



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINEOPLÁSICO DEL
EXTRACTO NATURAL DE *Azadirachta indica* SOBRE
CÉLULAS DE CÁNCER ORAL, *in vitro*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

P R E S E N T A:

ARANTXA MARGARITA TREJO HERNÁNDEZ

TUTORA: Dra. ADRIANA PÉREZ SORIA

Cd. Mx.

2019



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.

Dedicado a mis padres...

Margarita y Gerardo gracias por todo su amor, trabajo y sacrificio.

AGRADECIMIENTOS

Gracias Universo, todo ha sido necesario para poder estar aquí y ahora.

Mamá, no me alcanzan las palabras para agradecerte todo lo que haces por mí. Por el gran esfuerzo, paciencia, dedicación y por todo lo que me has dado a lo largo de mi vida.

Papá, gracias por creer en mí, por siempre impulsarme a ser mejor cada día, por tu experiencia y consejos. Los amo infinitamente, son los mejores papás.

A mi hermano Erick, soy muy afortunada al tener todo en una sola persona, mi hermano, compañero, cómplice, amigo y colega. Mi eterno agradecimiento por siempre estar ahí.

A mi tía María Luisa, por siempre estar dispuesta a escucharme y apoyarme, por todo tu amor y por enseñarme a ser una mujer fuerte.

A Francisco Marichi, Verónica Gacilazo, Paco y Juan Pablo, por todo su apoyo en mi formación profesional, por compartir su experiencia y abrirme las puertas, pero sobre todo muchas gracias por su amistad.

A la Familia Zavala Vázquez, por siempre recibirme con los brazos abiertos y apoyarme en las diferentes etapas de mi vida.

A mi Carmen, por cuidarme y consentirme todos estos años.

A mi tutora, la Doctora Adriana Pérez Soria, por todo el apoyo, paciencia, confianza, por compartir tus conocimientos y enseñarme el mundo de la ciencia. No lo habría logrado sin ti. Gracias.

A Osmar Chanes por tu tiempo, paciencia y enseñanza. Estoy feliz por haber encontrado un gran amigo en ti.

A todo el equipo del Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos.

A todas las personas que estuvieron en el camino apoyándome para cumplir esta meta.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por brindarme la oportunidad de formarme como profesionista.

Agradezco el apoyo por parte del programa **UNAM-DGAPA-PAPIIT_IA209217** por permitir el desarrollo de esta investigación.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

CÁNCER	7
Cáncer de cabeza y cuello	9
Cáncer oral.....	9
Tipos de cáncer oral.....	10
Factores de riesgo	11
Hábitos	11
Carcinogénesis	13
Ciclo celular.....	13
Apoptosis y Necrosis.....	15
Especies reactivas de oxígeno	16
Defectos genéticos en p53.....	16
Cáncer de lengua.....	18
Tratamientos	19
Cisplatino	19
Complicaciones del tratamiento	21
Pronóstico	21
Atención Posoperatoria.....	21
Prevención	21
Costos de los tratamientos para el cáncer oral.....	22
Efectos secundarios de la quimioterapia	23
TERAPIA ALTERNATIVA.....	24
Árbol de Neem	25
Taxonomía	25
Características del árbol de Neem.....	25
Compuestos del árbol de Neem.....	27
Propiedades terapéuticas del árbol de Neem.....	27
Posibles propiedades antineoplásicas del árbol de Neem.....	28
NEEM Y EL CONTROL DEL CÁNCER	29
Ciclo celular.....	29
Genética.....	29
Líneas celulares de cáncer	30
Apoptosis	30
Otras propiedades.....	30
Combinación de componentes de Neem con otras terapias	32
SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS	33
Novedad en tratamientos para cáncer	33

Tecnología de liberación controlada	33
Sistemas de liberación controlada	34
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	36
HIPÓTESIS	37
OBJETIVOS.....	37
MATERIALES	38
METODOLOGÍA	40
Colecta del espécimen	40
Extracción etanólica.....	40
Cultivo celular	42
Determinación de la concentración efectiva	43
Cursos temporales.....	43
Pruebas de modificación morfológica.....	44
Pruebas de viabilidad celular.....	46
Ensayo de citotoxicidad	47
Análisis Estadísticos	47
RESULTADOS	48
Ensayo de MTT	48
Cambios morfológicos	50
Gráficas Cisplatino vs Neem	52
CONCLUSIONES	54
DISCUSIÓN	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXO	60

RESUMEN

Las propiedades terapéuticas de *Azadirachta indica* (Neem) han sido reconocidas desde la antigüedad. El Neem ha sido ampliamente utilizado en la medicina ayurveda, unani y homeopática.

Entre los compuestos aislados de diversas partes del árbol de Neem, destacan los limonoides, azadirona, azadirachtina y flavonoides, ampliamente reconocidos por su potencial terapéutico.

Los efectos farmacológicos del Neem, se asocian al tratamiento de lepra, helmintiasis intestinal, trastornos respiratorios y estreñimiento. Para otras enfermedades no hay evidencia científica, aunque se ha recomendado su uso para el tratamiento de reumatismo, úlceras sifilíticas crónicas, para controlar diversas infecciones de la piel, úlceras en la piel, sensación de ardor y psoriasis. Lo anterior demuestra la diversa utilidad del Neem, en la medicina actual.

Estudios recientes, han reportado que el Neem también posee actividades anti-inflamatorias, antiartríticas, antipiréticas, hipoglucemias, antimicóticas, antibacterianas e incluso antitumorales. De éstas últimas, se tienen reportes únicamente con relación al cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer cérvicouterino, leucemia y cáncer de pulmón, pero no hay reportes para otros tipos de cáncer.

Dentro de los mecanismos moleculares antineoplásicos del Neem, se encuentran: efectos supresores de tumores, antiproliferativos, inductores de apoptosis, antiangiogénicos y efectos inmunomoduladores, los cuales podrían ayudar en la prevención y/o el tratamiento del cáncer.

Por lo anterior, las propiedades antineoplásicas del Neem están ganando relevancia médica. Sin embargo, aún es necesario estudiar los efectos antineoplásicos en otros tipos de cáncer, como el cáncer oral. Una enfermedad que ha tomado relevancia en la actualidad, dentro de la profesión odontológica, y de la cual no existen a la fecha reportes previos sobre los efectos del Neem.

INTRODUCCIÓN

CÁNCER

La OMS define el cáncer como un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo. [1]

El cáncer es un problema de salud a nivel mundial. Representa una de las causas de mortalidad de mayor prevalencia.

Según las estimaciones de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), hubo 14.1 millones de nuevos casos de cáncer en el 2012 en todo el mundo.

Para el 2030, se esperan 21.7 millones de nuevos casos de cáncer y 13 millones de muertes por cáncer, debido al crecimiento y envejecimiento de la población, o considerablemente mayor por la adopción de estilos de vida de los países en desarrollo, los cuales aumentan el riesgo de cáncer. [2]

Los factores externos como: tabaco, organismos infecciosos y una dieta no saludable; aunado a los factores internos como: mutaciones genéticas heredadas, hormonas y afecciones inmunitarias, actúan juntos o en secuencia durante el desarrollo de cáncer.

La elevada prevalencia de los diferentes tipos de cáncer por género se presenta en la siguiente tabla.

HOMBRES	MUJERES
1. Pulmón 16.8%	1. Cáncer de mama 25.1%
2. Próstata 14.8%	2. Colorrectal 9.2%
3. Colorrectal 10.1%	3. Pulmón 8.8%
4. Estómago 8.5%	4. Cérvico uterino 7.9%
5. Hígado 7.5%	5. Estómago 4.8%
6. Vejiga 4.5%	6. Ovarios 3.6%
7. Esófago 4.4%	7. Tiroides 3.5%
8. Riñón 2.9%	8. Hígado 2.5%
9. Leucemia 2.7%	9. Páncreas 2.5%
10. Labio y cavidad oral 2.7%	10. Labio y cavidad oral 1.5%

Tabla 1: GLOBOCAN 2012 Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence World Wide in 2012.
http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.

El cáncer se considera "una colección intrínsecamente compleja de patologías heterogéneas que varían según el tejido de origen y la constelación de alteraciones genómicas, proteómicas y metabólicas". [3]

La enfermedad se caracteriza porque las células malignas proliferan sin medida, ajenas al control de los organismos pluricelulares, por medio de mitosis repetidas y anómalas extendiéndose más allá de los límites normales e invadiendo partes adyacentes del cuerpo, propagándose a otros órganos. Éstas derivan de una única célula que en algún momento anterior ha experimentado una mutación que altera su programa normal de proliferación. [4].

Dentro de los tratamientos se incluyen: cirugía, radiación, quimioterapia, terapia hormonal, terapia inmune y terapia dirigida. Sin embargo, a pesar de los avances en los tratamientos, en todo el mundo, una de cada siete muertes se debe a cáncer. El cáncer representa hoy en día, la segunda

causa de muerte en países de altos ingresos y la tercera causa de muerte en países de bajos y medianos ingresos. [3]

CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

El cáncer de cabeza y cuello comprende una agrupación heterogénea de tumores localizados en diversos sitios anatómicos de la cabeza y el cuello, resultado de diferentes factores etiológicos.

Las malignidades en la cabeza y el cuello representan el 17.6% de la totalidad de las neoplasias malignas (108,064), reportadas al Registro Histopatológico de las Neoplasias en México. Si bien, el 72% son carcinomas cutáneos y tiroideos asociados a una baja letalidad, hasta el 12% (2269 casos) son carcinomas de células escamosas de las vías aerodigestivas superiores. De lo anterior, el 65% de los casos se diagnostican en etapas avanzadas asociándose a un mal pronóstico de supervivencia. [4]

Los sitios específicos donde se presentan, según el orden de prevalencia son: cáncer laríngeo 42%; cáncer bucal 37%; cáncer de fosas nasales y senos paranasales 9%; cáncer de la buco-faringe 6%; cáncer de la nasofaringe 3%, y el cáncer de hipofaringe con un 3%.

Mientras que la letalidad estimada es la siguiente: cavidad bucal 62.4%, laringe: 93%, bucofaringe cerca del 100%, hipofaringe 94%, nasofaringe 83% y, fosas nasales y senos paranasales 47%. [5]

CÁNCER ORAL

Dentro del cáncer de cabeza y cuello, el cáncer oral se caracteriza por presentarse específicamente en los siguientes sitios anatómicos: boca,

faringe, labios, lengua, piso de la boca, paladar, encía, mucosa alveolar, mucosa bucal, orofaringe, amígdalas, úvula y glándulas salivales.

Es importante mencionar que cuando se detecta cáncer oral en etapas prematuras de desarrollo, tiene un rango de supervivencia del 80 al 90%. Por tal motivo, es necesario implementar nuevas medidas de diagnóstico precoz.

Aunque la cavidad bucal es un área accesible y examinada con habitualidad, es muy frecuente que se presenten casos de diagnóstico tardío de carcinoma epidermoide. Por lo que, el porcentaje de supervivencia alcanza solo el 25% a los cinco años.

El cáncer oral ocurre con mayor frecuencia en personas mayores de cuarenta años. La tasa de sobrevivencia global a 5 años es del 50%, a pesar de los avances en los tratamientos. [5]

El carcinoma de células escamosas o epidermoide, es el tumor maligno más frecuentemente encontrado en la cavidad bucal. Comprende, el 5% de todas las lesiones malignas y el 30% de todos los tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Tipos de cáncer oral

Específicamente el carcinoma oral de células escamosas (COCE), comprende el 90% de todos los cánceres intraorales y es el quinto cáncer más frecuente en todo el mundo.

La incidencia de este tipo de cáncer oral está aumentando rápidamente en todo el mundo, especialmente en la India, donde representa el 40-50% de todos los cánceres humanos. [5]

Factores de riesgo

La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multifásico y multifactorial que comienza en una célula y en corto tiempo suele progresar desde una lesión precancerosa a un tumor maligno.

A través de su Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer, la OMS mantiene una clasificación de los agentes cancerígenos que ocasionan alteraciones celulares.

Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres categorías de agentes externos, a saber:

Carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioleta e ionizantes; carcinógenos químicos, como los asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) o el arsénico (contaminante del agua de bebida); y carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos.

La incidencia del cáncer también se ha visto aumentada con la edad, muy probablemente porque se van acumulando los factores de riesgo, compaginando con la tendencia de los mecanismos de reparación celular a perder eficacia, con el tiempo. Por lo anterior, el envejecimiento se enlista como otro factor de riesgo fundamental en la aparición del cáncer.

Hábitos

El desarrollo del COCE en humanos se asocia a la exposición del revestimiento de la mucosa oral con carcinógenos durante el consumo de tabaco y alcohol, principalmente. [6]

Estudios epidemiológicos describen una correlación entre el uso de tabaco y la alta incidencia de lesiones premalignas y malignas de la cavidad oral.

El 22% de las muertes mundiales por cáncer en general, y del 71% de las muertes mundiales por cáncer de pulmón, se asocian al uso de tabaco.

En el COCE 8 de cada 10 pacientes con cáncer oral son fumadores de tabaco en sus diversas formas: cigarrillos, puros, tabaco de mascar, tabaco en pipa, etc.

Incluso desarrollan cáncer aquellos que no utilizaron tabaco, pero fueron fumadores pasivos. Debido a que el humo inspirado del tabaco contiene más de 30 sustancias carcinogénicas conocidas. Concretamente, los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las nitrosaminas están asociadas fuertemente al cáncer de lengua y laringe-faringe. [7].

Por otra parte, el segundo agente de importancia, después del tabaco, es el consumo de alcohol que se asocia a un incremento en el riesgo de padecer cáncer de orofaringe. [8]

Está reportado que el riesgo de cáncer de orofaringe en bebedores es 6 veces mayor que en no bebedores, mientras que el riesgo de muerte por cáncer de orofaringe es 4 veces mayor en alcohólicos. [9].

Finalmente, dentro de los carcinógenos biológicos, el VPH es el de mayor relevancia en la actualidad. Se presume que, durante algunas prácticas sexuales, el virus puede infectar las células de la mucosa oral mediante contacto directo o transmisión digital por el alojamiento del virus en la zona periungueal o a través de superficies epiteliales maceradas. [10].

Algunos autores han mencionado que, para el desarrollo de cáncer oral, la exposición a factores cancerígenos o actividades que se relacionen con la generación de especies reactivas de oxígeno o radicales libres, también son agrupados dentro de los factores de riesgo carcinógenos.

Carcinogénesis

Es el término utilizado para explicar el mecanismo por el cual se desarrolla una neoplasia maligna.

La iniciación de una célula cancerosa se presenta cuando su ADN es alterado, resultado de la exposición a factores carcinogénicos, tanto endógenos como exógenos.

El desarrollo tumoral iniciado por carcinógenos genera alteraciones moleculares a nivel del DNA, principalmente en los oncogenes, que al sufrir variaciones en su secuencia de nucleótidos (mutaciones), adquieren capacidades generadoras de tumores. [11]

Por su parte, los proto-oncogenes son secuencias génicas que codifican a las proteínas que controlan el crecimiento y diferenciación celular. La alteración de la secuencia génica de un proto-oncogén, se debe a mutaciones, amplificación o reordenamiento cromosómico de los propios oncogenes. [12]

La sensibilidad de las células mutadas respecto a su microambiente puede generar un crecimiento más rápido que en las células no alteradas, característica principal de una lesión tumoral.

Ciclo Celular

Es el intervalo entre cada división celular. Cada ciclo celular consiste en cuatro fases ordenadas y estrictamente reguladas, denominadas G1, S (síntesis de DNA), G2 y M (mitosis/meiosis). En la fase S, ocurre la síntesis del DNA, la separación de cromosomas y división celular ocurre en la fase M, y las fases G1 y G2, son de crecimiento.

Las células que no están en crecimiento residen en la fase G₀, (un estado de descanso). Los factores que modulan la salida de G₀ y la progresión a G₁ son cruciales para determinar la frecuencia del crecimiento. [13]

El reloj del ciclo celular sirve como un regulador maestro de este proceso, para que las células se dividan cuando es necesario y permanezcan en reposo, cuando el crecimiento no es necesario. El ciclo celular está directamente regulado por una serie de proteínas quinasas de serina / treonina, que son dependientes de ciclinas (CDK). Las CDKs están presentes en todas las divisiones celulares. Las ciclinas se sintetizan en el comienzo de la fase en la que actúan, y son degradadas al final de la fase. [14]

Parte del ciclo celular está regulado por la acción de diversos factores de crecimiento, implicados en fenómenos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular. [15]

Los factores de crecimiento son moléculas de señalización que, estimulan la proliferación de las células normales, se cree que muchos de ellos intervienen en la tumorigénesis (mutaciones).

Asimismo, en el ciclo celular, intervienen los oncogenes que codifican proteínas llamadas oncoproteínas, similares a los productos normales de los protooncogenes salvo que las oncoproteínas carecen de algunos elementos reguladores importantes. Incluso la producción de oncoproteínas no depende de factores de crecimiento ni de otras señales externas, pues por sí mismas tienen la capacidad de fomentar la diseminación y metástasis de las células neoplásicas. [15]

Del mismo modo, los receptores de crecimiento, siendo proteínas transmembrana, sufren una activación transitoria cuando el receptor capta a su factor de crecimiento específico y tal unión desencadena rápidamente la mitosis, pero las versiones oncogénicas de estos receptores pueden experimentar activaciones persistentes, sin necesidad de unirse a su factor

de crecimiento correspondiente. De tal forma que el receptor mutante libera hacia la célula continuas señales que estimulan la mitosis. [15]

Como se puede ver, el desencadenante para detener el ciclo y/o iniciar la apoptosis celular, está dictado por el entorno celular.

Apoptosis y Necrosis.

Ambos procesos son medidas de control de crecimiento, que durante el proceso tumoral están ausentes.

La apoptosis, es una serie regulada y ordenada de eventos que conducen a la destrucción sistemática de células. Cuando las células perciben tensiones anormales, tales como daños en el ADN o una proliferación aberrante, se origina una cascada de muerte celular programada.

La apoptosis se lleva a cabo mediante la acción de diferentes miembros de una familia de proteínas denominadas caspasas.

Uno de los sistemas de alarma empleados por las células, para detectar anomalías implica la aparición de genes supresores tumorales como el Gen p53. Tal gen, funciona como factor de transcripción, en cantidades adecuadas, detiene el ciclo celular o inicia la apoptosis, mediante la expresión de genes implicados en dichos procesos.

Los fenómenos que se producen durante la muerte celular programada son: desorganización del citoesqueleto, alteración de las membranas de los organelos, la contracción celular, condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos, que posteriormente serán fagocitados por los macrófagos.

Por su parte, la necrosis es un proceso que implica una respuesta inflamatoria de por medio, que lo hace diferente a la apoptosis. En este

proceso la célula se aumenta de tamaño provocando la rotura de la membrana celular y liberando al exterior todo su contenido. [14]

Es de esperarse que las células tumorales evadan las señales de muerte celular, la resistencia a dichas señales aunado a la división celular aumentada genera las masas tumorales.

Especies reactivas de oxígeno

La generación de radicales libres o de especies reactivas de oxígeno, han sido asociadas con la génesis de diversas enfermedades, entre ellas el cáncer. La neutralización de la actividad de los radicales libres, se ha transformado en una alternativa viable la prevención de dicha enfermedad.

El uso de antioxidantes para estabilizar y/o desactivar los radicales libres, tiene fines preventivos, pues evitan el ataque de las células biológicas normales, también juegan un papel en la activación de las enzimas antioxidantes del cuerpo, que controlan el daño causado por los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno. [16]

Defectos genéticos en p53

P53 que es un importante gen supresor de tumores y desempeña un papel en la inhibición de la proliferación de células anormales, de tal manera que inhibe el desarrollo y la progresión del cáncer. Se ha demostrado que los defectos genéticos sobre el gen p53, pueden generar cáncer. [17]

La mutación del gen p53 es la alteración genética encontrada con más frecuencia en el cáncer humano. Se ha identificado en el cáncer colorrectal, carcinomas de pulmón, de mama, de ovario, leucemia, y en el cáncer de cabeza y cuello. El porcentaje de detección de la mutación del p53 en el cáncer de cabeza y cuello varía dependiendo de las series, y oscila desde un 35% hasta un 80%. [18] Mutaciones del p53 pueden ser causadas por un gen

resultando una proteína alterada con pérdida de actividades del punto clave del ciclo celular.

Este gen, en condiciones de normalidad, codifica una fosfoproteína nuclear (proteína natural) que actúa como un regulador negativo de la proliferación celular mediante una acción compleja, puesto que al mismo tiempo actúa como factor de transcripción, interruptor del ciclo celular e inductor de apoptosis. Cuando ocurren mutaciones en el p53, se produce una síntesis anormal de proteína, proteína p53 mutada, que tiende a estabilizarse y acumularse en el núcleo. Esta proteína mutada pierde su capacidad supresora del crecimiento celular. La regulación negativa del p53 sobre la replicación ocurre ante diferentes tipos de agresiones en el ADN, aumentando entonces la cantidad de proteína nuclear p53. La consecuencia inmediata del incremento de la p53 es la detención del ciclo celular en G1, actuando mientras los mecanismos de reparación del ADN. [19]

Si la reparación del ADN es satisfactoria, el p53, activará a un gen denominado mdm2, cuyo producto se une e inhibe a la propia p53, levantando así el bloqueo célula. Si las alteraciones del ADN son muy extensas y el daño no puede ser reparado, la proteína p53 puede inducir el inicio de muerte celular fisiológica (apoptosis). De esta forma, la proteína p53 actúa protegiendo la integridad del genoma, estableciendo la posibilidad de que las células dañadas reparen su ADN, previniendo la inestabilidad genómica. La p53 bloquea el ciclo celular mediante la inducción de la proteína p21, inhibidora de las CDK. La p21 bloquea la transición G1-S y bloquea también directamente la replicación del ADN en la fase S del ciclo celular mediante la inhibición de la actividad de la proteína PCNA sobre la ADN polimerasa α . También se ha visto como la p21 puede actuar por otro mecanismo independiente de la p53. [20]

El gen p53 bloquea también la angiogénesis, posible favorecedora del desarrollo y la diseminación tumoral, a través de la secreción de

trombospondina-1 (TSP-1) por parte de los fibroblastos; de esta forma, en las células transformadas, la ausencia de p53 favorecería la inducción de la angiogénesis mediante una disminución de la secreción de TSP-1.

La prevalencia de mutaciones del p53 en carcinomas escamosos de cabeza y cuello de individuos sin factores de riesgo es menor del 5%, pero alcanza el 33% en individuos expuestos únicamente al tabaco y hasta el 58% en individuos con exposición al tabaco y alcohol. [21]

CÁNCER DE LENGUA

El cáncer de lengua o carcinoma de lengua se clasifica en el grupo de tumores de cabeza y cuello. Es un tumor maligno poco frecuente que se localiza sobre todo en el tercio anterior de la lengua, donde causa las lesiones más graves, y comúnmente se extiende por las estructuras contiguas hacia la faringe y laringe.

Los carcinomas en la lengua representan el 25% de todos los cánceres de boca. La edad media de aparición de este tipo de tumor es por encima de los 50 años.

Es un tumor predominantemente masculino; aunque en los últimos años debido al aumento del tabaquismo en la mujer, se está igualando la prevalencia entre ambos géneros.

El orden de localización del cáncer de lengua por prevalencia es el borde lingual, tercio medio y tercio posterior, respectivamente. Es decir, la mayoría (75%) se observan en la parte móvil.

Generalmente el tumor es único, solo en el 3 % de los casos, es múltiple. Los carcinomas en la lengua pueden adoptar formas diferentes. Hay tumores

planos que se encuentran en las mucosas y tumores ramificados que sobresalen de ellas.

El 80% de las lesiones de cáncer iniciaron en zonas con úlceras traumáticas del dorso, luego en el tercio ventral y por último en la punta de la lengua.

Tratamiento

El objetivo del tratamiento para el carcinoma de lengua es conservar la funcionalidad de la lengua y del resto de las estructuras de la cabeza y cuello. Para elegir el tratamiento ideal es decisivo determinar con exactitud la extensión del carcinoma y determinar si existen metástasis, debido a que este tipo de carcinomas, se extienden por los ganglios linfáticos del cuello o mandibulares.

La primera opción de tratamiento es la intervención quirúrgica. Indicada para los tumores pequeños móviles y también para los tumores situados en la base de la lengua extendidos hacia la laringe.

Cuando existe metástasis hacia los ganglios linfáticos, se realiza la disección de cuello, para eliminar los ganglios linfáticos, vasos sanguíneos y estructuras anexas cercanas.

Por su parte, la quimioterapia se ha empleado para reducir la gravedad del cáncer de cabeza y cuello en los casos donde el tumor es demasiado grande para ser extirpado por completo y la radioterapia por sí sola no lo ha podido controlar. Los medicamentos de quimioterapia que se utilizan con mayor frecuencia para el cáncer de la cavidad oral y de la orofaringe son:

Cisplatino	5-fluorouracilo(5FU)	Carboplatino	Paclitaxel
Docetaxel	Metotrexato	Ifosfamida	Bleomicina

Tabla 2: Tratamientos usados con mayor frecuencia en tratamiento de cáncer oral.

La combinación usada más comúnmente es cisplatino y 5-FU, más eficaz que cualquier medicamento individual, en la reducción temporal del cáncer de la cavidad oral y de la orofaringe.

La última opción de tratamiento incluye, radioterapia y quimioterapia conjuntas, que se indican en carcinomas en estadio muy avanzado o cuando el tumor no puede eliminarse mediante cirugía.

Cisplatino

Los medicamentos a base de platino, en particular el cis-diammine-dichloroplatinum (II) (mejor conocido como cisplatino), se emplean para el tratamiento de una amplia gama de tumores malignos sólidos, incluyendo testicular, ovario, cabeza y cuello, colorrectal, vejiga y pulmón.

El cisplatino a menudo conduce a un éxito terapéutico inicial asociado con respuestas parciales o estabilización de la enfermedad.

El cisplatino ejerce efectos anticancerígenos a través de múltiples mecanismos, pero su modo de acción implica la generación de lesiones de ADN, seguidas de la activación de la respuesta al daño del ADN y la inducción de la apoptosis mitocondrial.

La citotoxicidad del cisplatino (que se administra por vía intravenosa como infusión a corto plazo en solución salina fisiológica) también afecta los riñones (nefrotoxicidad), los nervios periféricos (neurotoxicidad) y el oído interno (ototoxicidad) (Cvitkovic et al., 1977; Kelland , 2007).

Aun así, la principal limitación de la utilidad clínica del cisplatino como medicamento anticanceroso es la alta incidencia de quimio-resistencia. [22]

Complicaciones del tratamiento

Las complicaciones más frecuentes incluyen: molestias al deglutir y dificultad al hablar, disminuyendo la calidad de vida.

Pronóstico

El pronóstico y la tasa de curación dependen considerablemente de la extensión del tumor y de su expansión, así como de las posibles metástasis.

La supervivencia media a los 5 años es alrededor del 55%. Sin embargo, la supervivencia está en relación con el estadio tumoral, siendo del 70 y 60% para los estadios I y II, de 40 y 30% para los estadios III y IV.

Atención postoperatoria

Posterior al tratamiento del cáncer en la lengua se busca reconocer y tratar a tiempo las recidivas, para mejorar el pronóstico del cáncer de lengua.

En el caso de las cirugías extensas, existe la posibilidad de realizar una reconstrucción plástica para restablecer las funciones del habla, masticatoria y de deglución, principalmente.

Prevención

La prevención se basa en evitar el consumo de tabaco y de alcohol primeramente, además de realizar revisiones odontológicas periódicas de las prótesis dentales y de los implantes o sitios propensos para desarrollar cáncer.

COSTO DE LOS TRATAMIENTOS PARA EL CÁNCER ORAL

El costo del tratamiento para cáncer en el cuerpo humano es excesivamente elevado.

La sociedad en general tiene una importante necesidad de encontrar un tratamiento más selectivo, efectivo y primordialmente más barato.

Por lo anterior, la medicina alternativa considera que los productos derivados de plantas naturales representan una alternativa interesante para proporcionar soluciones para el tratamiento del cáncer.

Lo más importante es que los compuestos naturales, farmacológicamente activos, podrían atacar las vulnerabilidades de células cancerosas, sin toxicidad para las células no cancerosas.[23]. Un problema no resuelto en los actuales fármacos antineoplásicos.

EFFECTOS SECUNDARIOS DE LA QUIMIOTERAPIA

TOXICIDAD INMEDIATA Horas-días	TOXICIDAD PRECOZ Días-semanas	TOXICIDAD RETARDADA Semanas-meses	TOXICIDAD TARDÍA Meses-años
-Vómitos	-Alopecia	-Ototoxicidad	-Hipogonadismo/esterilidad
-Astenia	-Aplasia medular	-Anemia	-Leucemias agudas
-Fiebre	-Leucopenia, anemia,	-Pigmentación cutánea	-Encefalopatías
Híper/Hipotensión	trombopenia.	-Fibrosis pulmonar	-Cataratas
-Flebitis	-Mucositis	-Neuropatía periférica	Carcinogénesis
-Insuficiencia renal aguda	-Diarrea	-Cardiotoxicidad	-Menopausia precoz
-Reacciones alérgicas	-Hiperglucemia	-Fibrosis del conducto lagrimal	-Fibrosis hepática
-Rash cutáneo	-Psicosis	-Ataxia cerebelosa	-Osteoporosis
-Cistitis hemorrágica	-Retención hídrica	-Daño hepatocelular	
-Necrosis tisular local	-Síndrome pseudogripal	-Fenómeno de Raynaud	
		-Síndrome hemolítico	

Tabla 2: Efectos secundarios de la quimioterapia a corto, mediano y largo plazo.

TERAPIA ALTERNATIVA

Desde las culturas antiguas, el uso de plantas medicinales, ha formado parte integral de la lucha de la sociedad humana, contra una amplia gama de enfermedades.[24]

Recientemente, la investigación científica se ha interesado por los compuestos naturales como productos alternativos para las terapias contra el cáncer, con el fin de proporcionar tratamientos complementarios, más seguros, más baratos e incluso que ayuden a mejorar la calidad de vida de los pacientes con cáncer.

Hoy en día, diversos compuestos derivados de plantas, ya se utilizan exitosamente en la quimioterapia para diversos tipos de cáncer. Entre dichos compuestos destacan: Vinblastina y Paclitaxel (Taxol); entre otros.

Con las agencias de la salud, que proporcionan el marco regulatorio requerido para el desarrollo de compuestos naturales con fines terapéuticos, el futuro verá el crecimiento y la expansión de muchos compuestos naturales selectivos para el tratamiento del cáncer.[25]

ÁRBOL DE NEEM

Durante miles de años las propiedades benéficas del árbol de Neem (*Azadirachta indica*) han sido reconocidos en la India, y tal vez sea la planta tradicional más útil, en dicho país.

El árbol de Neem ha sido universalmente aceptado como un árbol maravilla debido a sus diversas propiedades: anti-inflamatorias, anti-piréticas, anti-histaminicas, anti-fúngicas, anti-bacteriales, analgésicas entre otras. [26]

Taxonomía

El árbol de Neem fue descrito por De Jussieu como: *A. Indica* en 1830 con la siguiente posición taxonómica.

Orden: Rutales Rutinae

Sub-orden: Meliaceae (mahogany family)

Familia: Melioideae

Subfamilia: Melieae

Tribu: Genus Azadirachta

Especie: indica

Características del árbol de Neem

El árbol de Neem pertenece a la familia *Meliaceae*, la cual se encuentra en abundancia en las regiones tropicales y semi-tropicales como India, Bangladesh, Pakistán y Nepal.

El árbol de Neem (Figura 1) puede medir entre 12 y 18 metros de altura con una circunferencia de hasta 1.8-2.4 metros.

Produce flores a los 3-5 años de edad. Las flores miden de 4-7 mm de largo y de 6-10 mm de ancho. La flor de color blanco, presenta un olor parecido al jazmín. [27]



Figura 1. Árbol de neem.

Las hojas del árbol de Neem son de color verde oscuro, llegan a medir hasta 30 cm de longitud. Su fruto son drupas de color verde, las cuales se tornan amarillo dorado y maduran en los meses de Junio y Agosto. (Figura 2) [27]



Figura 2. A) Ramas de árbol de neem. B) Hojas de árbol de neem C) Frutos de neem D) Semillas de neem E) Semillas de neem deshidratados.

Compuestos derivados del árbol de Neem

Azadirachta indica (Neem), es una fuente de componentes activos como: azadiractina, nimbolinina, nimbina, nimbidina, nimbidol, nimbinato de sodio, gedunina, salanina, y quercetina.

Las hojas contienen ingredientes como nimbina, nimbanene, 6-desacetylnimbinene, nimbandiol, nimbolide, ácido ascórbico, n-hexacosanol y aminoácido, 7-desacetil-7-benzoilazadiradiona, 7-desacetil-7-benzoilgedunina, 17-hydroxyazadiradiona y nimbiol.

Específicamente, Quercetina y β -sitosterol, son flavonoides polifenólicos, reconocidos porque presentan propiedades antibacterianas y antifúngicas ampliamente demostradas, mientras que las semillas contienen esencialmente gedunin y azadirachtin. [28]

PROPIEDADES TERAPEÚTICAS DEL NEEM

Se ha demostrado que los fitoconstituyentes del Neem tienen actividades biológicas y farmacológicas. Estas actividades incluyen efectos antiinflamatorios, antipiréticos, antihistamínicos, antifúngicos, antibacterianos, antiulcerosos, analgésicos, antiarrítmicos, antimicrobianos, antituberculosos, antipalúdicos, diuréticos, espermicidas, propiedades antiartríticas, antiprotozoarias, repelentes de insectos, antipesticida y anti-hormonales. [28]

Los efectos farmacológicos del Neem, se asocian al tratamiento de lepra, helmintiasis intestinal, trastornos respiratorios y estreñimiento. Para otras enfermedades no hay evidencia científica, aunque su uso se ha recomendado para el tratamiento de reumatismo, úlceras sifilíticas crónicas, para controlar diversas infecciones de la piel, úlceras en la piel, sensación de

ardor y psoriasis. Lo anterior demuestra la diversa utilidad del Neem, en la medicina actual.

Posibles propiedades antineoplásicas del Neem

Los componentes derivados del árbol de Neem pueden bloquear el crecimiento del cáncer a través de diversos mecanismos biomoleculares y celulares. Lo anterior podría deberse a la presencia de numerosos compuestos químicos, como azadirachtina, gedunina, nimbidina, nimbidol, nimbina, salanina y quercetina, presentes en diversas partes de la planta. [9]

Los fitoquímicos del Neem suprimen la proliferación y el crecimiento de las células cancerosas, inducen la detención del ciclo celular y la apoptosis, interfieren con la señalización del factor de crecimiento, inhiben la angiogénesis y disminuyen la invasión y migración de células tumorales mediante la activación de genes supresores de tumores y otras vías moleculares. [28]

La eficacia terapéutica, quimiopreventiva y anticancerígena de las fracciones y compuestos del Neem, podrían explicarse por múltiples mecanismos celulares y moleculares, que incluyen la eliminación de radicales libres, la desintoxicación carcinogénica, la reparación del ADN, la alteración del ciclo celular, la muerte celular programada (apoptosis) y la autofagia, actividades antiinflamatorias, antiangiogénicas, antiinvasivas y antimetastásicas, así como el aumento en la capacidad para modular varias vías de señalización oncogénicas desreguladas durante el desarrollo de una lesión de cáncer. [28]

NEEM Y EL CONTROL DEL CÁNCER

Ciclo celular

Inhibir el crecimiento de células tumorales es una característica común de muchos agentes quimiopreventivos y terapéuticos.

Se ha determinado que los limonoides del Neem, que se encuentran en mayor proporción durante los primeros extractos (1º-3er) de las hojas del Neem, inducen la detención del ciclo celular y la apoptosis en muchos tipos de células cancerosas, por lo que podrían ser agentes anticancerosos potenciales.

Los extractos de Neem suprimen la proliferación y el crecimiento de las células tumorales a través de la interrupción de la progresión del ciclo celular. Sin embargo, el mecanismo molecular subyacente de la muerte celular inducida por los limonoides del Neem, hasta la fecha no se encuentra definido.[29]

Genética

Por otra parte, también se ha demostrado que el Neem tiene un efecto directo sobre los genes supresores de tumores, como p53.

Un estudio confirmó que la fracción etanólica del tratamiento con hojas de Neem regula positivamente los genes supresores de tumores y algunas proteínas pro-apópticas, como: p53, proteína X asociada a Bcl-2 (Bax), caspases de proteína promotora de muerte asociada con Bcl-2 (Bad) caspasas, fosfatasa y tensina homólogo gen (pTEN), y c-Jun N-terminal quinasa (JNK). [29]

Líneas celulares de cáncer

La evidencia de la efectividad de los compuestos del Neem, ante líneas celulares y modelos animales de cáncer humano de colon, estómago, carcinoma de Ehrlich, pulmón, hígado, piel, oral, próstata y mama, ha demostrado que el Neem puede tener propiedades anticancerígenas importantes. [30]

Apoptosis

Los ingredientes activos obtenidos de la planta han demostrado inequívocamente, que pueden inducir la apoptosis en varios tipos de células tumorales y preparar el sistema inmune para eliminar las células cancerosas. Incluso se ha visto que no solo induce apoptosis, sino otras formas de muerte celular, incluida la autofagia y la apoptosis independiente de caspasas.

Los capacidad de los extractos de Neem para inducir otras formas de muerte en las células cancerosas sugieren un efecto proapoptótico múltiple.[31]

Los limonoides del Neem inducen la apoptosis a través de la vía intrínseca del cáncer de próstata y las células del cáncer de cuello uterino, junto con una mayor liberación de citocromo c. Se deduce que la apoptosis ocurre a través de la vía mitocondrial. [32]

Los limonoides de Neem también inducen apoptosis a través de la activación de las vías apoptóticas extrínsecas en cáncer de mama, colon, próstata, estómago y leucemia. [33]

La apoptosis o muerte celular es un proceso muy complejo que involucra múltiples grupos de proteínas. Curiosamente, la apoptosis inducida por Neem ocurre a través de un mecanismo independiente de p53 en células de cáncer

de colon. En el estudio se demostró que la pérdida de p53, no previene la apoptosis inducida por Neem [34]

Dado que la pérdida de la función p53 es una deficiencia común en la mayoría de los cánceres, el Neem puede proporcionar beneficios clínicos únicos, pues en comparación con la mayoría de los agentes quimioterapéuticos que dependen de la función p53 para inducir la apoptosis en las células tumorales, el Neem no requiere tal función. [35]

Por otra parte, la apoptosis inducida por radiación ionizante se potencia aún más con el tratamiento simultáneo de Neem, en células de neuroblastoma con extracto etanólico de Neem. Probablemente se deba al hecho de que la combinación del extracto de Neem mas la radiación ionizante, mejora la transcripción de genes que codifican proteínas proapoptóticas que incluyen Bak, Bax y caspasas, en comparación con la radiación sola.

Estudios reportan que es probable que los efectos moduladores de los componentes de Neem, sobre las proteínas de la familia Bcl-2, mejoren la apoptosis mediada por receptores de muerte celular. [36]

Otras propiedades

Se ha reportado que los componentes de Neem reducen el estrés oxidativo celular.

También se ha demostrado que la expresión de genes que regulan múltiples procesos celulares, se altera en respuesta al extracto de hojas de Neem en el modelo de bolsa bucal de hámster inducida por carcinógenos [37]

La citotoxicidad selectiva de los extractos de Neem hacia las células cancerosas en comparación con las células normales, muestran la trascendencia para reducir la toxicidad durante el tratamiento del cáncer. [38].

Combinación de componentes de Neem con otras terapias

Debido a la naturaleza compleja del cáncer, los actuales regímenes de quimioterapia con el uso de agentes individuales, tienen limitaciones significativas.

La eficacia terapéutica clínica, puede mejorarse mediante la combinación de múltiples agentes.

Curiosamente, se ha demostrado que el Neem mejora la eficacia de otros fármacos anticancerosos, adicional a sus propiedades anticancerígenas como agente único [39].

Se ha reportado en la literatura la combinación de dosis subletal de extracto etanólico de Neem y cisplatino, con efectos sinérgicos en la disminución de la viabilidad de las células de cáncer de mama y de cuello uterino en comparación con los compuestos individuales.[40].

SISTEMAS DE ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

NOVEDAD EN TRATAMIENTOS PARA EL CÁNCER

Actualmente los avances en materiales se enfocan en el diseño escalado, ámbito mejor conocido como nanotecnología.

Los avances en nanotecnología, posibilitan el diseño de nuevos sistemas para solventar el problema de la biodisponibilidad que presentan los fármacos actualmente.

TECNOLOGÍA DE LIBERACIÓN CONTROLADA

La tecnología de liberación controlada de medicamentos está en evolución constante. La nanotecnología oncológica busca desarrollar modelos novedosos para la entrega de fármacos, como estrategias alternas a los procedimientos terapéuticos actuales y representa un área de oportunidad para la nanomedicina.

Los sistemas de administración de fármacos son potencialmente capaces de modificar la absorción y / o la distribución y/o la eliminación de un fármaco y así modificar su perfil farmacocinético (Methiowitz 1999; Brouwers 1996). Por lo tanto, es posible mantener los niveles terapéuticos del fármaco durante largos períodos de tiempo para evitar el inicio de picos potencialmente tóxicos en la concentración del fármaco, reducir la cantidad de fármaco y el número de administraciones, y proteger el fármaco contra los productos químicos. y degradaciones enzimáticas (Methiowitz 1999; Breimer 1998)(Methiowitz 1999, Saltzman 2001). [41].

SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA

De la variedad de nanomateriales, los de sílice de la serie de SBA (Santa Barbara Amorphous type material. CA, USA) han desplegado novedosas alternativas por sus características estructurales de poros ordenados en un característico arreglo hexagonal de gran estabilidad.

La sílice mesoporosa SBA-15 fue estudiada por Doadrio et al. y Regí et al. para evaluar su aplicación como sistema de administración de medicamentos como gentamicina.

En la biomedicina se ha demostrado su habilidad como sistemas óptimos de liberación de fármacos, para ingresar partículas en sistemas biológicos *in vitro*.

De manera general, los estudios del uso de SBA-15, se han enfocado en incluir antibióticos y antiinflamatorios, sin embargo no se han probado su función con agentes antineoplásicos. [42].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo provocando 7.6 millones de fallecimientos cada año (OMS).

Estadísticamente el cáncer oral aumenta su tasa de prevalencia y mortalidad anualmente, datos que se asocian a la detección tardía y al fracaso terapéutico.

Específicamente los carcinomas en la lengua representan aproximadamente el 25% de los cánceres de boca. Suelen aparecer entre los 50 y los 70 años y afectan con más frecuencia a los hombres.

El costo del tratamiento de cáncer, para el ser humano y la sociedad en general, es muy alto. Tal hecho ha despertado una necesidad de encontrar nuevos tratamientos y evidentemente más accesibles para el paciente.

Los productos de salud natural tienen un gran potencial para proporcionar alternativas para el tratamiento del cáncer.

JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Durante la última década, las propiedades anticancerígenas del Neem se han investigado a detalle desde varios ángulos científicos, demostrando que el extracto de Neem es efectivo contra diferentes tipos de cáncer, descritos previamente. Sin embargo, la literatura no reporta estudios sobre ningún tipo de cáncer oral.

Dando pauta al presente trabajo, para estudiar el efecto del extracto natural de *Azadirachta indica* sobre células de cáncer oral SCC-9, a fin de determinar si se presenta un efecto antineoplásico, *in vitro*.

HIPÓTESIS

El extracto de Neem, que ha demostrado eficacia terapéutica contra diversos tipos de cáncer, será efectivo o no, contra un tipo de cáncer oral *in vitro*.

OBJETIVOS

I. GENERAL

Describir los efectos antineoplásicos del extracto natural de *Azadirachta indica* sobre líneas celulares de cáncer y normales, *in vitro*.

II. Específicos

- Obtención del extracto natural de *Azadirachta indica*.
- Cultivo y expansión de líneas celulares (control y experimental).
- Determinación de la concentración eficaz de *Azadirachta indica*, *in vitro*.
- Evaluación del efecto del extracto, sobre las líneas celulares, *in vitro*.
- Comparación del efecto del extracto contra fármaco actualmente usado para quimioterapias.
- Incorporación de los extractos activos a una nanocerámica SBA-15.
- Cuantificación de la liberación del extracto desde la nanocerámica.
- Comparación del efecto del extracto directo o asistido por una nanocerámica.

MATERIALES

Extracción etanólica

- 3 kg de hojas de *Azadirachta indica*.
- Licuadora convencional.
- Recipiente de vidrio de 2000ml.
- Papel aluminio.
- Etanol de grado molecular (Sigma-Aldrich).
- Parilla de calentamiento con control de temperatura.
- Papel filtro.
- Tela quirúrgica.
- Espátulas metálicas estériles.
- Frasco color ámbar 200ml estéril.

Cultivo celular

- Líneas celulares: hFOB 1.19, HaCat, SCC-9, MCF-7 y SiHa, (ATCC®).
- Placa de 96 pozos (Costar).
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (GIBCO).
- Suero Fetal Bovino (GIBCO).
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12 (DMEM-F12) (GIBCO).
- Incubadora de CO₂.
- Refrigeradores a 20°C, -10°C, -80°C y criotank de conservación.
- Placas de cultivo de 25 cm³ y 75cm³ (Corning).

Determinación de la concentración efectiva

- Extracto etanólico de Neem.
- Placas de cultivo de 25cm³ y 75cm³ (Corning).
- Placas de 24 pozos (Costar).
- Microscopio Microscópio Trinocular Invertido Amscope 40X-640X.

Pruebas de modificación morfológica.

- Microscópio Trinocular Invertido Amscope 40X-640X.
- Cámara fotográfica integrada al microscopio.
- Solución de fosfatos (PBS).
- Formaldehído al 10%.
- Agua bidestilada.
- Tinción de Alizarina Roja.
- Etanol de grado molecular al 50% 70% y 100%.

Pruebas de viabilidad celular

- Cell Counting Kit-8 (CCK-8). Cell Proliferation Assay and Cytotoxicity Assay. Dojindo Molecular Technologies, Inc.
- Lector de microplacas ELISA RT2100C (Elicrom).

Ensayo de citotoxicidad

- Kit MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Invitrogen™).
- Lector de microplacas ELISA RT2100C (Elicrom).
- Extracto etanólico de Neem.
- *cis*-Diamineplatinum(II) dichloride (Sigma-Aldrich).

Análisis estadísticos.

- Software SigmaStat versión 3.5 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA).
- GraphPad Prism 7 Software
- Computadora.
- Servicios de paquetería Microsoft office 365 Education.

METODOLOGÍA

COLECTA DEL ESPÉCIMEN

Se recolectó hojas de *Azadirachta indica*, provenientes de Ticuman, Morelos, México. (1845'40"N99 07'09"O).

Se llevó a cabo la selección de hojas, sin manchas, sin perforaciones y de color uniforme.

EXTRACCIÓN ETANÓLICA

Se lavaron las hojas con agua purificada y se dejaron secar durante 5 días, fuera de los rayos del sol.

Una vez secas, se pesaron 3 Kg de hojas y se pulverizaron en una licuadora convencional.(Figura 3)

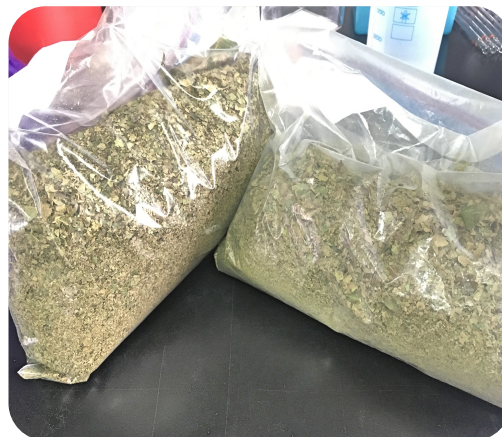


Figura 3 Neem pulverizado

Se colocó 1 Kg de hojas pulverizadas en un recipiente de vidrio de 2000 ml. (Figura 4). Se agregaron 1.5 Litros (L) de etanol de grado molecular.(Figura 5) y se cubrió el recipiente de la luz durante todo el procedimiento.



Figura 4 Neem pulverizado

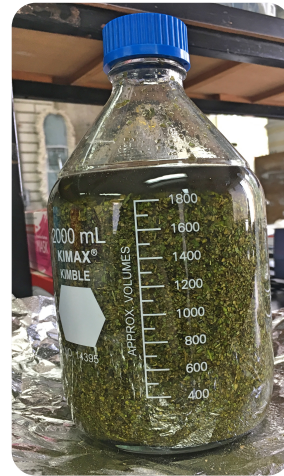


Figura 5 Neem pulverizado y etanol.

Se calentó la mezcla en una parrilla a 60°C, durante dos horas.(Figura 6)



Figura 6: Recipiente en parrilla de calentamiento

Se separó la fase líquida con papel filtro (Figura 7). La fase líquida se colocó en recipientes de vidrio (Figura 8) cubiertos de luz con un filtro de tela quirúrgica estéril, para permitir la evaporación del diluyente, durante 5-10 días.

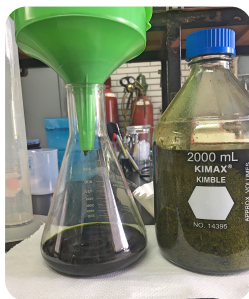


Figura 7 Separación de la fase líquida.

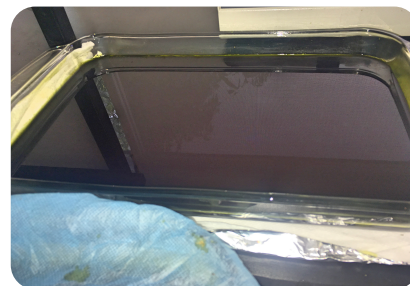


Figura 8 Fase líquida

Una vez deshidratado, el sedimento se recuperó mediante raspado de la superficie, con ayuda de espátulas metálicas estériles.(Figura 9)



Figura 9 Recuperación del sedimento.

La pasta recuperada, se colocó en un frasco color ámbar. Se pesó y determinó concentración final obtenida.

El extracto se almacenó en un lugar fresco y seco, protegido de la luz y a temperatura ambiente.[43]

CULTIVO CELULAR

Como controles positivos, se cultivaron células fetales de osteoblastos: hFOB 1.19 y queratinocitos inmortalizados: HaCat, (ATCC®). Se utilizaron las células de los pases 4-7 que se encontraron en subconfluencia al 70%. Se realizó conteo celular y se sembraron en placas de 96 pozos, en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) de Suero Fetal Bovino (SFB) durante 24h previas a la estimulación.

El grupo experimental fueron las líneas celulares de: carcinoma oral de células escamosas de lengua: SCC-9, cáncer cervicouterino: SiHa y cáncer de mama; MCF-7 (ATCC®), cultivadas en medio suplementado DMEM-F12 o RPMI, respectivamente.

Las líneas celulares se mantuvieron en ayuno de 24h, previas a la estimulación.

Los grupos experimentales y control, fueron estimulados con diferentes diluciones del extracto etanólico de Neem.

Los grupos control, fueron las células con medio de cultivo suplementado 10% de SFB. Para comparar el control normal de crecimiento con los tratados con el extracto etanólico de Neem.

Las células se mantuvieron en una incubadora de CO₂ (humedad, 37°C, 5% CO₂). [44]

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN EFECTIVA

Se sembraron 1000 células por pozo, en placas de 24 pozos, se dejaron en ayuno durante 24hr. Posteriormente se agregó a las líneas celulares, el extracto de Neem en concentraciones graduales [0.001-1000ug/ml], excluyendo los pozos control, que no se estimularon para llevar una referencia de crecimiento normal con el medio habitual. (Grupos control SFB 10%)

Se observaron al microscopio durante 10 días y se determinaron las concentraciones tóxicas y efectivas de los pozos experimentales, mediante la evaluación de la modificación de las características morfológicas observadas sugerentes de muerte celular, en comparación con los pozos control.

CURSOS TEMPORALES

Se llevaron a cabo cursos temporales a tiempos cortos (0-48hr) y largos (0-10 días), por duplicado. Los resultados derivan de 5 experimentos independientes.

Se evaluó el curso temporal diariamente, realizando cambio de medio cada tercer día, durante diez días.

Se determinaron las dosis efectivas de extracto etanólico de Neem [50-100ug/ml] y posteriormente se confirmaron, en ensayos por triplicado. Los triplicados se realizaron tanto para muestras experimentales, como controles. Primeramente, sobre líneas celulares control o normales para evaluar los efectos citotóxicos y posteriormente sobre las líneas celulares MCF7, SiHa y SCC9.

De manera anexa, se probó el efecto de un fármaco antineoplásico común (cisplatino [10ug 0.1ug]), para hacer una comparación entre el extracto etanólico de Neem y un fármaco que se usa actualmente para quimioterapias. (Figuras 16, 17 y 18)

PRUEBAS DE MODIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Los cambios morfológicos que se presentan normalmente durante la muerte celular por apoptosis y/o necrosis, son evidentes y fueron acompañados de observaciones diarias al microscopio para identificar aquellas diferencias morfológicas entre los grupos controles y experimentales. Al término de los cursos temporales, las células fueron fijadas y teñidas. Las imágenes de microscopía se presentan en la sección de resultados.

La detección de apoptosis ha adquirido gran importancia en el área del cáncer, ya que puede ser útil para conocer el mecanismo de acción de fármacos, mecanismos asociados a la naturaleza de la enfermedad y la efectividad de los tratamientos. [45] Las señales de muerte que conducen a la apoptosis son muy diversas: elevados niveles de oxidantes en el interior de la célula; lesión del DNA por oxidantes, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, fármacos quimioterapéuticos.[46]. Sin embargo, comparten ciertas

modificaciones morfológicas características de una célula en proceso de muerte, que fueron identificadas en fotografía.

Fotografías

Al final de los experimentos, las células fueron fijadas y teñidas tomar las fotografías representativas de cada grupo.

Se tomaron fotografías secuenciales de cada grupo control y experimental, utilizando los objetivos 4x, 5x y 10x del Microscopio Trinocular Invertido Amscope 40X-640X, a fin de comparar las diferencias en la morfología celular.

Tinciones

Alizarina

Para las células experimentales hFOB se realizó la tinción de alizarina roja.

Se aspiró el medio de cada pozo, posteriormente, se realizó un primer lavado con PBS y se colocó formaldehído al 10% en cada pozo para fijación. Se eliminó el formaldehído con tres lavados de agua destilada, de 5 minutos cada uno.

Al remover el agua, se colocó 1 ml de alizarina por pozo. Se incubó una hora y posteriormente se removió el exceso de colorante mediante cuatros lavados con agua destilada.

Al término se añadió 1ml de agua a cada pozo para evitar que se deshidrataran.

Se dejaron secar y se fotografiaron.

Hematoxicilina

Se utilizó una tinción de Hematoxilina para las células experimentales de cáncer y las control.

Una vez finalizados los cursos temporales a tiempos cortos y largos, se aspiró el medio de cada pozo.

Se lavaron las células con PBS 1X y se fijaron las células gradualmente con etanol (50%, 70% y 100%).

Posteriormente se agregó glutaraldehído por 20 minutos y retiró por pipeteo.

Se agregó etanol al 95% durante 3 minutos, se retiró para colocar etanol al 70% durante tres minutos y por último se agregó etanol al 95% durante 3 minutos.

Se agregó la tinción de hematoxicilina, se dejó en los pozos durante 10 minutos y se retiró.

Al terminar se lavaron indirectamente durante 5 minutos, con agua corriente.

PRUEBAS DE VIABILIDAD CELULAR

Se utilizó el Cell Counting Kit-8 (CCK-8). Cell Proliferation Assay and Cytotoxicity Assay. Dojindo Molecular Technologies, Inc.

Se añadieron diez microlitros de solución de CCK-8 a cada pozo, se colocó la caja en la incubadora durante un periodo de 3 horas.

Posteriormente se tomaron 100 microlitros de cada pozo y se colocaron sobre la placa de lectura. Se midió la absorbancia a 450nm lector de placas L de microplacas ELISA RT2100C (Elicrom)

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Se utilizó el kit: MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Invitrogen™)

Se añadieron diez microlitros de solución de MTT a cada pozo.

Se incubó la caja a 37°C, 5% de CO₂ durante 4 horas. Se agregaron 100 microlitros de DMSO a cada pozo para disolver los cristales formados y el mismo volumen fue transferido a una placa de lectura.

Se midió la absorbancia a 545nm en un lector de placas L de microplacas ELISA RT2100C (Elicrom).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos de al menos tres experimentos independientes fueron evaluados con el software SigmaStat versión 3.5 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA), para determinar las diferencias estadísticamente significativas.

RESULTADOS

Ensayo MTT

Los efectos antiproliferativos de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de Neem probado se evaluaron mediante el ensayo MTT.

Las líneas celulares fueron tratadas con concentraciones crecientes del extracto, la muerte celular incrementó dependiente de la dosis y el tiempo de exposición al extracto.

El extracto etanólico de Neem mostró efectos citotóxicos sobre las líneas celulares en las dosis de 50 y 100 µg/ml. (Figura 10)

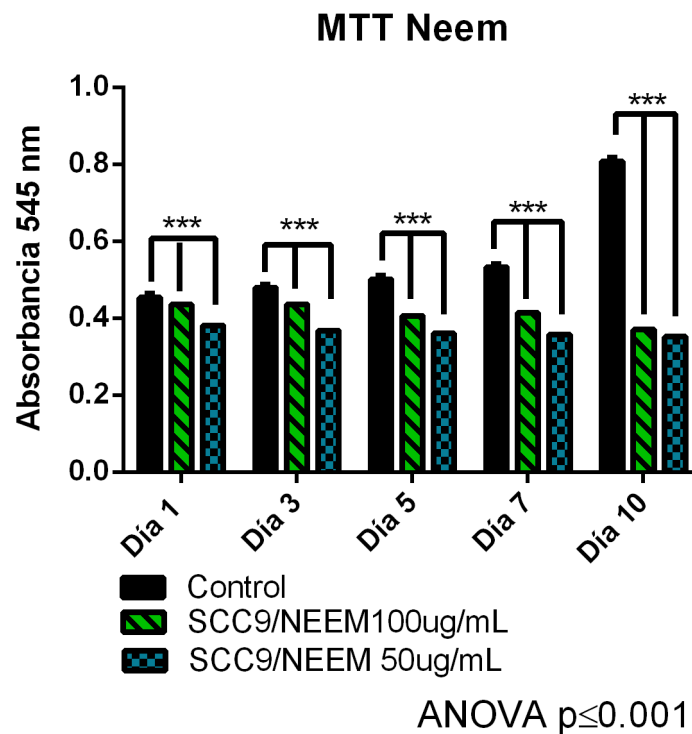


Figura 10. Las células control de SCC-9 sin tratamiento muestran crecimiento normal con el paso de los días comparadas con las células tratadas con extracto etanólico de Neem.

Para evaluar si el extracto etanólico de Neem poseía un perfil citotóxico seguro, el ensayo de MTT se realizó en las líneas celulares control (hFOB y HaCat). (Figura 11- Figura 15)

No se observó ningún efecto negativo en la proliferación y viabilidad en concentraciones inferiores a 100 µg/ml durante 24 y 48 horas. (Figura 11)

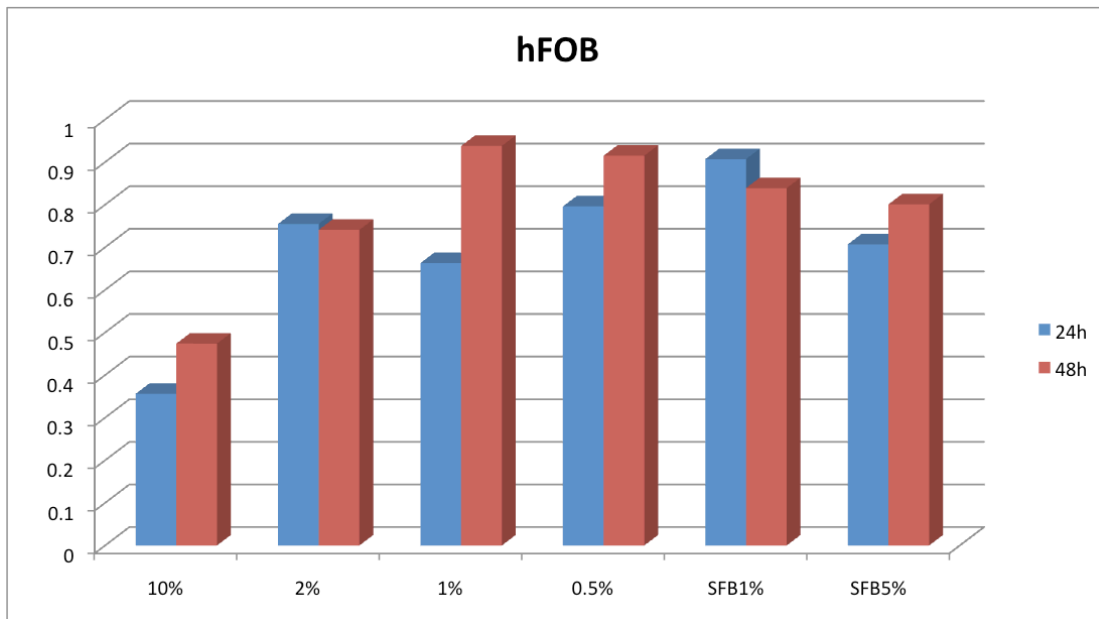


Figura 11 El extracto etanólico de Neem no muestra inducción de apoptosis en osteoblastos a concentraciones de 50 y 100 µg (0.5% y 1%).

Tales concentraciones fueron seleccionadas como seguras y se probaron en las líneas celulares de cáncer o experimentales, donde si hubo efecto citotóxico.

Lo anterior demuestra que el extracto de Neem es seguro para las células control, no así para las experimentales

Por lo tanto el extracto de Neem podría tener un buen perfil de seguridad.

Cambios morfológicos

La apoptosis tiene un significado biológico muy importante, que es opuesto al de la mitosis en la regulación del volumen tisular.[47]

En las células tratadas con el extracto de Neem, se observaron cambios morfológicos característicos de la muerte celular por apoptosis, tales como: retracción citoplasmática con fragmentación nuclear, cambios en la organización de la membrana citoplasmática, la aparición de condensación de la cromatina y pérdida de la adhesión celular. [48]

En un periodo de 10 días, las concentraciones de 50 y 100µg/mL, evidenciaron cambios morfológicos indicativos de apoptosis bajo el microscopio invertido.

Al microscopio, las células apoptóticas se observan como células pequeñas, hipereosinófilas, de citoplasma redondeado u oval con o sin material nuclear basófilo.

Las células tratadas con extracto etanólico de Neem (Figura 12) mostraron características distintas, tales como redondeo, contracción celular y desprendimiento de la matriz, que son las características típicas de las células que experimentan la muerte celular programada (apoptosis) en comparación con las células no tratadas en las que estos cambios morfológicos fueron ausentes. (Figura 13 y 14)

Observación de cambios morfológicos en las células de cáncer de lengua, tratadas con extracto de Neem.

Figura 12 Fotografías de células SCC-9 bajo el microscopio invertido. Se muestran diferentes concentraciones [$\mu\text{g/mL}$] del extracto etanólico de Neem. a)0.5, b)1, c)5, d)10, e)15 μg , f)20, g)50, h)100, i)Control 10%SFB.

Imágenes de la morfología de las células hFOB.

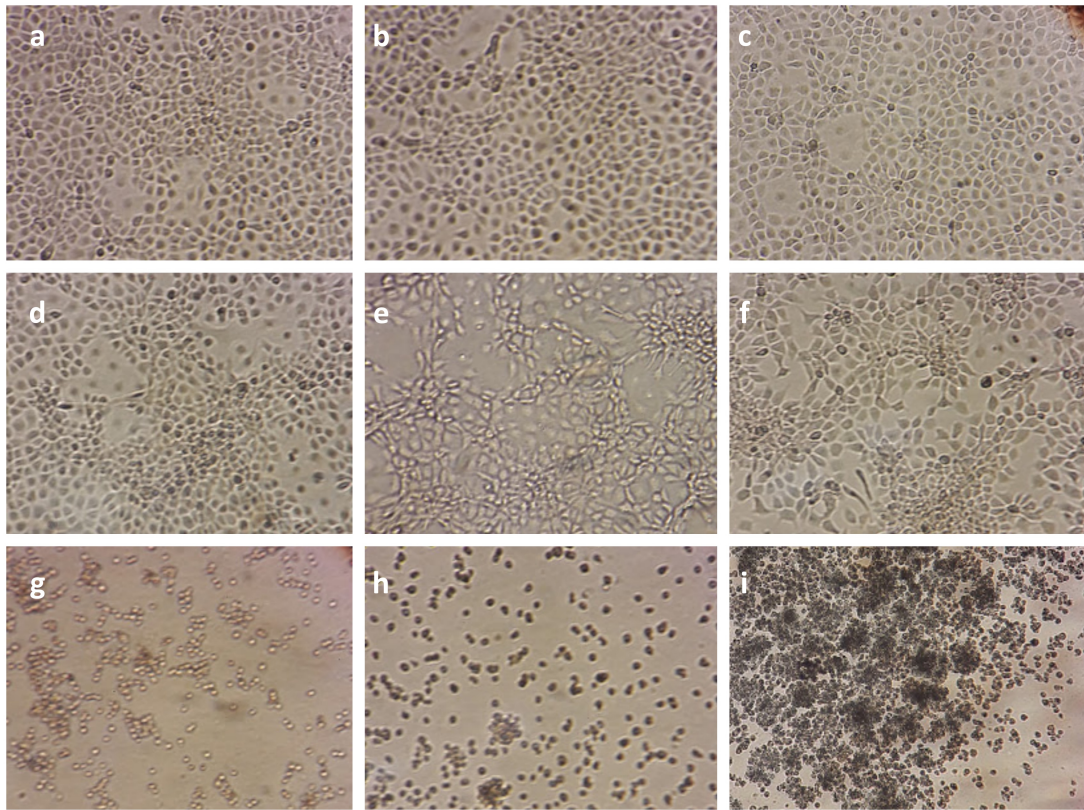


Figura 13 Fotografías de las células hFOB bajo microscopio invertido. Se muestran diferentes concentraciones [$\mu\text{g/mL}$] del extracto etanólico de Neem. a)0.5, b)1, c)5, d)10, e)15 μg , f)20, g)50, h)100, i)Control 10%SFB.

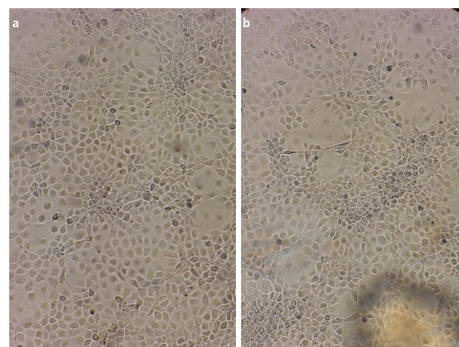


Figura 14 a) Control 5% SFB b) Control 10% SFB

Gráficas Cisplatino vs Neem

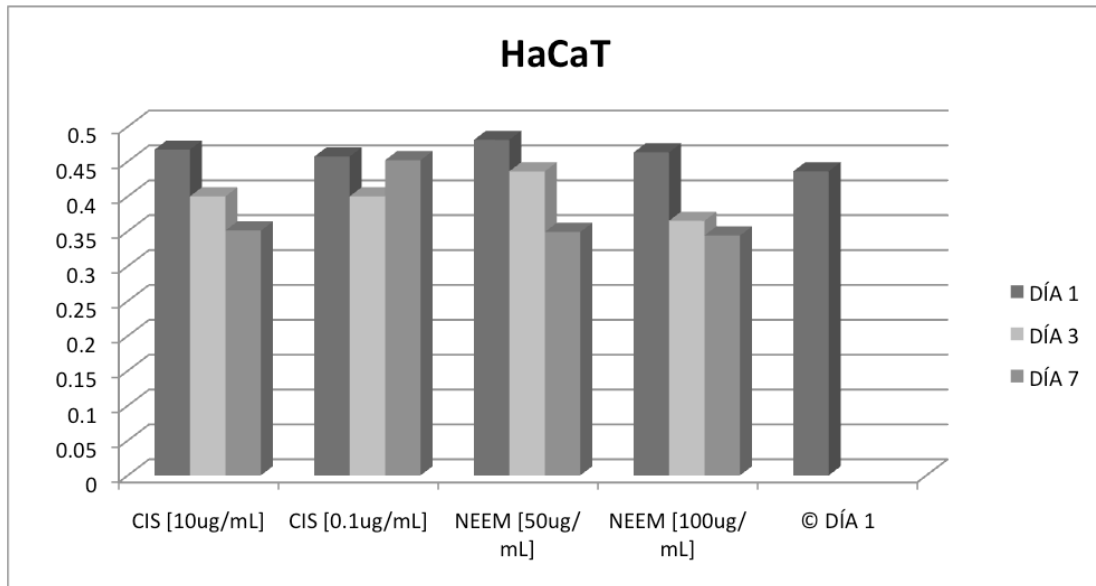


Figura 15. Se muestra el comparativo entre el tratamiento de células HaCaT con el extracto etanólico de Neem y el fármaco antineoplásico (Cisplatino). Se demuestra que en ninguno de los casos, las dosis determinadas muestran un efecto citotóxico sobre células control.

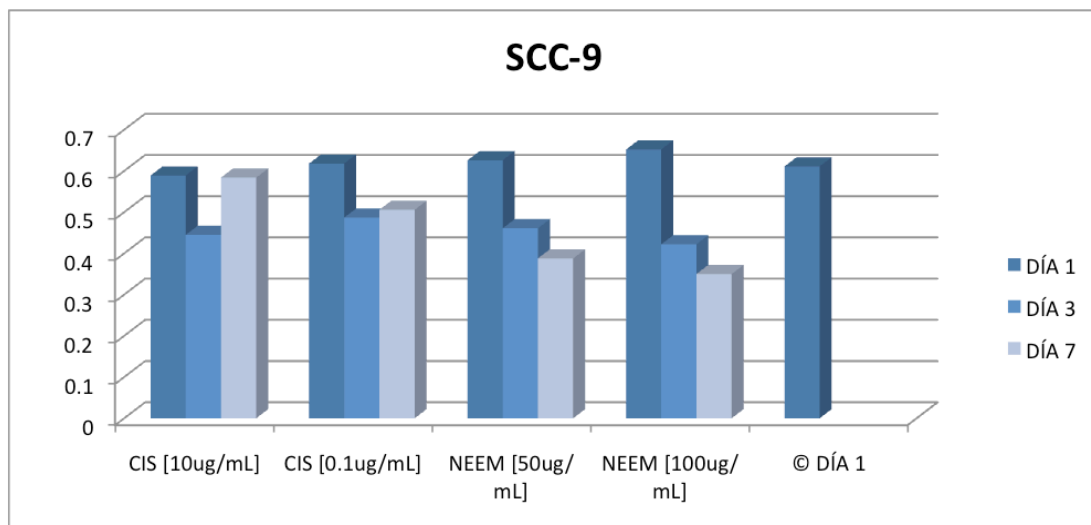


Figura 16. A partir del tercer día, se muestra una significativa disminución del crecimiento de las células tratadas con extracto étanólico de Neem, en ambas concentraciones. El efecto es incluso mejor que el que presentan las células tratadas con Cisplatino.

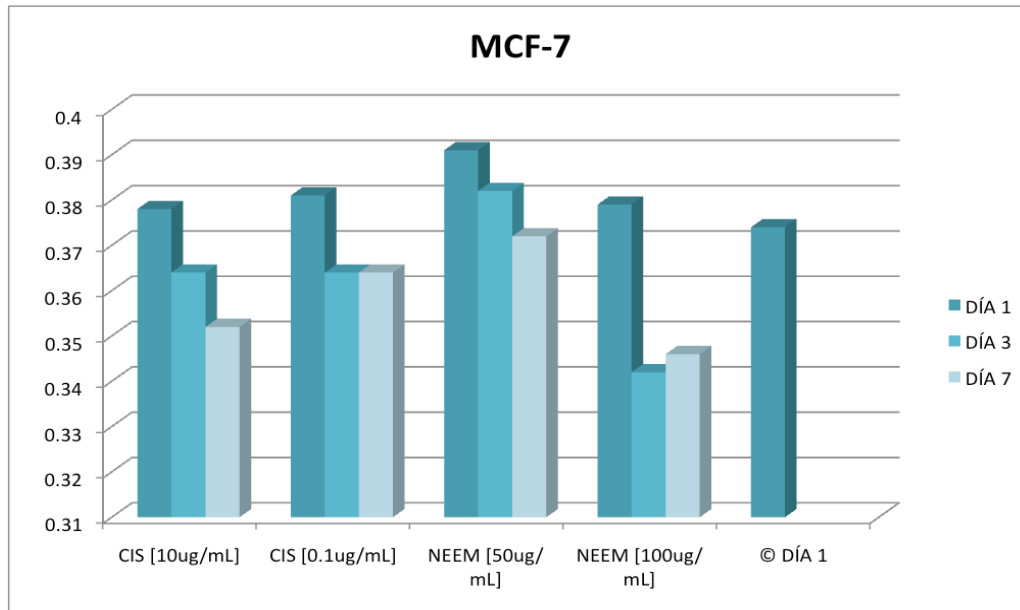


Figura 17. Se muestra significativa disminución de crecimiento en las células tratadas con extracto etanólico de Neem 50ug desde el día 1, muy similar a el efecto del Cisplatino, sin embargo con la concentración de 100ug, el efecto se muestra superior al de Cisplatino.

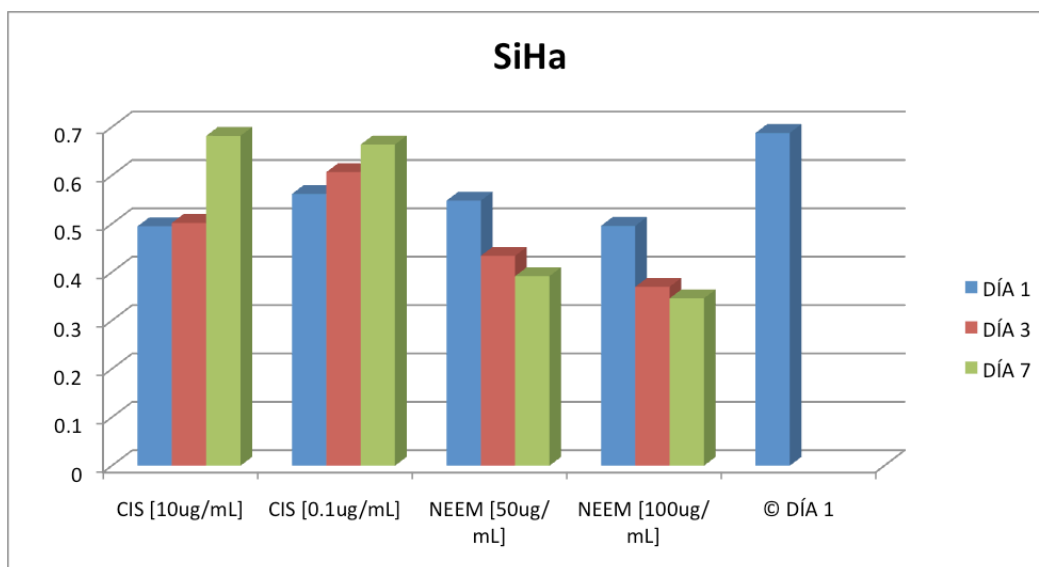


Figura 18. A partir del tercer día, se muestra una significativa disminución del crecimiento de las células tratadas con extracto étanólico de Neem, en ambas concentraciones. El efecto es incluso mejor que el que presentan las células tratadas con Cisplatino.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo demuestran la eficacia del extracto etanólico del Neem sobre líneas celulares de cáncer. Los efectos sobre la proliferación celular fueron tan buenos que en ocasiones supera al uso de un fármaco de la quimioterapia habitual contra las líneas celulares representantes de diferentes tipos de cáncer de gran prevalencia a nivel nacional e internacional.

De manera similar fue el efecto que se presentó al evaluar el extracto etanólico de Neem sobre las líneas representativas de células control de cáncer y a su vez de una línea de células normales. Los resultados indican que en las concentraciones usadas, efectivas contra líneas celulares de cáncer, no representa un riesgo su uso, pues las células control no tuvieron modificaciones que representaran un riesgo de muerte celular o e citotoxicidad.

Dado lo anterior, los resultados indican que además del efecto probablemente antineoplásico, el Neem como un recurso natural, tiene las ventajas de fácil disponibilidad, bajo costo y seguro para el uso humano.

Las acciones del extracto Neem contra el cáncer se asocian con la modulación de la proliferación y la inducción de la muerte celular.

Los compuestos naturales derivados del Neem pueden significar una alternativa para el tratamiento del cáncer, de menor toxicidad y con efectos secundarios menos agresivos que la actual quimioterapia y a su vez, satisfacer las necesidades administrativas de la sociedad y de accesibilidad para el paciente, que mantiene la actual quimioterapia.

El potencial uso del extracto de Neem para mejorar la eficacia de otros agentes quimioterapéuticos merece una exploración más profunda.

DISCUSIÓN

Estudios recientes informan que el uso regular de preparaciones de Neem, podría ayudar a eliminar el cáncer. Los estudios sugieren que, los componentes del Neem tienen un alto potencial para su consideración como efectivos agentes antineoplásicos con efectos secundarios mínimos o nulos durante el tratamiento.

Sus compuestos farmacológicamente activos actúan a través de múltiples mecanismos que incluyen principalmente, la producción de niveles sustanciales de antioxidantes y la desintoxicación de carcinógenos.

Por otra parte, diferentes estudios *in vitro* han demostrado que las actividades antiproliferativas de los extractos y limonoides de Neem ejercen efectos antiproliferativos en líneas celulares de cáncer, mediante la modulación de ciclinas, inhibidores de CDK y p53, moléculas que están relacionadas con la inhibición del ciclo celular y la inducción de la apoptosis. [49]

Si bien, el presente trabajo se enfocó en las propiedades antiproliferativas del extracto etanólico de Neem. Los resultados indican que el extracto etanólico de Neem inhibe el crecimiento de las líneas celulares de cáncer de una manera dependiente de la dosis y del tiempo. Se determinó la concentración eficaz que reducía la viabilidad de las células de cáncer notablemente, sin efecto significativo sobre la viabilidad de las células control. Al señalar una citotoxicidad selectiva hacia las células cancerosas, proporciona un fundamento para su desarrollo como agente quimiopreventivo.

Independientemente de los avances recientes en la prevención y detección de cáncer y el desarrollo de nuevas modalidades de tratamiento, el cáncer sigue siendo una de las enfermedades más terribles debido a las limitaciones de las estrategias de tratamiento disponibles [50]

Actualmente se están investigando agentes quimiopreventivos que sean farmacológicamente seguros y que tengan la capacidad de suprimir el proceso de carcinogénesis en diferentes etapas, así como potenciar los efectos de la terapia convencional con fitoquímicos combinados con quimioterapia.[51]

Dado que la carcinogénesis se asocia con desequilibrios en los mecanismos antiapoptóticos y proapoptóticos que conducen a la proliferación rápida e incontrolada de células cancerosas, la muerte celular inducida resulta un aspecto fundamental en la terapia del cáncer [52] . Por esta razón, la apoptosis inducida por el extracto etanólico de Neem sobre las líneas celulares experimentales del presente trabajo, reafirma el potencial antineoplásico del extracto natural.

Los tratamientos convencionales contra el cáncer, como la quimioterapia, están asociados con varios efectos citotóxicos; por lo tanto, se postuló que estos fármacos, cuando se combinan a dosis más bajas con agentes quimiopreventivos como el Neem, pueden minimizar la citotoxicidad a la vez que potencian el índice terapéutico. [53]

En el presente trabajo, se encontró que el cisplatino tenía citotoxicidad inespecífica en las líneas de células cancerosas (células MCF-7 y SiHa). En el contexto de los hechos mencionados anteriormente, este es el primer informe que analiza el efecto combinado de extracto etanólico de Neem y cisplatino en las células MCF-7, SiHa y SCC-9. Observando que dosis subletales de extracto etanólico de Neem y cisplatino mostraron efectos inhibidores del crecimiento.

Por lo tanto, el uso de agentes quimiopreventivos puede representar enfoques nuevos, para el desarrollo de estrategias terapéuticas, a fin de superar la resistencia asociada a la quimioterapia y los muchos efectos secundarios, de la quimioterapia actual. [54]

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N England J Med* 2002; 347:1593- 603.
2. American Cancer Society. *Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition*. Atlanta: American Cancer Society; 2015.
3. Judith K. Payne. State of the Science: Stress, Inflammation, and Cancer. *Oncology Nursing Forum* • Vol. 41, No. 5, September 2014
4. García-García V, González-Moles MA, Bascones Martínez A. Bases moleculares del cáncer oral. *Revisión bibliográfica. Av Odontostomatol* 2005; 21(6):287-95.
5. DGE. SSA, Registro Histopatológico de las Neoplasias en México, 2002
6. Tirado-Gómez y Granados, *Epidemiología y Etiología del Cáncer de la Cabeza y el Cuello, Cancerología 2* (2007): 9-17 *Epidemiología*
7. International Agency for Research on Cancer Tobacco Smoking. *IARC Monograph on the evaluation of the carcinogenic risk of Chemicals to humans*. Washington DC: IARC; 2007
8. ACTA MÉDICA GRUPO ÁNGELES. Volumen 3, No. 4, octubre-diciembre 2005 MG Dr. José Francisco Gallegos Hernández, Grupo Oncológico Valle de México, Hospital Ángeles Lomas
9. Marandas P, Marandas N. Situation actuelle des cancers des voies aéro- digestives supérieures en France et données épidémiologiques. In: Marandas P. Editor. *Cancers des voies aéro-digestives supérieures. Données actualles*. Masson. Issy-les-Moulineaux. 2004: 3-19. 70
10. Franceschi S., Muñoz N., Bosch XF., Snijders P., Walboomers J. Human Papillomavirus and Cancers of the Upper Aerodigestive Tract: A Review of Epidemiological and Experimental Evidence. *Cancer Epidemilogy, Biomarkers and Prevention*. Vol. 5, 567-575, July 1999.
11. Shigdar, Sarah Li, Yong Bhattacharya, Inflammation and cancer stem cells, *Cancer Letters* 345 (2014) 271–278
12. Willingham AT, Deveraux QL, Hampton GM, et al. RNAi and HTS: exploring cancer by systematic loss-of-function. *Oncogene* 2004; 23: 8392-400
13. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266: 1821-8.
14. Loro L. y cols. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *J Oral Pathol Med* 2003;32: 125-38.
15. Satyanarayana A, Rudolph KL. p16 and ARF: activation of teenage proteins in old age. *J Clin Invest* 2004; 114: 1237-40..
16. Schwartzman R, Cidlowski A. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Rev* 1993; 14: 133-51.
17. Fang Hao, Sandeep Kumar, Neelu Yadav, and Dhyana Chandra, Neem components as potential agents for cancer prevention and treatment, *Biochim Biophys Acta*. 2014 August ; 1846(1): 247–257.
18. Rothman K, Keller A. The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx. *J Chron Dis* 2004; 25: 711-716. 148
19. Vera Sempere F.J., Navarro Hervas M. Sobreexpresión del gen supresor p53 en el cáncer oral. *Medicina Oral* 1997; 2: 283-96. 52
20. Saiz Rodríguez A. Bases moleculares del cáncer oral. *Med Oral* 2001;6: 342- 9.
21. Pande P., Soni S., Kaur J., Agarwal S., Mathur M., Shukla NK., Ralhan R. Prognostic factors in betel and tobacco related oral cancer. *Oral Oncol Jul*; 38 (5): 491-9. 2002.
22. Galluzi, L. Senovilla Molecular mechanisms of cisplatin resistance *Oncogene* (2012) 31, 1869–1883
23. Arunkumar Arumugam, Ramadevi Subramani, Sushmita Nandy, Desacetyl nimbinene inhibits breast cancer growth and metastasis through reactive oxygen species mediated mechanisms, *Tumor Biology*, (2016) 37:6527–6537
24. Gordon M. Cragg, David J. Newman, Plants as a source of anti-cancer agents, *Journal of Ethnopharmacology* 100 (2005) 72–79

25. Arunkumar Arumugam, Pamela Agullo, Thiyagarajan Boopalan, Sushmita Nandy, Rebecca Lopez, Christina Gutierrez, Mahesh Narayan, Lakshmanaswamy Rajkumar (2014) Neem leaf extract inhibits mammary carcinogenesis by altering cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis, *Cancer Biology & Therapy*, 15:1, 26-34
26. Patel Shradha M., Nagulapalli Venkata, Kalyan C., Bhattacharyya, Piyali Sethi, Gautam Bishayee, Potential of Neem (*Azadirachta indica* L.) for prevention and treatment of oncologic diseases, 2015, 40-41, 100-115.
27. Muthulingam Nishan, Partiban Subramanian, Pharmacological and non pharmacological activity of *Azadirachta indica* (Neem) –A review, *Int. J. Biosci.* 2014 International Journal of Biosciences Vol. 5, No. 6, p. 104-112, 2014
28. Mohammad A. Alzohairy Department, Therapeutics Role of *Azadirachta indica* (Neem) and Their Active Constituents in Diseases Prevention and Treatment Mohammad Neem components as potential agents for cancer prevention and treatment, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Vol. 2016, 11 pages
29. Rajkumar Paul, Murari Prasad & Nand K. Sah To, Anticancer biology of *Azadirachta indica* L (Neem): A mini review Rajkumar, *Cancer Biology & Therapy*, 12:6, 467-476, DOI: 10.4161/cbt.12.6.16850
30. Rajkumar Paul, Murari Prasad & Nand K. Sah To, Anticancer biology of *Azadirachta indica* L (Neem): A mini review Rajkumar, *Cancer Biology & Therapy*, 12:6, 467-476, DOI: 10.4161/cbt.12.6.16850
31. Subapriya R, Kumaraguruparan R, Nagini S. Expression of PCNA, cytokeratin, Bcl-2 and p53 during chemoprevention of hamster buccal pouch carcinogenesis by ethanolic Neem (*Azadirachta indica*) leaf extract. *Clin. Biochem.* 2006; 39:1080–1087. [PubMed: 16989797]
32. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012; 13:780–788. [PubMed: 23175281]
33. Srivastava P, Yadav N, Lella R, Schneider A, Jones A, Marlowe T, Lovett G, O'Loughlin K, Minderman H, Gogada R, Chandra D. Neem oil limonoids induces p53-independent apoptosis and autophagy. *Carcinogenesis.* 2012; 33:2199–2207. [PubMed: 22915764].
34. Kikuchi T, Ishii K, Noto T, Takahashi A, Tabata K, Suzuki T, Akihisa T. Cytotoxic and apoptosis-inducing activities of limonoids from the seeds of *Azadirachta indica* (Neem). *J. Nat. Prod.* 2011; 74:866. [PubMed: 21381696].
35. Arunkumar Arumugam, Pamela Agullo, Thiyagarajan Boopalan, Sushmita Nandy, Rebecca Lopez, Christina Gutierrez, Mahesh Narayan, Lakshmanaswamy Rajkumar (2014) Neem leaf extract inhibits mammary carcinogenesis by altering cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis, *Cancer Biology & Therapy*, 15:1, 26-34
36. Manikandan P, Ramalingam SM, Vinothini G, Ramamurthi VP, Singh IP, Anandan R, Gopalakrishnan M, Nagini S. Investigation of the chemopreventive potential of Neem leaf subfractions in the hamster buccal pouch model and phytochemical characterization. *Eur. J. Med. Chem.* 2012; 56:271–281. [PubMed: 22939101]
37. Ricci F, Berardi V, Risuleo G. Differential cytotoxicity of MEX: a component of Neem oil whose action is exerted at the cell membrane level. *Molecules.* 2008; 14:122–132. [PubMed: 19127242]
38. Kikuchi T, Ishii K, Noto T, Takahashi A, Tabata K, Suzuki T, Akihisa T. Cytotoxic and apoptosis-inducing activities of limonoids from the seeds of *Azadirachta indica* (Neem). *J. Nat. Prod.* 2011; 74:866. [PubMed: 21381696]
39. Bodduluru LN, Kasala ER, Thota N, Barua CC, Sistla R. Chemopreventive and therapeutic effects of nimbolide in cancer: the underlying mechanisms. *Toxicol. In Vitro.* 2014; 28:1026–1035. [PubMed: 24759803]
40. Sharma C, Vas AJ, Goala P, Gheewala TM, Rizvi TA, Hussain A. Ethanolic Neem (*Azadirachta indica*) leaf extract prevents growth of MCF-7 and HeLa cells and potentiates the therapeutic index of cisplatin. *J. Oncol.* 2014; 2014:321754. [PubMed: 2462414]
41. Drug Delivery Devices Based on Mesoporous Silicate Gennara Cavallaro, Paola Pierro, and Fabio Salvatore Palumbo Dipartimento di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche, Palermo, Italy Flaviano

42. M.V. Regí, J.C. Doadrio, A.L. Doadrio, I.I. Barba, J. Pérez-Pariente, Hexagonal ordered mesoporous material as a matrix for the controlled release of amoxicillin, *Solid State Ionics* 172 (2004) 435–439
43. Subapriya, R Bhuvaneswari, V Nagini, S (2005), Ethanollic Neem (*Azadirachta indica*) Leaf Extract Induces Apoptosis in the Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis Model by Modulation of Bcl-2, Bim, Caspase 8 and Caspase 3 *Asian Pacific J Cancer Prev*, 6, 515-520.
44. Sarita Panula, Renee A. Reijo Pera, Preparation of Human Foreskin Fibroblasts for Human Embryonic Stem Cell Culture, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2016.
45. Ernesto Alfaro Moreno, Claudia García Cuéllar, Alfonso Dueñas González Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones, *Rev Inst Nal Cancerol (Mex)*, Vol. 46, N.º 4 Octubre-Diciembre 2000 pp 275-280
46. Cascales Angosto "Bases moleculares de la apoptosis" Vol.69 Num 1 *Anal. Real Acad. Nal. Farm.* 2003 pp. 38-47.
47. Porras, A., Marzo, I. "Apoptosis : una forma controlada de muerte" SEBBM Divulgación. Universidad Complutense de Madrid, 2010 pp1-2
48. Elmore Susan, "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death", *Toxicologic Pathology*
49. Roy MK, Kobori M, Takenaka M, Nakahara K, Shinmoto H, Isobe S, Tsushida T (2007) Antiproliferative effect on human cancer cell lines after treatment with nimbolide extracted from an edible part of the Neem tree (*Azadirachta indica*). *Phytother Res* 21:245–250
50. H. Nersesyan and K. V. Slavin, "Current aproach to cancer pain management: availability and implications of different treatment options," *Therapeutics and Clinical RiskManagement*, vol. 3, no. 3, pp. 381–400, 2007].
51. Ezz-Din, M. S. Gabry, A. R. H. Farrag, and A. E. Abdel Moneim, "Physiological and histological impact of *Azadirachta indica* (Neem) leaves extract in a ratmodel of cisplatin-induced hepato and nephrotoxicity," *Journal of Medicinal Plant Research*, vol. 5, no. 23, pp. 5499–5506, 2011, 23, D. Ghosh, A. Bose, E.Haque, and R. Baral, "Neem (*Azadirachta indica*) leaf preparation prevents leukocyte apoptosis mediated by cisplatin plus 5-fluorouracil treatment in swiss mice," *Chemotherapy*, vol. 55, no. 3, pp. 137–144, 2009].
52. R. S. Wong, "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment," *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, vol. 30, article 87, 2011.
53. N. Pabla and Z.Dong, "Curtailing side effects in chemotherapy: ataleofPKC in cisplatin treatment," *Oncotarget*, vol. 3, no. 1, pp. 107–111, 2012.
54. Chhavi Sharma, Andrea J. Vas. Ethanollic Neem (*Azadirachta indica*) leaf extract prevents growth of MCF-7 and HeLa cells and potentiates the therapeutic index of cisplatin, *Journal of Oncology*, Vol. 2014 17-20 2014.

ANEXO

ESTUDIOS PROSPECTIVOS.

La literatura indica que, los dispositivos de SBA-15, sirven como vehículos seguros para principios activos y además les brindan protección, para no ser degradados rápidamente por el metabolismo, permitiendo mejorar la biodistribución. Además presentan una biocompatibilidad alta y baja toxicidad en contacto con las células.

Una de las ventajas de los dispositivos de SBA-15 es la capacidad de poder presentar una liberación de los principios activos absorbidos sin modificarlos. Lo anterior, se comprueba con los ensayos de viabilidad, donde la presencia del dispositivo no reveló efectos diferentes a los observados sin el dispositivo.

CARGA Y LIBERACIÓN DEL EXTRACTO, DESDE EL DISPOSITIVO DE SBA-15.

Materiales

- Computadora.
- Membranas PLA-SBA 15
- Extracto etanólico de Neem
- Software SigmaStat versión 3.5 (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA).
- Viales con tapa de 2 ml
- Horno de secado.

Métodología

El extracto etanólico de Neem se usó para evaluar el rendimiento del SBA-15 como sistema de alojamiento.

El SBA-15 sintetizado se sumergió en el extracto etanólico de Neem (5 mg / ml) y se dejó en el horno de secado a 37°C hasta que el disolvente se evaporó por completo.

El 100% del extracto se absorbió dentro y fuera de la superficie de los canales SBA-15.

El perfil de liberación del extracto etanólico de Neem se logró sumergiendo los discos de SBA-15 en 1 ml de fluido biológico simulado (FBS).

La temperatura se fijó a 37 ° C y las soluciones se dejaron en el horno de secado durante la prueba.

Se usó un espectrofotómetro ELISA RT2100C (Elicrom) para controlar la cantidad de extracto liberado en función del tiempo.

Se realizó una prueba en espectrofotómetro a 405nm en periodos de 5 minutos durante una hora.

RESULTADOS

Liberación del extracto.

Período de tiempo transcurrido para la liberación del 50% y 75% del extracto etanólico de Neem en la superficie de SBA-15.

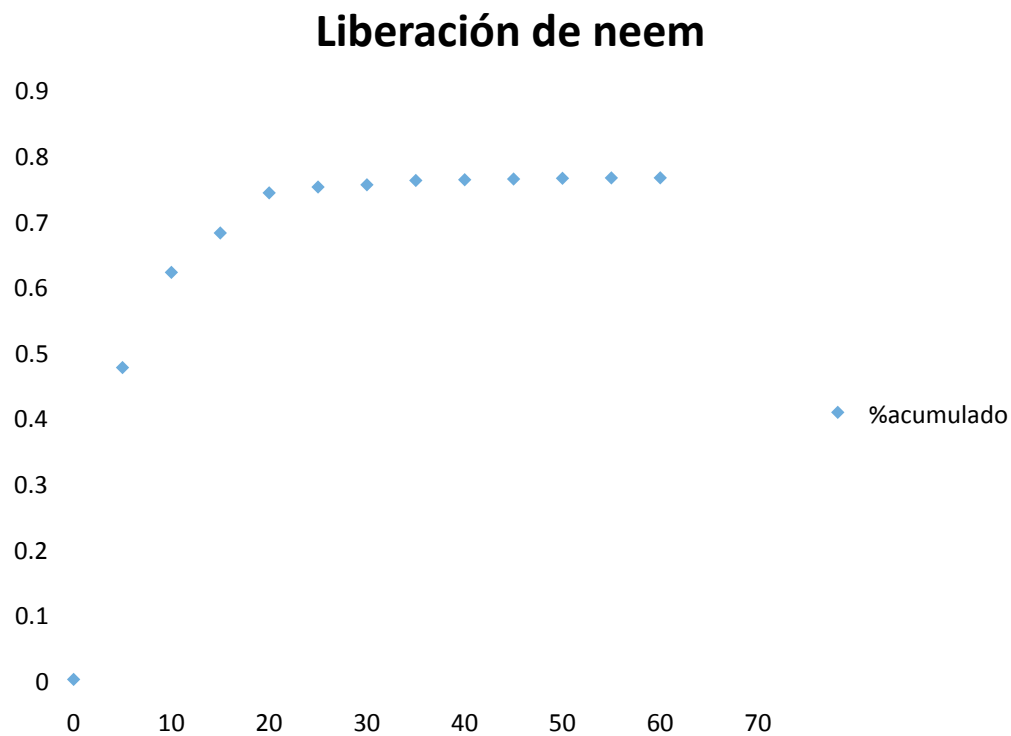


Figura 1 Liberación de extracto etanólico de Neem

Se muestra el porcentaje de liberación del extracto en función del tiempo (horas) para las muestras cargadas con extracto de Neem.

Carga del extracto.

Respecto a la carga y liberación del extracto, a partir del dispositivo de SBA-15, la liberación se presenta en una hora, aproximadamente. Probablemente, se debe a que las moléculas de Neem se posan sobre la superficie del dispositivo, y no dentro de la estructura porosa, haciendo relevante estudiar el tamaño del poro del dispositivo, contra el tamaño promedio de las partículas del extracto de Neem.

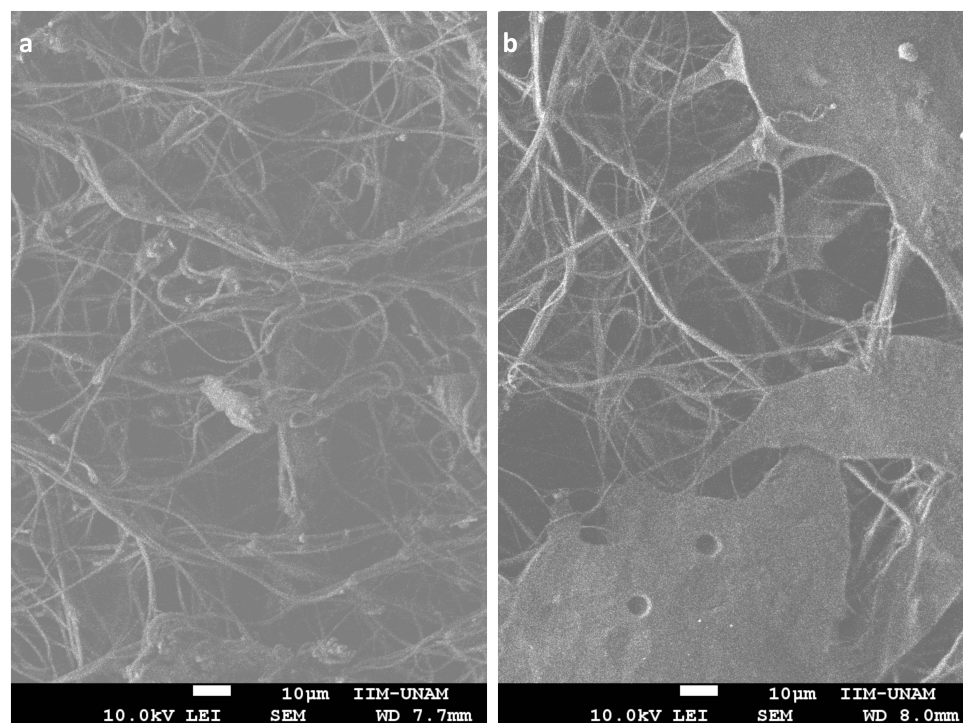


Figura 2 Microscopía electrónica de membranas de SBA-15 a) Membrana sin carga de extracto etanólico de neem. b) Membrana cargada con extracto etanólico de Neem.

CONCLUSIONES PRELIMINARES

El dispositivo cargado, fue biocompatible y presentó baja toxicidad en contacto con las células control, mientras que sobre las células experimentales (cáncer), el efecto fue el mismo que se presentó previamente . Por lo tanto, la presencia del dispositivo de SBA-15 no modificó el efecto del extracto absorbido.

Por el momento, el dispositivo de SBA-15 permite la carga del extracto de Neem y asegura su liberación en un lapso no mayor a dos horas. Sirviendo como un acarreador de liberación local rápida. Serán necesarias algunas modificaciones del dispositivo si se contempla la liberación prolongada para futuros estudios.