



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 del efecto de las flavonas Crisina y 8-Nitrocrisina en la ruta de inducción de apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama, pulmón y cérvix.

TESIS

Que para obtener el título de:

BIÓLOGA

Presenta

Medina Ruiz Ivonne

Director de Tesis

Dr. Hugo López Muñoz

Ciudad de México, 2021



FES
ZARAGOZA



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Al Dr. Hugo López Muñoz por todas sus enseñanzas, su tiempo, conocimientos y su invaluable apoyo en la realización de este trabajo.

A la Dra. María de Lourdes Mora García por sus valiosos comentarios y observaciones que ayudaron a mejorar este trabajo.

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez por haberme permitido formar parte de su grupo trabajo, su conocimiento y correcciones a lo largo de este tiempo.

Al Dr. Juan José Rodríguez Mercado por su tiempo invertido a revisar esta tesis, así como de sus comentarios y observaciones.

Al Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández por su apoyo y su siempre amable disposición para compartir sus enseñanzas.

Al Dr. Fernando Flores Guzmán por su invaluable apoyo y enseñanzas para realizar las técnicas necesarias para realizar este proyecto.

Este trabajo se realizó con apoyo de los Proyectos
PAPIIT IN-226420, IN-216718, CONACyT 258156

A mis padres Humberto y Zaira, especialmente a mi madre que sin su ayuda, amor y apoyo incondicional durante toda mi vida no hubiera podido concluir mis estudios, así como el darme las herramientas para sobrevivir en este viaje llamada vida. Te adoro y te agradezco infinitamente todo lo que haces por mí y por nuestra familia.

A mi hermana Mariana por su gran apoyo y todas las experiencias que hemos vivido juntas, gracias por compartir la vida, las risas y el cuarto conmigo.

A Daniel por darme su apoyo, amor y confianza desde el primer día que lo conocí, además de impulsarme a seguir mis sueños.

A mis abuelos, tías, tíos y familia en general, especialmente a mi abuelita Vicenta que es mi adoración.

A mis amigos y compañeros de laboratorio por hacer mi estancia una experiencia increíble, además de todos los recuerdos y enseñanzas que guardo conmigo siempre.

ÍNDICE

RESUMEN	1
MARCO TEÓRICO	2
<i>Ciclo celular</i>	2
<i>Muerte celular</i>	4
<i>Necrosis</i>	4
<i>Apoptosis</i>	5
<i>Vía extrínseca</i>	6
<i>Vía intrínseca</i>	7
<i>Cáncer</i>	9
<i>Cáncer de Pulmón</i>	11
<i>Cáncer de mama</i>	12
<i>Cáncer cervicouterino</i>	14
<i>Flavonoides</i>	16
<i>Crisina</i>	18
<i>NOC</i>	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	24
METODOLOGÍA	25
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por la proliferación incontrolada de células inestables con la capacidad de invadir tejidos y diseminarse a otras partes del cuerpo. En 2020 se registraron 19.2 millones de casos nuevos en el mundo, siendo los más incidentes el de pulmón, colorrectal, mama y cervicouterino, además de causar 9.9 millones de muertes a nivel mundial debido a que los tratamientos usados en la actualidad (cirugía, radioterapia y quimioterapia) son ineficientes en etapas avanzadas de la enfermedad, además de los muchos efectos secundarios que perjudican la calidad de vida de los pacientes. Es por ello en el presente trabajo se evaluó el efecto antiproliferativo e inductor de muerte celular de la crisina y 8-nitrocrisina (NOC) en líneas celulares de cáncer de mama, pulmón y cervicouterino así como su efecto en células no tumorales. Los resultados obtenidos establecen que la crisina y el NOC ejercieron una actividad antiproliferativa de manera dosis dependiente en las líneas celulares MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki con valores de IC_{50} de 10, 8 y 6 $\mu\text{g/mL}$ para la crisina y de 9, 6 y 8 $\mu\text{g/ml}$ para NOC respectivamente. La determinación de la enzima lactatodeshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes provenientes de los cultivos celulares establecen que ninguno de los compuestos induce a las células a una muerte necrótica. Las características morfológicas propias de células apoptóticas observadas en las líneas celulares SK-LU-1 y CaSki tratadas con la crisina y NOC (contracción celular, pérdida de la adherencia, cuerpos apoptóticos, fragmentación y condensación de la cromatina que fue visible gracias a la tinción nuclear con DAPI) así como, la observación por microscopía de epifluorescencia de la caspasa 8, 9, 3 activa y las proteínas proapoptóticas Bid y Bax en las células tratadas, concluyen que la crisina y el NOC inducen a estas células tumorales a una muerte apoptótica. Sin embargo, en la línea MDA-MB-231 no se observaron ninguna de las características antes mencionadas pero sí vacuolas esféricas en el citoplasma, sugiriendo que en la línea celular MDA-MB-231 el decremento en el número celular observado es debido a una muerte celular diferente a la necrosis y a la apoptosis. Por último, el efecto de la crisina y NOC en la proliferación de células no tumorales (linfocitos humanos) estableció que estos compuestos no afectan el potencial proliferativo de las células linfocíticas, sugiriendo una acción selectiva. En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que la crisina y NOC son candidatos para ser estudiados como agentes terapéuticos prometedores.

MARCO TEÓRICO

La célula es la unidad morfológica y funcional de todos los organismos vivos (Alberts et al., 2015), se le considera además como la unidad más pequeña que puede vivir por sí sola y que forma a todos los organismos pluricelulares (NIC, 2020).

Además de sobrevivir y diferenciarse, las células son capaces de reproducirse realizando una secuencia ordenada de eventos en la que duplica su contenido y luego se divide para dar lugar a células hijas idénticas a la progenitora, este proceso es conocido como el ciclo celular y es el mecanismo esencial por el cual todos los organismos vivos se reproducen, desde los unicelulares como las bacterias hasta los pluricelulares como nosotros (Alberts et al., 2015).

Ciclo celular

El ciclo celular es un conjunto de eventos ordenados que culmina con el crecimiento de la célula y su división, para que ocurra una apropiada división y proliferación para reemplazar a las células que murieron y mantener la homeostasis en el organismo, toda célula eucariota debe seguir un correcto programa genético, el cual hace que ésta pase por diferentes fases y culmine en la citocinesis (Rodríguez et al, 2004).

Los detalles del ciclo celular varían de un organismo a otro y en diferentes momentos de la vida, sin embargo, ciertas características son universales, como mínimo la célula debe formar células hijas con los elementos estructurales y funcionales para su supervivencia, esto solo será posible si ocurre una correcta replicación del genoma, una distribución equitativa de la masa celular y una segregación precisa de cromosomas (Rodríguez et al, 2004).

La ejecución de esos eventos divide al ciclo celular primero en 2 grandes fases, la interfase que agrupa a G1, S y G2; y la fase de Mitosis que en una célula humana típica que prolifera en cultivo dura 1 hora, mientras que la interfase podría ocupar 23 horas de un ciclo de 24 horas (Alberts et al, 2015). Durante la primera fase de crecimiento (G1) la célula aumenta de tamaño, produce todas las proteínas necesarias para la síntesis del ADN y se sintetiza nuevo material citoplasmático, sobre todo proteínas y ARN. En la fase S o de síntesis, se lleva a cabo la duplicación del ADN, cuando termina el núcleo contiene el doble de ADN y un aumento considerable de proteínas nucleares.

En G2 se sigue sintetizando ARN y proteínas, se incrementan las proteínas citoplasmáticas y organelos, por lo que la célula aumenta de tamaño y hay cambios visibles en la estructura celular que nos indican el principio de la mitosis donde ocurre la división nuclear y celular, en este periodo los cromosomas se separan y ocurre la citocinesis (Fig. 1) (Rodríguez et al., 2004; Melendez, 2021).

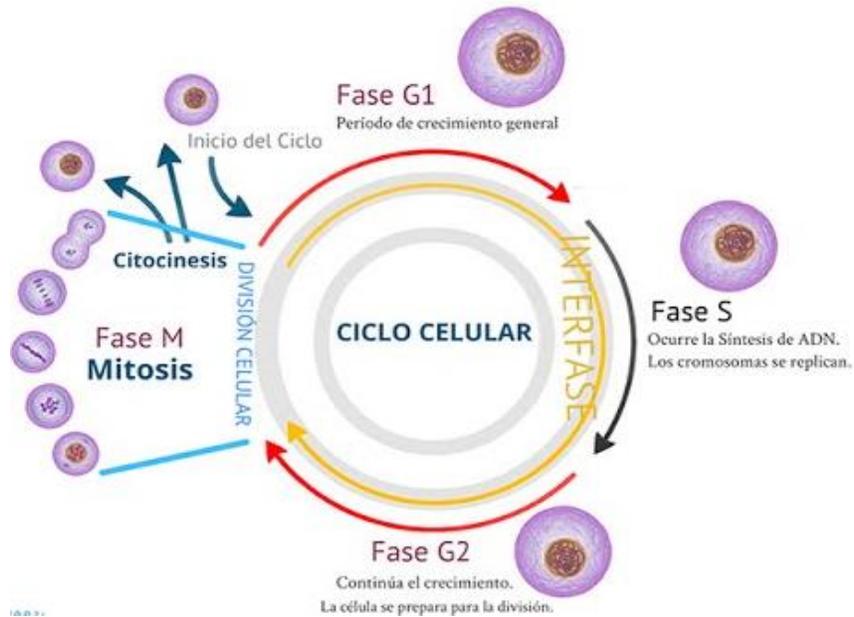


Figura 1. Diagrama esquemático del ciclo celular (Modificado de Meléndez, 2021).

Las dos fases de crecimiento además proporcionan tiempo para que la célula monitoree el entorno interno y externo para garantizar que las condiciones sean adecuadas antes de que se comprometa a los trastornos principales de la fase S y la mitosis. Si las condiciones extracelulares son desfavorables; por ejemplo, las células retrasan el progreso a través de G1 e incluso pueden entrar en un estado de reposo especializado conocido como G0, en el que pueden permanecer durante días, semanas o incluso años antes de reanudar la proliferación (Alberts et al., 2015).

La progresión del ciclo celular es de suma importancia para la célula y el organismo, por lo que es altamente monitoreada y regulada, donde las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclina juegan un papel importante (Rodríguez et al., 2004). Las cinasas dependientes de ciclina son una familia de proteínas cinasas de serina / treonina con niveles constantes durante todo el ciclo celular, al contrario de las ciclinas que son proteínas con niveles muy variados a lo largo de este proceso, las dos al estar unidas constituyen una sola macromolécula con actividad enzimática de cinasa, llevando la regulación a través de fosforilaciones y desfosforilaciones (Vermeulen et al., 2003).

Estás actúan en los diferentes puntos de control que garantizan una secuencia ordenada del ciclo celular, para la transición de G1 a S actúan la ciclina D/Cdk-4, ciclina D/Cdk-6 y ciclina E/Cdk-2, en la fase S inicia la ciclina A/Cdk-2 y la ciclina A/Cdk-1 para la transición a G2, por último, la ciclina B/Cdk-2 influencia la progresión de esta fase a la mitosis (Rodríguez et al, 2004). Aunque como se menciona es un proceso altamente controlado pueden ocurrir errores que comprometan los puntos de control y por lo tanto a todo el ciclo celular, dando como resultado células anormales con inestabilidad genética que pueden ser reconocidas por proteínas como p53, ATM y ATR para detener el ciclo celular y reparar los daños al ADN, sin embargo, si el daño es muy grande la célula puede ser inducida a muerte.

Muerte celular

La muerte celular es un fenómeno que forma parte en el ciclo de vida de todos los organismos y es el cese de las funciones vitales de una célula producida por cambios irreversibles ya sean morfológicos, funcionales y/o bioquímicos; puede desencadenarse por daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes (Lizarbe, 2007).

Históricamente se han descrito tres tipos de muerte celular en base a sus diferencias morfológicas, estas son: muerte celular tipo I o apoptosis, tipo II o autofagia y tipo III o necrosis, de los cuales destacan el tipo I y tipo III por diferir marcadamente en sus características, por lo cual han sido objeto de estudio mayor que el tipo II. Actualmente se han incluido estudios genéticos bioquímicos, farmacológicos, funcionales y moleculares (Galluzi et al., 2018).

Necrosis

La necrosis es un tipo de muerte celular incontrolada o patológica que puede ser causada por la exposición de las células a condiciones suprafisiológicas como la fuerza mecánica, el calor o el frío, sin embargo, nuevos estudios señalan que puede ser un proceso controlado por un conjunto de vías de transducción de señales y mecanismos catabólicos (Zong & Thompson, 2006).

Una de las características fundamentales de la muerte celular necrótica es la pérdida de los potenciales de membrana celular, que va acompañado por un aumento del volumen celular (oncosis), hinchazón de los orgánulos y eventualmente en la ruptura de la membrana citoplasmática, con la salida del citosol al espacio extracelular que estimula al sistema inmunológico del organismo y generando un proceso inflamatorio (Fig. 2) (Kroemer et al., 2009).

También ocurren otros fenómenos celulares como alteraciones mitocondriales, tales como la permeabilización de la membrana externa y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés); cambios lisosomales y fragmentación del ADN en fragmentos irregulares (Golstein & Kroemer, 2007).

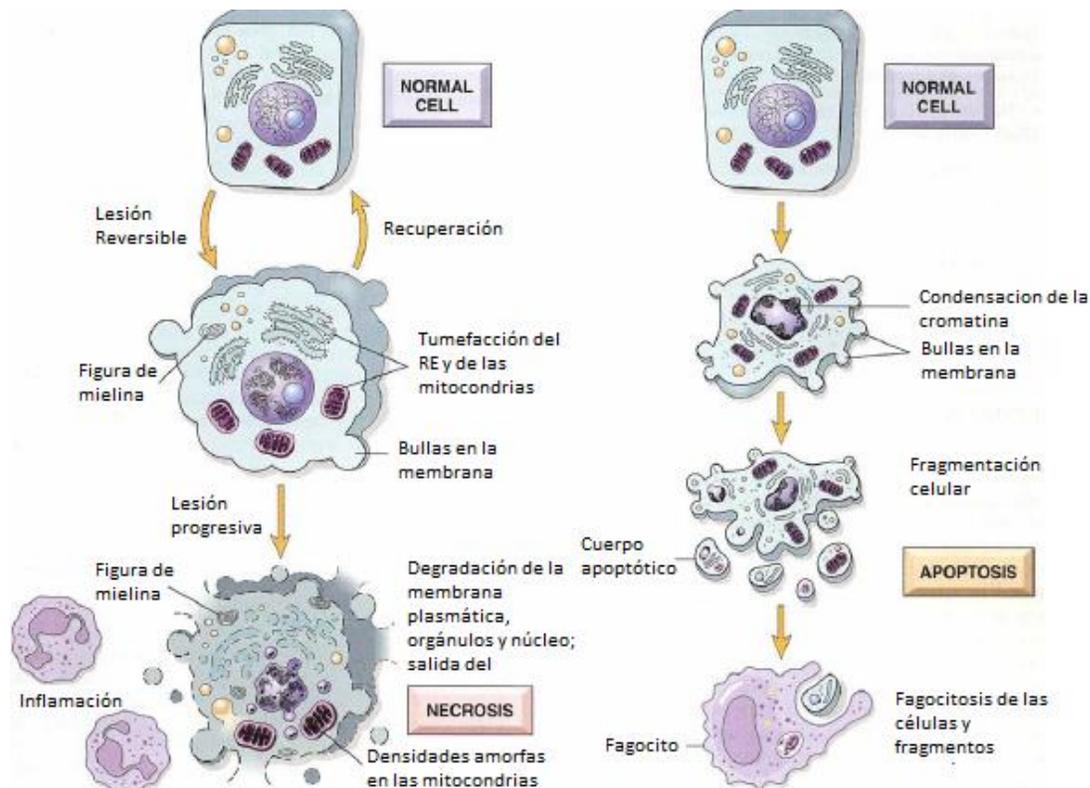


Figura 2. Características morfológicas de la necrosis y la apoptosis (modificado de Agudelo y López 2010).

Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular que ocurre de manera fisiológica durante la morfogénesis, la renovación tisular y en la regulación del sistema inmunitario para el mantenimiento de la homeostasis del organismo (Machado y Concepción, 2012). También se lleva a cabo en aquellas células envejecidas, mutadas, neoplásicas o no neoplásicas, alteradas por tóxicos y las que están en proceso de metamorfosis o atresia (Jordán, 2003).

Las células apoptóticas se caracterizan por la retracción y reducción del tamaño de la célula, condensación y fragmentación de la cromatina por acción de nucleasas endógenas en fragmentos de ADN regulares de 180 pares de bases o sus múltiplos (oligonucleosomas), el colapso del citoesqueleto, la translocación de la fosfatidilserina, formación de cuerpos apoptóticos y alteración de la superficie

celular, para que puedan ser eficientemente englobadas vía fagocitosis y, consecuentemente, reutilizar sus componente por células del sistema inmune o por células adyacentes (Fig. 2) (Alberts et al., 2006). Todos estos cambios estructurales son provocados por la transmisión de señales mediadas por un grupo evolutivamente conservado de proteasas de cisteína denominadas caspasas que se escinden después de un residuo de aspartato en sus sustratos (Elinos-Báez et al., 2003), que son uno de los agentes más importantes que llevan a cabo todo el mecanismo molecular de la apoptosis (Machado y Concepción, 2012).

Se encuentran en la célula como moléculas precursoras inactivas (procaspasas) que al recibir la señal apoptogénica sufren un rompimiento proteolítico y dan lugar a dos subunidades que constituyen la enzima activa o caspasa (Ashkenazi y Salvesen, 2014). Existen las caspasas iniciadoras (1, 2, 8, 9 y 10) con dominios de interacción proteína-proteína que propician la formación de complejos homodiméricos, favoreciendo su rompimiento autoproteolítico en sitios específicos de residuos de ácido aspártico, una vez activadas viajan al citoplasma donde activan a las caspasas efectoras (3, 6 y 7) que no tienen la capacidad de autoproteolizarse y durante su activación forman complejos heterodiméricos que favorecen su rompimiento proteolítico e iniciar los mecanismos apoptóticos hidrolizando a las diversas proteínas del citoesqueleto, nucleares, proteínas que intervienen en la división celular, en el control del ciclo celular, reparación, replicación y transcripción del ADN (Machado y Concepción, 2012).

Vía extrínseca

Existen dos vías principales para la ejecución de la apoptosis, una es la vía extrínseca o de los "receptores de muerte", se da cuando las señales proapoptóticas llegan desde el espacio extracelular o de las células vecinas (Machado y Concepción, 2012).

En esta vía están involucrados los receptores pertenecientes a la superfamilia de TNF que comparten dominios extracelulares de cisteína con un dominio citoplasmático de aproximadamente 80 aminoácidos denominado "dominio de muerte", que juega un papel fundamental en la transmisión de la señal de muerte desde la superficie celular a las vías de señalización intracelular. Los receptores de muerte con sus ligandos mejor caracterizados son Fas/FasL, TNF- α /TNF-R1, DR3/Apo3L, DR4/Apo2L y DR5/Apo2L (Suliman et al., 2001).

Una vez que el ligando se unió con su receptor, se induce la transmisión de la señal a través del dominio transmembranal al dominio citoplasmático del receptor, el cual sufre un cambio conformacional que le permite reclutar a proteínas adaptadoras como FADD (asociado a Fas) o TRADD y RIP (asociados a TNF), con la procaspasa 8 y formar el complejo de señalización inductor de muerte (DISC), que da como resultado la activación de la caspasa 8 y el desencadenamiento de la fase de ejecución de la apoptosis (Fig. 3) (Elmore, 2007).

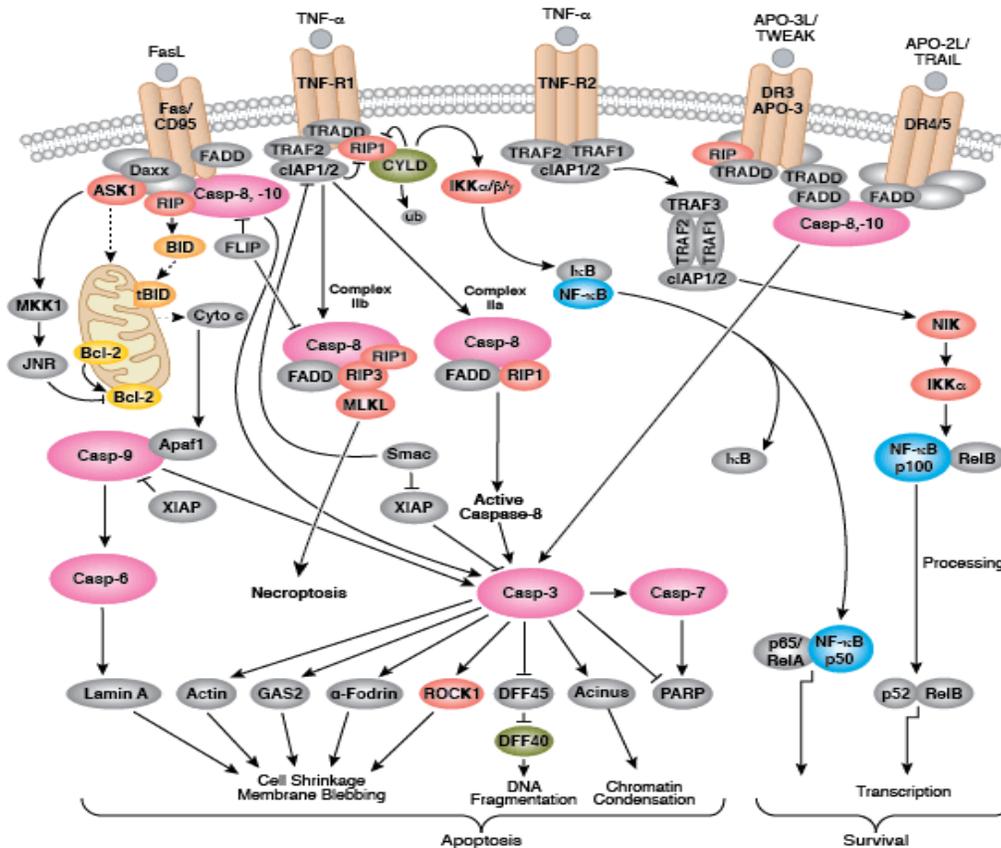


Figura 3. Ruta extrínseca de la apoptosis o de los receptores de muerte. Tomada de Cell Signaling Technology (CST, 2021).

Vía intrínseca

La segunda vía de la apoptosis es la intrínseca o mitocondrial que involucra una gama diversa de estímulos no mediados por receptores como radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales y radicales libres (Saelens et al., 2004); que producen señales intracelulares que actúan sobre todo en la membrana interna de la mitocondria, que resulta en una apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPT), pérdida del potencial transmembrana mitocondrial y consecuentemente en la liberación de su contenido hacia el citosol (Elmore, 2007).

Algunos de los elementos liberados al citoplasma son el citocromo c, Smac / DIABLO, la serina proteasa HtrA2/-Omi, AIF (factor inductor de apoptosis), endonucleasa G y CAD (subunidad beta del factor de fragmentación del ADN). El citocromo c se une y activa a Apaf-1 (factor activador de proteasa apoptótica) que junto con la procaspasa 9 forman un gran complejo llamado apoptosoma, conduciendo a la activación de la caspasa que contiene solo un sitio activo para después reclutar a la procaspasa ejecutora 3, que luego se escinde y se activa (Harwood et al., 2005).

El control y la regulación de estos eventos mitocondriales apoptóticos ocurre a través de los miembros de la familia de Bcl-2, que juegan un papel fundamental en la permeabilidad de la membrana externa de la mitocondria (Cory & Adams, 2002). Se divide en tres grupos:

- a) Proteínas proapoptóticas de tipo "multidominio" como Bax, Bak y Bok que son las responsables de hacer el poro proteolítico en la membrana externa de la mitocondria y permitir la liberación del citocromo c.
- b) Proteínas proapoptóticas de tipo "BH3-only" como Bid, Bim, Bad, Puma, Noxa y Bik que activan a las proteínas ya mencionadas, además de estar involucradas en diferentes vías de estrés celular.
- c) Proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, A1 y Mcl-1 que inhiben a las proteínas proapoptóticas y consecuentemente impedir que se le hagan poros a la membrana mitocondrial (Machado & Concepción, 2012).

Estas dos vías pueden converger en determinadas circunstancias; por ejemplo, una vez activada la caspasa 8, esta puede truncar a Bid (tBid) y activar proteínas proapoptóticas como Bax para promover la liberación del citocromo c, la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa 9 y 3 (Fig. 4) (Harwood et al., 2005).

Su aparición y desarrollo es el resultado de la interacción entre distintos factores, ya sean los químicos como el arsénico, mercurio, cadmio, plomo e hidrocarburos clorados y benceno; los físicos como la radiación ionizantes, la luz UV o los biológicos como las infecciones provocadas por virus, bacterias o parásitos (De la Garza y Juárez, 2014). Todos estos interactúan con uno de los factores más importantes que es el genético, ya sea por herencia o por los factores antes mencionados surgen mutaciones en distintos genes implicados en la supervivencia y proliferación celular (oncogenes) para favorecer a la formación del cáncer (Meza et al., 2006).

Las células cancerígenas se caracterizan en general por tener la señal de proliferación sostenida, evadir a los supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis, inestabilidad genómica, inflamación, evadir la destrucción por el sistema inmune, desregulación del sistema energético celular, activar la invasión y la metástasis (Fig. 5) (Hanahan y Weinberg, 2011).



Figura 5. Características o sellos del cáncer (Modificado de Hanahan & Weinberg 2011).

De acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer en 2020, se estimaron 19.2 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo y se reportaron 9.9 millones de muertes a causa de esta enfermedad. Los cinco tipos de cáncer con más defunciones registradas fueron:

- Pulmón con 1.79 millones de muertes
- Colorrectal con 935, 173 muertes
- Hepático con 830,180 muertes
- Estómago con 768,793 muertes
- Mamario con 684,996 muertes

En México se registraron 195,000 nuevos casos de cáncer y 92,000 defunciones a causa de esta enfermedad (IARC, 2020).

Cáncer de Pulmón

En México, el cáncer de pulmón ocupa el séptimo lugar en incidencia con 7,588 casos y el quinto lugar en mortalidad con 7,100 defunciones (IARC, 2020), originándose por la proliferación descontrolada de las células de los bronquios, bronquiolos o los alveolos (Fig. 6) (IARC, 2020).

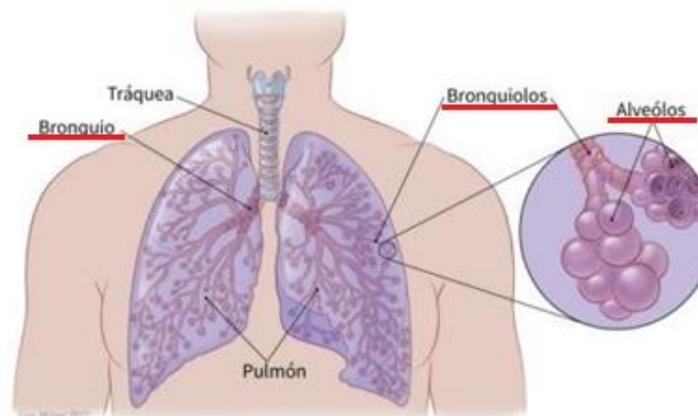


Figura 6. Anatomía del sistema respiratorio. Remarcados los bronquios, bronquiolos y alveolos (modificado de ACS, 2019 <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-pulmon/>).

Existen dos tipos de cáncer de pulmón por su origen y el comportamiento de las células cancerosas. El primero es el carcinoma de células no pequeñas o no microcítico siendo el más común con 85 a 90% de los cánceres de pulmón, este se clasifica a su vez en tres subtipos que son el carcinoma escamoso o epidermoide que suele localizarse en la parte central de los pulmones, el carcinoma de células grandes y por último el adenocarcinoma pulmonar que se localiza en las zonas más periféricas de los pulmones, por lo que frecuentemente afecta a la pleura y pared torácica. El segundo es el carcinoma de células pequeñas o microcítico que representa de 10 al 15 % de los cánceres de pulmón, localizándose preferentemente en la zona central de dichos órganos (AECC, 2020).

El principal factor de riesgo para desarrollar este tipo de cáncer es el tabaquismo, donde las personas que fuman continuamente incrementan la posibilidad de tenerlo de 20 a 50% más en comparación con aquellas que no fuman (Doll et al., 2004), pero estas últimas pueden ser vulnerables al humo secundario que despiden los cigarrillos, cigarros, pipas y puritos, aumentando el riesgo de padecer cáncer de pulmón (IARC, 2004).

Se ha encontrado que un historial familiar o personal positivo de cáncer de pulmón también aumenta el riesgo de desarrollar esta enfermedad. En cuanto al factor genético el único *locus* que se ha replicado consistentemente en todos los tipos de cáncer de pulmón es el 15q25 en el cromosoma 15 donde se encuentran los genes CHRNA3, CHRNA5 y CHRNB4 que codifican receptores de acetilcolina nicotínicos en tejidos neuronales y otros (Amos et al., 2008; Malhotra et al., 2016). También se asocian variantes en el *locus* 15q25 con una mayor vulnerabilidad a la adicción al tabaco y un comportamiento de tabaquismo alterado, incluido el aumento del número de cigarrillos fumados por día debido a que los receptores nicotínicos de acetilcolina median la sensibilidad a la nicotina, ocasionando mayor exposición a los carcinógenos del tabaco (Liu et al., 2010; Saccone et al., 2010).

Otro factor de riesgo es la exposición al radón o sus derivados (Darby et al., 2005), a minerales radiactivos como el uranio, a sustancias químicas o minerales como el asbesto, arsénico, berilio, cadmio, sílice, componentes de cromo, níquel, carbón y productos en la combustión del diésel (Malhotra et al., 2016).

Debido a las actividades como el transporte, la industria, la agricultura, las centrales termoeléctricas, la combustión de carbón, el uso de leña como combustible de calefacción y la cocina es que encontramos partículas contaminantes en el aire, algunas de ellas resultan ser cancerígenas como el tabaco, el asbesto y el polvo de sílice, provocando que el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón aumente paralelamente a los niveles de contaminación ambiental (Loomis et al., 2014).

Cáncer de mama

La mama está conformada por diferentes tejidos, que van de tejido muy adiposo a tejido muy denso. Dentro de este tejido, se encuentra una red de lóbulos, que está formado por estructuras minúsculas tubulares llamadas lobulillos, que contienen a las glándulas de secreción de la leche. Conductos minúsculos conectan las glándulas, los lóbulos y los lobulillos, y transportan la leche desde los lóbulos hasta el pezón (Fig. 7). El cáncer se origina cuando las células saludables de la mama empiezan a cambiar y proliferar sin control, formando así una masa o conglomerado de células que puede crecer y no diseminarse (tumor *in situ*) o propagarse a otras partes del cuerpo por los vasos sanguíneos y linfáticos que se encuentran en la mama (tumor invasivo) (ASCO, 2019).

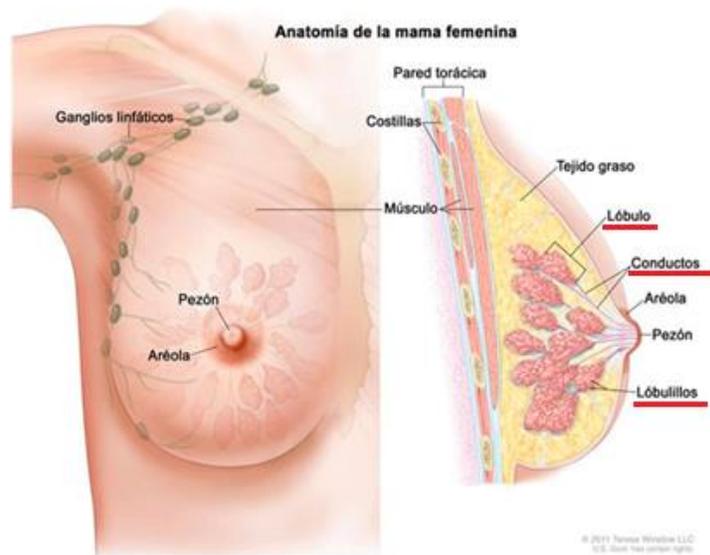


Figura 7. Anatomía de la mama; en rojo remarcados el lóbulo, conductos y lobulillos (modificado de SEOM, 2020 <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cancer-de-mama?showall=1>).

De acuerdo a datos de la OMS en México la incidencia y la mortalidad del cáncer de mama ocupan el primer lugar con 29,929 casos y 7,931 defunciones (IARC, 2020).

Los tipos más comunes de cáncer de mama son el carcinoma ductal que se origina en las células que recubren internamente los conductos de la leche (de mayor incidencia) y el carcinoma lobular que se origina en los lóbulos. Otros tipos de cáncer menos comunes son el medular, mucinoso, tubular, metaplásico, papilar y la enfermedad de Paget (ASCO, 2019).

Los factores de riesgo que se han identificado para este tipo de cáncer son la edad (en la mayoría de los casos la enfermedad se desarrolla en mujeres de más de 50 años), antecedentes personales y familiares de cáncer de mama, mutaciones en los genes *BRCA1* o *BRCA2* que se vinculan con un aumento del riesgo de desarrollar cáncer de mama y ovario, así como otros tipos de cáncer, menstruación temprana y menopausia tardía (debido a que las células mamarias están expuestas al estrógeno y a la progesterona durante un tiempo más prolongado), historial reproductivo (no haber tenido hijos o haberlos tenido después de los 35 años de edad), terapia de reemplazo hormonal, uso prolongado de anticonceptivos, sobrepeso u obesidad y el consumo de alcohol (SEOM, 2021).

Cáncer cervicouterino

El cuello uterino, que es la parte más inferior del útero, es una estructura de forma cilíndrica compuesta por estroma y epitelio. La parte intravaginal, el ectocérvix, se proyecta hacia la vagina y está revestida por epitelio escamoso. El canal endocérvix se extiende desde el orificio interno en la unión con el útero hasta el orificio externo que se abre hacia la vagina y está revestido por epitelio columnar. Casi todos los casos de carcinoma cervical se originan en la zona de transformación que es la zona donde convergen estos 2 tipos celulares (Fig. 8) (Bhatla et al., 2018).

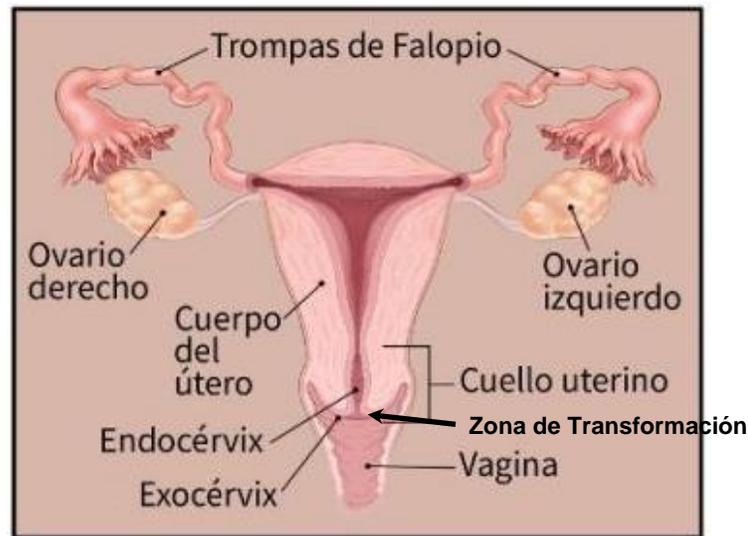


Figura 8. Anatomía del sistema reproductor femenino (modificado de ACS, 2020 <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/>).

De acuerdo a datos de la OMS, en México la incidencia y la mortalidad del cáncer cervicouterino ocupan el segundo lugar con 9,439 nuevos casos y 4,335 defunciones en mujeres (IARC, 2020).

Se identifican dos tipos principales de cáncer de cuello uterino, el primero y el de mayor incidencia con cerca del 80% de los casos es el carcinoma de células escamosas que puede ser queratinizante, no queratinizante, papilar, basaloide, verrugoso o escamotransicional; y el restante 20% son adenocarcinomas pudiendo ser endocervical, mucinoso, villoglandular o endometriode (AECC, 2018).

La mayoría de los casos de cáncer de cuello uterino se producen como resultado de una infección por el virus del papiloma humano (VPH) que es un virus de ADN de doble cadena con más de 200 tipos diferentes, de los cuales 15 tipos son de alto riesgo.

De los 604 000 nuevos casos estimados anualmente, el VPH 16 y el VPH 18 representan el 71%; mientras que los tipos 31, 33, 45, 52 y 58 representan el 19% (Bhatla et al., 2018).

La infección suele transmitirse por contacto sexual, provocando lesiones intraepiteliales escamosas, la mayoría desaparecen después de 6 a 12 meses, sin embargo, un pequeño porcentaje de estas lesiones permanecen y pueden causar cáncer (Momenimovahed y Salehiniya, 2017). Los principales mecanismos a través de los cuales el VPH contribuye a la carcinogénesis involucran la actividad de las oncoproteínas virales E6 y E7 que interfieren con los principales genes supresores de tumores, además de estar asociados con cambios en la metilación del ADN del huésped y del virus, en conjunto ocasionan cambios en vías celulares clave que regulan la integridad genética, la adhesión celular, la respuesta inmune, el control del ciclo celular y la apoptosis (Galani & Christodoulou, 2009).

Otras infecciones de transmisión sexual como la *Chlamydia trachomatis*, el VIH, el virus del herpes simple y la gonorrea son consideradas como otro factor de riesgo para desarrollar cáncer de cuello uterino ya que aumentan la susceptibilidad del huésped al VPH o potenciar los efectos mediados por el VPH (Smith et al, 2002). Además del número de parejas sexuales, la multiparidad, uso prolongado de anticonceptivos orales, el fumar y la obesidad (Momenimovahed & Salehiniya, 2017).

Actualmente la selección del tratamiento para combatir el cáncer depende del tipo que se presente, así como su grado de avance. Los tres principales tratamientos son:

- a) Cirugía, que se aplica a pacientes cuyo cáncer está restringido en una zona (no se usa para el tratamiento de leucemias), y generalmente se extirpa junto con tejido circundante que pudiera contener células cancerosas.
- b) Radioterapia donde se usan partículas u ondas de alta energía como los rayos X, rayos gamma, haces de electrones o protones que dañan el ADN de las células cancerosas destruyéndolas e impidiendo su crecimiento.
- c) Quimioterapia, que es un tratamiento sistémico inyectado u oral donde se usan fármacos de acción fuerte para destruir células con una tasa alta de proliferación (NIC, 2020b).

Cabe recalcar que estos tipos de tratamiento tienen efectos secundarios que disminuyen la calidad de vida de los pacientes, debido a su carácter invasivo, citotóxico y poco selectivo (en el caso de la quimioterapia y la radioterapia), además de su poca eficacia en estadios avanzados a metastásicos.

Es por lo cual surge la necesidad imperiosa de encontrar o desarrollar nuevos agentes anticancerígenos para el tratamiento del cáncer.

Flavonoides

Los flavonoides representan un grupo de compuestos al que en los últimos años se le ha puesto gran interés dentro de las diferentes áreas de la investigación. Son compuestos naturales polifenólicos de bajo peso molecular caracterizados por una estructura benzo- γ -pirona, los cuales están altamente distribuidos en el reino vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas vasculares en forma de glucósidos. Debido a sus propiedades biológicas han sido objeto de estudio por varios años para el tratamiento de diversas enfermedades, incluidas el cáncer (Cartaya, 2013).

Su estructura química básica está formada por un esqueleto carbonado C6-C3-C6, compuesto por dos anillos de fenilo (A y B) unidos por tres átomos de carbono que pueden formar o no un tercer anillo (C) de pirano o pirona. Se subdivide en distintos grupos que son las flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanonoles, los flavanoles y las antocianidinas, que se diferencian en la concentración de saturación y en los sustituyentes del anillo C (Fig. 9) (Álvarez y Orallo, 2003).

En las plantas el papel que juegan los flavonoides son el de defensa frente a agentes agresores externos, de señal química o marcadores florales que sirven para guiar a las abejas y otros insectos polinizadores hacia el néctar, facilitando indirectamente la polinización y su efecto directo o indirecto sobre las enzimas de las plantas afectando su fisiología y metabolismo. Su alta reactividad química en sistemas animales se expresa en su afinidad de enlace a iones de metales pesados y polímeros biológicos, así como su habilidad para catalizar el transporte de electrones y secuestrar radicales libres (Cartaya, 2013).

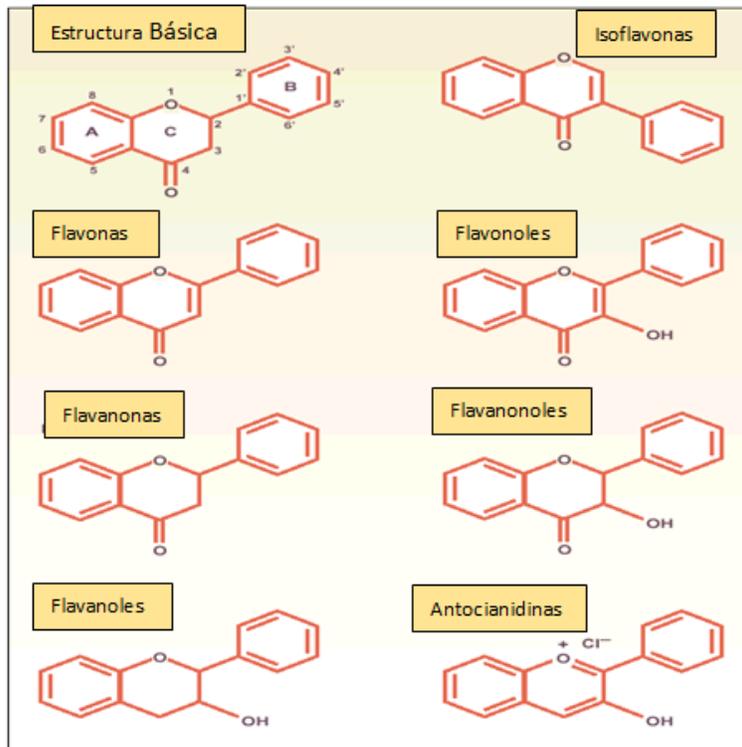


Figura 9. Estructura química básica de los flavonoides y de los distintos subgrupos (modificado de Álvarez y Orallo, 2003).

También son inhibidores de una gran cantidad de enzimas (hidrolasas, liasas, transferasas, etc.) y, consecuentemente, interferir en mecanismos de señalización y otros procesos celulares; esto puede deberse, al menos en parte a la presencia de grupos hidroxilos aromáticos, que son relativamente reactivos y permiten el establecimiento de puentes de hidrógeno o uniones covalentes y la posibilidad de formar complejos con iones metálicos como el cobre y el hierro. (Álvarez & Orallo, 2003.)

Aunque todos los grupos hidroxilo en el esqueleto flavonóico pueden glicosilarse, algunas posiciones tienen mayor probabilidad que otras en hidrolizarse como el grupo 7-hidroxil en las flavonas e isoflavonas (Cartaya, 2013).

Debido a sus características antes mencionadas, los flavonoides han sido de interés para evaluar su efecto en distintas enfermedades como el cáncer, han demostrado interferir en 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 y Orallo, 2003).

Crisina

Dentro del subgrupo de las flavonas encontramos a la crisina (5,7 dihidroxiflavona) la cual es una flavona que se encuentra principalmente en la miel, el propolio y la flor de la pasión azul (*Passiflora caerulea*). También podemos encontrarla en menor cantidad en diferentes especies de flores como *Pelargonium crispum*, *Passiflora incarnata*, *Oroxylum indicum*, *Scutellaria immaculata*, *Desmos cochinchinensis* y en una gran variedad de hongos de la isla de Lesbos en Grecia (Nagasaka et al., 2018).

La flavona crisina tiene una estructura química que consta de dos anillos fusionados (A y C) y un anillo de fenilo (B), unido a la segunda posición del anillo C, comparte la estructura común de las flavonas con un grupo hidroxilo adicional en las posiciones 5 y 7 del anillo A (Fig. 10) (Mani y Natesan, 2018).

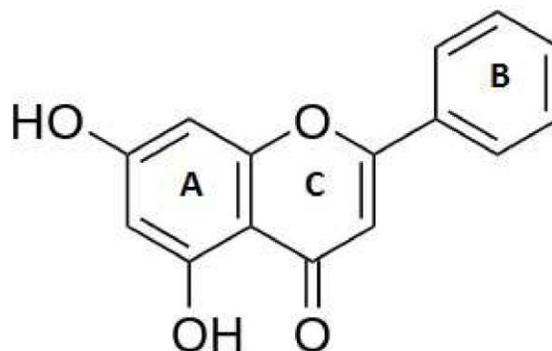


Figura 10. Estructura química de la Crisina. Tomada de Chylińska-Wrzos et al., 2017.

En diversos estudios, la crisina ha demostrado ser un potente inhibidor de la aromataasa y la activación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en modelos de infección latente, además de mostrar propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas, neuroprotectoras, antienterovirales, antibacterianas, antiasmáticas, antidiabéticas, antidepresivas y antiartríticas (Mani y Natesan, 2018).

En cuanto a su actividad antitumoral se ha reportado que la crisina puede inducir la apoptosis en diferentes células tumorales, tanto de humano como de ratón, siendo el mecanismo molecular clave responsable de las actividades anticancerígenas de la mayoría de los posibles agentes anticancerígenos actualmente estudiados (Khoo et al., 2010). La inducción de apoptosis por la crisina se ha estudiado en líneas celulares de cáncer cervical, leucemia, carcinoma escamoso esofágico, glioma maligno, cáncer de próstata, cáncer de pulmón y cáncer de colon (Bahadori, 2016; Monasterio et al., 2004; Parajuli et al., 2009; Woo et al., 2004; Zhang et al., 2004; Zhang et al., 2009).

También ha demostrado inhibir la proliferación celular, bloquear el ciclo celular, activar la ruta de señalización de Notch 1, e inhibir a la histona desacetilasa que puede frenar significativamente el crecimiento tumoral (Chylińska-Wrzos et al., 2017).

Contrariamente, existen trabajos que establecen que la crisina tiene poco efecto de proliferación en diversas líneas celulares de cáncer de mama, sugiriendo que el papel de la crisina en el cáncer de mama no está claro (Hong et al., 2010; Maasomi et al., 2017; Parajuli et al., 2009; Samarghandian et al., 2016).

Sin embargo, a pesar de su potencial terapéutico y su baja citotoxicidad (dosis de 400 mg no muestran efectos tóxicos observables en humanos) la biodisponibilidad de la crisina es extremadamente baja, principalmente debido a la mala absorción, el rápido metabolismo y la rápida eliminación sistémica por excreción fecal donde se pierden los metabolitos de la crisina. Por esta y otras razones se ha tratado de diseñar nuevos compuestos químicos que mejoren y potencien las propiedades biológicas de la crisina (Walle et al., 2001).

NOC

Un derivado prometedor es NOC (5,7-dihidroxi-8-nitrocrisina), una flavona sintética con una estructura química que consta de dos anillos fusionados (A y C), un anillo de fenilo (B) unido a la segunda posición del anillo C y un grupo nitro unido en la posición 8 del anillo A con dos grupos hidroxilo adicionales en las posiciones 5 y 7 del anillo A (Fig.11)

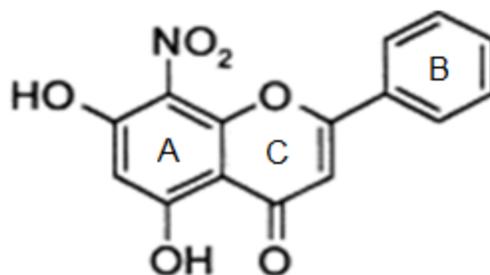


Figura 11. Estructura química de NOC (modificado de Zheng et al., 2003).

Algunos estudios han mostrado que la NOC presenta efectos antiproliferativos en líneas celulares de cáncer de colon (HT-29) y cáncer gástrico (SGC-7901) en mayor medida que la crisina (Zheng et al., 2003).

En estudios posteriores se demostró su efecto antiproliferativo en la línea de cáncer de mama MDA-MB-453, debido a que la NOC induce a estas células tumorales a una muerte por apoptosis mediante la generación de especies reactivas de oxígeno, la desfosforilación de Akt y la activación de caspasas (Zhao et al., 2010; Zhao et al., 2013).

De acuerdo con esto, el mecanismo por el cual la crisina y la NOC parecen actuar en las células tumorales es a través de la inducción de muerte por apoptosis, sin embargo, el proceso subyacente que se lleva a cabo para hacer esto posible sigue siendo poco claro, y específicamente para la crisina, solo se describe que en el inicio del proceso pueden estar implicadas ciertas proteínas como Bax, Bcl-2, caspasa 3, 8, 9, p53 y citocromo c (Woo et al., 2004; Bahadori, 2016; Zhang et al., 2009). Y en el caso de su derivado sintético NOC, Ai y colaboradores en 2007 describen la participación de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2, que es corroborado por Zhao y colaboradores en 2013 donde además reporta la activación de la caspasa 9.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad los tratamientos contra el cáncer como la cirugía, radioterapia y quimioterapia resultan ser poco eficientes en estadios avanzados de la enfermedad, además de su carácter invasivo, citotóxico y poco selectivos. Por lo cual ha surgido la necesidad de buscar y diseñar nuevas alternativas terapéuticas que puedan ser más eficientes, mayormente selectivas y que induzcan a las células tumorales a una muerte por apoptosis.

Dentro de los flavonoides encontramos a la crisina y NOC que pertenecen al subgrupo de las flavonas y han demostrado poseer propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiproliferativas y antitumorales, llevando a las células tumorales de distintos tipos de cáncer a una muerte por apoptosis. Pero todavía se desconoce el mecanismo por el cual lleva a cabo este proceso, por lo que es importante conocer la ruta o rutas de la apoptosis mediante la cual actúan para llevar a cabo esta muerte celular en células tumorales.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo ocasionando 9.9 millones de defunciones de acuerdo a datos de la OMS en el 2020. En mujeres el cáncer de mama ocupa el primer lugar de incidencia y mortalidad en México y en el mundo, en hombres a nivel mundial el cáncer de mayor incidencia y mortalidad fue el de pulmón, al igual que en México y el cáncer de cérvix es la segunda causa de muerte por enfermedades ginecológicas en todo el mundo. Es por ello que surge la necesidad de continuar con la búsqueda de alternativas terapéuticas más eficientes que pudieran apoyar la lucha contra esta enfermedad.

HIPÓTESIS

Se sabe que algunas flavonas presentan actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en ciertos tipos de cáncer, por lo que se espera que las flavonas crisina y NOC induzcan a las células de las líneas tumorales CaSki, MDA-MB-231 y SK-LU-1 a una muerte celular apoptótica.

OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto antiproliferativo e inductor de apoptosis de las flavonas crisina y NOC en las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231 y SK-LU-1,

Particulares

- Cultivar células de las líneas tumorales CaSki, MDA-MB-231 y SK-LU-1, así como de linfocitos humanos provenientes de sangre periférica.
- Determinar la actividad antiproliferativa de la crisina y su derivado sintético NOC en cultivos de células SK-LU-1, MDA-MB-231 y CaSki, mediante la determinación de la IC_{50} , por medio de la técnica de incorporación de cristal violeta.
- Evaluar la actividad necrótica de la crisina y NOC en cultivos de células tumorales, por medio de la cuantificación de la actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes celulares.
- Evaluar si la crisina y NOC presentan un efecto apoptótico en líneas tumorales CaSki, MDA-MB-231 y SK-LU-1 mediante el análisis morfológico celular por microscopía de contraste de fases, tinción nuclear con el fluorocromo DAPI y la detección de la caspasa 3 activa por microscopía de epifluorescencia y citometría de flujo.
- Determinar la presencia de la caspasa 8 y 9 activa, así como de las proteínas Bid y Bax mediante su inmunodetección en cultivos celulares de las líneas tumorales y su posterior observación en el microscopio de epifluorescencia.
- Determinar la actividad antiproliferativa y citotóxica de la crisina y NOC en cultivos de linfocitos humanos mediante el marcaje con carboxifluoresceína, así como la cuantificación de la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes celulares.

METODOLOGÍA

1. Preparación de la solución stock de los compuestos crisina y NOC

Se pesó un 1 mg de cada compuesto y se disolvió en 100 µl de DMSO en tubos cónicos tipo eppendorf (Corning, USA) y se almacenaron a temperatura ambiente.

2. Cultivo celular

Las células de las tres líneas tumorales fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) y fueron sembradas en cajas Petri de cristal de 5 mm (Pirex, USA) con 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, USA) suplementado con suero de ternera neonata al 5% (SNT; Gibco, USA) y se mantuvieron en incubación (NuAire, USA) a una temperatura de 37 °C con 5% de CO₂ y una atmósfera a punto de rocío.

3. Determinación de la IC₅₀ a través de la técnica de incorporación de cristal violeta

Partiendo de los cultivos previos, se sembraron las células de las tres líneas celulares (CaSki, MDA-MB-231 y SK-LU-1) en placas estériles de 96 pozos (Corning, USA), a una densidad de 7,000 células por pozo con 100 µl de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) con 5% de ternera neonata (SNT; Gibco, USA) y se dejaron en incubación por 24 horas a una temperatura de 37 °C con 5% de CO₂ y una atmósfera a punto de rocío. Posteriormente se retiraron de los pozos el medio de cultivo RPMI-1640 y se trataron a las células con diferentes concentraciones de los dos compuestos, considerando un control al cual solo se le cambio el medio de cultivo y un vehículo con dimetilsulfóxido (DMSO) con una concentración de 1 µl/ml por 24 horas. Transcurrido este tiempo se evaluó la inhibición del crecimiento celular inducida por los dos compuestos a analizar usando la técnica de incorporación del colorante cristal violeta, para el cual se retiró el medio de cultivo RPMI-1640 de la placa y se fijaron a las células con 50 µl/pozo de glutaraldehído al 1.1% (Sigma-Aldrich, USA) por 20 minutos en agitación constante. Después de este tiempo se retiró el glutaraldehído al 1.1% y se lavaron a las células con agua destilada hasta retirarlo. Una vez secado se añadieron 50 µl/pozo de solución cristal violeta al 0.1% (Sigma-Chemical Co) en ácido fórmico (Sigma-Aldrich, USA) en constante agitación por 20 minutos para teñir a las células. Transcurrido este tiempo se retiró el colorante y se lavó a las células con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Una vez seco se agregaron 50 µl/pozo de ácido acético al 10% (J. T. Baker, MEX) por 20 minutos en constante agitación para solubilizar el colorante incorporado en el núcleo de las células. Por último, se realizó una lectura en el lector de placas de ELISA (ChroMate, USA) a una

longitud de onda de 570 nm. Con los datos que se obtuvieron se realizaron gráficas concentración-efecto por regresión lineal para obtener la concentración inhibitoria del 50% o IC₅₀. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

4. Determinación de la muerte celular por necrosis a través de la cuantificación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

Realizar cultivos de las tres líneas celulares en placas estériles de 96 pozos (Corning, USA), a una densidad de 7,000 células por pozo con 100 µl de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) con 5% de suero de ternera neonata (SNT; Gibco, USA) y se dejaron en incubación por 24 horas a una temperatura de 37 °C con 5% de CO₂ y una atmósfera a punto de rocío. Posteriormente se retiró de los pozos el medio de cultivo RPMI-1640 y se realizaron los siguientes tratamientos: un control basal al cual solo se le agrego medio de cultivo fresco y que fungió como blanco al momento de la lectura; un control positivo al cual se le añadió 100 µl de Tritón X-100 al 0.1% (Sigma-Aldrich, USA) en RPMI-1640 por una hora con el fin de lisar a las células; un vehículo con dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 1 µl/ml y la IC₅₀ correspondiente a cada compuesto. Las células estuvieron con estos tratamientos por 24 horas y una vez transcurrido este tiempo se recuperaron los sobrenadantes de los cultivos celulares de manera individual en tubos cónicos de plástico y se centrifugaron (Dinac, USA) a 2,000 rpm durante 5 minutos. Después se traspasaron 40 µl de cada uno de los sobrenadantes a otra placa de 96 pozos para su evaluación. La actividad de la enzima LDH liberada se determinó con el kit Cyto TOx 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, USA), del cual se agregaron 50 µl/pozo de la mezcla de reacción por 20 minutos a temperatura ambiente protegiéndolo de la luz. Se evaluó en un lector de placas ELISA (ChroMate, USA) a una longitud de onda de 490 nm, los resultados obtenidos se compararon con el control y el control positivo que fue el Tritón X-100. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5. Evaluación de la morfología celular apoptótica por tinción con DAPI e inmunodetección de la caspasa 3, 8 y 9 activa, y las proteínas Bid y Bax

Se cultivaron en placas estériles de 96 pozos con fondo negro (Corning, USA) 7,000 células por pozo de cada línea tumoral con 100 µl de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) y 5% de suero fetal bovino (SNT; Gibco, USA). Las células se incubaron por 24 horas a una temperatura de 37 °C con 5% de CO₂ y una atmosfera húmeda. Transcurrido este tiempo, el medio se retiró y las células se trataron con la concentración IC₅₀ obtenida de cada compuesto, se consideró un control al cual solo se le realizó un cambio de medio, un vehículo (1 µl/mL de

DMSO) y un control positivo de apoptosis usando camptotecina (Sigma-Aldrich, USA) a una concentración de 10 µl/mL. Después de 24 horas se les retiró el estímulo y se fijaron con 50 µl de paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, USA) por 1 hora y 20 minutos en agitación constante, después se lavaron tres veces con 100 µl de PBS filtrado. Posteriormente se permearon a las células con 30 µl de Tritón X-100 al 0.05% (Sigma-Aldrich, USA) por 30 minutos en agitación en frío, transcurrido este tiempo las células se lavaron tres veces con 100 µl de PBS filtrado. Consecutivamente se colocaron 30 µl de anticuerpo primario anticaspasa 3, 8 y 9 activa, Bid y Bax hecho en conejo 1:1000 (Sigma-Aldrich, USA) en PBS respectivamente y se dejaron por toda la noche a 4°C. Al día siguiente se les retiró el anticuerpo primario y se lavaron a las células tres veces con PBS filtrado, inmediatamente después se agregaron 30 µl de anticuerpo secundario acoplado a FITC contra conejo hecho en ratón 1:1000 (Sigma-Aldrich, USA) en PBS durante 2 horas en constante agitación a temperatura ambiente y protegidas contra la luz; transcurrido este tiempo se lavaron con PBS tres veces y en el último lavado se agregó 1 µl del fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich, USA) por cada pozo con 50 µl de PBS por 1 minuto y se continuó a lavar tres veces. Se observaron las células en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse TS2R-FL, Japón).

6. Cuantificación de las células positivas a caspasa 3 activa por citometría de flujo.

Las células de las tres líneas celulares se cultivaron en cajas estériles de 6 pozos (Corning, USA) con una densidad de 300,000 células por pozo con 2.5 ml de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) con 5% de suero de ternera neonata (SNT; Gibco, USA). Las células se dejaron en incubación por 24 horas, transcurrido este tiempo se trataron con las IC₅₀ correspondientes a cada línea de los dos compuestos, además de un control testigo al cual solo se le cambio el medio de cultivo por uno fresco, un vehículo (1 µl/mL de DMSO) y un control positivo con camptotecina (Sigma-Aldrich, USA) en medio RPMI-1640 (para CaSki y SK-LU-1 se usó una concentración de 10 µl/ml y para la línea MDA-MB-231 20 µl/ml). Después de 24 horas de tratamiento se recuperaron las células adheridas con el sobrenadante en tubos para citometría y se centrifugaron (Dinac, USA) a 3,000 rpm por 5 minutos, se recuperó el botón y se agregaron 500 µl de etanol al 70% por 30 minutos a 4 °C, transcurrido este tiempo se lavaron tres veces a las células con 1mL de PBS.

Inmediatamente después se agregaron 50 µl de anticuerpo primario anticaspasa 3 activa hecho en conejo 1:1000 (Sigma-Aldrich, USA) en PBS y se dejó toda la noche a 4 °C. Después, las células se lavaron tres veces con PBS y se agregaron 50 µl de anticuerpo secundario acoplado a FITC contra conejo hecho en ratón 1:1000 (Sigma-Aldrich, USA) en PBS por 2 horas protegidas de la luz a 37 °C.

Transcurrido este tiempo, las células se lavaron en dos ocasiones con PBS y se evaluaron al citómetro (BD FACSAria II, USA) con 500 µl de PBS. Los datos se analizaron posteriormente con el programa Flowing Software 2.5.1. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

7. Evaluación de la proliferación de los linfocitos humanos mediante la técnica de incorporación de carboxifluoresceína (CFSE)

Para el cultivo de linfocitos humanos se obtuvieron 20 ml de sangre periférica de un donador aparentemente sano en tubos Vacutainer con heparina (BD Franklin Lakes NJ, USA).

En un tubo de vidrio cónico se colocó 5 ml de Ficoll-Hystopaque (Sigma Aldrich, USA) e inmediatamente se agregó por las paredes 5 ml de sangre, la muestra se centrifugó a 300 rpm por 5 minutos, sucesivamente se aumentó la velocidad 300 rpm cada vez por 5 minutos hasta llegar a las 1,500 rpm, donde se dejó a la muestra por 30 minutos más para permitir la separación por gradiente de densidad. Una vez separados los diferentes componentes celulares, se recolectó con mucho cuidado el anillo de linfocitos para colocarlo en un tubo cónico de vidrio limpio y se agregó 10 ml de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) sin suero de ternera neonata para lavarlos y posteriormente centrifugarlos a 1500 rpm por 5 minutos desechando el sobrenadante. Se repitió este procedimiento 3 veces para después marcarlo con 50 µl de una disolución de RPMI-1640 sin suero (5 ml) con 12 µM de carboxifluoresceína (CFSE) (Sigma Aldrich, USA) durante 15 minutos protegidos contra la luz. Una vez transcurrido este tiempo se lavaron a los linfocitos 2 veces con 5ml de medio RPMI-1640 con 5% de suero de ternera neonata (SNT; Gibco, USA) y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos. Después del segundo lavado y una vez desechado el sobrenadante se resuspendió con 5 ml de medio RPMI-1640 con 20 % de suero de ternera neonata.

Para activar a los linfocitos se usó una solución de 20 µl de fitohemaglutinina (PHA) en 1 ml de medio de cultivo RPMI-1640. Una vez activados se cultivaron en una placa de 96 pozos estéril con una densidad de 200,000 linfocitos/pozo con 200 µl de medio RPMI-1640 con 20% de suero de ternera neonata con los siguientes controles: -, - (sin CFSE y sin PHA), -, + (sin CFSE y con PHA), +, - (con CFSE y sin PHA) y +, + (con CFSE y con PHA) Los cultivos se dejaron en incubación 48 horas a una temperatura de 37 °C con 5 % de CO₂ a una atmósfera a punto de rocío. Después se estimuló al cultivo con las siguientes condiciones: control sin activar, control sin marca y activado, control sin activar y sin marca, vehículo con DMSO y las IC₅₀ obtenidas para cada línea celular y con cada compuesto usando a los linfocitos marcados con CFSE y activados con PHA por 24 horas. Transcurrido este tiempo, se colectaron los linfocitos en tubos de citometría y se

centrifugaron (Dinak, USA) a 1500 rpm por 5 minutos, una vez desechado el sobrenadante se agregó a cada tubo 500 µl de verseno. Se realizaron dos lavados y el botón se resuspendió en 500 µl de PBS filtrado para ser analizado en el citómetro de flujo (BD FACSAria II, USA) y posteriormente procesar los resultados en el programa Flowing Software 2.5.1.

8. Evaluación de la actividad necrótica en los linfocitos humanos por medio de la cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

En una placa de 96 pozos estéril (Corning, USA) se sembraron linfocitos humanos con una densidad de 200,000/pozo con 200 µl de medio RPMI-1640 (Gibco, USA) con 20% de suero de ternera neonata (SNT; Gibco, USA) y se dejaron en incubación 48 horas a una temperatura de 37 °C con 5% de CO₂ a una atmosfera a punto de rocío.

Después de este tiempo se retiró de cada pozo 100 µl de medio RPMI-1640, el cual fue substituido con las siguientes condiciones: para blanco, control positivo y control sin tratamiento solo se reemplazó con 100 µl de medio de cultivo fresco, vehículo (DMSO) y 100 µl de las IC₅₀ obtenidas para cada línea celular y con cada compuesto por 24 horas en incubación. A las 23 horas se le agregó sólo al control positivo 18 µl de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, USA) al 9%. Después de las 72 horas de cultivo totales se recolectaron 60 µl de los medios a una placa de fondo cónico para ser centrifugada (Dinak, USA) a 1500 rpm por 5 minutos a 4 °C, de aquí se tomaron 40 µl y se pasaron a una placa de 96 pozos con fondo plano para su evaluación. Para medir la actividad de la enzima LDH liberada se utilizó el kit Cyto TOx 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, USA), del cual se agregaron 50 µl/pozo de la mezcla de reacción por 20 minutos a temperatura ambiente protegiéndolo de la luz. Para finalizar las placas se evaluaron en un lector de ELISA (ChroMate, USA) a una longitud de onda de 490 nm y se obtuvieron los resultados comparando al control y al control positivo tratado con tritón X-100.

9. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos son una representación de la media de al menos tres experimentos independientes aplicando un análisis de varianza (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey con una significancia de $p < 0.05$ comparada con el control y el vehículo.

RESULTADOS

Actividad Antiproliferativa de la crisina y NOC en células tumorales

Se sembraron células SK-LU-1, MDA-MB-231 y CaSki en placas de 96 pozos, las cuales fueron estimuladas a diferentes concentraciones con los compuestos (Fig. 12 a 15), y la concentración que disminuye la población celular en un 50% (IC_{50}) fue calculada para cada línea celular con cada compuesto (Cuadro 1).

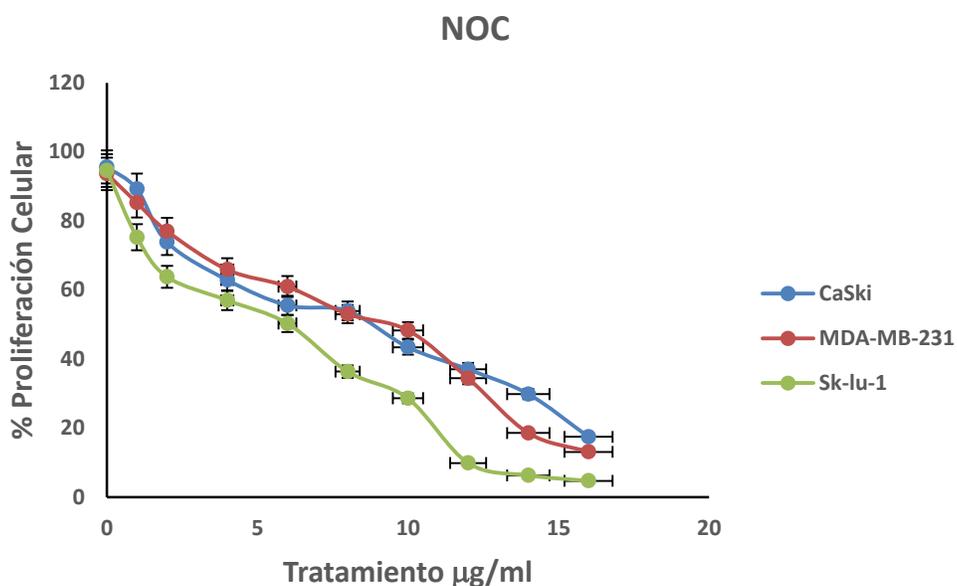


Figura 12. Efecto antiproliferativo de NOC en líneas de cáncer cervical (CaSki), mama (MDA-MB-231) y pulmón (SK-LU-1). Las células fueron tratadas con NOC por 24 horas y se evaluaron mediante la técnica de incorporación de cristal violeta. Los datos se obtuvieron de 3 ensayos independientes con 6 repeticiones por condición y se les realizó una prueba de ANDEVA con $p < 0.05$ vs control.

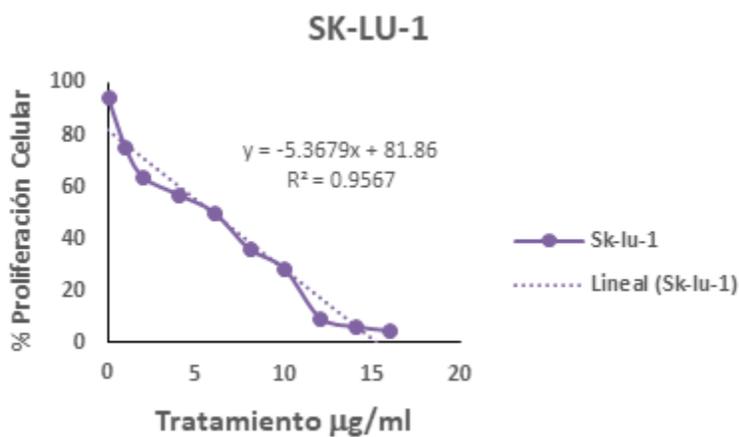
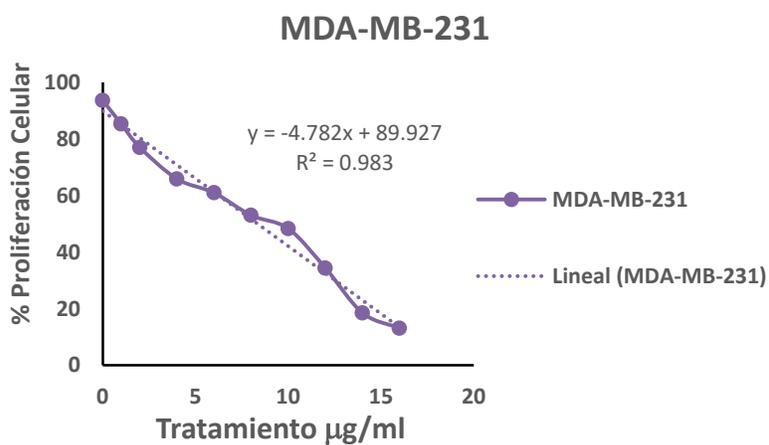
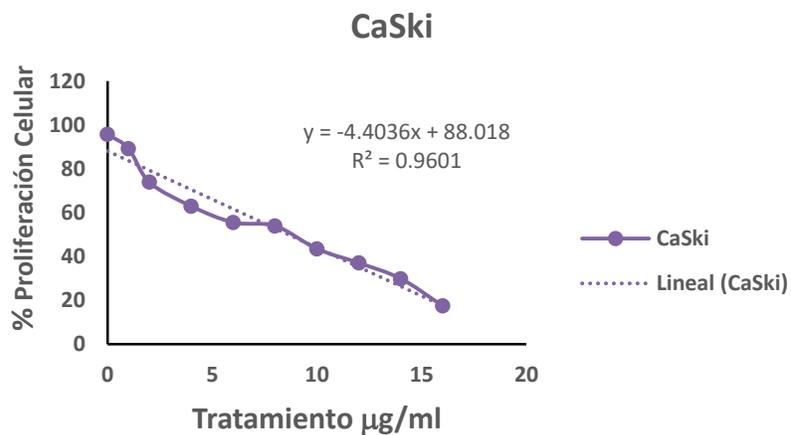


Figura 13. Actividad antiproliferativa de NOC en las líneas tumorales CaSki, MDA-MB-231 y SK-LU-1. Se obtuvo la IC₅₀ mediante la linealización de los datos y la ecuación de la recta. Los datos se obtuvieron de 3 ensayos independientes con 6 repeticiones por condición y se les realizó una prueba de ANDEVA con $p < 0.05$ vs control.

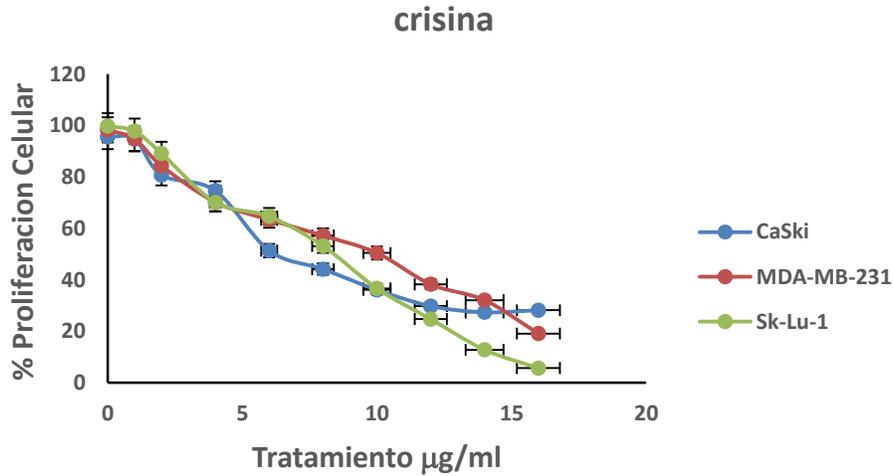
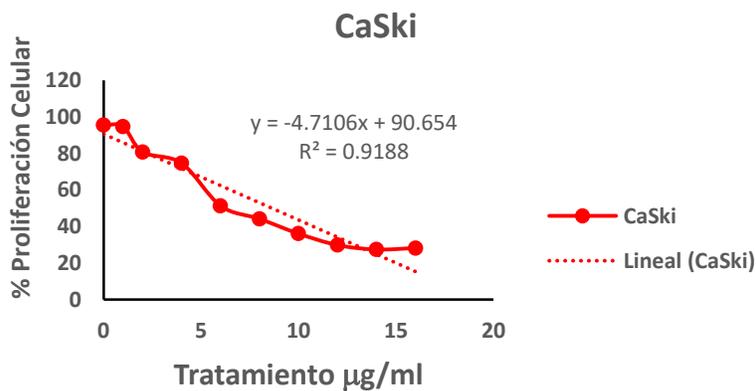
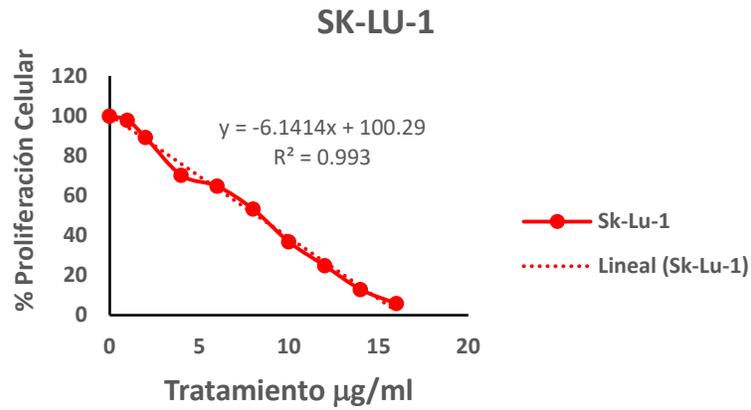


Figura 14. Efecto antiproliferativo de la crisina en líneas de cáncer cervical (CaSki), mama (MDA-MB-231) y pulmón (SK-LU-1). Las células fueron tratadas con crisina por 24 horas y se evaluaron mediante la técnica de incorporación de cristal violeta. Los datos se obtuvieron de 3 ensayos independientes con 6 repeticiones por condición y se les realizó una prueba de ANDEVA con $p < 0.05$ vs control.



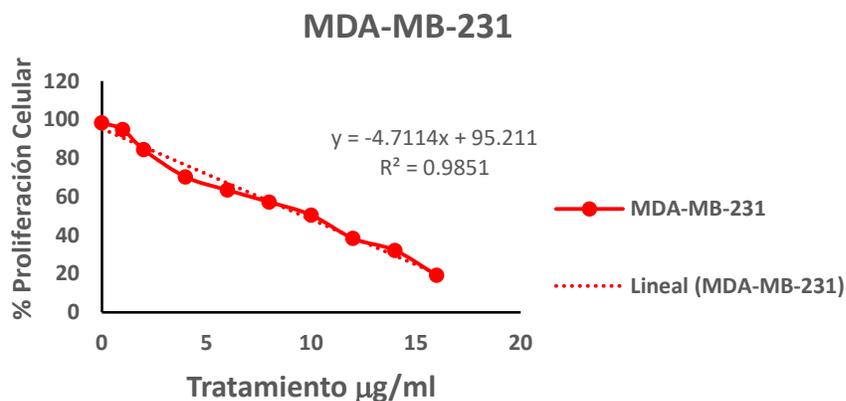


Figura 15. Actividad antiproliferativa de la crisina en las líneas tumorales CaSki, MDA-MB-231 y SK-LU-1. Se obtuvo la IC₅₀ mediante la linealización de los datos y la ecuación de la recta. Los datos se obtuvieron de 3 ensayos independientes con 6 repeticiones por condición y se les realizó una prueba de ANDEVA con p<0.05 vs control.

	CaSki	MDA-MB-231	SK-LU-1
Crisina	6±0.3	10±0.8	8±0.5
NOC	8±0.6	9±1.1	6±0.2

Cuadro 1. Concentración que disminuye la población celular en 50% (IC₅₀) de la crisina y NOC en líneas tumorales. Los resultados están expresados en µg/mL.

Los resultados muestran que tanto la crisina, como la NOC afectan la proliferación de las líneas tumorales utilizadas, además de que se observa un efecto dosis-dependiente.

Efecto necrótico de la crisina y NOC en las células tumorales

Una vez demostrada la actividad antiproliferativa de la crisina y NOC, se procedió a estimular a las células con la concentración IC₅₀ correspondiente a cada línea con cada compuesto para determinar si esta disminución celular se debía a una muerte necrótica, por medio de la cuantificación de la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares (Fig. 16 y 17).

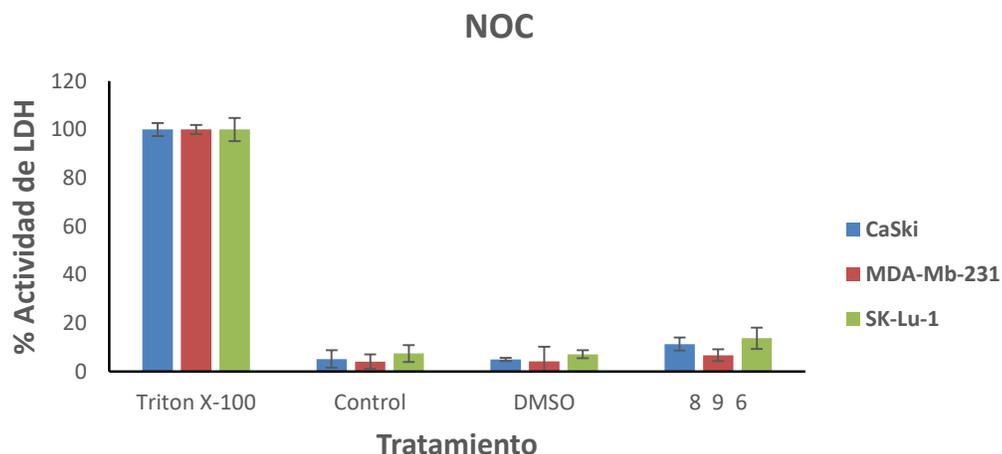


Figura 16. Evaluación del efecto necrótico de NOC por medio de la actividad de la enzima LDH en cultivos de células tumorales. Se trataron a las células con las IC_{50} obtenidas para este compuesto en cada línea tumoral por 24 horas y se tomó como 100% a los sobrenadantes de las células tratadas con Tritón X-100. Los datos corresponden a 3 ensayos independientes con 6 repeticiones por condición y se les realizó una prueba de ANDEVA con $p < 0.05$ que no muestra diferencia significativa entre los tratamientos.

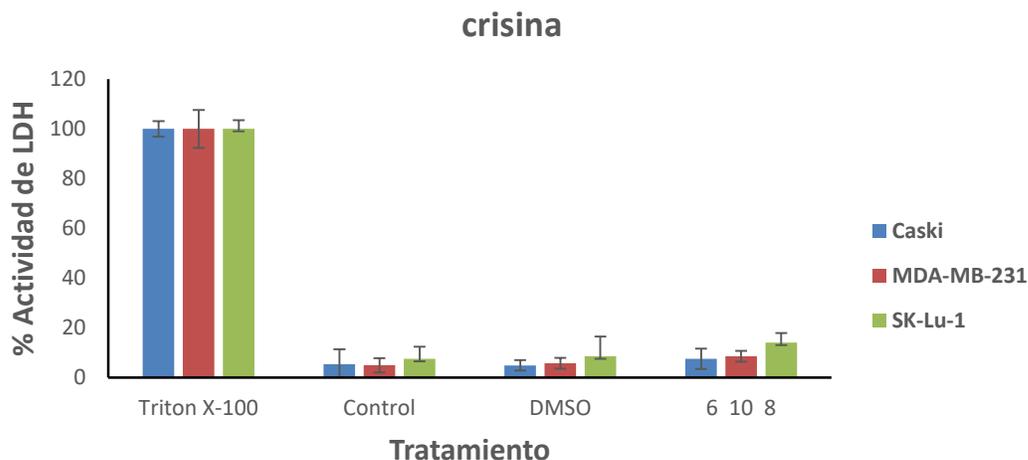


Figura 17. Evaluación del efecto necrótico de la Crisina por medio de la actividad de la enzima LDH en cultivos de células tumorales. Se trataron a las células con las IC_{50} obtenidas para este compuesto en cada línea tumoral por 24 horas y se tomó como 100% a los sobrenadantes de las células tratadas con Tritón X-100. Los datos corresponden a 3 ensayos independientes con 6 repeticiones por condición y se les realizó una prueba de ANDEVA con $p < 0.05$ que no muestra diferencia significativa entre los tratamientos.

Los datos obtenidos en conjunto de las figuras 16, 17 y el cuadro 2 y 3 muestran una baja actividad de la enzima LDH tanto en la crisina como en NOC en las tres líneas celulares, por lo cual se descarta a la necrosis como causa en la disminución de la población de células tumorales.

Línea Celular	Tritón X-100	Control	DMSO	Crisina
MDA-MB-231	100	4.97±0.9	5.73±0.7	8.55±0.7
CaSki	100	5.33±2.1	4.92±0.6	7.5±1.3
SK-LU-1	100	7.56±1.6	8.62±2.6	14.05±1.2

Cuadro 2. Valores de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en células tumorales tratadas con crisina, comparadas con el Tritón X-100 (control positivo).

Línea Celular	Tritón X-100	Control	DMSO	NOC
MDA-MB-231	100	4.14±0.9	4.25±2	6.77±0.8
CaSki	100	5.19±1.1	5.01±0.6	11.35±0.9
SK-LU-1	100	7.46±1.1	7.14±0.5	13.76±1.4

Cuadro 3. Valores de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en células tumorales tratadas con NOC, comparadas con el Tritón X-100 (control positivo).

Efecto apoptótico de la crisina y NOC en células tumorales

Se sabe que cuando una célula sufre una muerte por apoptosis, esta muestra características morfológicas como reducción citoplasmática, redondeamiento de la célula, formación de burbujas o ampollas en la membrana citoplasmática (beblings) y la formación de cuerpos apoptóticos, a nivel nuclear la cromatina se condensa y se fragmenta, por lo que se procedió a evaluar el efecto apoptótico de la crisina y NOC en las células tumorales, mediante la observación morfológica de estas características por microscopía de contraste de fases, la fragmentación nuclear con la tinción del fluorocromo DAPI usando un microscopio de epifluorescencia y la inmunodetección de la caspasa 3 activa.

En las líneas celulares CaSki y SK-LU-1 (Fig. 18 y 19) se puede observar en el contraste de fases y DAPI que las células del control y el vehículo (DMSO) conservaron una morfología típica celular con su tamaño normal, forma poliédrica y proyecciones citoplasmáticas, en cuanto a su morfología nuclear en el DAPI, se pueden apreciar núcleos esféricos y definidos. Por último, en la detección de la caspasa 3 activa no se observó su presencia en estas dos condiciones.

Mientras que en las células tratadas con camptotecina (control positivo), crisina, y NOC se pudieron observar cambios morfológicos como reducción del tamaño, pérdida de sus proyecciones citoplasmáticas, en cuanto a su morfología nuclear en el DAPI se pueden apreciar núcleos condensados y fragmentados, además de una evidente presencia de la caspasa 3 activa en las tres condiciones.

Por otro lado, en la línea MDA-MB-231 (Fig. 20) no se observan cambios morfológicos, nucleares, ni la presencia de la caspasa 3 activa en las células tratadas con crisina y NOC en comparación con el control positivo (camptotecina), Sin embargo, se observan vacuolas en el citoplasma de las células (Fig. 19). Los resultados obtenidos nos indican que el tratamiento con crisina y NOC no inducen a las células de MDA-MB-231 a muerte por apoptosis, pero podrían estar induciendo la muerte celular por otros mecanismos.

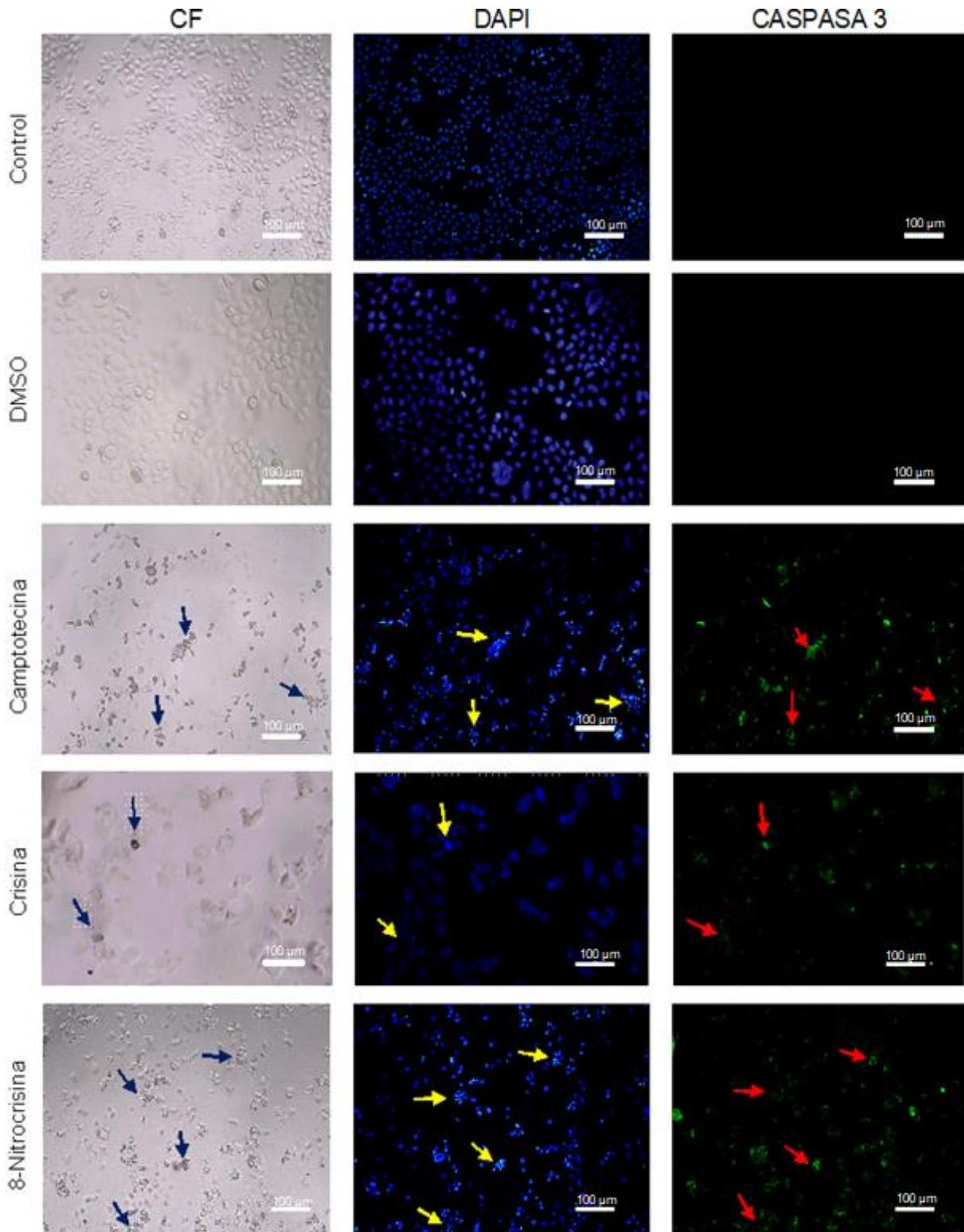


Figura 18. Efecto de la crisina y NOC en la línea tumoral CaSki después de 24 horas de estimulación con la IC_{50} correspondiente (6 y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente). Flechas azules señalan células sin proyección citoplasmáticas y de menor tamaño en contraste de fases; flechas amarillas señalan células con fragmentación de la cromatina en el DAPI y flechas rojas la presencia de la caspasa 3 activa.

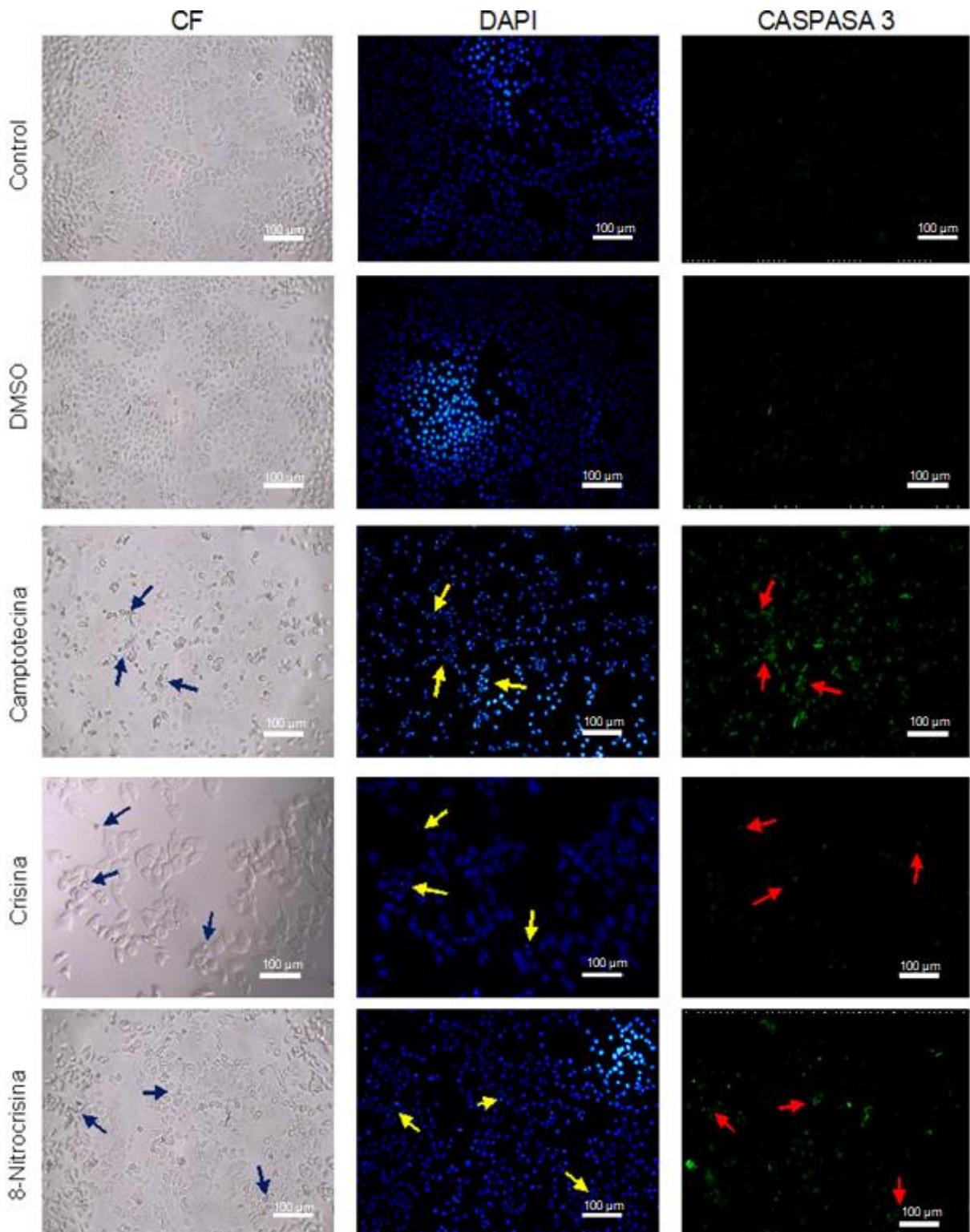


Figura 19. Efecto de la crisina y NOC en la línea tumoral SK-LU-1 después de 24 horas de estimulación con la IC_{50} correspondiente (8 y 6 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente). Flechas azules señalan células sin proyección citoplasmáticas y de menor tamaño en contraste de fases; flechas amarillas señalan células con fragmentación de la cromatina en el DAPI y flechas rojas la presencia de la caspasa 3 activa.

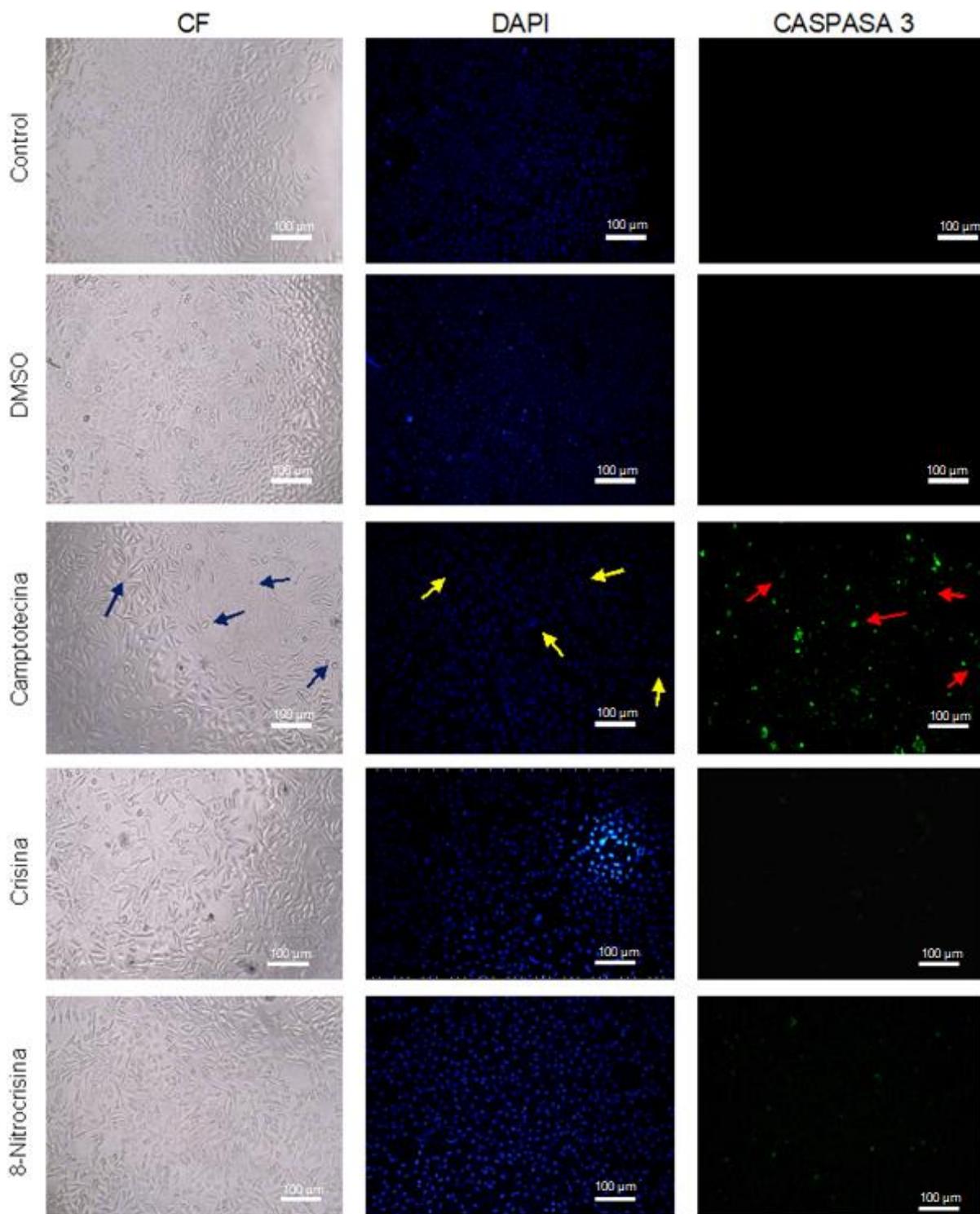


Figura 20. Efecto de la crisina y NOC en la línea tumoral MDA-MB-231 después de 24 horas de estimulación con la IC_{50} correspondiente (10 y 9 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente). Flechas azules señalan células sin proyección citoplasmáticas y de menor tamaño en contraste de fases y flechas amarillas señalan células con fragmentación de la cromatina y flechas rojas la presencia de la caspasa 3 activa en las células tratadas con camptotecina. En las células tratadas con los compuestos no se observan estos cambios.

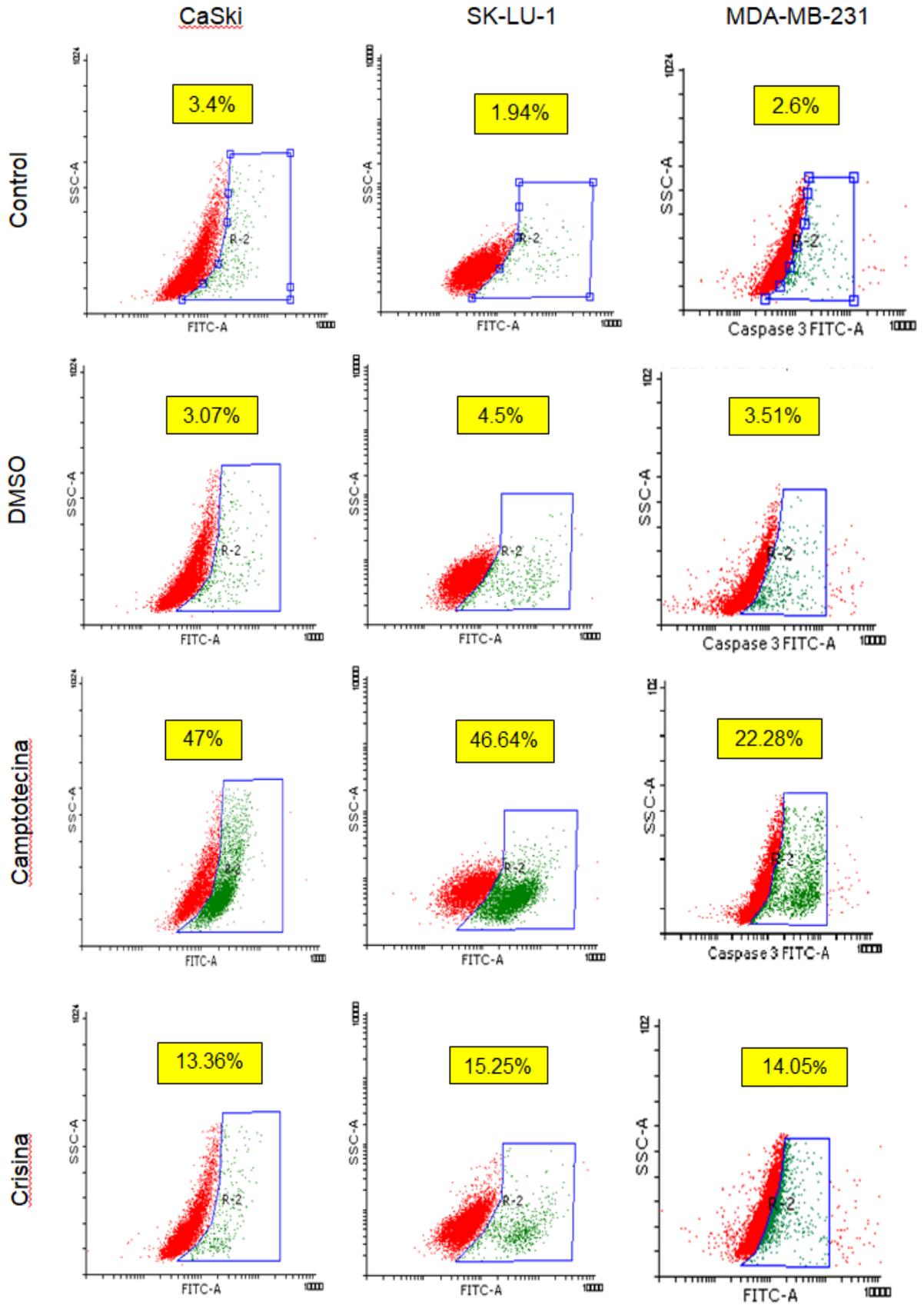


Figura 21. Células MDA-MB-231 tratadas con 10 µg/ml de Crisina (A) y 9 µg/ml de NOC (B) en contraste de fases. En la imagen se puede observar vacuolas esféricas en el citoplasma de las células a causa del tratamiento con Crisina y NOC por 24 horas.

Análisis por citometría de flujo

Finalmente, con la intención de poder confirmar que las células de SK-LU-1 y CaSki son inducidas a una muerte apoptótica cuando son tratadas con Crisina y NOC se procedió a desarrollar cultivos celulares que fueron tratados con la IC_{50} correspondiente a cada línea celular de los dos compuestos para cuantificar a las células de la población que fueran positivas a las caspasa 3 activa mediante citometría de flujo

Los datos obtenidos (Fig. 22) muestran que las células de SK-LU-1 y CaSki son inducidas a una muerte apoptótica cuando son tratadas con Crisina y NOC, mientras que las células de MDA-MB-231 no son inducidas a este tipo de muerte.



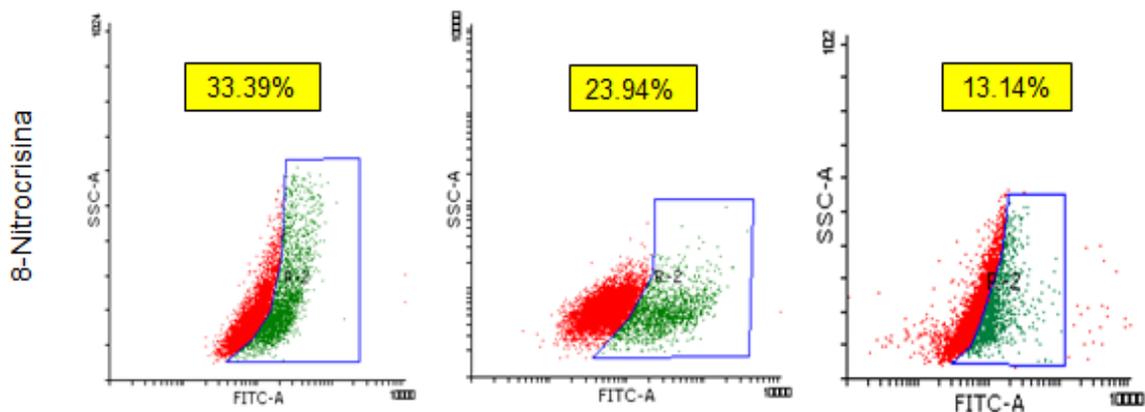


Figura 22. Cuantificación de las células positivas a caspasa 3 activa después de 24 horas de tratamiento con crisina y NOC en las líneas tumorales CaSki, SK-LU-1 y MDA-MB-231. En verde se representa a la población de células positivas a caspasa 3 activa. Los valores son representativos de tres ensayos independientes.

Determinación de la ruta de inducción de apoptosis de la crisina y NOC

Una vez demostrado que los dos compuestos inducían a las células de las líneas tumorales CaSki y SK-LU-1 a una muerte celular por apoptosis, se prosiguió a conocer el tipo de ruta que estaba induciendo esta muerte. Se sabe que las rutas principales de la apoptosis son la extrínseca e intrínseca que son activadas por las caspasas 8 y 9 respectivamente, por lo que se continuó a inmunodetectar la presencia de estas proteínas, así como de Bid y Bax después de tratar por 24 horas a las células con la crisina y NOC por medio de un microscopio de epifluorescencia (Fig. 23 a 31).

Los resultados obtenidos de la figura 23 a la 26 muestran que las células CaSki tratadas con crisina y NOC presentan un incremento en la presencia de la caspasa 8 y 9 activa, en cuanto a las proteínas proapoptóticas se observa una gran presencia de Bax y muy poca de Bid, en cambio en las células de la línea SK-LU-1 (Fig. 27 a 30) se observa un incremento en la presencia de las caspasas 8 y 9, así como de las proteínas Bid y Bax. Los datos obtenidos nos sugieren que la crisina y NOC activan la vía extrínseca e intrínseca en las células de CaSki y SK-LU-1

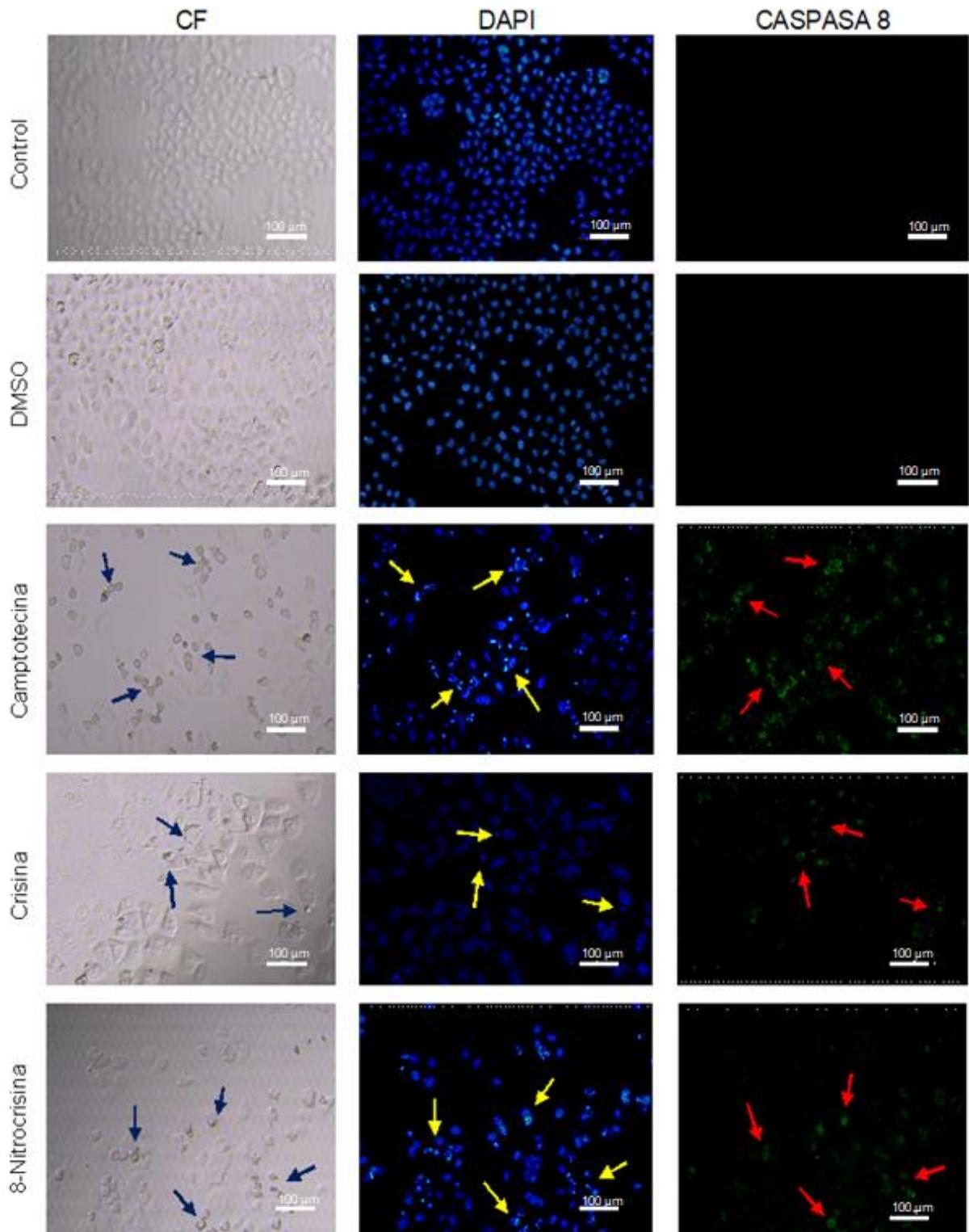


Figura 23. Efecto de la crisina y NOC en la línea tumoral CaSki después de 24 horas de estimulación con la IC_{50} correspondiente (6 y 8 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente). Flechas azules señalan células sin proyección citoplasmáticas y de menor tamaño en contraste de fases; flechas amarillas señalan células con fragmentación de la cromatina en el DAPI y flechas rojas la presencia de la caspasa 8 activa.

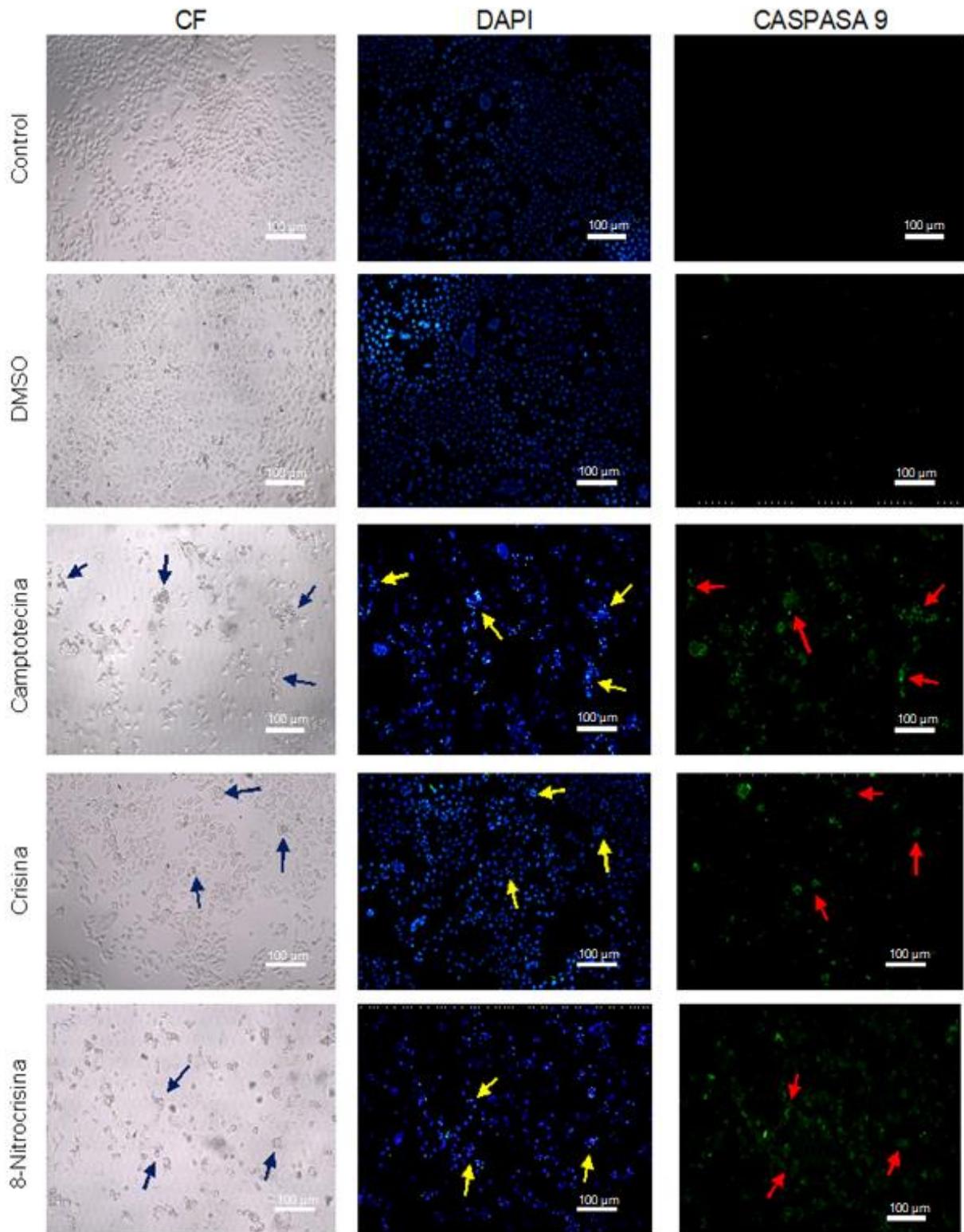


Figura 24. Efecto de la crisina y NOC en la línea tumoral CaSki después de 24 horas de estimulación con la IC_{50} correspondiente (6 y 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente). Flechas azules señalan células sin proyección citoplasmáticas y de menor tamaño en contraste de fases; flechas amarillas señalan células con fragmentación de la cromatina en el DAPI y flechas rojas la presencia de la caspasa 9 activa.

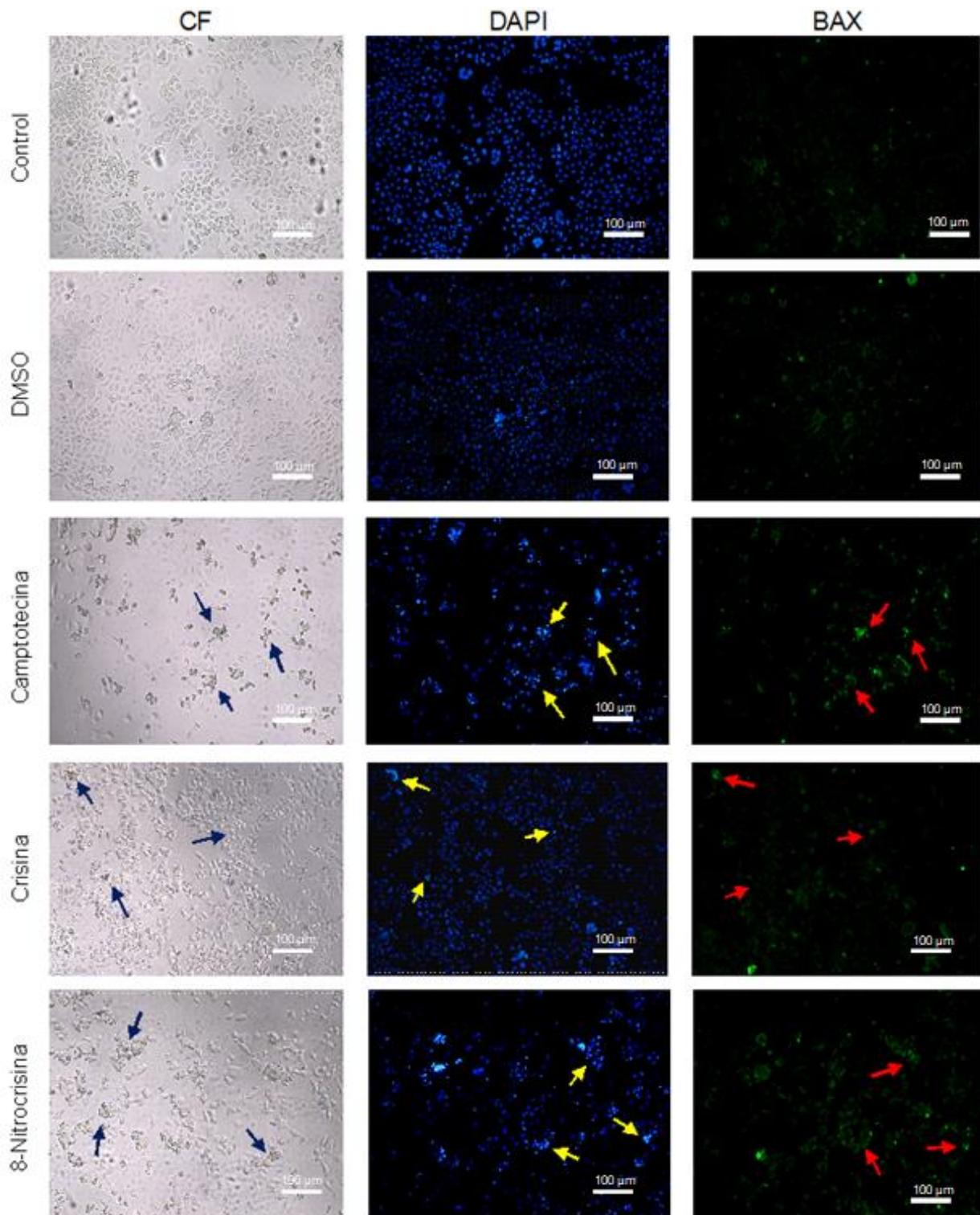


Figura 25. Efecto de la crisina y NOC en la línea tumoral CaSki después de 24 horas de estimulación con la IC_{50} correspondiente (6 y 8 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente). Flechas azules señalan células sin proyección citoplasmáticas y de menor tamaño en contraste de fases; flechas amarillas señalan células con fragmentación de la cromatina en el DAPI y flechas rojas la presencia de la proteína proapoptótica Bax.

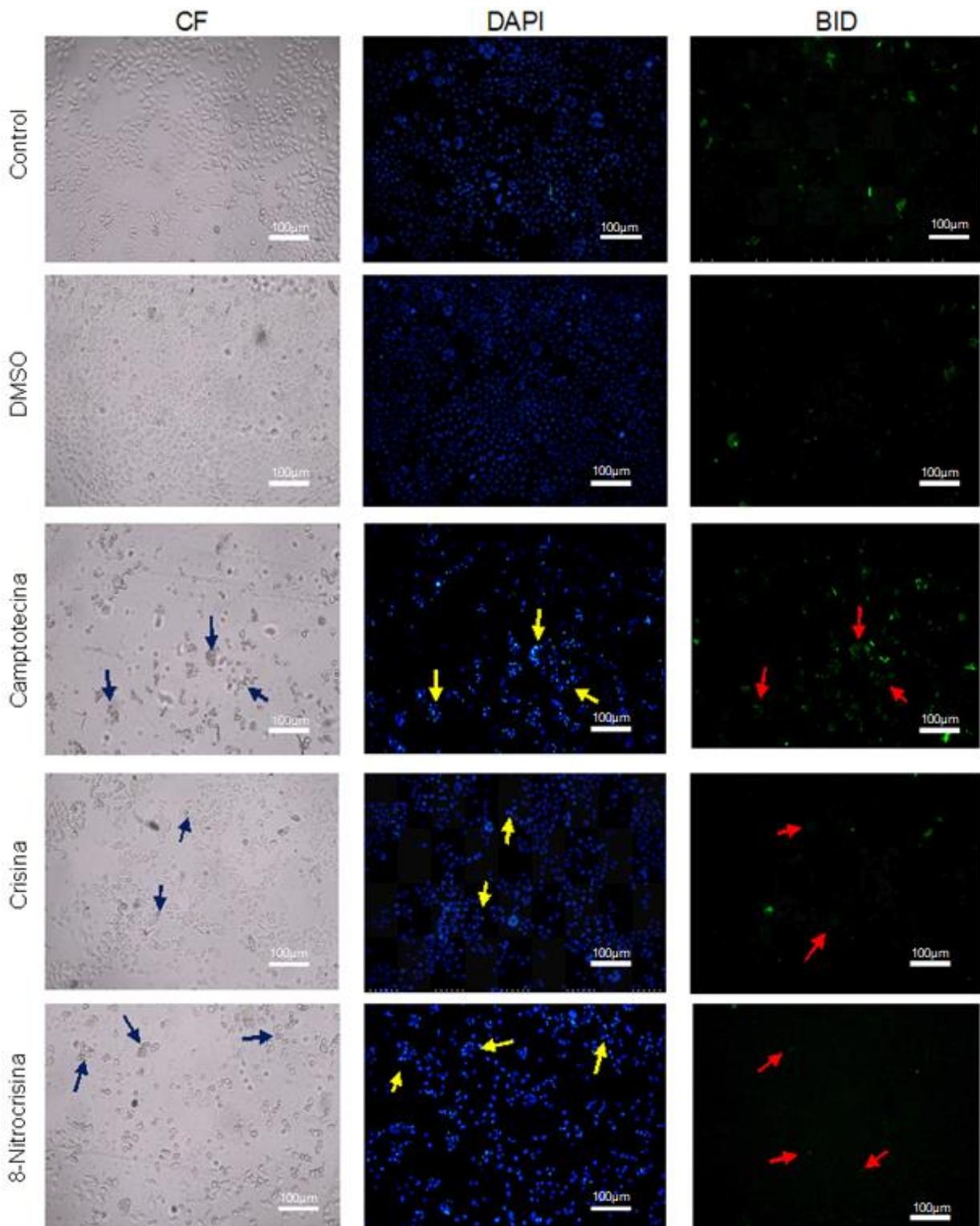


Figura 26. Efecto de la crisina y NOC en la línea tumoral CaSki después de 24 horas de estimulación con la IC_{50} correspondiente (6 y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente). Flechas azules señalan células sin proyección citoplasmáticas y de menor tamaño en contraste de fases; flechas amarillas señalan células con fragmentación de la cromatina en el DAPI y flechas rojas la presencia de la proteína proapoptótica Bid.

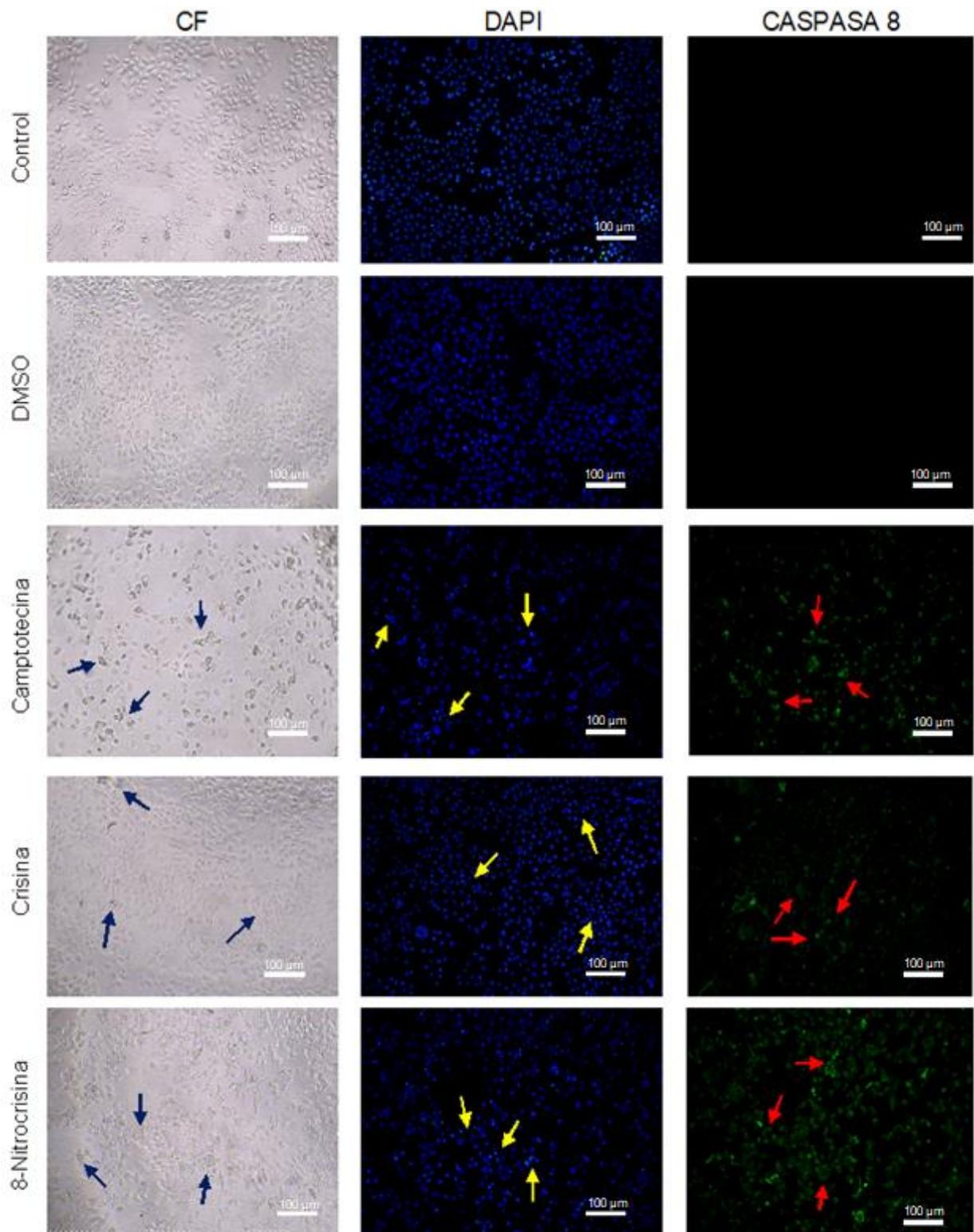


Figura 27. Efecto de la crisina y NOC en la línea tumoral SK-LU-1 después de 24 horas de estimulación con la IC_{50} correspondiente (8 y 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente). Flechas azules señalan células sin proyección citoplasmáticas y de menor tamaño en contraste de fases; flechas amarillas señalan células con fragmentación de la cromatina en el DAPI y flechas rojas la presencia de la caspasa 8 activa.

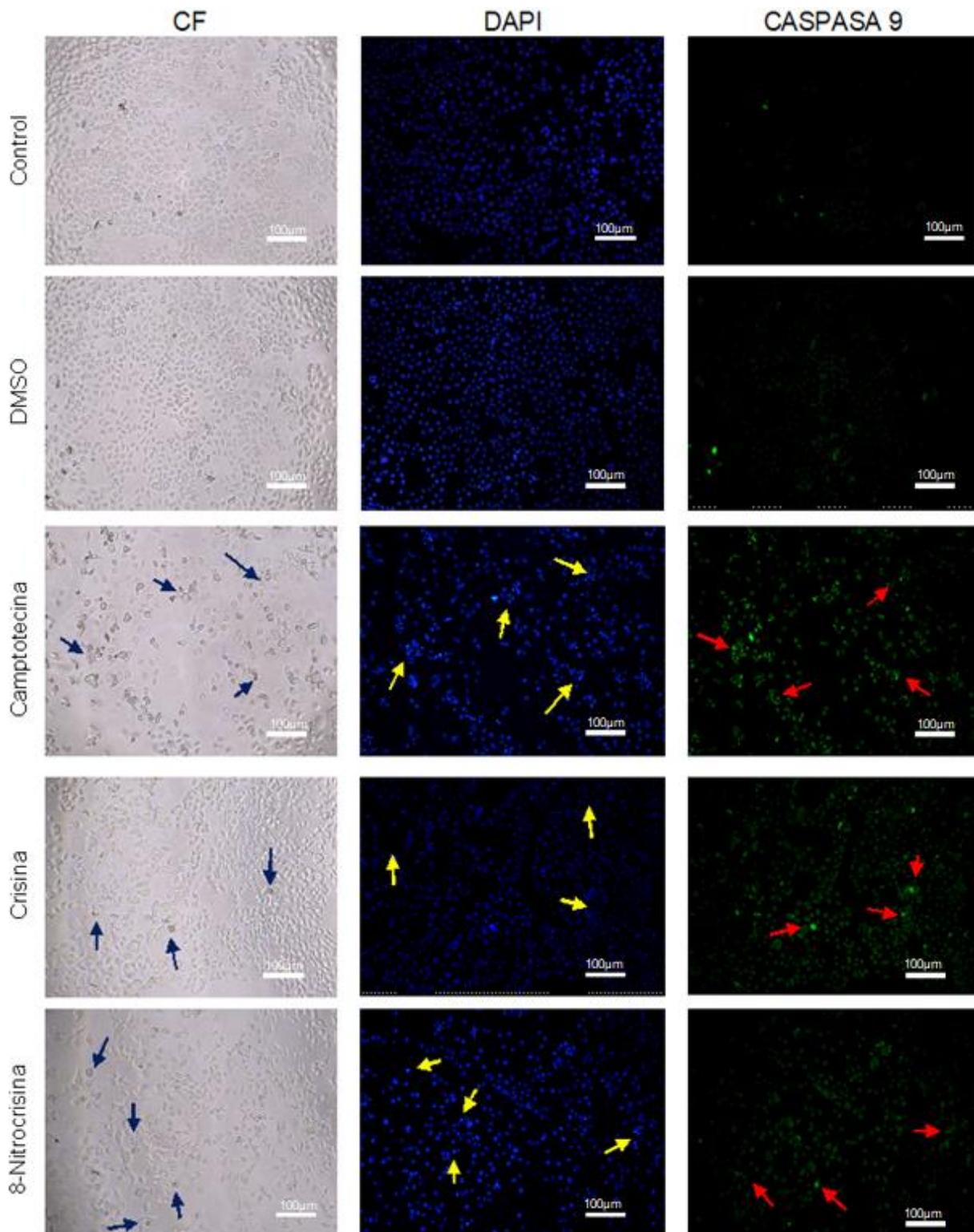


Figura 28. Efecto de la crisina y NOC en la línea tumoral SK-LU-1 después de 24 horas de estimulación con la IC_{50} correspondiente (8 y 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente). Flechas azules señalan células sin proyección citoplasmáticas y de menor tamaño en contraste de fases; flechas amarillas señalan células con fragmentación de la cromatina en el DAPI y flechas rojas la presencia de la caspasa 9 activa.

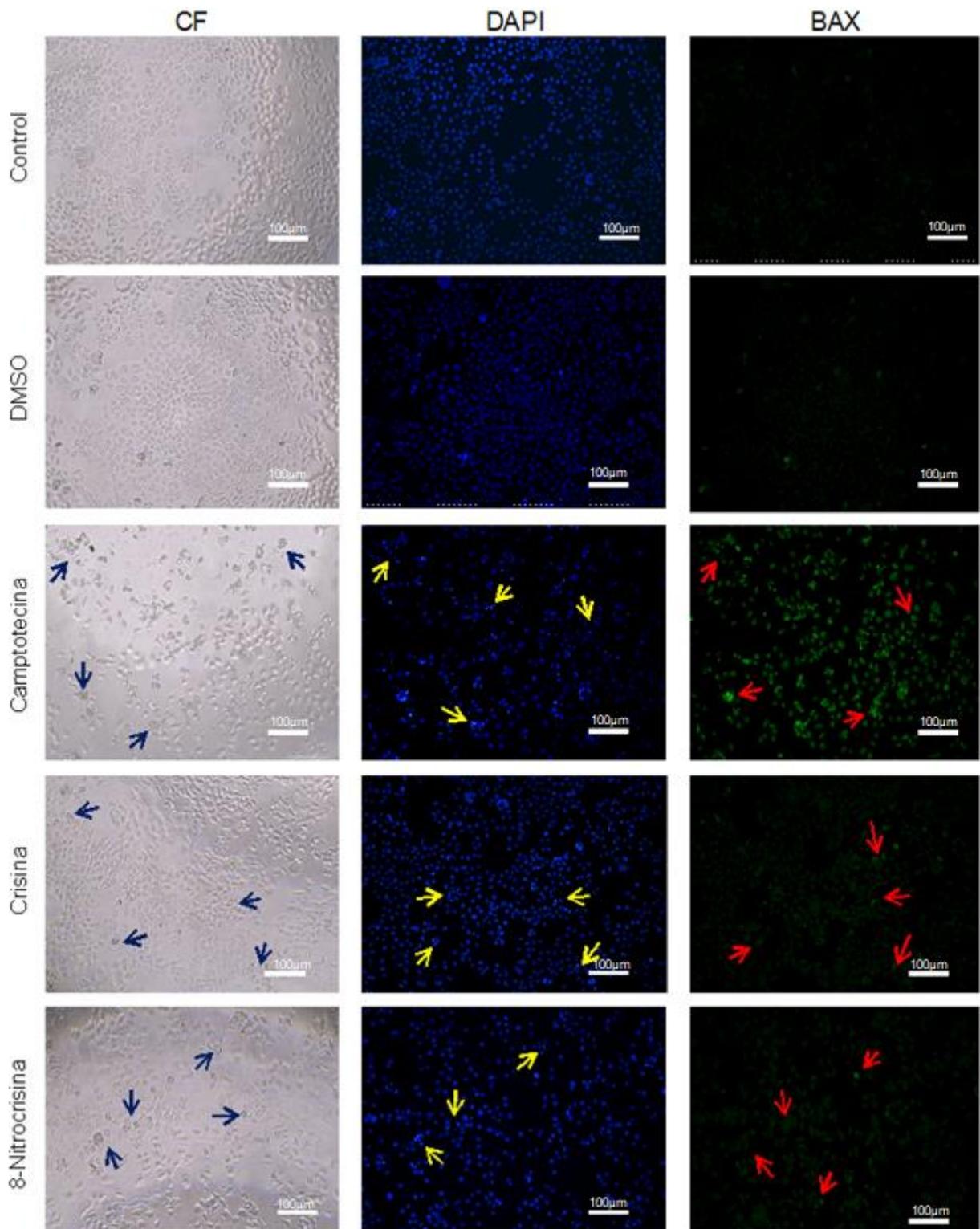


Figura 29. Efecto de la crisina y NOC en la línea tumoral SK-LU-1 después de 24 horas de estimulación con la IC_{50} correspondiente (8 y 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente). Flechas azules señalan células sin proyección citoplasmáticas y de menor tamaño en contraste de fases; flechas amarillas señalan células con fragmentación de la cromatina en el DAPI y flechas rojas la presencia de la proteína proapoptótica Bax.

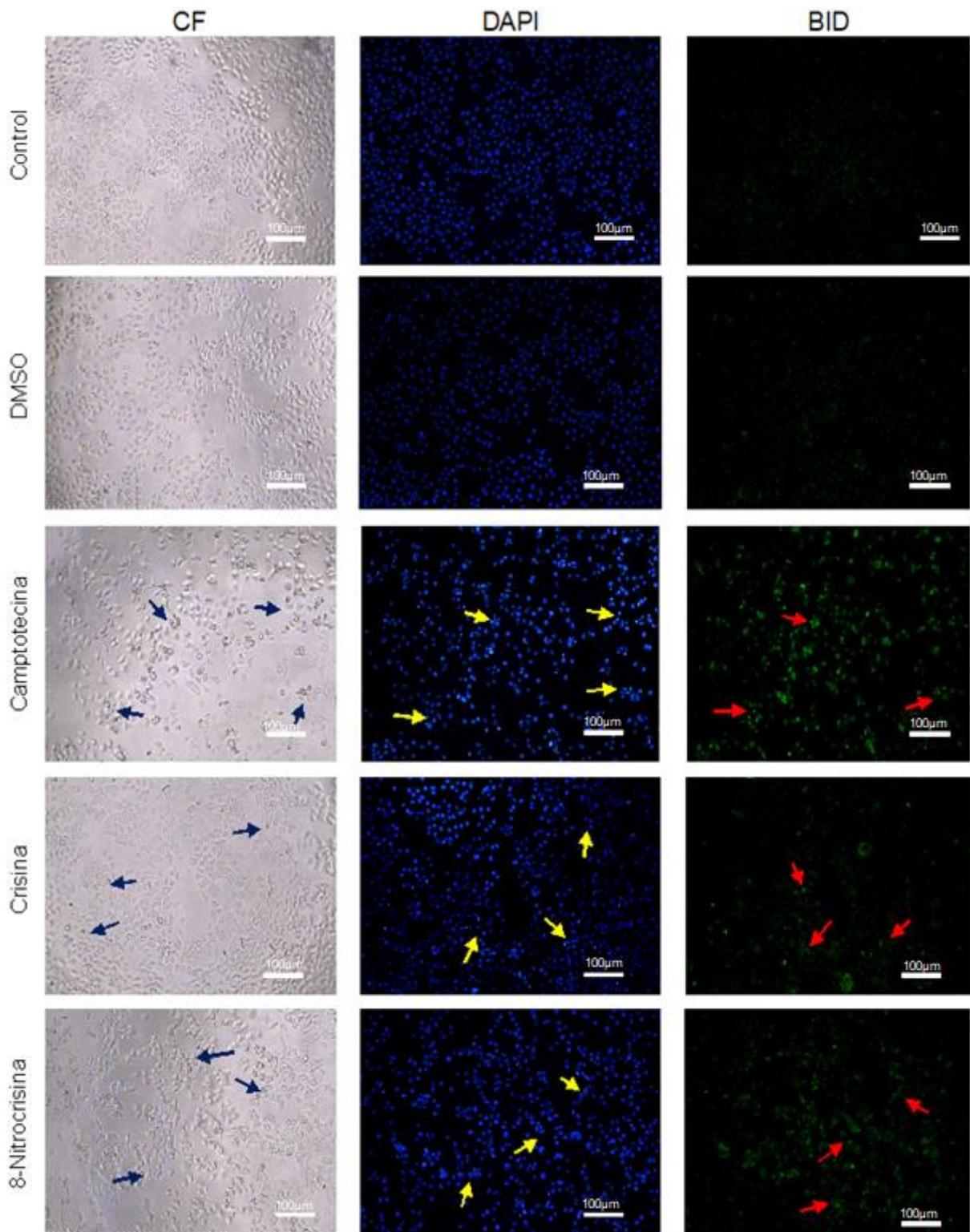


Figura 30. Efecto de la crisina y NOC en la línea tumoral SK-LU-1 después de 24 horas de estimulación con la IC_{50} correspondiente (8 y 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente). Flechas azules señalan células sin proyección citoplasmáticas y de menor tamaño en contraste de fases; flechas amarillas señalan células con fragmentación de la cromatina en el DAPI y flechas rojas la presencia de la proteína proapoptótica Bid.

Evaluación del efecto antiproliferativo de la crisina y NOC en células no tumorales

Con la finalidad de determinar si los compuestos poseen selectividad, se procedió a evaluar su efecto en células linfocíticas obtenidas de sangre periférica humana, para lo cual se realizaron cultivos de linfocitos humanos que fueron tratados con las IC_{50} obtenidas de la crisina y NOC para las tres líneas tumorales por 24 horas. Después se evaluó su efecto proliferativo usando la técnica de marcaje con carboxifluoresceína a través del citómetro de flujo (Fig. 31 y 32).

Los resultados establecen que la crisina a las concentraciones de 10, 8 y 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y NOC a las concentraciones de 9, 8 y 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no afectan el potencial proliferativo de los linfocitos humanos, sugiriendo que estos dos compuestos pueden poseer selectividad.

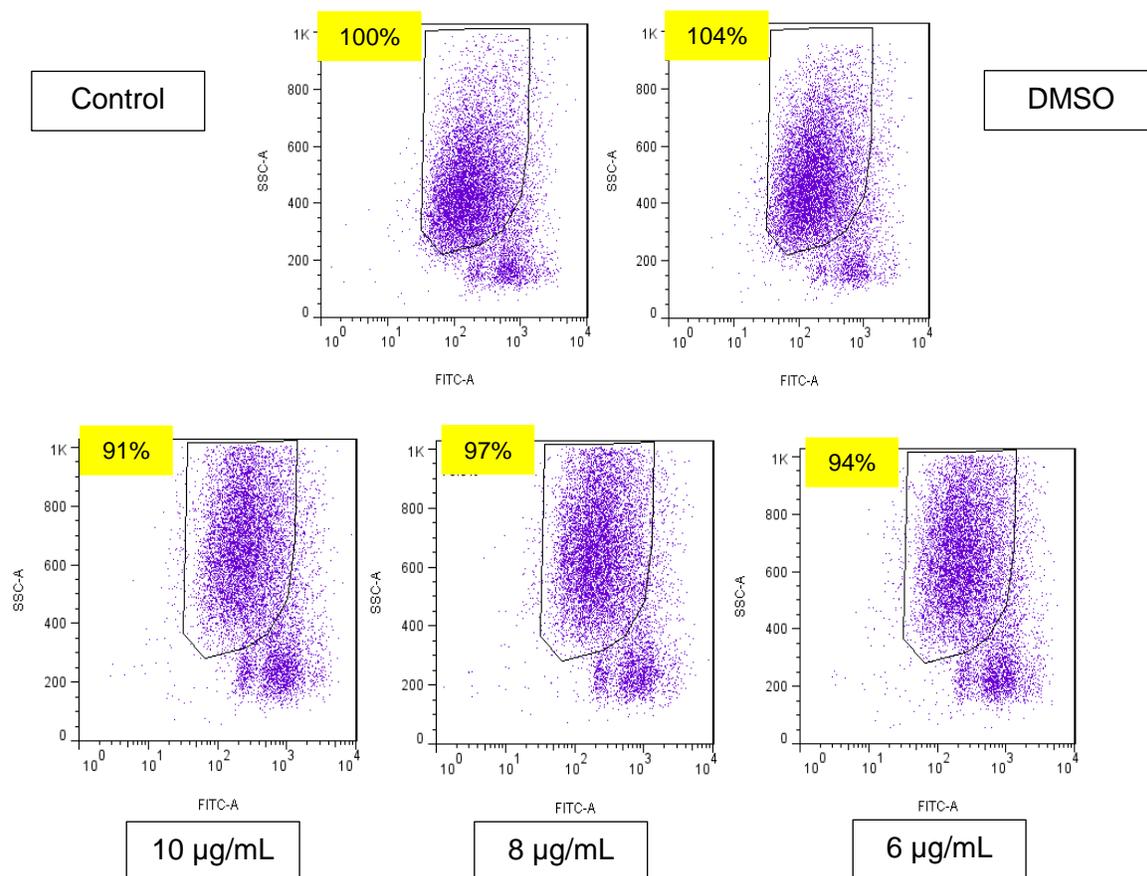


Figura 31. Efecto antiproliferativo de la crisina en células linfocíticas humanas. Los linfocitos fueron tratados con las IC_{50} del compuesto obtenidas para las líneas tumorales MDA-MB-231 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), SK-LU-1 (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y CaSki (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 horas. Los datos se obtuvieron de 3 ensayos independientes con 6 repeticiones por condición.

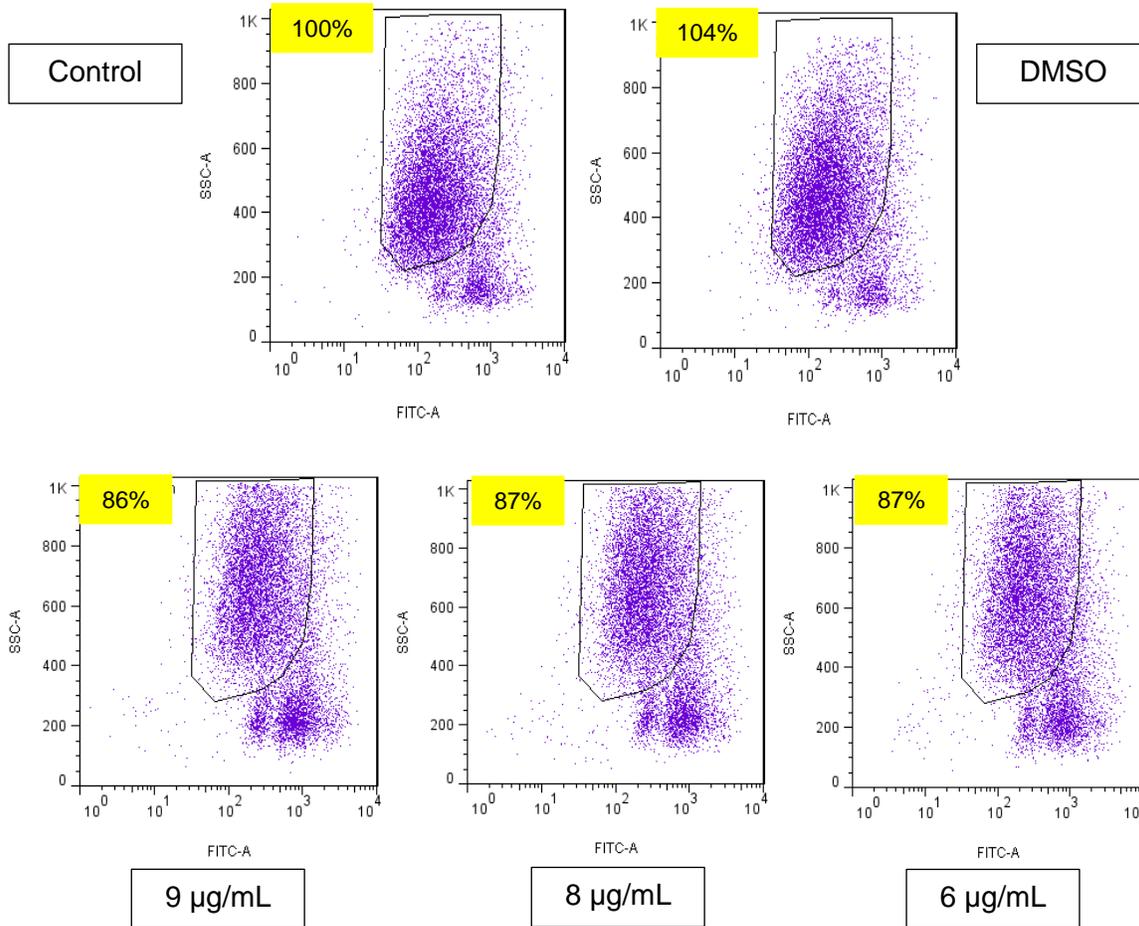


Figura 32. Efecto antiproliferativo de NOC en células linfocíticas humanas. Los linfocitos fueron tratados con las IC_{50} del compuesto obtenidas para las líneas tumorales MDA-MB-231 (9 $\mu\text{g/mL}$), CaSki (8 $\mu\text{g/mL}$) y SK-LU-1 (6 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. Los datos se obtuvieron de 3 ensayos independientes con 6 repeticiones por condición.

Evaluación del efecto necrótico de la crisina y NOC en células no tumorales

Para determinar si los compuestos poseen un efecto necrótico en los linfocitos humanos, se cuantificó la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos (Fig. 33).

Los datos obtenidos en la figura 33 muestran una baja actividad de la enzima LDH tanto en la crisina como en NOC en sus tres concentraciones que corresponden a las IC_{50} obtenidas para las líneas tumorales CaSki, SK-LU-1 y MDA-MB-231, por lo cual los compuestos no tienen efecto necrótico sobre los linfocitos humanos.

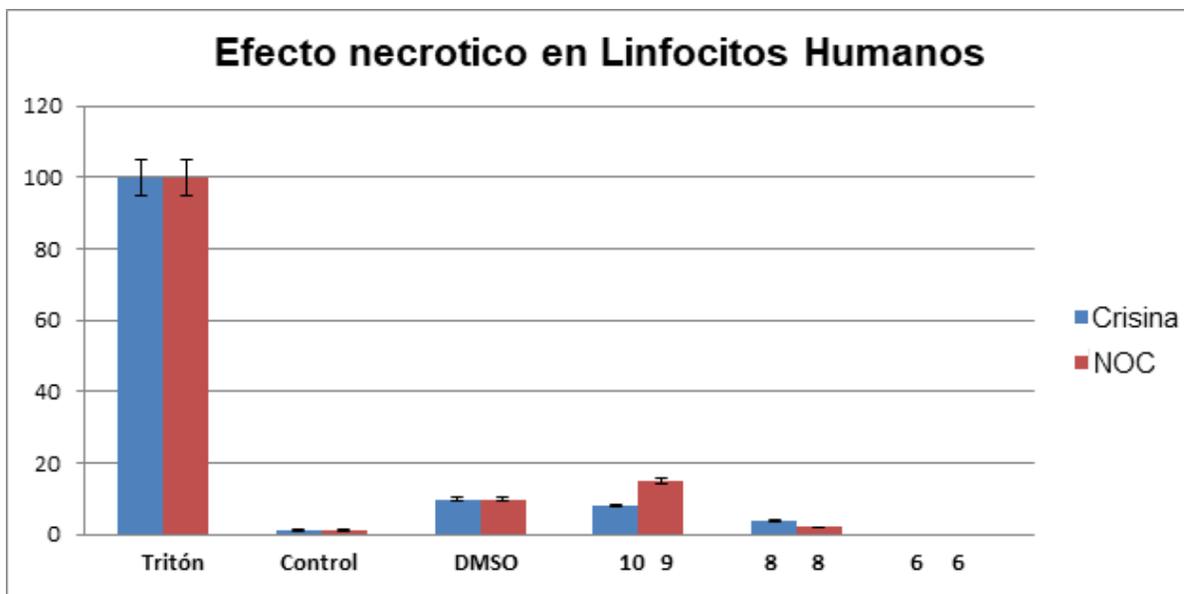


Figura 33. Evaluación del efecto necrótico de la crisina y NOC por medio de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en cultivos de linfocitos humanos. Se les trató con las IC_{50} obtenidas para las líneas de células tumorales de cada compuesto por 24 horas y se tomó como 100% a los sobrenadantes de las células tratadas con Tritón X-100. Los datos corresponden a 3 ensayos independientes con 6 repeticiones por condición y se les realizó una prueba de ANDEVA con $p < 0.05$ que no muestra diferencia significativa entre los tratamientos.

DISCUSIÓN

El cáncer de mama, pulmón y cervicouterino afectan a millones de personas, además que el número de casos aumenta cada año de acuerdo a datos de la OMS.

Un tratamiento adecuado es crítico para erradicar esta enfermedad en cualquier etapa en la que se encuentre, especialmente en aquellos cánceres avanzados y metastásicos. Los compuestos naturales y aquellos sintetizados a partir de ellos son una gran fuente de nuevos agentes terapéuticos, por esto, han sido ampliamente investigados como medicamentos contra el cáncer, sin embargo, el mecanismo exacto de su acción requiere mayor atención.

Los flavonoides han demostrado poseer importantes actividades biológicas, tales como antiinflamatorias, antioxidantes, antivirales y antineoplásicas, donde en esta última se ha visto que son capaces de interferir en 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.)

Dentro de los flavonoides encontramos al subgrupo de las flavonas donde encontramos a la crisina que en el presente estudio demostró tener actividad antiproliferativa dependiente de la dosis en las líneas celulares MDA-MB-231, SK-LU-1 y CaSki con IC_{50} de 10, 8 y 6 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. De estas tres líneas tumorales la única con antecedentes en la literatura es MDA-MB-231, donde se reporta actividad antiproliferativa con una IC_{50} de 100 μM (Parajuli et al., 2009) y 20 μM (Hong et al., 2010). Sin embargo, se ha estudiado su potencial antiproliferativo en diferentes líneas celulares correspondientes a leucemia (U937) y cáncer cervicouterino (HeLa), mama (4T1, T47D, MCF7), colon (HT-29, HCT-116, CNE-1, CT-26), pulmón (A549), esófago (KYSE-510) e hígado (HepG2) con IC_{50} de 14.2 a 100 μM (Chylińska-Wrzos et al., 2017; Monasterio et al., 2004; Bahadori et al., 2016)

Por otra parte, el derivado sintético NOC demuestra también tener actividad antiproliferativa en las líneas celulares MDA-MB-231, CaSki y SK-LU-1 con IC_{50} de 9, 8 y 6 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. En el caso particular de la línea MDA-MB-231, Hong y colaboradores (2010) reportan una IC_{50} de 20 μM ; sin embargo, también ha sido estudiado en otras líneas celulares de cáncer de mama como MDA-MB-453 y MCF-7, en células de cáncer gástrico como SGC-7901 y cáncer de colon HT-29 en IC_{50} de 1.78 μM a 8 μM (Zhao et al., 2010; Ai et al., 2007).

Si comparamos todos los datos reportados para la crisina y NOC, se puede notar que las IC_{50} reportadas para NOC son mucho menores que las reportadas para la crisina, sugiriendo que la adición del grupo nitro en la posición 8 a la crisina potencia su efecto antiproliferativo, ya que se llega a la concentración inhibitoria 50 con menor cantidad de compuesto.

Con respecto a la actividad necrótica de la crisina los resultados obtenidos demuestran que no induce a las células de las líneas tumorales antes mencionadas a una muerte celular por necrosis, de hecho la actividad de la enzima LDH no depende de la concentración ya que no se observa que entre más compuesto se agregue, más es la actividad de esta enzima, incluso las IC_{50} correspondientes a la línea SK-LU-1 es donde se registra mayor actividad en comparación con las concentraciones obtenidas para CaSki y MDA-MB-231, siendo las IC_{50} correspondientes a esta última línea tumoral las más altas obtenidas. En 2008 Josipović y Oršolić obtuvieron resultados similares demostrando que la crisina no es citotóxica a concentraciones bajas (menos a 12.5 $\mu\text{g/ml}$), solo a concentraciones de 50 a 100 $\mu\text{g/ml}$.

NOC al igual que la crisina demostró no inducir a las células de CaSki y MDA-MB-231 y SK-LU-1 a muerte por necrosis, ya que no se observó actividad significativa de la enzima LDH en ninguna de las concentraciones evaluadas. En resumen, los resultados sugieren que las dos flavonas tienen baja citotoxicidad, una ventaja importante contra los actuales compuestos usados en los tratamientos contra el cáncer, además que la adición del grupo nitro en la posición 8 de NOC no parece conferir significativamente menor citotoxicidad en comparación con la crisina.

En cuanto a la actividad apoptótica de la crisina y NOC en las líneas SK-LU-1 y CaSki los resultados establecen que inducen a las células a una muerte celular por apoptosis con la participación de la caspasa 3 activa, que es un regulador intracelular clave en este proceso (Elinos-Baez et al., 2003). En cuanto al porcentaje de células positivas a caspasa 3 activa se observa una diferencia importante entre la Crisina y NOC en las dos líneas celulares, datos similares se observan en diferentes estudios donde NOC obtiene porcentajes mayores de células positivas a caspasa 3 que la Crisina aunque se hayan llevado a cabo en diferentes líneas celulares, sugiriendo que la adición del grupo nitro a la posición 8 en el anillo A de NOC aumenta su actividad apoptótica.

La activación de la caspasa 3 puede deberse a que en el inicio del proceso apoptótico se lleve a cabo la vía extrínseca mediada por la caspasa 8, la vía intrínseca que involucra a la activación de la caspasa 9 o de las dos (Elmore, 2007). En el presente estudio los resultados sugieren que la crisina y NOC inducen su actividad apoptótica en las células de CaSki y SK-LU-1 a una muerte

apoptótica a través de la vía extrínseca e intrínseca. Es importante resaltar que en CaSki las células tratadas con los dos compuestos se ve más encendida la presencia de la caspasa 9 activa, sugiriendo que la ruta intrínseca es la ruta principal por la que actúa este compuesto. Mientras que en las células tratadas NOC en la línea SK-LU-1 se observa más encendida la presencia de la caspasa 8 activa, sugiriendo que la ruta extrínseca es la ruta principal por la que actúa este compuesto, en tanto que las células tratadas con crisina de la misma línea celular se ve más encendida la presencia de la caspasa 9 activa sugiriendo que la ruta intrínseca es la ruta principal por la que actúa este compuesto.

Ciertos estudios han informado que la crisina induce apoptosis a través de la vía intrínseca, otros por la vía extrínseca específicamente, y en algunas ocasiones han informado que lo hace por las dos vías. Por ejemplo, en células KYSE-510 la apoptosis fue inducida por la vía intrínseca mediante la activación de la caspasa 3 y 9 (Zhang et al., 2009), en células CT26 donde también se observa aumento de Bax (Bahadori et al., 2016), en líneas de Melanoma uveal humano (Raina et al., 2020) y de carcinoma hepatocelular donde además se observa disminución de las proteínas antiapoptóticas Bcl- 2 y Bcl-XL y aumento en las proteínas pro apoptóticas (Raina et al., 2020). Por otro lado, en células U937 se reporta la activación de la caspasa 3 y 8 (Monasterio et al. 2004) así como la liberación del citocromo c (Woo et al., 2004), de manera similar pasa en las células HCT-116 donde primero reportan la inducción de apoptosis por la vía extrínseca (Li et al., 2011) y un año después describen también la participación de la vía intrínseca (Raina et al., 2020), deduciendo entonces que en estas dos líneas celulares están involucradas las dos vías de la apoptosis.

En el caso de NOC, estudios informan que el mecanismo de inducción de apoptosis es mediante la vía intrínseca, uno de ellos reporta en células MDA-MB-453 la activación de la caspasa 3 y 9, así como el aumento de la proteína proapoptótica Bim, perdida en el potencial de la membrana mitocondrial y consecuentemente la liberación del citocromo c (Zhao et al., 2013), mientras que en otro estudio solo informan el aumento de la proteína Bax y una disminución de Bcl-2 (Ai et al., 2007). Resultados similares se obtuvieron en el presente estudio en la línea CaSki donde se observa la presencia de la caspasa 3 y 9 activa, así como un aumento en la presencia de la proteína Bax.

En cuanto a la línea MDA-MB-231 la crisina y NOC a una concentración de 10 y 9 $\mu\text{g/mL}$ no se observa morfología característica de la apoptosis, condensación de la cromatina ni expresión de la caspasa 3 activa, por lo cual se deduce que la apoptosis no es responsable de la disminución en la proliferación celular. Hong y colaboradores en 2010 reportan resultados similares donde la crisina tuvo un efecto antiproliferativo en las células de MDA-MB-231 con una IC_{50} de 20 μM , que

se debía a una mayor expresión de ARNm de PPAR y PPAR γ , ocasionando una alta tasa de acumulación de lípidos en el citoplasma de las células, en cambio en nuestros resultados se observan vacuolas en el citoplasma de las células, que es más evidente en aquellas tratadas con NOC. Sugiriendo en conjunto que la disminución de la población celular se debe a otro tipo de muerte celular como la Methuosis que se caracteriza principalmente por la macropinocitosis, un proceso por el cual las células de mamíferos internalizan líquido extracelular, nutrientes y proteínas en vesículas (macropinosomas), aunque es necesario hacer más pruebas experimentales.

Siguiendo la línea de estudio en células de cáncer de mama, estudios reportan efecto apoptótico por NOC en la línea MDA-MB-453 a concentración de 8 μ M, con la activación de la caspasa 3 y 9 activa, liberación del citocromo c, aumento en los niveles de la proteína Bim y de ROS (Zhao et al., 2010; Zhao et al., 2013). En cambio, en la línea celular HBL-100 y MCF-7 con receptores a estrógenos y progesterona se reporta ningún o poco efecto por NOC (Zhao et al., 2010), pero la crisina en la línea MCF-7 muestra tener actividad antiproliferativa por la activación de la ruta ATM-Chk 2 a la IC₅₀ de 40 μ M (Nagasaka et al., 2018).

Los agentes terapéuticos usados contra el cáncer en la actualidad afectan tanto a las células tumorales como a normales, por lo cual es importante evaluar en los nuevos compuestos si poseen selectividad. La crisina y NOC han demostrado tener una gran ventaja sobre los quimioterapéuticos convencionales al no afectar la proliferación de células normales significativamente (en este caso linfocitos de sangre periférica humana), presentando un comportamiento dosis-dependiente y además de no inducir al pequeño porcentaje de células afectadas a una muerte necrótica.

En conjunto los resultados indican que la Crisina y NOC son buenos candidatos como posibles agentes terapéuticos en diferentes tipos de cáncer que vale la pena seguir estudiando.

CONCLUSIONES

- La crisina y NOC afectan el potencial proliferativo de células tumorales de las líneas CaSki, SK-LU-1 y MDA-MB-231 con valores de IC₅₀ de 6, 8 y 10 µg/ml y de 8, 6 y 9 µg/ml, respectivamente.
- La crisina y NOC no inducen a las líneas celulares de cáncer cervicouterino, pulmón y de mama a la muerte necrótica a las concentraciones probadas (IC₅₀).
- La crisina y NOC inducen a las células de CaSki y SK-LU-1 a la muerte por apoptosis.
- La crisina y NOC no inducen a las células de MDA-MB-231 a la muerte por apoptosis.
- La crisina y NOC inducen a la activación de la caspasa 8 y 9 en células Caski y SK-LU-1.
- La crisina y NOC aumenta la presencia de la proteína Bax en células Caski y, la presencia de Bid y Bax en células SK-LU-1.
- La crisina y NOC no afecta la proliferación de linfocitos humanos provenientes de sangre periférica, ni tampoco los induce a una muerte por necrosis en las IC₅₀ para crisina y para NOC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agudelo, M. & López, M. (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Iatreia*, 23 (2), Pág-166
2. Ai, X., Zheng, X., Tang, X., Sun, L., Zhang, Y., Qin, Y. & Cao, J. (2007). Induction of apoptosis of human gastric carcinoma SGC-7901 cell line by 5, 7-dihydroxy-8-nitrochrysin in vitro. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 13(28), 3824.
3. 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.
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell*. (6th ed.). New York: Garland Science.
5. Álvarez, E. & Orallo, F. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). *Acción frente al cáncer*, *Bioquímica* 22(10) 130– 140.
6. American Cancer Society (ACS). (2020). *Cáncer de cuello uterino*. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/>.
7. American Society of Clinical Oncology (ASCO). (2019). *Cáncer de mama*. Consultado el 12 de enero de 2021. Disponible en <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/cancer-de-mama/introducci%C3%B3n>
8. Amos, C., Wu, X., Broderick, P., Gorlov, I., Gu, J., Eisen, T. & Houlston, R. (2008). Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25. 1. *Nature genetics*, 40(5), 616-622.
9. Ashkenazi, A. & Salvesen, G. (2014). Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 337-356.
10. Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). (2018). *Cáncer de Cérvix*. Consultado el 18 de enero de 2021. Disponible en: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-cuello-uterino-cervix>.
11. Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). (2020). *Lung Cancer*. Consultado el 14 de enero de 2021. Disponible en <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-pulmon>.
12. Bahadori, M., Baharara, J., & Amini, E. (2016). Anticancer properties of chrysin on colon cancer cells, in vitro and in vivo with modulation of Caspase-3,-9, Bax and Sall4. *Iranian journal of biotechnology*, 14(3), 177.
13. Bhatla, N., Aoki, D., Sharma, D. & Sankaranarayanan, R. (2018). Cancer of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 143, 22-36.

14. Cartaya, O. (2013). Reseña bibliográfica flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*, 22(2), 5-14.
15. Cell Signaling Technology (CST). (2021). Disponible en <https://www.cellsignal.com/pathways>
16. Chylińska-Wrzos, P., Lis-Sochocka, M. & Jodłowska-Jędrych, B. (2017). Chrysin and its potential antineoplastic effect. *European Journal of Biological Research*, 7(3), 245-254.
17. Cooper, G. & Hausman, R. (2008). *La célula*. 4^o edición. Madrid: Marbán libros, S.L. 820pp.
18. Cory, S., & Adams, J. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* 2, 647-656.
19. Darby, S., Hill, D., Auvinen, A., Barros-Dios, J. M., Baysson, H., Bochicchio, F. & Heid, I. (2005). Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *Bmj*, 330(7485), 223.
20. De La Garza, J. & Juárez, P. (2014). *El cáncer*. Monterrey: Universidad Autónoma de Nuevo León
21. Doll, R., Peto, R., Boreham, J., & Sutherland, I. (2004). Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *Bmj*, 328(7455), 1519.
22. Elinos-Báez, C., Maldonado, V. & Zajgla, J. (2003). Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gaceta Médica de México*, 139(5), 493-499.
23. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicology Pathology*, 35(4):495-516.
24. Galani, E. & Christodoulou, C. (2009). Human papilloma viruses and cancer in the post-vaccine era. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(11): 977-981.
25. Galluzzi, L. et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25:486–541.
26. Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences*, 32, 37-43.
27. Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
28. Harwood, S., Yaqoob, M. & Allen, D. (2005). Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis. *The Association for Clinical Biochemistry* 42, 415–431.
29. Hong, T. B., Rahumatullah, A., Yogarajah, T., Ahmad, M., & Yin, K. B. (2010). Potential effects of chrysin on MDA-MB-231 cells. *International journal of molecular sciences*, 11(3), 1057-1069.
30. Instituto Nacional del Cáncer (NIC). (23 de julio del 2020). Definición de célula. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/celula>

31. Instituto Nacional del Cáncer (NIC). (2020). Tipos de tratamiento. Consultado el 19 de enero del 2021. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>.
32. International Agency for Research on Cancer. (IARC). (2004). Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 83. International Agency for Research on Cancer, Lyon; pp. 51.
33. International Agency for Research on Cancer. (IARC). (2020). Cancer Today. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/home>
34. Jordán J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. *Offarm*, 22(6), 100-6.
35. Josipović, P., & Oršolić, N. (2008). Cytotoxicity of polyphenolic/flavonoid compounds in a leukemia cell culture. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 59(4), 299-308.
36. Khoo, B., Chua, S. & Balaram, P. (2010). Apoptotic effects of chrysin in human cancer cell lines. *International journal of molecular sciences*, 11(5), 2188-2199.
37. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. & Hengartner, M. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death & differentiation*, 16, 3-11.
38. Li, X., Wang, J. N., Huang, J. M., Xiong, X. K., Chen, M. F., Ong, C. N., ... & Yang, X. F. (2011). Chrysin promotes tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis in human cancer cell lines. *Toxicology in vitro*, 25(3), 630-635.
39. Liu, J., Tozzi, F., Waterworth, D., Pillai, S., Muglia, P., Middleton, L. & Vollenweider, P. (2010). Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity. *Nature genetics*, 42(5), 436-440.
40. Lizarbe, I. (2007). El Suicidio y la Muerte Celular. *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 101, 2-33.
41. Loomis, D., Huang, W., & Chen, G. (2014). The International Agency for Research on Cancer (IARC) evaluation of the carcinogenicity of outdoor air pollution: focus on China. *Chinese journal of cancer*, 33(4).
42. Maasomi, Z. J., Soltanahmadi, Y. P., Dadashpour, M., Alipour, S., Abolhasani, S., & Zarghami, N. (2017). Synergistic anticancer effects of silibinin and chrysin in T47D breast cancer cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 18(5), 1283.
43. Machado, J. & Concepción, A. (2012). Apoptosis, mecanismo de acción. *Medimay*, 18(2), 138-153.

44. Mani, R. & Natesan, V. (2018). Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochemistry*, 145, 187-196.
45. Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C. & Boffetta, P. (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *European Respiratory Journal*, 48(3), 889-902.
46. Meza, J., Montañó, A. & Aguayo, A. (2006). Bases moleculares del cáncer. *Revista de investigación clínica*, 58(1), 56-70.
47. Meléndez, J. (2021). El ciclo celular. Consultado el 8 de febrero del 2021. Disponible en: <https://www.asturnatura.com/articulos/nucleo-mitosis-meiosis/ciclo-celular.php>
48. Momenimovahed, Z. & Salehiniya, H. (2017). Incidence, mortality and risk factors of cervical cancer in the world. *Biomedical Research and Therapy*, 4, 1795-1811.
49. Monasterio, A., Urdaci, M., Pinchuk, I., Lopez-Moratalla, N. & Martinez-Irujo, J. (2004). Flavonoids induce apoptosis in human leukemia U937 cells through caspase-and caspase-calpain-dependent pathways. *Nutrition and cancer*, 50(1), 90-100.
50. Nagasaka, M., Hashimoto, R., Inoue, Y., Ishiuchi, K. I., Matsuno, M., Itoh, Y. & Makino, T. (2018). Anti-tumorigenic activity of chrysin from *Oroxylum indicum* via non-genotoxic p53 activation through the ATM-Chk2 pathway. *Molecules*, 23(6), 1394.
51. Parajuli, P., Joshee, N., Rimando, A., Mittal, S. & Yadav, A. (2009). In vitro antitumor mechanisms of various *Scutellaria* extracts and constituent flavonoids. *Planta médica*, 75(01), 41-48.
52. Raina, R., Hussain, A., & Sharma, R. (2020). Molecular insight into apoptosis mediated by flavones in cancer. *World Academy of Sciences Journal*, 2(3), 1-1.
53. Rodríguez, L., Hernández, E. & Reyes, J. (2004). El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. *Biotecnología Aplicada*, 21:60-69.
54. Saccone, N., Culverhouse, R., Schwantes-An, T., Cannon, D., Chen, X., Cichon, S. & Bierut, L. (2010). Multiple independent loci at chromosome 15q25. 1 affect smoking quantity: a meta-analysis and comparison with lung cancer and COPD. *PLoS Genet*, 6(8).
55. Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G. & Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861–74.
56. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). (2021). Cáncer de mama. Disponible en: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cancer-de-mama?showall=1>

57. Suliman, A., Lam, A., Datta, R., & Srivastava, R. (2001). Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and independent pathways. *Oncogene* 20, 2122–33.
58. Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., Borji, A., Hasanzadeh, M., Jabbari, F., Farkhondeh, T., & Samini, M. (2016). Inhibitory and cytotoxic activities of chrysin on human breast adenocarcinoma cells by induction of apoptosis. *Pharmacognosy magazine*, 12(Suppl 4), S436.
59. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. & Berneman, Z. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36, 131–149.
60. Walle, T., Otake, Y., Brubaker, J. A., Walle, U. K. & Halushka, P. V. (2001). Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers. *British journal of clinical pharmacology*, 51(2), 143-146.
61. Woo, K., Jeong, Y., Park, J. & Kwon, T. (2004). Chrysin-induced apoptosis is mediated through caspase activation and Akt inactivation in U937 leukemia cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 325(4), 1215-1222.
62. Zhang, T., Chen, X., Qu, L., Wu, J., Cui, R., & Zhao, Y. (2004). Chrysin and its phosphate ester inhibit cell proliferation and induce apoptosis in Hela cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(23), 6097-6105.
63. Zhang, Q., Zhao, X. H., & Wang, Z. J. (2009). Cytotoxicity of flavones and flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line (KYSE-510) by induction of G2/M arrest and apoptosis. *Toxicology in vitro*, 23(5), 797-807.
64. Zhao, X. C., Tian, L., Cao, J. G., & Liu, F. (2010). Induction of apoptosis by 5, 7-dihydroxy-8-nitrochrysin in breast cancer cells: the role of reactive oxygen species and Akt. *International journal of oncology*, 37(5), 1345-1352.
65. Zhao, X. C., Cao, X. C., Liu, F., Quan, M. F., Ren, K. Q., & Cao, J. G. (2013). Regulation of the FOXO3a/Bim signaling pathway by 5, 7-dihydroxy-8-nitrochrysin in MDA-MB-453 breast cancer cells. *Oncology letters*, 5(3), 929-934.
66. Zheng, X., Meng, W. D., Xu, Y. Y., Cao, J. G., & Qing, F. L. (2003). Synthesis and anticancer effect of chrysin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13(5), 881-884.
67. Zong, W. & Thompson, C. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes & Development*, 20:1–15.