH, y la presencia o ausencia de los dobles enlaces. (Tomado y modificado de: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>).

### 2.8.1 Biodisponibilidad

Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas; proporcionar color, fragancia y sabor a los frutos, flores y semillas, lo que los convierte en atractivos para insectos, aves o mamíferos, que ayudan en la transmisión de polen o semillas. Las plantas liberan diversos productos químicos tanto para disuadir y atraer a los insectos. También funcionan como defensa ante herbívoros, regulación del transporte de la hormona auxina, inducción de la nodulación por parte de las bacterias fijadoras de nitrógeno, protección contra los hongos etc. Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. (Mierziak *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2002; Rubio, 2009).

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soya, los cuales son consumidos en la dieta humana de forma habitual y también pueden utilizarse en forma de suplementos nutricionales, junto con ciertas vitaminas y minerales. Los flavonoides se encuentran también en extractos de plantas como arándano, ginkgo biloba, cardo, mariano o crataegus. Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre (Yao *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2002; Batra *et al.*, 2013).

Abundan, sobre todo, en las partes aéreas jóvenes y más expuestas al sol, como hojas, frutos y flores, ya que la luz solar favorece su síntesis. Una excepción son los tubérculos de cebolla, que contienen una gran cantidad de quercitina 4'-D-glucósidos (López, 2002; Martínez *et al.*, 2002).

Los flavonoides son importantes para el desarrollo normal de las plantas; se encuentran localizados en la membrana del tilacoide de los cloroplastos. Son sintetizados en el citoplasma y luego migran hacia su destino final en las vacuolas celulares. Están disueltos como glicósidos en el jugo vacuolar, cloroplastos y membranas. La luz no es esencial para su formación, pero influye de forma cuantitativa (Cartaya & Reynaldo, 2001; Rubio, 2009).

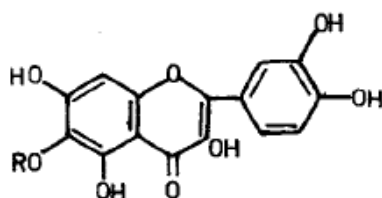
Los flavonoides constituyen un grupo de sustancias colorantes importantes en las plantas. Una gran proporción de flores tienen tonalidades blancas marfil o crema, debido a estos pigmentos. También contribuyen a los colores naranjas escarlatas, malvas y azules. La gran mayoría de ellas están pigmentadas por las agliconas más comunes: flavonas y flavonoles (Cartaya & Reynaldo, 2001).

Los principales precursores de flavonoides son la fenilalanina, obtenida a través de la vía del ácido shikímico y la vía del ácido malónico (Andersen & Markham, 2006).

El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones. Otras actividades que merecen ser destacadas son las acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades antitrombóticas y antiinflamatorias (Martínez *et al.*, 2002).

El número de estudios ha puesto de manifiesto su importancia como antioxidantes naturales y su papel beneficioso mediante su administración en la dieta, en la prevención de muchas enfermedades infecciosas (bacterianas y virales), enfermedades relacionadas con la edad, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer actuando a diferentes niveles dentro del proceso de inducción y proliferación de los tumores (Kumar & Pandey, 2013; Cartaya & Reynaldo, 2001).

En cuanto a la actividad antitumoral de los flavonoides se ha demostrado que la quercetagina y Patuletina son activas contra el carcinoma de Lewis (lengua) (Fig.9). También se sugiere que la quercetina pueda tener efectos protectores contra el cáncer gástrico (Ferraro, 1983; Wenying *et al.*, 2003).



**R= H: quercetagina**

**R= CH<sub>3</sub>: patuletina**

**Fig.9.** Se muestra la estructura y similitud entre la Quercetagina y Patuletina. (Tomado y modificado de <http://www.acuedi.org/ddata/6753.pdf>).

En experimentos *in vitro* se ha confirmado el papel protector de la quercetina, la cual ejerce efectos de inhibición frente a células cancerígenas en humanos: en colon, glándula mamaria y ovario, en región gastrointestinal y en la leucemia. De igual manera se estima que actúa como preventivo del cáncer de mama (Martínez *et al.*, 2002).

Algunos flavonoides han sido reportados como potentes inhibidores de la aromatasas. Pruebas sustanciales apoyan el concepto de que los estrógenos están involucrados en carcinomas mamarios. El estradiol, el estrógeno endógeno más potente, es biosintetizado a partir de andrógenos por el complejo enzimático del citocromo P450



llamado aromatasa. La inhibición de la aromatasa es un enfoque importante para reducir los efectos estimulantes del crecimiento de los estrógenos en el cáncer de mama dependiente de hormonas. Por lo tanto, los flavonoides podrían ser considerados agentes potenciales contra el cáncer de mama a través de la inhibición de la actividad de la aromatasa (Wenying *et al.*, 2003).

## 2.9 Patuletina

La Patuletina es un flavonol que se obtuvo de la flor de Cempasúchil. El Cempasúchil es una especie de la familia Asteraceae, nativa de México y se encuentra en estado silvestre (Fig.10).

La Patuletina se encuentra ampliamente distribuida en las asteráceas (Asteraceae), también llamadas compuestas (Compositae) por ejemplo en *Xanthium spinosum*, *Matricaria chamomilla* (manzanilla alemana) y *Chamaemelum nobile* (manzanilla romana) (Salinas *et al.*, 1998; Srivastava & Gupta, 2009).

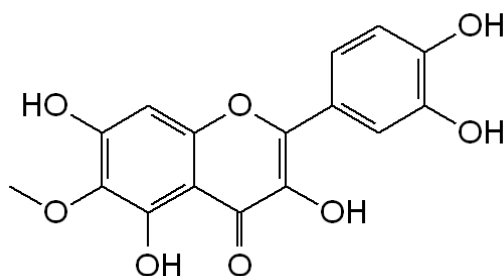


Fig.10. Estructura del flavonoide Patuletina.

Jabeen *et al.* (2016), reportan un estudio realizado con *Tagetes patula* Linn, perteneciente a la familia *compositae* que es ampliamente conocida por sus propiedades fitoquímicas y medicinales. Tradicionalmente, la planta es comestible y se utiliza para tratar la tos, cólicos, estreñimiento, diarrea, reumatismo y problemas oculares. Se sabe que la planta posee propiedades antimicrobianas, antisépticas, purificadoras de la sangre y diuréticas. Toda la planta de *T. patula* se toma internamente en forma de polvo. Químicamente, diferentes partes de *T. patula* contienen carotenos, terpenos, esteroides, flavonoides y tiofenos. Se sabe que los flavonoides de diferentes clases exhiben varias propiedades farmacológicas y bioquímicas y también tienen un papel regulador en diferentes hormonas y tienen un gran potencial terapéutico debido a sus amplias acciones biológicas. Patuletina es uno de los principales flavonoides encontrados en *T. patula*. Fue aislado por primera vez por Rao y Seshadri en 1941 a partir de los pétalos de *T. patula* y representado como 3,5,7,3', 4'-pentahidroxi-6-metoxi flavona. (Jabeen *et al.*, 2016).

Patuletina pertenece a un grupo biológicamente activo de compuestos fenólicos "flavonoles" que están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Es un flavonoide no tóxico que se puede extraer fácilmente en gran cantidad principalmente de las flores. También se ha informado de otras especies de *Tagetes*. Se sabe que la patuletina posee diversas actividades biológicas, que incluyen propiedades de eliminación de radicales, antiinflamatorias, antimicrobianas, analgésicas, antiespasmódicas e hipotensoras. Estas propiedades significativas de patuletina junto con su nula toxicidad

y potente efecto inhibidor sobre diversos parámetros inflamatorios (potente efecto supresor en la producción de citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$ ) llevan a la siguiente conclusión; la patuletina podría ser considerada como un potencial inmunosupresor, anti TNF- $\alpha$  y candidato principal antiartrítico (Jabeen *et al.*, 2016).

En cuanto a la manzanilla las flores secas se utilizan en gran medida por sus propiedades medicinales. La manzanilla alemana en particular es la variedad más común utilizada con fines medicinales. Se sabe que contiene varias clases de compuestos biológicamente activos, incluyendo aceites esenciales y varios polifenoles; incluyendo apigenina, quercetina y patuletina como glucósidos y varios derivados acetilados. La manzanilla posee significativamente actividad antiproliferativa y anticancerígena en comparación con otros derivados glucósidos. Numerosos estudios han evaluado los efectos biológicos; antiproliferativos y de inducción de la apoptosis (Srivastava & Gupta, 2009).

Los resultados en un estudio muestran que la exposición de las células PC-3 al extracto acuoso de manzanilla durante 24 horas aumento la inhibición del crecimiento celular a concentraciones comprendidas entre 25 y 800  $\mu\text{g/ml}$  además, provocó la inducción de apoptosis (Srivastava & Gupta, 2009).

Es notable que los flavonoides (compuestos polifenólicos) exhiban un espectro notable de actividades biológicas, incluyendo aquellas que podrían ser capaces de influenciar procesos que están desregulados durante el desarrollo del cáncer. Por lo tanto, pueden tener efectos beneficiosos para la salud y pueden considerarse posibles agentes quimiopreventivos o terapéuticos contra el cáncer (Wenying Ren *et al.*, 2003).

Un estudio realizado entre 1996 y 1998 sugiere fuertemente un posible papel de los flavonoides en la prevención del cáncer de mama. En otro estudio se encontró que los hombres con ingestas de quercetina más altas tenían una menor incidencia de cáncer de pulmón, y los hombres con mayor ingesta de myricetina tenían un menor riesgo de cáncer de próstata. Estos datos sugieren un papel protector de los flavonoides contra el cáncer. Además, un grupo de investigación en Uruguay realizó un estudio en el período de enero de 1996 a diciembre de 1997 y se encontró que los flavonoides mostraron una marcada reducción del 70% en los riesgos de cáncer de cavidad oral, faringe, laringe, esófago y gástrico (Wenying *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que los flavonoides inhiben la carcinogénesis *in vitro* y evidencia sustancial indica que también pueden hacerlo *in vivo*. Pueden inhibir la carcinogénesis al afectar los eventos moleculares en las etapas de iniciación, promoción y progresión. (Wenying Ren *et al.*, 2003).

## **2.10 Principales mecanismos moleculares de acción de los flavonoides**

La diversidad de patrones estructurales de los flavonoides ha dado lugar a que sean reconocidos como una rica fuente de compuestos con potenciales propiedades anticancerígenas. La capacidad de los flavonoides para bloquear el ciclo celular, inducir la apoptosis, interrumpir la formación del huso mitótico o inhibir la angiogénesis los convierte en agentes prometedores en la investigación contra el cáncer. Los efectos quimiopreventivos de los flavonoides están estrechamente ligados a sus propiedades anticancerígenas que implican la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y oxidantes promotores del crecimiento que son los principales catalizadores para la promoción de tumores. Estas propiedades destacan el potencial

de los flavonoides para el desarrollo como agentes antiproliferativos (Ravishankar *et al.*, 2013).

\* **Inhibición de la proliferación celular**

La prevención del cáncer está generalmente asociada con la inhibición, reversión o retraso de la hiperproliferación celular. Se ha demostrado que la mayoría de los flavonoides inhiben la proliferación en muchos tipos de líneas celulares de cáncer humanas cultivadas, mientras que son menos o nada tóxicas para las células normales humanas. El mecanismo molecular de la antiproliferación puede implicar la inhibición del proceso prooxidante que causa la promoción del tumor. Los oxidantes promotores del crecimiento y los ROS son los principales catalizadores de las etapas de promoción y progresión del tumor. Los flavonoides son eficaces en la inhibición de la xantina oxidasa, COX o LOX55, y por lo tanto inhiben la proliferación de células tumorales. Además, el mecanismo de inhibición de la biosíntesis de poliaminas puede contribuir a las actividades antiproliferativas de los flavonoides (Wenying *et al.*, 2003; Chahar, 2011).

\* **Detención del ciclo celular**

Un gran número de estudios experimentales demuestran que muchos fitoquímicos detienen la progresión incontrolada del ciclo celular en las células cancerosas. Entre estos fitoquímicos, los flavonoides naturales han sido identificados como una de las principales clases de agentes anticancerígenos naturales que ejercen actividad antineoplásica a través de la detención del ciclo celular como mecanismo principal en varios tipos de células cancerosas (Singh & Agarwal, 2006).

Se ha encontrado que los puntos de control tanto en G1/S como en G2/M del ciclo celular en líneas celulares de cáncer cultivadas están perturbados por flavonoides tales como silimarina, genisteína, quercetina, daidzeína, luteolina, kaempferol, apigenina y 3-galato de epigallocatequina. Estudios de diferentes laboratorios revelaron que el flavopiridol podría inducir la detención del ciclo celular durante G1 o G2/M por la inhibición de todas las CDK hasta ahora examinadas (Wenying Ren *et al.*, 2003).

\* **Inducción de apoptosis**

Las propiedades anticancerígenas significativas observadas de los flavonoides pueden deberse a apoptosis. Se ha demostrado que los flavonoides inducen la apoptosis en algunas líneas celulares de cáncer, sin dañar células normales. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales los flavonoides inducen apoptosis todavía no han sido aclarados. Pueden estar involucrados varios mecanismos, incluyendo la inhibición de la actividad de la topoisomerasa I/II del ADN, la disminución de ROS, modulación de las vías de señalización, activación de la endonucleasa y supresión de la proteína Mcl-1 (Chahar, 2011; Wenying *et al.*, 2003).

### **3. Planteamiento del problema**

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y los tratamientos que se emplean resultan ser poco eficientes sobre todo cuando el cáncer es metastásico y los tumores son de difícil acceso. Con respecto al tratamiento con fármacos (quimioterapia) que se utilizan contra el cáncer, éstos resultan ser muy citotóxicos y de baja selectividad, generando efectos colaterales graves para el paciente. Por ello, en los últimos años ha surgido el interés por el estudio farmacológico de compuestos naturales, que presenten actividad antiproliferativa, de baja citotoxicidad y de acción selectiva, capaces de inducir en las células tumorales una muerte por apoptosis. Entre los compuestos que han causado un gran interés debido a sus actividades biológicas, se encuentran los flavonoides, los cuales han sido descritos con propiedades antiproliferativas, antioxidantes, bactericidas, etc., generando la necesidad de extraer o sintetizar nuevos flavonoides de origen natural con actividad antiproliferativa, de baja o nula citotoxicidad y con acción selectiva.

#### **4. Justificación**

Datos de la OMS refieren al cáncer como la primera causa de muerte en el mundo y la segunda, después de las enfermedades cardiovasculares, en los países de ingresos bajos y medianos (África, Asia, América central y Sudamérica) con más del 70% de las defunciones registradas, situación que se asocia con deficiencias en las estrategias, de prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. En 2012, los cánceres diagnosticados con más frecuencia en hombres fueron los de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado. En las mujeres fueron los de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago.

Además en 2012, se presentaron en el mundo 14.1 millones de casos nuevos de cáncer con 8.2 millones de muertes. Las proyecciones indican que el número de muertes por cáncer en las américas aumentará de 1.3 hasta 2.1 millones en 2030. (GLOBOCAN, 2012; OMS, 2017).

Desafortunadamente los tratamientos para esta enfermedad resultan ser agresivos y poco selectivos por lo que surge la necesidad de buscar compuestos de origen natural, que presenten mejores características para su posible uso terapéutico.

## 5. Hipótesis

Se ha reportado, que los flavonoides y sus derivados presentan actividad antiproliferativa y apoptótica sobre células tumorales, por lo que se espera que el compuesto Patuletina perteneciente al grupo de los flavonoides, presente características antiproliferativas en las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 así como en células no tumorales provenientes de sangre periférica humana, además de inducir a las células tumorales a una muerte apoptótica.

## 6. Objetivos

### 6.1 General

- ❖ Evaluar el efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del flavonoide Patuletina sobre las líneas tumorales CaSki, SK-LU-1 y MDA-MB-231, así como la actividad antiproliferativa en cultivos de linfocitos humanos no tumorales.

### 6.2 Particulares

- ❖ Desarrollar cultivos de las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231, así como de linfocitos humanos provenientes de sangre periférica humana.
- ❖ Determinar la actividad antiproliferativa del flavonoide Patuletina sobre los cultivos de las líneas celulares CaSki, SK-LU-1 y MDA-MB-231, expresado como la concentración requerida del compuesto para decrecer en un 50% el número celular ( $IC_{50}$ ) por medio de la técnica de tinción con cristal violeta.
- ❖ Evaluar la actividad necrótica del compuesto Patuletina en cultivos de las líneas celulares CaSki, SK-LU-1 y MDA-MB-231, mediante la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH), en los sobrenadantes celulares.
- ❖ Determinar si el flavonoide Patuletina induce a las células tumorales a presentar características morfológicas exclusivas de muerte apoptótica, mediante la tinción nuclear con el fluorocromo DAPI.
- ❖ Establecer si el compuesto Patuletina induce a las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 a presentar caspasa-3 activa, cuantificada por citometría de flujo.
- ❖ Determinar la actividad antiproliferativa y citotóxica del flavonoide Patuletina en cultivos de linfocitos humanos provenientes de sangre periférica humana, mediante el marcaje con carboxifluoresceína y la cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes celulares.

## 7. Método

### Preparación del compuesto

El compuesto Patuletina fue donado por el Dr. Manuel Jiménez Estrada, Investigador del Instituto de Química, UNAM.

La preparación del compuesto consistió en pesar 1 mg de Patuletina y se solubilizó en 100  $\mu$ l de etanol en tubos cónicos tipo eppendorf de 600 $\mu$ l (Cornig, USA) y se almaceno a 4°C.

### Cultivo celular de las líneas tumorales SK-LU-1, MDA-MB-231 y CaSki

Las líneas celulares de cáncer de pulmón, mama y cérvix, fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATTC). Las células SK-LU-1 y CaSki fueron cultivadas en cajas Petri de cristal de 100 mm (Pirex, USA), con 10 ml de medio RPMI 1640 (Laboratorios Microlab) con L-glutamina, rojo fenol y bencilpenicilina, al 5% de suero de neonato de ternera (STN) previamente desactivado a 57°C por 30 minutos. Las células MDA-MB-231 fueron cultivadas en medio D-MEM (laboratorios Microlab) suplementado al 5% de suero fetal bovino (SFB). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nuaire, US) a una temperatura de 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, y una atmósfera húmeda saturante.

### Determinación de la concentración de Patuletina que abate el 50% de la proliferación celular (IC<sub>50</sub>).

Las células de las líneas tumorales SK-LU-1, MDA-MB-231 y CaSki se cultivaron en placas estériles de 96 pozos a una densidad de 4,500 células/pozo en 100 $\mu$ l de medio RPMI 1640 al 5% de SNT (células SK-LU-1 y CaSki) para MDA-MB-231 se agregaron 100 $\mu$ l de medio D-MEM con 5% de SFB y se incubaron a 37°C, a 5% de CO<sub>2</sub> y a una atmosfera húmeda por 24 h. Una vez transcurridas las 24 horas, se retiró el medio de la placa y las células se estimularon a diferentes concentraciones partiendo de 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 $\mu$ g/ml, del compuesto diluido en RPMI-1640 al 5% de STN o en D-MEM al 5% de SFB, y se dejaron incubando durante 24 horas. Transcurridas las 24h del tratamiento, se retiró el medio de cultivo e inmediatamente se fijaron las células con 50 $\mu$ l/pozo de glutaraldehído al 1.1% (Sigma- Aldrich, USA) durante 20min en agitación constante, una vez transcurridos los 20 minutos se retiró el glutaraldehído, se lavó la placa a chorro de agua y se dejó secar al aire, a continuación se añadió 50 $\mu$ l/pozo de colorante cristal violeta (Sigma- Aldrich, USA) al 0.1% en solución amortiguadora de ácido fórmico pH 6.0, durante 20 minutos en agitación constante. Se eliminó el exceso de colorante lavando la placa a chorro de agua y se dejó secar al aire libre. Posteriormente, el colorante incorporado en el núcleo de las células es solubilizado en 100  $\mu$ l/pozo de ácido acético (J.T. Baker, USA) al 10% durante 20 minutos en agitación constante. Por último, se midió la absorbancia en un lector de placas (Awarenes Technology INC, ChroMate, USA) a 590nm.

En cada caso se obtuvieron las absorbancias y se realizaron curvas dosis- respuesta y se analizaron por regresión lineal para poder determinar la concentración que abate el 50% de la población celular (IC<sub>50</sub>).



### **Determinación de muerte celular por necrosis a través de la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).**

Se realizaron cultivos de las líneas tumorales SK-LU-1, MDA-MB-231 y CaSki en placas estériles de 96 pozos (Corning Incorporated, USA) se sembraron 4,500 células/pozo de las tres líneas tumorales con 100  $\mu$ l de medio RPMI-1640 con rojo de fenol suplementado con 5% de SNT o con DMEM suplementado con 5% de SFB respectivamente para cada línea y se incubaron por 24h a 37°C, a 5% de CO<sub>2</sub> y a una atmosfera húmeda a punto de rocío.

Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se realizaron los siguientes tratamientos: un control basal, únicamente con medio de cultivo el cual se utilizó como blanco en la reacción colorimétrica y al que solo se le cambió el medio de cultivo por medio fresco. Un control positivo, en el cual las células fueron lisadas durante una hora con 100  $\mu$ l de una solución al 2% de Tritón X-100 (Sigma- Aldrich, USA) en RPMI-1460 o DMEM. Un control con el vehículo empleado (etanol 10  $\mu$ l/ml) y los tratamientos con las diferentes concentraciones del compuesto. Pasadas las 24 horas se transfirieron 60  $\mu$ l del medio de cultivo de cada condición a una placa cónica de 96 pozos (Corning Incorporated, USA) y se centrifugó (centrifuga Orto alresa, digicen 21 R, USA) A 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente del sobrenadante se transfirieron 40  $\mu$ l de medio de cultivo a una placa de 96 pozos y se adicionaron 40  $\mu$ l de la mezcla de reacción del Kit Cytotox 96® Non- Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Corporation, USA) a cada pozo, la placa se mantuvo a temperatura ambiente, protegida de la luz durante 20 minutos. Finalmente se determinó la absorbancia en un lector de placas (ChroMate, Awareness Technology INC, US) a 490nm. Los resultados fueron expresados en porcentaje y graficados.

### **Evaluación de la morfología apoptótica por microscopia de fluorescencia con tinción de DAPI**

Se sembraron células de las tres líneas tumorales SK-LU-1, MDA-MB-231 y CaSki sobre cubreobjetos limpios y estériles en placas de 24 pozos (Corning, USA) a una densidad de 15,000 células/pozo con un volumen de 500  $\mu$ l de medio RPMI o DMEM suplementado con 5% de SNT y/o SFB respectivamente, se incubaron por 24 horas. Transcurridas las 24 horas se retiró el medio de cultivo y se trataron con las siguientes condiciones: control (se cambió el medio de cultivo por medio fresco), vehículo (concentración de etanol utilizada para la obtención de la IC<sub>50</sub> diluido en medio de cultivo), control positivo de muerte apoptótica con camptotecina (Sigma- Aldrich, USA) 10  $\mu$ l/ml, y las concentraciones correspondientes de las IC<sub>50</sub> de cada línea celular. Después de las 24 horas del estímulo se retiró el medio de cultivo y las células se fijaron con paraformaldehído al 2% por 20 min en agitación constante. Al término de ese tiempo se realizaron cuidadosamente tres lavados con PBS filtrado. Posteriormente se agregaron 10  $\mu$ l/ml del fluorocromo 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; Sigma- Aldrich, USA) sobre cada cubreobjetos y se dejó actuar durante un minuto a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras fueron lavadas dos veces con PBS filtrado y se montaron sobre portaobjetos con medio para fluorescencia VECTASHIELD Mounting Medio (VECTOR LABORATORIES, USA). Las muestras fueron selladas con resina acrílica transparente y fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, JAP). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### **Determinación de muerte celular (apoptosis) mediante la detección de caspasasa-3 activa por citometría de flujo**

Las células SK-LU-1, MDA-MB-231 y CaSki fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de 22,5000 células/pozo en un volumen de 500  $\mu$ l de medio RPMI o D-MEM suplementado con 5% de STN o SFB respectivamente y se mantuvieron en incubación por 24 horas en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Transcurridas las 24 horas las células se estimularon con las siguientes condiciones: control (células sin tratamiento a las que solo se les cambió el medio), vehículo (cantidad de etanol utilizado para la obtención de las iC<sub>50</sub> diluido en medio de cultivo), un control positivo de muerte apoptótica, camptotecina 10 $\mu$ l/ml y la concentración de IC<sub>50</sub> obtenida. Todas las condiciones fueron incubadas 24 horas.

Después de 24 horas, se recuperó el medio y se despegaron las células pasándolas a tubos cónicos de 15ml y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se fijaron las células con 500  $\mu$ l de metanol al 50% en PBS durante 1 hora a 4°C. Al término de este tiempo, se centrifugaron las células a 1500 rpm durante 5 min y se realizaron dos lavados con PBS filtrado, considerando que al término de cada lavado se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Posteriormente el botón celular se resuspendió en 50 $\mu$ l de anticuerpo 1° (1:1000 $\mu$ l en PBS filtrado) policlonal de conejo anticaspasa-3 activa (Abcam, USA), las muestras se dejaron a 4°C por 24 horas.

Transcurridas las 24 horas se centrifugaron las muestras a 1500 rpm durante 5 min y se realizaron dos lavados con PBS filtrado para retirar el exceso de anticuerpo, el botón obtenido se resuspendió en 50 $\mu$ l de anticuerpo 2° acoplado al fluorocromo FIT-C (1:500 $\mu$ l de PBS filtrado) IgG anticonejo (Sigma-Aldrich, USA) las muestras se mantendrán, en oscuridad durante 3h a una temperatura de 37 °C. Finalmente, las células se lavaron dos veces con PBS filtrado y los botones fueron resuspendidos en 500 $\mu$ l de PBS, las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo (BD FACSAria II, USA). Los datos fueron procesados en el programa Flowing Software 2.5.1. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### **Evaluación de la proliferación de linfocitos humanos a través de la técnica de marcaje con carboxifluoresceína (CFSE)**

Se obtuvieron 25ml de sangre periférica de un donador aparentemente sano en tubos vacutainer con heparina (BD Franklin Lakes N.J., USA).

En cuatro tubos cónicos de vidrio de 15ml (Pirex, USA), se colocaron 6ml de Ficoll-Hysopaque (Sigma-Aldrich, USA), a continuación se agregó lentamente por la pared del tubo 6ml de sangre (obteniendo una concentración 1:1 de ficoll:sangre). Se centrifugaron las muestras a 300rpm durante 10 minutos, la velocidad se fue incrementando gradualmente 300rpm cada 5 minutos hasta llegar a 1500rpm donde se dejó centrifugar durante 20 minutos más. Las células se separaron por gradiente de densidad, una vez obtenido los diferentes componentes celulares, se recolectaron los anillos de linfocitos evitando extraer ficoll y otras células diferentes a los linfocitos. Los anillos se colocaron en dos tubos cónicos de vidrio de 15ml y se agregaron 5ml de RPMI- 1640 sin suero, las muestras se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos y se realizaron dos lavados, se retiró el sobrenadante y los botones fueron resuspendidos en un volumen total de 5mL de RPMI-1640.

Posteriormente los linfocitos se marcaron agregando 50µl de carboxifluoresceína (10µl de carboxifluoresceína/ 1ml de RPMI-1640 20%) durante 15 minutos protegidos de la luz. A continuación, se realizaron dos lavados agregando 5ml de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 5% de SFB y se centrifugo a 1500rpm durante 5 minutos y se resuspendieron en 5ml de medio de cultivo RPMI-1640 al 20% de SFB. A continuación se activaron los linfocitos con fitohematoglutinina (20µl fitohematoglutinina/ mL RPMI-1640) y se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 ml (Corning, USA) a una densidad de 1<sup>6</sup> células/ml de RPMI-1640 al 20% SFB y fitohematoglutinina.

Los linfocitos se estimularon considerado los siguientes tratamientos: control sin activar (con CSFE y sin PHA), control activado (con CSFE y con PHA), vehículo (concentración de etanol para obtener la IC<sub>50</sub>) e IC<sub>50</sub> correspondientes a cada línea tumoral. Las células contenidas en cada uno de los tubos eppendorf se sembraron en una placa de 96 pozos a una densidad de 200,000 células/pozo en 200µl de RPMI-1640 al 20% de SFB. Se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> a una atmosfera húmeda por 72 horas.

Transcurridas las 72 horas se colectaron los linfocitos en tubos de citometría (un tubo por condición) y se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregaron 500µl de verseno, se realizaron dos lavados, y el botón celular se resuspendió en 500µl de PBS filtrado. Finalmente las muestras fueron analizadas con el citómetro de flujo (BD FACS Aria II, USA) y los datos obtenidos fueron procesados en el programa Flowing Software 2.5.1. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **Determinación de citotoxicidad en linfocitos humanos mediante la evaluación de LDH**

Transcurridas las 72 horas se centrifugó la placa a 1500rpm durante 5 minutos, y se recolectaron los linfocitos de uno de los controles (células marcadas y activadas con medio de cultivo RPMI-1640 con 20% SFB) se lisaron agregando tritón X-100 al 2% durante una hora. Para evaluar el % de LDH presente en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos, se colectaron 40µL/pozo del sobrenadante y se transfirieron a una placa nueva de 96 pozos y se adicionaron 40µL/pozo de la mezcla de reacción del Kit Cyto Tox 96® Non- Radiactive Cytotoxicity Assay (Promega, Corporation, USA) y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz. Finalmente se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 490nm en un lector de placas tipo ELISA (Awarenes Technology INC, Chromate, USA).

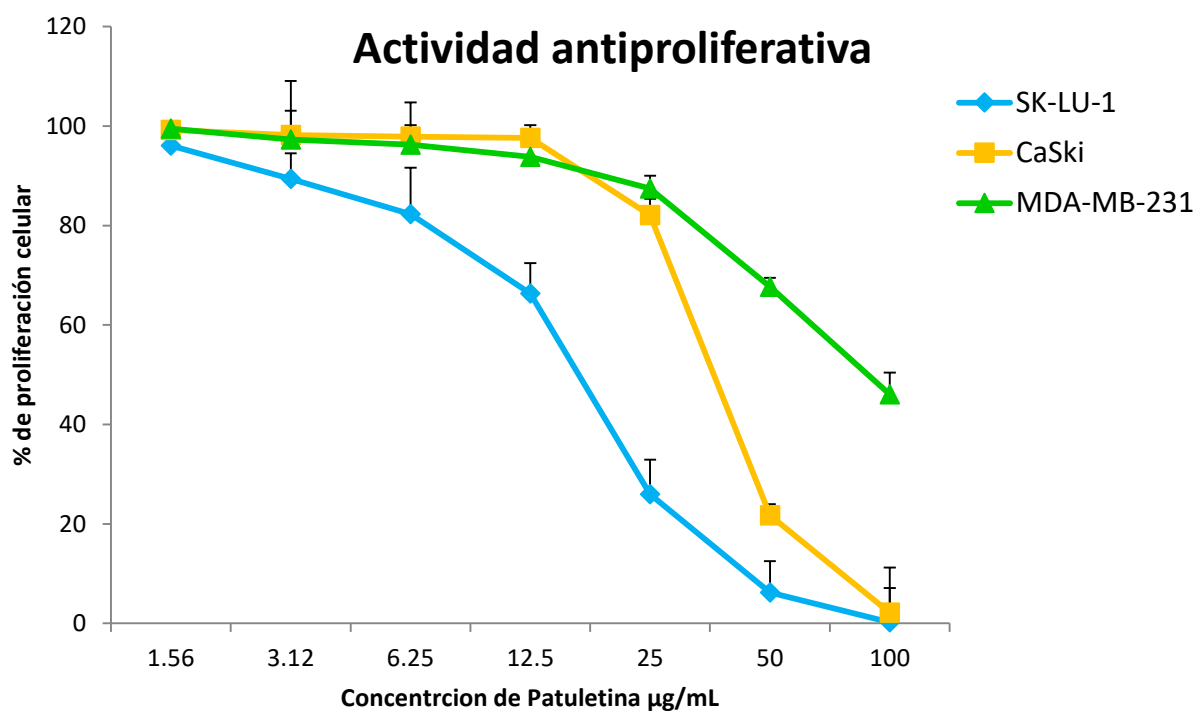
#### **Análisis Estadístico**

Los datos obtenidos experimentalmente fueron presentados como la media ± S.D. de tres ensayos independientes y fueron analizados estadísticamente usando un análisis de varianza (ANDEVA) seguido de una prueba de Tukey con un nivel de significancia de p≤0.05 comparados con el control usando el programa estadístico GraphPad InStat.

## 8. Resultados

### Actividad antiproliferativa en células tumorales

Estudios anteriores sobre las propiedades biológicas de los flavonoides han reportado actividad antioxidante, antifúngica, antiinflamatoria y antiproliferativa sobre líneas tumorales (MCF-7, MDA-MB-231, WRO, HT-29-SW480, SW620); con la finalidad de demostrar el efecto antiproliferativo del compuesto Patuletina los cultivos celulares SK-LU-1, MDA-MB-231 y CaSki fueron estimulados a diferentes concentraciones del compuesto. La actividad antiproliferativa fue expresada como la cantidad del compuesto requerida para inducir un decremento del 50% en el número celular ( $IC_{50}$ ). (Figura. 11, Tabla 1). El número celular fue cuantificado mediante la técnica de tinción con el colorante cristal violeta.



**Fig. 11.** Actividad antiproliferativa de la Patuletina sobre las líneas celulares SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos, y posteriormente fueron estimuladas con diferentes concentraciones del compuesto durante 24 horas. El número celular se evaluó mediante la técnica de cristal violeta.

Los resultados obtenidos establecen que la Patuletina presenta actividad antiproliferativa sobre las tres líneas tumorales de manera dependiente de la dosis, es decir, conforme se incrementa la concentración el número celular disminuye. Los valores de  $IC_{50}$  calculadas se presentan en la tabla 1.

Línea celular	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	IC <sub>50</sub> (µM)
SK-LU-1	18	54
CaSki	37	111
MDA-MB-231	86	259

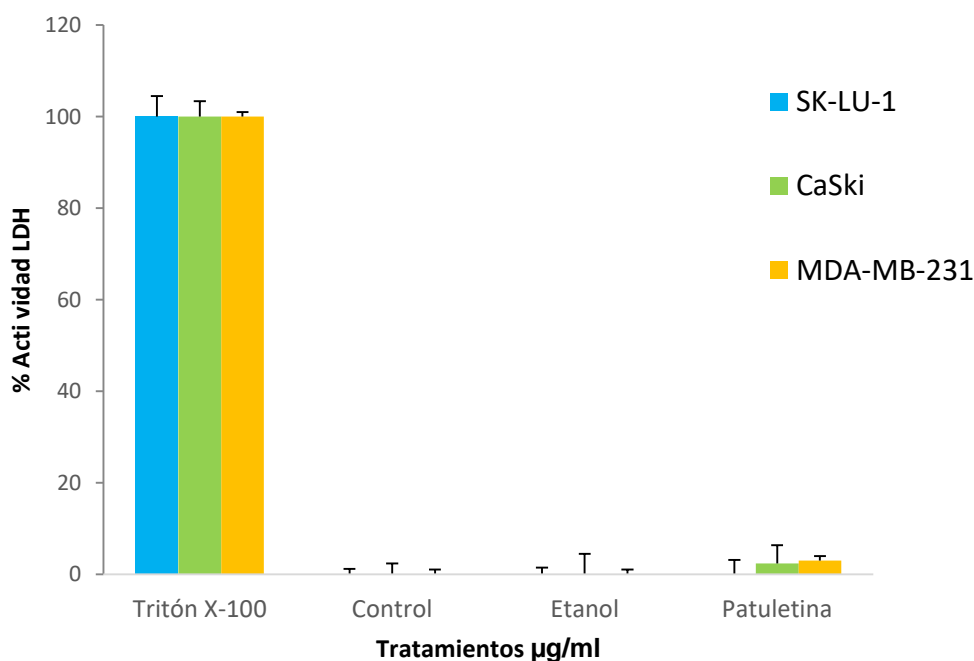
**Tabla 1.** Concentración requerida para abatir en un 50% la población celular con el compuesto Patuletina. IC<sub>50</sub>s determinadas para las líneas SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231.

Se observa que la línea SK-LU-1 fue la más sensible a la Patuletina, seguida de la línea CaSki, finalmente, se observa que la línea celular MDA-MB-231 requirió mayor concentración del compuesto para obtener la IC<sub>50</sub>.

### Efecto necrótico en células tumorales.

Con la finalidad de establecer si la Patuletina induce a las células tumorales a una muerte necrótica, cultivos de células SK-LU-1, MDA-MB-231 y CaSki fueron tratados con sus respectivas IC<sub>50</sub>. La actividad de la enzima citoplasmática LDH fue cuantificada en los sobrenadantes de los cultivos celulares. (Fig.12, Tabla 2).

## Necrosis



**Fig.12.** Porcentaje de actividad de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes provenientes de cultivos SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231; tratadas con el flavonoide Patuletina. El control positivo es representado por el Tritón X-100 que muestra la máxima actividad de LDH. Los datos obtenidos se sometieron a una prueba ANDEVA seguida de una prueba Tukey ( $p < 0.05$  vs control).

Los resultados obtenidos en la figura 12 indican que la Patuletina presenta una baja o nula actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares, ya que no se observa diferencia significativa entre los tratamientos y el control (Tabla 2), indicando que la Patuletina no induce a las células tumorales a una muerte necrótica y que el decremento en el número celular es producido por una causa diferente a la necrosis.

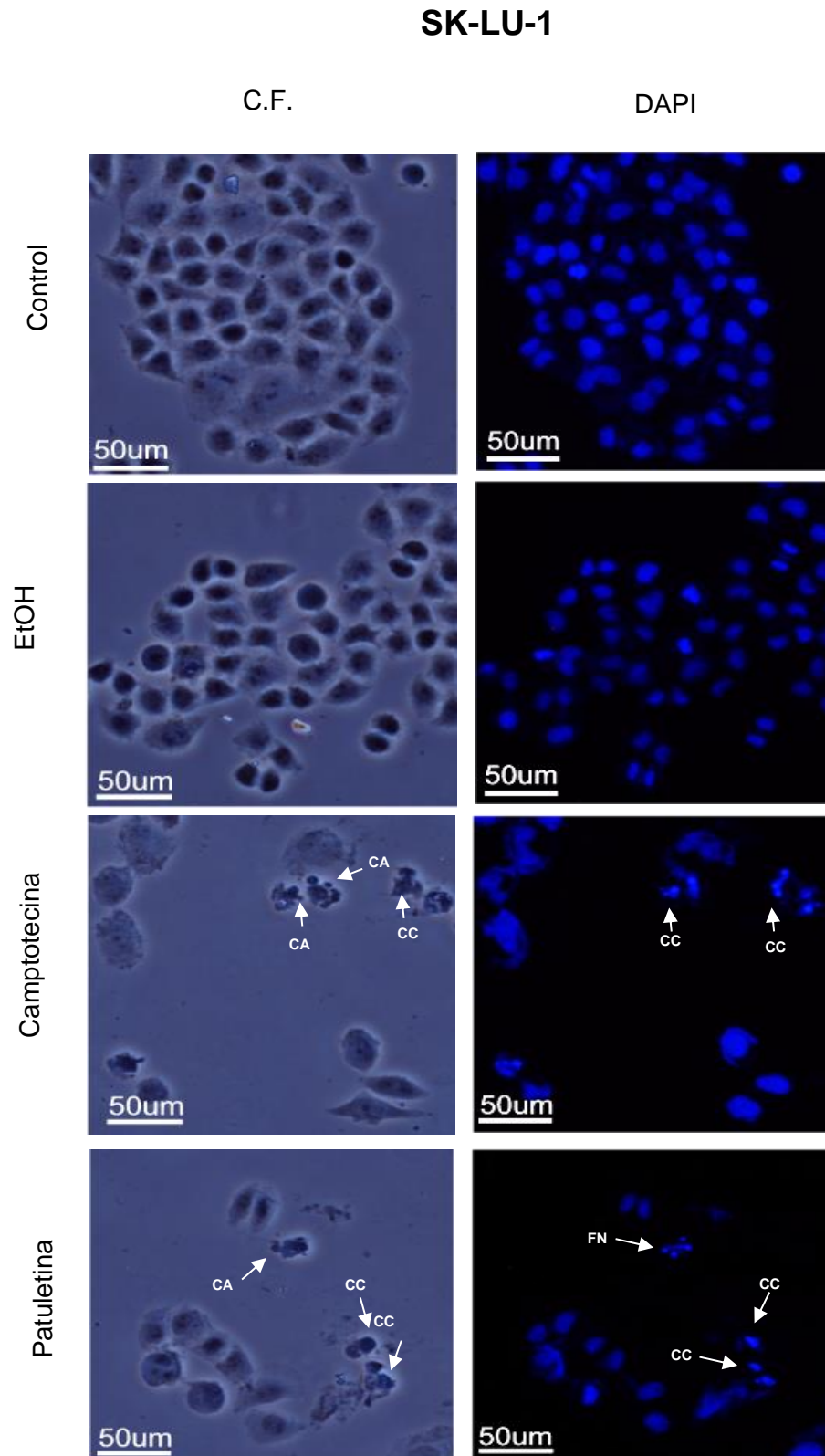
#### % Actividad LDH

	Tritón X-100	Control	Etanol	Patuletina
<b>SK-LU-1</b>	100	0	0	0
<b>CaSki</b>	100	0	0	2.38
<b>MDA-MB-231</b>	100	0	0	2.97

**Tabla 2.** Porcentaje de actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos de las células tumorales SK-LU-1, MDA-MB-231 y CaSki tratados con las IC<sub>50</sub> correspondientes para cada línea tumoral. La liberación máxima de LDH se tomó como el 100% de actividad con la aplicación de Tritón X-100.

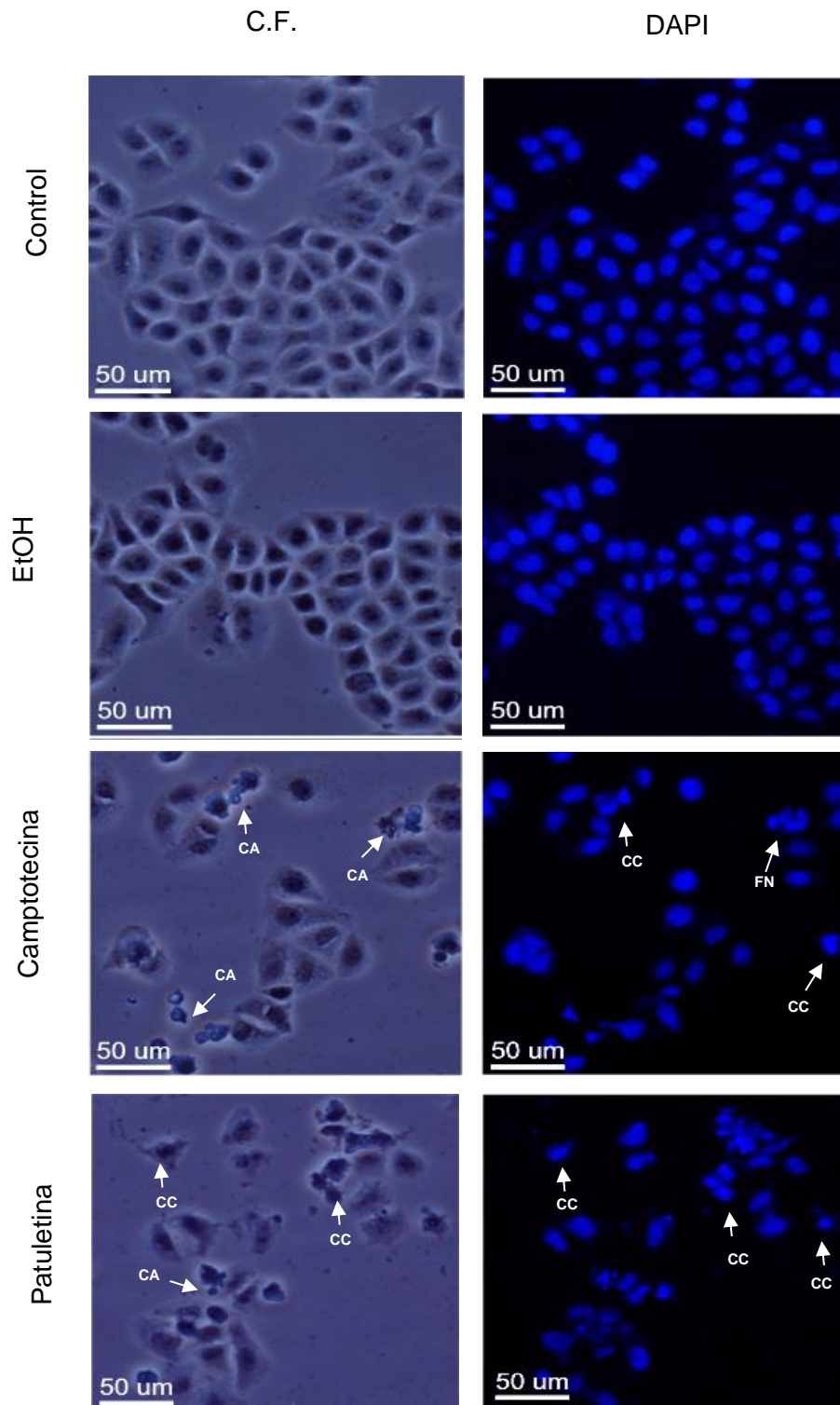
#### **Muerte apoptótica en células tumorales: evaluación de la morfología celular**

Con la finalidad de determinar si el flavonoide Patuletina induce una muerte apoptótica, cultivos de células SK-LU-1, MDA-MB-231 y CaSki fueron sembrados en cubreobjetos y tratadas con las IC<sub>50</sub> correspondientes durante 24 h y la observación de características morfológicas propias de esta muerte como la condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos fue observada en un microscopio de epifluorescencia, mediante la tinción con el fluorocromo DAPI (Figuras. 13, 14 y 15).



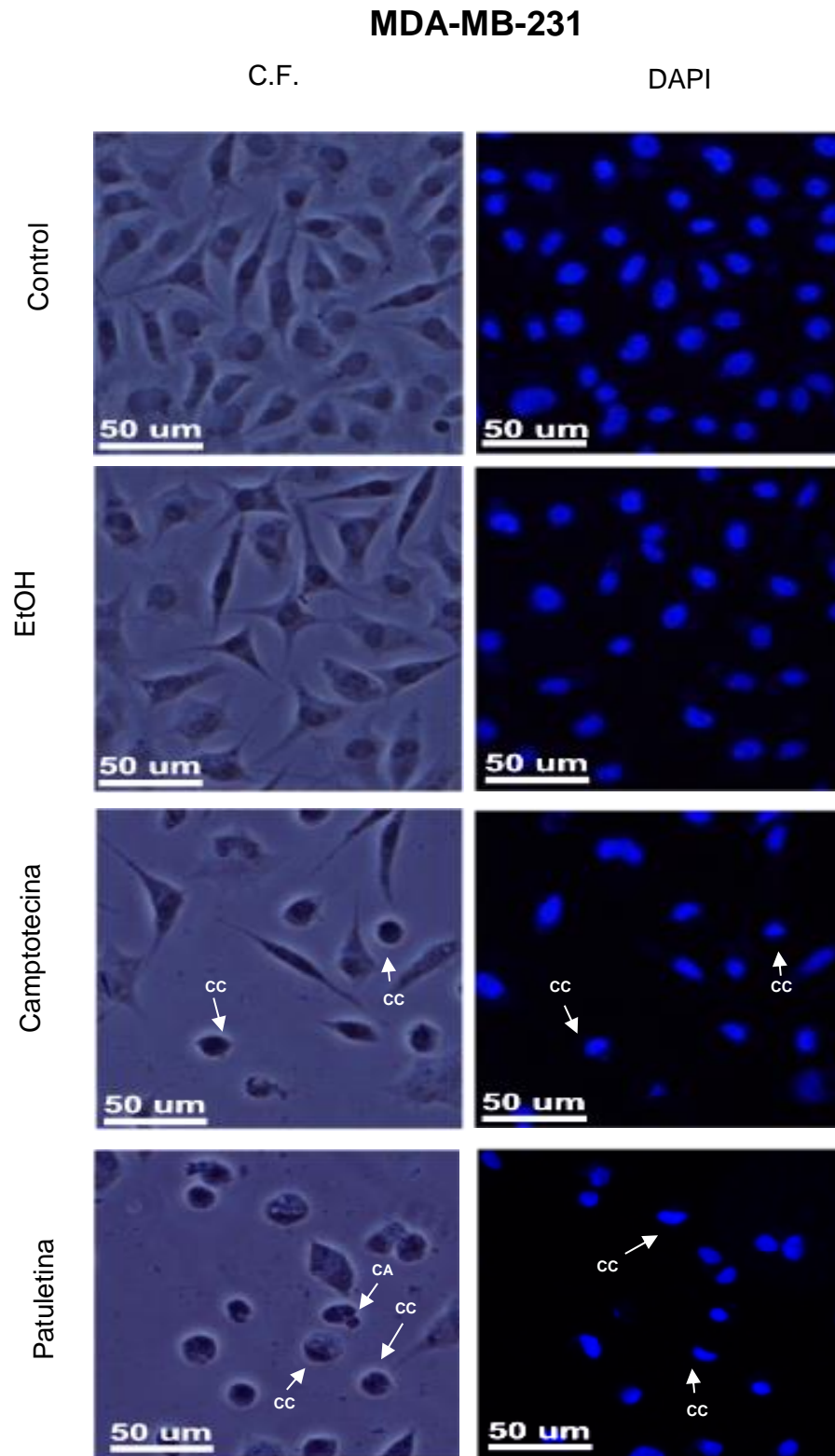
**Fig.13.** Características morfológicas de la línea celular SK-LU-1 mediante la tinción con el fluorocromo DAPI, observadas en microscopio de epifluorescencia. Se sembraron 15,000 células/pozo sobre cubreobjetos y se trataron con la  $IC_{50}$  correspondiente por 24h. Posteriormente fueron fijadas y teñidas con DAPI. Las flechas indican: cuerpos apoptóticos (CA), Condensación cromática (CC) y fragmentación nuclear (FN)

### CaSki



**Fig.14.**Características morfológicas de la línea celular CaSki mediante la tinción con el fluorocromo DAPI, observadas en microscopio de epifluorescencia. Se sembraron 15,000 células/pozo sobre cubreobjetos y se trataron con la IC<sub>50</sub> correspondiente por 24h. Posteriormente fueron fijadas y teñidas con DAPI. Las flechas indican: cuerpos apoptóticos (CA), Condensación cromática (CC) y fragmentación nuclear (FN)



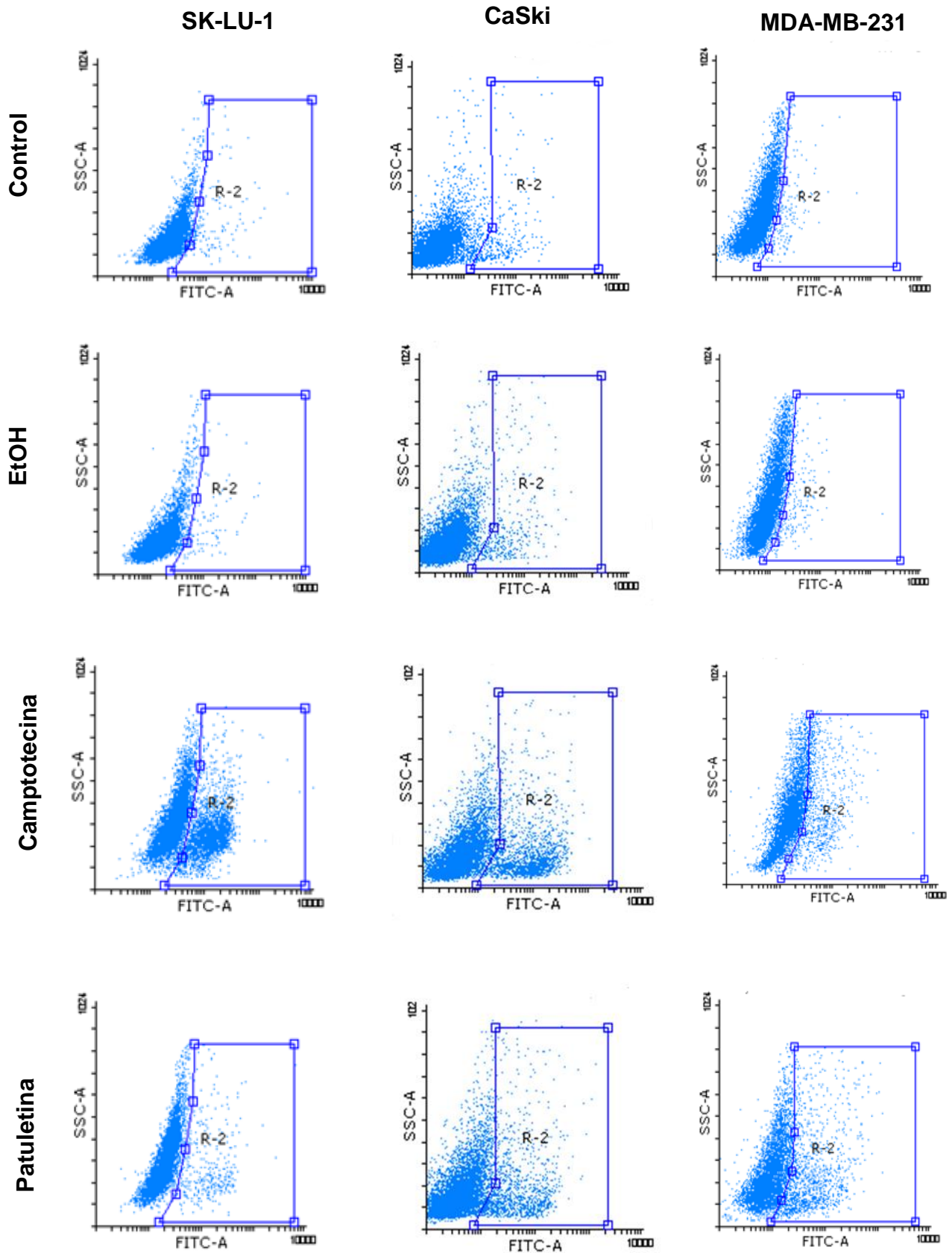


**Fig.15.** Características morfológicas de la línea celular MD-MB-231 mediante la tinción con el fluorocromo DAPI, observadas en microscopio de epifluorescencia. Se sembraron 15,000 células/pozo sobre cubreobjetos y se trataron con la IC<sub>50</sub> correspondiente por 24h. Posteriormente fueron fijadas y teñidas con DAPI. Las flechas indican: cuerpos apoptóticos (CA), condensación cromática (CC) y fragmentación nuclear (FN)

Los resultados observados en figuras 13, 14 y 15 establecen que la Patuletina induce a las tres líneas tumorales a presentar una morfología esférica, disminución del tamaño celular (contracción celular), condensación de la cromatina nuclear, formación de cuerpos apoptóticos, así como fragmentación del ADN, sugiriendo que la Patuletina induce a las tres líneas celulares a una muerte por apoptosis.

### **Cuantificación de caspasa-3 activa por citometría de flujo**

Con la finalidad de confirmar si la Patuletina induce una muerte apoptótica, las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 fueron tratadas con el compuesto a sus respectivas  $IC_{50}$  y la caspasa-3 activa fue determinada por inmunocitoquímica y cuantificada mediante citometría de flujo. (Figura. 16, Tabla 3).



**Fig.16.** Detección y cuantificación de la caspasa-3 activa en las líneas tumorales Sk-LU-1, CaSki y MDA-MB-231, tratadas con el compuesto Patuletina, mediante citometría de flujo. La figura muestra un ensayo representativo de tres ensayos independientes

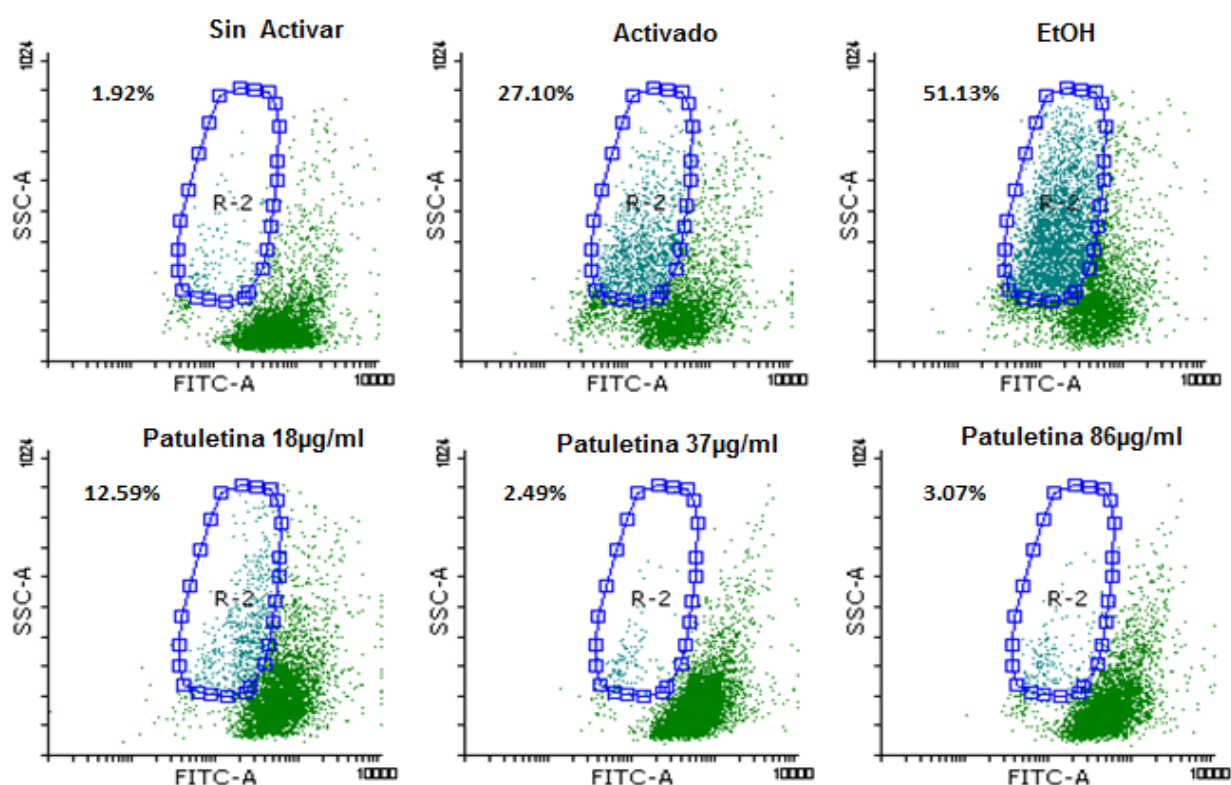
Línea celular	Control	EtOH	Camptotecina	Flavonol Patuletina
SK-LU-1	1.29	1.57	32.08	11.07
CaSki	3.57	3.40	36.64	22
MDA-MB-231	1.57	1.86	15.26	26.07

**Tabla.3.** Expresión de caspasa-3 activa en las líneas SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 con las condiciones; control, etanol, camptotecina y Patuletina. Los datos se expresan como la media  $\pm$  S.D. de cada línea celular.

Los resultados obtenidos en la figura 16 muestran que la Patuletina induce a las líneas celulares SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 a presentar la caspasa-3 activa con un 11%, 22% y 26% respectivamente (Tabla 3), confirmando que la Patuletina induce a las células tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 a una muerte por apoptosis, dependiente de caspasa 3.

#### Actividad antiproliferativa de linfocitos humanos

Una vez establecido que la Patuletina presenta actividad antiproliferativa sobre las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231, induciendo una muerte apoptótica, se determinó si este compuesto afecta a las células no tumorales. Para ello, cultivos de linfocitos humanos, provenientes de sangre periférica, fueron tratados con el flavonol Patuletina a las concentraciones 18, 37 y 86 $\mu$ g/ml por 72 horas y la proliferación celular fue evaluada mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceína (CFSE) y cuantificada por citometría de flujo (Figura.17).

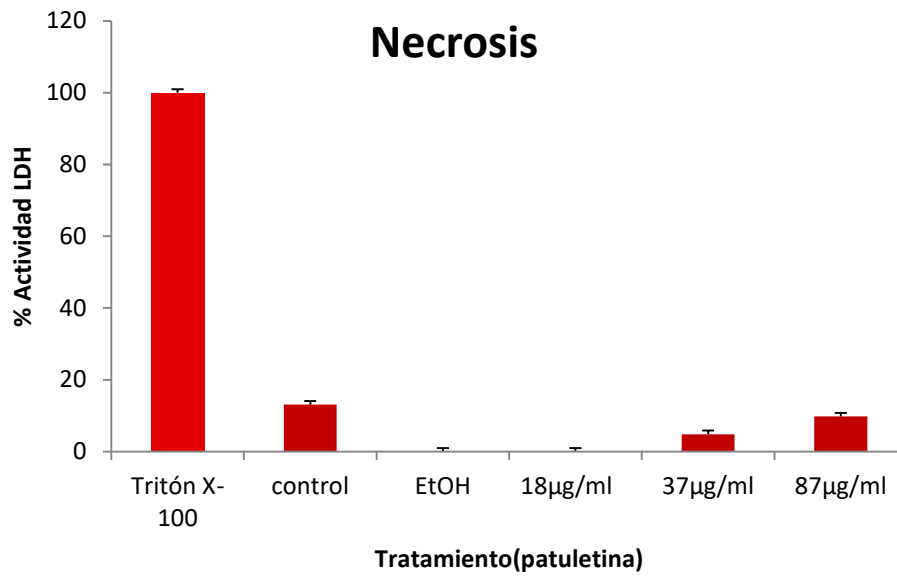


**Fig.17.** Efecto de la Patuletina sobre el potencial proliferativo de células linfocíticas obtenidas de sangre periférica humana. Los linfocitos fueron sembrados en placas de 96 pozos, activados con fitohematoglutina (PHA) y marcados con carboxifluoresceína (CFSE) y se estimularon con el compuesto a concentraciones de 18, 37 y 86 µg/ml por 72h. Los resultados muestran un ensayo representativo de tres ensayos independientes.

Los resultados mostrados en la figura 17 establecen que la Patuletina afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas de manera significativa, sugiriendo que la actividad antiproliferativa de este flavonoide no es selectiva.

#### Actividad necrótica en células no tumorales

Con la finalidad de determinar si el flavonol Patuletina induce a las células linfocíticas a una muerte necrótica, cultivos de linfocitos fueron tratados con Patuletina a concentraciones de 18, 37 y 86 µg/ml y la actividad de la enzima citoplasmática LDH fue determinada en los sobrenadantes de los cultivos celulares. (Figura 18).



**Fig.18.** Inducción de muerte necrótica por Patuletina en cultivos de linfocitos provenientes de sangre periférica humana. La grafica representa uno de tres ensayos independientes, los datos fueron sometidos a una prueba ANDEVA seguido de una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$  vs control).

Los resultados obtenidos en la Figura 18 muestran que la Patuletina en los linfocitos humanos a las concentraciones de 18, 37 y 86 µg/ml no induce una muerte celular necrótica, sugiriendo que el decremento en el número celular es debido a una causa diferente a la muerte necrótica

## 9. Discusión

Los flavonoides son compuestos naturales, a los que la comunidad científica ha dedicado más atención en los últimos años. Sus múltiples propiedades biológicas observadas experimentalmente y su abundancia en la dieta, junto con su presencia en numerosos remedios de la medicina tradicional, los convierten en posibles candidatos a explicar la asociación encontrada entre el consumo de determinados productos de origen vegetal y la disminución del riesgo de presentar determinadas enfermedades crónicas. Los flavonoides presentan características que los han hecho atractivos para la investigación anticancerígena. Interfieren *in vitro* y por distintos mecanismos en el proceso oncogénico, lo que los hace posibles agentes de utilidad en las primeras fases del cáncer o en la inhibición de las etapas posteriores de progresión o invasión. (Álvarez & Orallo, 2003).

En busca de fármacos anticancerosos, los datos obtenidos han mostrado que los flavonoides tienen efectos importantes sobre la quimioprevención y la quimioterapia. En muchos mecanismos moleculares de acción para la prevención contra el cáncer, los flavonoides juegan un papel importante interactuando entre los diferentes tipos de genes y enzimas. Se han identificado muchos mecanismos de acción, como la inactivación de carcinógenos, la antiproliferación, la detención del ciclo celular en la fase G2-M, la inducción de la apoptosis en las líneas celulares de leucemia mieloide humana HL-60 y U937. La inhibición de la angiogénesis, la antioxidación y la reversión de la resistencia a múltiples fármacos. Los flavonoides inducen apoptosis, asociada con la activación de múltiples caspasas, la liberación mitocondrial del citocromo c, la hidrólisis de PARP y la fragmentación del ADN. Otro mecanismo de apoptosis está mediado por caspasa-8 caracterizado por, la hidrólisis de Bid y de las pro-caspasas-8, -9, -3 y -7. (Chahar et al., 2011; Rubio, 2009).

Alrededor del 50% de todos los quimioterapéuticos utilizados hoy en día para tratar el cáncer se desarrollan directa o indirectamente a partir de fuentes naturales. La posibilidad de utilizar sustancias naturales para el desarrollo de nuevos compuestos ha contribuido a la aparición de nuevos fármacos. Teniendo en cuenta que los agentes quimioterapéuticos utilizados en la actualidad todavía causan fuertes efectos secundarios, la búsqueda de nuevos compuestos que inducen la apoptosis sigue siendo necesaria. (Franzoni et al., 2017).

En el presente trabajo fue evaluada la actividad antiproliferativa, apoptótica y necrótica del flavonol Patuletina, sobre tres líneas tumorales, si bien se tiene información acerca de las propiedades biológicas de algunos flavonoides para el flavonol Patuletina esa información es escasa, de ahí la importancia de este trabajo para aportar nueva información, ya que no ha habido ningún informe sobre los efectos de Patuletina en las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231.

En investigaciones llevadas a cabo con flavonoides, se ha demostrado que sus componentes ejercen una actividad antiproliferativa sobre diferentes líneas celulares; de colon (SW620) con una IC50 de 85.1  $\mu\text{M}$  (Areiza et al., 2013), próstata (HL-60) con IC50 de 60  $\mu\text{M}$  (Wang et al., 1999), tiroideas (HT-29) con 54.8  $\mu\text{M}$  (Uwe et al., 2000) y mama (MDA-MB-231) con una IC50 de 50  $\mu\text{M}$  (Bail et al., 1998).

Los resultados obtenidos muestran que la Patuletina presenta actividad antiproliferativa, en las celulares tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 con una IC50 de 54.21, 111.44 y 259  $\mu\text{M}$  respectivamente, siendo la línea SK-LU-1 la más

susceptible al compuesto seguida de la línea celular CaSki y finalmente la línea celular MDA-MB-231 siendo esta la más resistente al compuesto pues se requirió mayor concentración para obtener la IC50. Las tres líneas tumorales generaron una actividad dosis dependiente.

Los flavonoides han demostrado múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres (ERO). Se ha afirmado que los flavonoides, como antioxidantes, pueden inhibir la carcinogénesis. Se afirma que algunos flavonoides, como la fisetina, la apigenina, luteolina y la quercetina son potentes inhibidores de la proliferación celular. Además, se ha especulado que los flavonoides pueden inhibir la angiogénesis. Un posible mecanismo podría ser la inhibición de las proteínas quinasas. (Martinez, 2002; Nijveldt *et al.*, 2001).

Los flavonoides son eficaces en la inhibición de la xantina oxidasa, COX o LOX55, y por lo tanto inhiben la proliferación de células tumorales. Además, el mecanismo de inhibición de la biosíntesis de poliaminas puede contribuir a las actividades antiproliferativas de los flavonoides. (Wenying *et al.*, 2003; Chahar, 2011).

Respecto a la citotoxicidad, se ha demostrado que la inhibición del crecimiento en líneas celulares de cáncer por los flavonoides, se produce en ausencia de citotoxicidad. Jabeen *et al.*, probó *in vitro* que la Patuletina no es necrótica en dos líneas celulares diferentes 3T3 y MDBK, mientras que se observó un nivel moderado de necrosis en las células CC1. Es importante destacar, que en este trabajo el flavonol Patuletina no presenta citotoxicidad (necrosis) en ninguna de las tres líneas tumorales, ya que no induce la liberación de la enzima LDH en los cultivos tratados y por tanto no se genera una muerte celular necrótica. (Jabeen *et al.*, 2016; Kuntz *et al.*, 1999).

El principal objetivo de los nuevos agentes quimioterapéuticos es inducir cambios celulares que culminan en daño al ADN. En respuesta a la extensión del daño, las células tienen mecanismos de señalización que pueden restaurar y promover la supervivencia celular o iniciar la muerte celular programada. Entre los diversos tipos de muerte celular, la apoptosis es la más estudiada. La búsqueda de compuestos anticancerígenos que inducen la muerte celular por apoptosis es altamente deseable, ya que este tipo de muerte genera una reacción inflamatoria mínima. (Franzoni *et al.*, 2017).

En cuanto a la muerte apoptótica, las células presentan características comunes típicas tales como la contracción celular, condensación de la cromatina, citoplasma condensado, núcleos fragmentados y empollación de la membrana. (Ding *et al.*, 2017; Elmore, 2007).

Para investigar si la muerte celular inducida por Patuletina dependía de apoptosis se observaron las características morfológicas de las células, nuestros resultados, muestra que el flavonol Patuletina induce una muerte apoptótica sobre las líneas tumorales SK-LU-1 CaSki y MDA-MB-231, después de las 24 horas del tratamiento con el compuesto, observando condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos.

Al respecto, se ha informado que diversos flavonoides como la quercetina, rutina y algunas chalconas, conducen una muerte apoptótica mostrando características propias de esta muerte que se confirma con la tinción DAPI, observando volumen



celular reducido, condensación de cromatina, formación de ampollas y cuerpos apoptóticos y pérdida de la integridad de la membrana. (Ding *et al.*, 2017; Franzoni *et al.*, 2017), lo cual coincide con nuestros resultados.

De acuerdo a la literatura, diversos flavonoides pueden desencadenar la apoptosis mediante la liberación del citocromo c de la membrana mitocondrial. La vía apoptótica mitocondrial está determinada por la relación de disminución de proteínas antiapoptóticas y el aumento de proteínas proapoptóticas (Bax) que producen una mayor liberación de citocromo c en el citoplasma y eventualmente causan la activación de caspasa-3 y la muerte de las células. Sin embargo no se descarta que la vía extrínseca también esté implicada en la muerte celular inducida por algunos flavonoides. Estas dos vías principales convergen en la activación de la caspasa efectora 3 y la escisión de PARP, lo que indica que la apoptosis de hecho no solo se inicia sino que también se ejecuta. (Ding *et al.*, 2017; Franzoni *et al.*, 2017; Yi *et al.*, 2016).

Otra característica de muerte apoptótica, como se mencionó anteriormente es la activación de la caspasa-3, en las líneas SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231, estimuladas con Patuletina, se observó después de 24 horas, la expresión de caspasa-3 con porcentajes de 11, 22 y 26% respectivamente. Confirmando que la muerte que se lleva a cabo en las tres líneas tumorales es apoptótica.

Aunque hoy en día existen muchas opciones de tratamiento para los pacientes con cáncer, incluidas las intervenciones quirúrgicas, la radioterapia y la inmunoterapia, un tratamiento exitoso con medicamentos anticancerígenos sigue siendo un desafío debido a la baja selectividad de los medicamentos disponibles. Además, los agentes quimioterapéuticos disponibles en la actualidad son altamente citotóxicos para las células normales, lo que resulta en una serie de efectos secundarios. (Franzoni *et al.*, 2017).

Un nuevo compuesto prometedor en terapia contra el cáncer no se basa solo en su capacidad para inducir la muerte de las células tumorales, también en su selectividad, es decir, en su capacidad para afectar mínimamente a las células normales. En cuanto a la selectividad del flavonol Patuletina, no existen antecedentes, por lo tanto nuestros resultados son de gran relevancia y aporte a la literatura.

Al respecto, solo se tiene información acerca del efecto del flavonol Patuletina en las células T, Jabeen *et al.*, probó el compuesto usando el ensayo de proliferación de células T con incorporación de timidina. El compuesto mostró una potente supresión de la proliferación de células T activadas por PHA aisladas de sangre periférica humana. También se descubrió que suprime la proliferación de células T de la línea celular Jurkat. Nuestros resultados, muestran también una disminución de la proliferación de células linfocíticas humanas no tumorales de manera dosis dependiente al ser tratadas con el compuesto Patuletina. Es relevante destacar, que la citotoxicidad en células linfocíticas no tumorales es nula, debido a que no se detectó la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos, pudiendo ser que las células linfocíticas no tumorales presenten un efecto distinto a la muerte necrótica. Se sabe que la quercetina un flavonoide estructuralmente parecido a la Patuletina, produce detención del ciclo celular durante la proliferación de células linfoides. (Jabeen *et al.*, 2016; Kumar & Pandey, 2013).

A pesar de que este flavonol afecta la proliferación de células no tumorales, es importante destacar que la Patuletina podría emplearse para tratar enfermedades

autoinmunes o linfomas, atacando a las células cancerosas sin generar daños fuertes que comprometan la calidad de vida de los pacientes, a comparación de lo que ocurre con la quimioterapia, los compuestos que generalmente se utilizan para el tratamiento del cáncer son altamente necróticos y presentan citotoxicidad, como consecuencia se generan efectos secundarios que comprometen más la vida del paciente.

Finalmente, se sugiere que el flavonol Patuletina podría servir de molécula modelo para sintetizar compuestos derivados que presenten una mejor acción selectiva sobre células tumorales.

## 10. Conclusiones

El compuesto Patuletina presenta actividad antiproliferativa dosis dependiente sobre las líneas SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 con IC50 de 18µg/ml, 37 µg/ml y 86 µg/ml respectivamente.

El Flavonol Patuletina induce la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos de las células tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 en 0%, 2.38% y 2.97% respectivamente, por lo tanto la muerte celular no es por proceso necrótico.

El flavonol Patuletina genera características morfológicas propias de la apoptosis, así como la inducción de la caspasa-3 activa en 11, 22 y 26% para las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki y MDA-MB-231 respectivamente, tratadas con las IC50 correspondientes.

El flavonol Patuletina afecta el potencial proliferativo de células linfocíticas humanas a las concentraciones de 18µg/ml 37µg/ml y 86µg/ml, sin inducir una muerte necrótica.

## 11. Bibliografía

- Adolfo Elena G. (2002). Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis, *Rev. Arg. Anest*, 60, 6: 391-401
- Aguilar Cordero M.<sup>a</sup> J., Neri Sánchez M., Padilla López C. A., Pimentel Ramírez M. L., García Rillo A. & Sánchez López A. M. (2012). Factores de riesgo como pronóstico de padecer cáncer de mama en un estado de México. *Nutrición Hospitalaria*, 27(5): 1631-1636.
- Aguirre Cruz M. L., & Sotelo J. (2008). Tumores cerebrales, Cap. V, Ed. Médica Panamericana:69-72
- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Jhonson A., Lewis J., Roberts K & Walter P. (2006) *Introducción a la Biología Celular*. 2ª edición. Panamericana: 610-633.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; Programmed Cell Death (Apoptosis). Consultado 24 de Septiembre de 2017. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26873/>
- Álvarez Castro Ezequiel & Orallo Cambeiro Francisco. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). *Acción frente al cáncer*. *Offarm*; 22:130-40.
- Alvarado J.A. & Mayani H. (2006). El ciclo celular y su papel en la biología de las células progenitoras hematopoyéticas, *Gac. Méd. Méx.* Vol. 143 No. 2: 149-161.
- American Cancer Society (2016). Cáncer Cervical. Consultado 13 Julio 2017. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/prevencion-y-deteccion-temprana/que-es-cancer-de-cuello-uterino.html>
- American Society of Clinical Oncology (ASCO). (2014). Cáncer de mama. Consultado 13 de Julio de 2017. Disponible en: <http://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-mama/panorama-general>.
- American Cancer Society (ACS). (2015). Cáncer de seno (mama). Consultado 28 de septiembre de 2017. Disponible en: [http://www.pagroupco.com/wp-content/uploads/2015/10/ACS\\_PreventionEarlyDetection\\_SP.pdf](http://www.pagroupco.com/wp-content/uploads/2015/10/ACS_PreventionEarlyDetection_SP.pdf)
- Andersen M & Markham R. (2006). *FLAVONOIDS, Chemistry, Biochemistry and Applications*. Ed. Taylor & Francis CRC: 143-177
- Areiza Mazo N., Maldonado M. E., & Rojano B. (2013). Extracto acuoso de uchuva (*Physalis peruviana*): actividades antiproliferativa, apoptótica y antioxidante. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 15(1): 41-55
- Arias J., Angeles Aller M., Arias J.I. & Lorente L. (1999). *Cáncer*. Fisiopatología quirúrgica, Editorial Tebar: 455-513
- Asociación Española contra el Cáncer (AECC). (2011). Cáncer de mama. Consultado 28 de septiembre de 2017. Disponible en: <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/CancerMama/Paginas/anatomia.aspx>
- American Cancer Society. (ACS). (2016). Lung Cancer Risk Factors. Consultado: 29 de Septiembre de 2017. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/prevention-and-early-detection/risk-factors.html>
- Asociación Española contra el Cáncer (AECC). (2013). Cáncer de mama. ¿Qué es? Consultado 28 de septiembre de 2017. Disponible es: <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/CancerMama/Paginas/quees.aspx>

- American Cancer Society. (ACS). (2017). Tipos de Tratamiento. Consultado: 30 de septiembre de 2017. Disponible en: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types.html>
- Bail J.C., Varnat F., Nicolas J.C. & Habrioux G. (1998). Estrogenic and antiproliferative activities on MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids. *Cancer Letters* 130: 209–216
- Batra, P. & Sharma A. K. (2013). Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech*, 3(6): 439–459.
- Blagosklonny M.V. & Pardee A.B. (2002). The Restriction Point of the Cell Cycle. *Cell Cycle*, 1:2:103-110
- Campbell Neil A., Mitchell Lawrence G. & Reece Jane B. (2001). *Biología. Conceptos y Relaciones*, 3ra edición, Ed. Pearson Educación: 125-135
- Cancer Treatment Centers of America. (CTCA). (2017). Cervical cancer risk factors. Consultado: 27 de Septiembre de 2017. Disponible en: <http://www.cancercenter.com/cervical-cancer/risk-factors/>
- Cancer Resear UK. (CR-UK). (2017). Lung Cancer. Consultado: 29 de septiembre de 2017. Disponible en: <http://about-cancer.cancerresearchuk.org/about-cancer/lung-cancer/stages-types-grades/types>.
- Cancer Support Community (CSC). (2009). Consultado: 01 de octubre de 2017. Disponible en: [https://www.cancersupportcommunity.org/sites/default/files/uploads/living-with-cancer/topics/booklet/fsac\\_treatments\\_and\\_side\\_effects.pdf?v=1](https://www.cancersupportcommunity.org/sites/default/files/uploads/living-with-cancer/topics/booklet/fsac_treatments_and_side_effects.pdf?v=1)
- Cartaya O. & Reynaldo I. (2001). Flavonoides: Características Químicas y Aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, vol. 22, no. 2: 5-14.
- Cascales Angosto M. (2003). Bases moleculares de la apoptosis, *Anal. Real Acad. Nal. Farm*: 36-69.
- Castro Romero J.I., Hernández Girón C & Madrid Marina V. (2011). La anticoncepción hormonal como factor de riesgo para cáncer cervicouterino: evidencias biológicas, inmunológicas y epidemiológicas Artículo original *Ginecol Obstet Mex*; 79 (9):533-539
- Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades. (CDC). (2017). Consultado: 29 de septiembre de 2017. Disponible es: [https://www.cdc.gov/spanish/cancer/lung/basic\\_info/risk\\_factors.htm](https://www.cdc.gov/spanish/cancer/lung/basic_info/risk_factors.htm)
- Cooper G.M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach. The Eukaryotic Cell Cycle*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. Consultado 22 de septiembre de 2017. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/>
- Curtis Helena & Schnek Adriana (2006). *Invitación a la biología*. Ed. Médica Panamericana: 20-26
- Chavaro Vicuña N., Arroyo Hernández G., Felipe Alcázar L, Maruchi Garrón G. W. & Pérez Zuñiga I. (2009). Cáncer cervicouterino, *Anales de Radiología México*; 1:61-79
- Chinembiri Tawona N, Du Plessis Lissinda H., Gerber M., Hamman Josias H. & Du Plessis J. (2014). Review of Natural Compounds for Potential Skin Cancer Treatment. *Molecules* 2014, 19(8): 11679-11721.
- Chahar M.K, Sharma N, Dobhal M.P & Joshi Y.C. (2011). Flavonoides: Una fuente versátil de drogas contra el cáncer. *Phcog Rev*. 5:1-12

- Ding Y., Ren K., Dong H., Song F., Chen J., Guo Y., Liu Y., Tao W. & Zhang Y. (2017). Flavonoids from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves inhibit proliferation and induce apoptosis in PC-3 cells by activation of oxidative stress and mitochondrial apoptosis. *Chemico-Biological Interactions* 275: 210-217.
- Elmore S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4): 495–516.
- European Society for Medical Oncology (ESMO) (2011). *Cancer de mama*. Consultada 28 de septiembre de 2017. Disponible en: <https://www.esmo.org/content/download/6594/114963/file/ES-Cancer-de-Mama-Guia-para-Pacientes.pdf>
- Ferraro Graciela E. (1983). Flavonoides: Actualización de su Uso en Terapéutica. *Acta Farm. Bonaerense* 2 (2): 97-103
- Franzoni Maioral M., Nascimento Bodack C., Marcelli Stefanos N., Bigolin A., Mascarello A., Chiaradia-Delatorre L., Augusto Yunes R., Nunes R. & Santos Silva M. (2017). Cytotoxic effect of a novel naphthylchalcone against multiple cancer cells focusing on hematologic malignancies. *Biochimie* 140:48-57
- GLOBOCAN. (2012). Estimated Cancer Incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Consultado 13 Julio 2017. Disponible en: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)
- Guido Majno G & Joris I. (1995). Apoptosis, Oncosis, and Necrosis An Overview of Cell Death. *American Journal of Pathology*, Vol. 146, No. 1: 3-15.
- Health Guide. (2013). *Cervical Cancer*. Consultado 27 de septiembre de 2017. Disponible en: <http://www.nytimes.com/health/guides/disease/cervical-cancer/risk-factors.html?mcubz=0>
- Instituto Nacional de Cancerología (INCAN). 2015. *Cáncer de pulmón*. Consultado 15 de julio de 2017. Disponible en: <http://cancerdepulmon.com.mx/>
- Instituto Nacional del Cáncer (NIH). (2017). *Tipos de Tratamiento*. Consultado 15 de julio de 2017. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>
- Instituto Nacional del Cáncer (NIH) (2017). *Breast Cancer*. Consultado 28 de septiembre de 2017. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/paciente/tratamiento-seno-pdq>
- Israels E. D. & Israels, L. G. (2001). *The Cell Cycle*. *Stem Cells*. 19: 88–91.
- Jacobson M, Weil M & Raff M. (1997). *Programmed Cell Death in Animal Development*. Volume 88: 347-354
- Jabeen A., Ahmed M. , Simjee S. , Lubna , Bano S. & Faizi S. (2016). Anti-TNF- $\alpha$  and anti-arthritic effect of patuletin: A rare flavonoid from *Tagetes patula*. *International Immunopharmacology* 36: 232–240
- Jordán J. (2003). *Apoptosis: muerte celular programada*, Vol. 22, Núm.6.
- Kozłowska A. & -Węgierek D. (2014). *Flavonoids - Food Sources and Health Benefits*. *Rocz Panstw Zakl Hig*;65(2):79-85
- Kumar S. & Pandey A.K. (2013). *Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview*. *The Scientific World Journal*. Volume 2013: 1-16.
- Kuntz S., Wenzel U. & Daniel H. (1999). *Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines*. *Eur J Nutr*;38(3):133-42.
- Lagunas Cruz M.C., Valle Mendiola A. & Soto Cruz I. (2014). *ciclo celular: mecanismos de Regulación*, *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 17(2):98-107.

- Lizarbe Iracheta M.A. (2007). El Suicidio y La Muerte Celular, Rev. R.Acad. Cienc. Exact.Fís.Nat. (Esp) Vol. 101, Nº. 2: 1-33
- Lomanto Díaz L.D., Ortiz Cala O.L., Bretón Pinto C.O., Gómez Lizcano A.I. & Mesa Cornejo V.M. (2003). El ciclo celular. MEDUNAB; 6(16): 21 – 29
- López Luengo M. (2002). Flavonoides. Farmacéutica. Vol. 21 Núm. 4: 108-113
- Mailliet Marc. (2002). Biología celular. Ed. Elsevier España: 1-12
- Manthey J.A. & Buslig B.S. (1998). Flavonoids in the Living System. Flavonoids in the Living System. Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer, Boston, MA, vol 439: 1-7
- Martínez Flórez S., González Gallego J., Culebras J.M. & Tuñón M.J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes, Nutr Hosp, 17:271-278.
- Mierziak J , Kostyn K & Kulma A.(2014). Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. Molecules , 19: 16240-16265
- Mayo Clinic. (2017).Cervical cancer. Consultado: 27 de septiembre de 2017. Disponible en: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/cervical-cancer/symptoms-causes/dxc-20210892>
- Moctezuma Velasco C.R & Patiño Zarco M. (2009). Cáncer de pulmón, Anales de Radiología México; 1:33-45
- National Cancer Institute (NHI). (2012). Lung Cancer. Consultado: 29 de septiembre de 2017. Disponible en: <https://www.cancer.gov/publications/patient-education/wyntk-lung.pdf>
- Nijveldt R., Nood E., Hoorn D, Boelens P., Norren K. & Leeuwen P. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am J Clin Nutr. Vol. 74 no. 4: 418-425
- Organización Mundial de la Salud (OMS)(2016). Cáncer. Consultado mayo 2016. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud OPS-OMS (2016). El Virus del Papiloma Humano y el Cáncer Cervicouterino. Consultado 27 de septiembre de 2017. Disponible en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=11568%3Avph-y-cancer-cervicouterino&catid=1872%3Acancer&Itemid=40602&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11568%3Avph-y-cancer-cervicouterino&catid=1872%3Acancer&Itemid=40602&lang=es)
- Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud OPS-OMS (2015). Cáncer. Consultado 13 julio de 2017. Disponible en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=2&Itemid=40735&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=2&Itemid=40735&lang=es)
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). Cáncer de mama: prevención y control. Consultado: 28 de septiembre de 2017. Disponible en: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index2.html>
- Ortiz Serrano R, Uribe Pérez C.J, Díaz Martínez L.A & Dangond Romero Y.R. (2004). Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología Vol. 55 No.2: 146-160.
- Organización Mundial de la Salud. (OMS). (2017). Tratamientos del cáncer. Consultado 30 de septiembre de 2017. Disponible en: <http://www.who.int/cancer/treatment/es/>
- Peralta Zaragza O. Bahena Roman M., Diaz Benítez C.E. & Madrid Marina V. (1997). Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. Salud Pública de México, [S.I.], v. 39, n. 5: 451-462.
- Pérez Machado J. & Lie Concepción A.E. (2012). Apoptosis, mecanismo de acción. Revista de Ciencias Médicas La Habana. Vol.18.Núm. 2: 1-16

- Quiñones & Aleixandre A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp*;27(1):76-89
- Ramos Lage M. Rondón Madrigal E.A. Carbonell Rivero N.A. & Toledo Martín T.R. *Cancer de Pulmon*. (2012). Consultado 30 de septiembre de 2017. Disponible en: <https://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/4927/2/Cancer-de-pulmon>
- Ravishankar D., Kumar Rajora A., Greco F. & Osborn H. (2013). Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45: 2821–2831
- Rodríguez Fragoso L., Hernández Baltasar E & Reyes Esparza J.A. (2004). El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer,21:60-69
- Rojas M., Salmen S. & Berrueta L. (2009). Muerte celular programada: I. Activación y mecanismo de regulación. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa. ULA. Vol.4, Núm.3:* 92-106
- Rubio Sánchez S. (2009). Flavonoides Con Actividad Antitumoral: Identificación y Estudio Del Mecanismo De Acción. Consultado 16 de julio de 2017. Disponible en: [https://acceda.ulpgc.es:8443/bitstream/10553/3490/1/tesis\\_flavonoides.pdf](https://acceda.ulpgc.es:8443/bitstream/10553/3490/1/tesis_flavonoides.pdf)
- Sánchez Torres L. E. & Diosdado Vargas F. (2003). Apoptosis: the phenomenon and its determination, *Téc Pecu Méx*; 41(1):49-62.
- Sociedad Mexicana de Oncología AC. SMeO. (2016). *Cáncer de Pulmón*. Consultado 15 de Julio de 2017. Disponible en: <https://www.smeo.org.mx/index.php/pulmon>
- Salinas A., De Ruiz R. E.L. & Ruiz S.O. (1998). Esteroles, Flavonoides y Lactonas Sesquiterpénicas aisladas de *Xanthium spinosum* (L.) Cronquist (Asteraceae). *Acta Farm. Botlaerense* 17 (4): 297-300.
- Singh R. & Agarwal R. (2006). Natural flavonoids targeting deregulated cell cycle progression in cancer cells. *Curr Drug Targets*.;7(3):320-345.
- Suryadinata R., Sadowski M & Sarcevic B. (2010). Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Vol. 30 (4):* 243–255
- Srivastava J.K & Gupta S. (2009). Extraction, Characterization, Stability and Biological Activity of Flavonoids Isolated from Chamomile Flowers. *Molecular and Cellular Pharmacology*, 1(3): 138-152.
- Syntichaki, P., & Tavernarakis, N. (2002). Death by necrosis: Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO Reports*, 3(7): 604–609
- Tirado Gómez L.L., Mohar Betancourt A., López Cervantes M., García Carrancá A., Franco Marina F. & Borges G. (2005). Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas. *Vol.47. Núm.5:* 342-350
- Uwe W., Sabine K., Mathias D.B & Hannelore D. (2000). Dietary Flavone Is a Potent Apoptosis Inducer in Human Colon Carcinoma Cells. *Cancer Research* 60: 3823–3831
- World Cancer Research Fund International (WCRFI). (2015). *Cáncer de mama*. Consultado 13 de Julio de 2017. Disponible en: <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/breast-cancer-statistics>
- Wenying R., Zhenhua Q., Hongwei W & Li Z., (2003). Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Medicinal Research Reviews*, Vol. 23, No. 4: 519-534



- Wang I.K., Lin-Shiau S. & Lin J.K. (1999). Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *35(10):1517-25.*
- Wong R.S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Wong Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. CR , 30 (1), 87: 2-14*
- Yao L.H., Jiang Y.M., Shi J., Barber F.A., Datta N., Singanusong R. & Chen S. (2004). Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition 59: 113–122.*
- Yi X., Zuo J., Tan C., Xian S., Luo C., Chen S. & Luo Y. (2016). Kaempferol, a flavonoid compound from *gynura medica* induced apoptosis and growth inhibition in mcf-7 breast cancer cell. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines, 13(4): 210–215.*

## 12. Apéndice

### Preparación de reactivos

- **Medio de cultivo RPMI-1640**

RPMI-1640 (Laboratorios Microlab)	10.42 g
NaHCO <sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, E.U.A)	2 g

Los reactivos se disuelven en 800ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 0.47µm. se almacena a 4° C. El medio de cultivo se complementa con 5% de suero de ternera neonatada (STN), en la porción requerida y posteriormente es nuevamente filtrada en vacío a través de una membrana con poro de 0.47µm.

- **Medio de cultivo D-MEM**

D-MEM (Laboratorios Microlab)	13.42 g
NaHCO <sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, E.U.A)	3.7 g

Los reactivos se disuelven en 800ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 0.47µm. se almacena a 4°C. El medio de cultivo se complementa con 5% de suero fetal bovino (SFB), en la porción requerida y posteriormente es nuevamente filtrada en vacío a través de una membrana con poro de 0.47µm.

- **Desactivación del suero**

El suero fetal bovino (SFB) como el suero de ternera neonatada (STN) se colocan en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelados, posteriormente se coloca a baño maría a 56°C durante 30min. Posteriormente es transvasado en alícuotas de 50ml en tubos cónicos de plástico estériles.

- **Verseno**

Esta solución se empleó para despegar las células tumorales adherentes y funciona como agente quelante que secuestra iones de calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utiliza:

Etilen-diamen-tetra-acético (EDTA) (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.40 g
Cloruro de Sodio (NaCl) (Sigma- Aldrich, E.U.A)	8.00 g
Cloruro de Potasio (KCl) (Sigma- Aldrich, E.U.A)	0.40 g
Tris (Sigma- Aldrich, E.U.A)	3.04 g

Los reactivos se disuelven en 800ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.7 con HCl 1N y se afora a 1000ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza a una presión de 1.20 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 min. Se almacena a 4°C.

- **Solución de Tripsina**

La solución fue utilizada para el desprendimiento de las células tumorales (MDA-MB-231), es preparada al 0.05% en verseno en condiciones estériles.

- **Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)**

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Para su preparación se utiliza:

Fosfato diácido de potasio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.20 g
Fosfato monoácido de sodio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	2.16 g
Cloruro de sodio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	8.0 g
Cloruro de potasio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.20 g

Los componentes se diluyen en 800ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 utilizando HCl 1N y se afora a un volumen final de 1000ml. Esta solución se esteriliza por medio de filtros de una membrana con diámetro de 22µm y se almacena a 4°C hasta el momento de su uso.

- **Glutaraldehído**

Esta solución se utilizó para fijar las células, manteniendo la integridad estructural de los tejidos y células. La tendencia a formar uniones cruzadas entre proteínas hace del glutaraldehído un excelente fijador. Se prepara de la siguiente manera: a 1.57 ml de glutaraldehído (70% v/v) se le agrega 98.43 ml de agua bidestilada y se almacena a una temperatura de 4°C.

- **Solución de Cristal Violeta (0.1%)**

Para preparar 500ml de cristal violeta en una concentración de 0.1% se requiere previamente preparar una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM con un pH de 6. Posteriormente se adiciona el cristal violeta, se diluye y se filtra usando papel Whatman número 2. Se almacena a temperatura ambiente.

NaOH (Sigma-Aldrich, E.U.A)	3.96 g
Ácido Fórmico (Sigma-Aldrich, E.U.A)	4.28 g
Cristal Violeta (Sigma-Aldrich, E.U.A)	1.0 g

- **Solución de ácido acético (10%)**

A 10ml de ácido acético (J.T.Baker) se le agrega 90ml de agua bidestilada.

- **Paraformaldehído (2%)**

Paraformaldehído al 2% en PBS, se disuelve a baño maría sin que la temperatura rebase los 60°C. Se almacena a 4°C.

- **Camptotecina**

La camptotecina se utiliza como positivo a muerte apoptótica, se prepara agregando 5mg de camptotecina en 1 ml de DMSO. Posteriormente es transvasado en alícuotas de 50 µl en tubos eppendorf estériles y se almacena a temperatura ambiente.