



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LUTEOLINA EN LA ANGIOGÉNESIS E INVASIVIDAD
EN LA LÍNEA CELULAR FADU DERIVADA DE
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE HIPOFARINGE.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

MANUEL ALEJANDRO SÁNCHEZ CARBALLIDO

Cd. Mx.

AÑO 2020





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS
VOCAL: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
SECRETARIO: FRANCISCA MORAYNA GUTIÉRREZ LUNA
1er. SUPLENTE: JAVIER AXOSCO MARIN
2° SUPLENTE: MANUEL GUTIERREZ AGUILAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Bioquímica, División de estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS

SUSTENTANTE:

MANUEL ALEJANDRO SÁNCHEZ CARBALLIDO

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, porque me acogió como mi segundo hogar, y me dio no solo la formación académica que necesitaba para llegar hasta este lugar, sino que también me dio una serie de experiencias invaluable que me hicieron un mejor ser humano.

A la Facultad de Química, por la oportunidad de formarme con una excelencia inigualable y darme increíbles personas que ahora son parte de mi vida.

A la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas, que en todo momento me brindó su apoyo no solo académico, también en el ámbito personal, y con la cual estoy muy agradecido por todos los recursos que me proporcionó, por todas sus enseñanzas desde Bioquímica Experimental hasta la fecha y por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo.

A todos los integrantes del Laboratorio de Bioquímica de la DEPEl, que, gracias a su apoyo en todo momento, mi estancia allí fue extraordinaria. Me llevo conmigo varios amigos y compañeros magníficos.

A la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, dónde se realizaron experimentos de citometría de flujo, con el apoyo de la Dra. Laura Sánchez Sandoval.

A la DGAPA, UNAM, que apoyó al proyecto con el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (IN230119)

Í N D I C E

	ABREVIATURAS	VII
	ÍNDICE DE TABLAS	VIII
	ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
1.	Resumen.....	1
2.	Introducción	2
	2.1 Cáncer.....	2
	2.1.1 Clasificación del cáncer.....	4
	2.1.2 Causas del cáncer.....	5
	2.1.3 Factores de riesgo.....	9
	2.2 Cáncer de cabeza y cuello.....	16
	2.2.1 Epidemiología.....	16
	2.2.2 Factores de riesgo del cáncer de cabeza y cuello.....	19
	2.2.3 Patogénesis.....	22
	2.3 Cáncer de hipofaringe.....	24
	2.3.1 Tratamiento contra el cáncer hipofaríngeo.....	26
	2.3.2 Epidemiología del cáncer hipofaríngeo.....	27
	2.4 Flavonoides.....	28
	2.4.1 Luteolina.....	31
	2.5 Antecedentes.....	33
3.	Justificación.....	36
4.	Hipótesis.....	37
5.	Objetivo.....	37
	5.1 Objetivos particulares.....	37
6.	Materiales y Métodos.....	38
	6.1 Equipo.....	38
	6.2 Materiales.....	39
	6.2.1 Material biológico.....	40
	6.3 Métodos.....	40
	6.3.1 Cultivo celular.....	40
	6.3.2 Ensayo de viabilidad con MTT.....	41
	6.3.3 Ensayo de viabilidad con diacetato de fluoresceína.....	41
	6.3.4 Ensayo de cierre de herida.....	42

6.3.5	Ensayo de Transwell.....	42
6.3.6	Ensayo de TUNEL.....	42
6.3.7	Análisis del ciclo celular.....	43
6.3.8	Western Blot.....	43
6.3.9	ELISA para VEGF.....	45
6.3.10	RT- PCR.....	45
6.3.11	Análisis estadístico.....	45
7.	Resultados.....	46
7.1	Efecto de luteolina en la viabilidad celular.....	46
7.2	Efecto de luteolina en la cierre de herida.....	48
7.3	Efecto de luteolina en la migración celular.....	48
7.4	Efecto de luteolina en la angiogénesis.....	49
7.5	Efecto de luteolina en la apoptosis.....	50
7.6	Efecto de luteolina en el ciclo celular.....	51
7.7	Efecto de luteolina en la vía de señalización PI3K/AKT y MAPK.....	52
8.	Discusión.....	53
9.	Conclusiones.....	60
10.	Perspectivas.....	61
11.	Referencias bibliográficas.....	62

ABREVIATURAS

AKT	Proteína cinasa B (PKB)
AP-1	Proteína activadora 1
Ara C	Arabinósido de citosina
EFG	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EKR	Cinasa regulada por señales extracelulares
FDA	Diacetato de fluoresceína
IC50	Concentración inhibitoria media
IKK	Cinasa de I κ B
JNK	Cinasa de c-Jun N-terminal
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MMP	Metaloproteinasas de matriz extracelular
mTOR	Blanco de rapamicina en células de mamífero
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NF-κB	Factor nuclear potenciados de las cadenas kappa en las células B activadas
PBS	Buffer de fosfatos salino
PDK1	Proteína cinasa-1 dependiente de 3-fosfoinosítido
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-trifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKA	Proteína cinasa A
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato-3-fosfatasa (Phosphatase and tensin homolog)
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	Receptor de factor de crecimiento endotelial vascular
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPH	Virus del papiloma humano

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de genes supresores de tumores y tipos de cáncer relacionados con su alteración.....	6
Tabla 2. Ejemplos de oncogenes y tipos de cáncer relacionados con su expresión.....	8

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de progresión del cáncer.....	3
Figura 2. Tasa de incidencia de cáncer, de neoplasias más frecuentes.....	17
Figura 3. Tasa de incidencia de cáncer, de cada país.....	18
Figura 4. Mecanismos de carcinogénesis propuestos para el consumo de etanol.....	21
Figura 5. Alteraciones moleculares y progresión del cáncer de cabeza y cuello.....	23
Figura 6. Vías de señalización molecular involucradas en el desarrollo de cáncer de cabeza y cuello.....	24
Figura 7. Regiones en las que se puede presentar los diferentes tipos de cáncer de cabeza y cuello.....	25
Figura 8. Esqueleto básico de los flavonoides.....	29
Figura 9. Subdivisiones de los flavonoides.....	29
Figura 10. Estructura de la luteolina.....	32
Figura 11. Células FaDU.....	41
Figura 12. Ensayo de MTT con luteolina en células FaDu.....	46
Figura 13. Ensayo fluorométrico de citotoxicidad en microcultivo con luteolina en células FaDu.....	47
Figura 14. Ensayo de Curación de Herida.....	48
Figura 15. Ensayo de migración e invasión celular con Transwell.....	49
Figura 16. ELISA para VEGF.....	49
Figura 17. Expresión de VEGF.....	50
Figura 18. Ensayo de TUNEL.....	50
Figura 19. Ensayo de citometría de flujo para evaluar el ciclo celular.....	51
Figura 20. Evaluación de proteínas de las vías MAPK y PI3K/AKT.....	52

1. Resumen

Alrededor del 71% de las muertes en el mundo son causadas por enfermedades no transmisibles, entre las causas más destacadas se encuentra el cáncer, este engloba una serie de enfermedades caracterizadas por una proliferación descontrolada, cambios fenotípicos, alteración de las vías de señalización, aumento en migración, capacidad de invasión y en la supervivencia celular. El cáncer de células escamosas de cabeza y cuello ocupa la sexta posición en cuanto a su prevalencia en el mundo y representa el 3% de todos los tipos de cáncer. Se origina en múltiples sitios anatómicos entre los que se encuentra: la cavidad oral, faringe, laringe, senos paranasales, cavidad nasal, glándulas salivales y lengua. Entre los factores de riesgo asociados a esta patología se encuentran el consumo de alcohol y tabaco, y las infecciones por virus del papiloma humano (VPH). Entre los protocolos de tratamiento se encuentra: la radioterapia, quimioterapia y cirugía con consecuencias contraproducentes en los pacientes entre las que se encuentran: fatiga, pérdida de peso, dolor, pérdida de cabello, vómitos, diarreas, dificultad al hablar, comer y respirar. Por este motivo desde el siglo pasado diversas investigaciones se han abocado en la búsqueda de nuevos fármacos que no produzcan todos estos efectos adversos en los pacientes, entre los que se encuentran los flavonoides. Se ha reportado que estos compuestos exhiben una amplia variedad de efectos biológicos, uno de estos efectos es la actividad anti-tumoral. En particular la luteolina (3,4,5,7-tetrahidroxi flavona) es una flavona presente en el apio, zanahoria, brócoli, cebolla y perejil, y se ha demostrado que esta molécula puede inhibir la proliferación de varios tumores entre los que se encuentran el de mama, colon, próstata, glioblastoma y pancreático con una concentración inhibitoria media (IC_{50}) de 3 a 50 μM . Por este motivo es que en el proyecto se evaluó el efecto de la luteolina en la línea celular FaDu derivada de carcinoma de células escamosas de hipofaringe en diversos procesos de la progresión del cáncer. Logrando determinar que la luteolina puede disminuir la viabilidad celular (IC_{50} 24 h: 19.59 μM ; IC_{50} 48 h: 12.16 μM ; IC_{50} 72 h: 7.917 μM), así como la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), inhibir la migración y la capacidad invasiva, así como modular algunos de los integrantes de las vías de AKT/PI3K y MAPK, que se encuentran asociadas a este padecimiento. Lo que la posiciona como una molécula de interés terapéutico en este tipo de padecimientos.

2. Introducción

2.1 Cáncer

El cáncer engloba una serie de enfermedades relacionadas, que pueden desarrollarse prácticamente en cualquier parte del cuerpo. Se caracterizan por una alteración sobre varios sistemas de regulación de las células sanas, ocasionando una proliferación descontrolada, cambios fenotípicos, alteración de las vías de señalización, aumento en migración, la capacidad invasiva y en la supervivencia celular.

Las células cancerosas ya no presentan una morfología y función especializada normal, debido a que pueden multiplicarse exponencialmente de manera muy rápida y sin control, ignorando las señales que le indican la detención de la división celular, así como la señal de inducción de apoptosis. Estas mismas células tienen la capacidad de generar microambientes que causan la evasión de la respuesta inmune, y también pueden liberar señales que promueven en las células aledañas la formación de tejidos y vasos sanguíneos, para poseer una mayor protección para su supervivencia y, aumentar el suministro de oxígeno y nutrientes.

El progreso de estas enfermedades (**Figura 1**), conlleva una desdiferenciación celular y un proceso denominado transición epitelio-mesénquima, la cual consiste en el cambio fenotípico que permite la generación de células similares a las embrionarias en cuanto a la capacidad de migración y replicación rápida se refiere, dando lugar a la formación de cúmulos celulares llamados tumores; en el caso de los tumores cancerosos o también llamados malignos pueden extenderse e invadir otros órganos, esto sucede cuando las células de estos conglomerados presentan la capacidad de separarse y diseminarse a lugares alejados en el cuerpo utilizando como transporte el sistema circulatorio y/o el linfático, cuando este fenómeno se presenta, se le denomina metástasis [1].

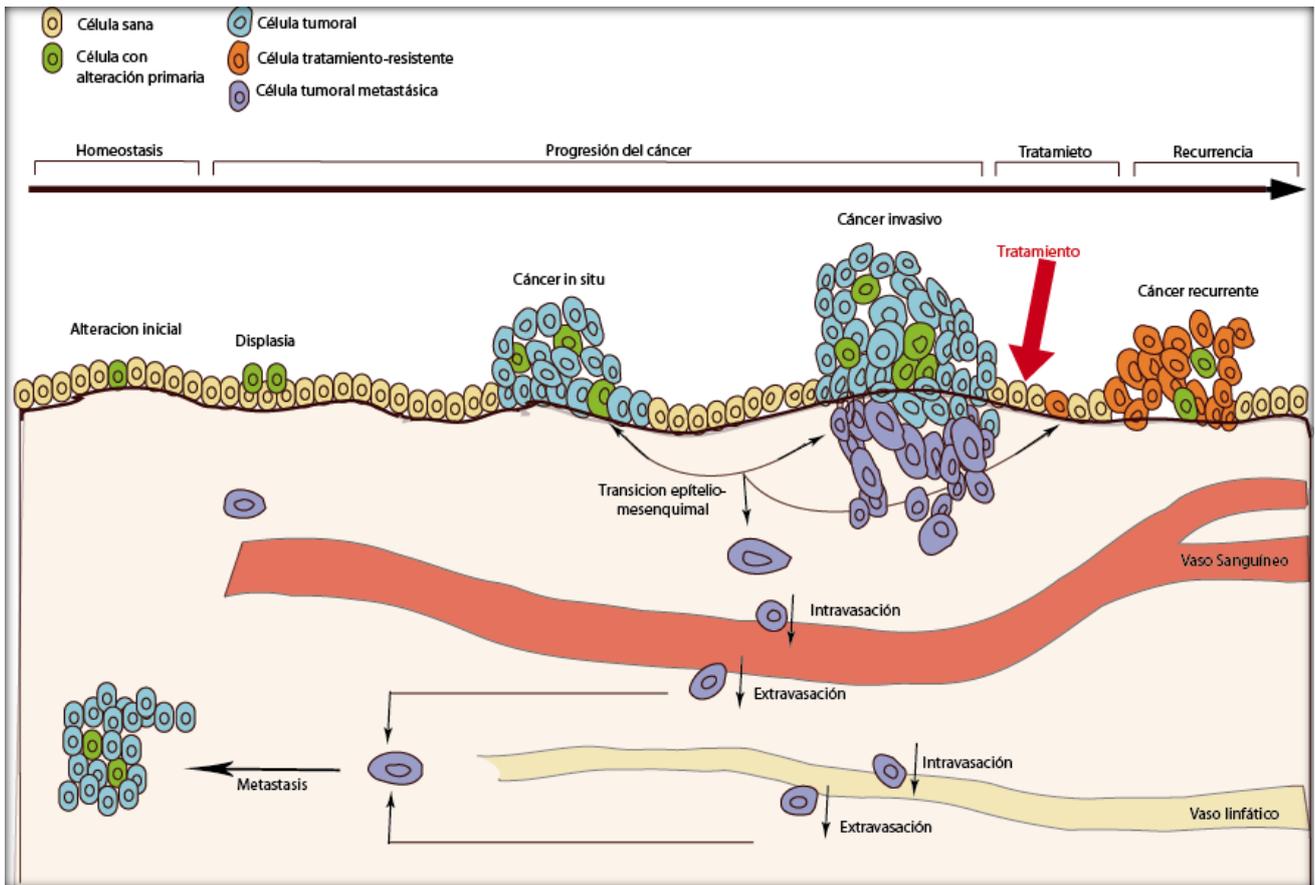


Figura 1. Etapas de progresión del cáncer. En este esquema se muestra el progreso en la formación de tumores, comenzando por una alteración inicial dando lugar a una displasia, que al proliferar y acumular más mutaciones da lugar a un cáncer *in situ*, mediante diferentes señales y estímulos las células comienzan el proceso de transición epitelio-mesenquimal lo que provoca fenómenos de migración, intravasación y subsecuente extravasación para dar inicio a la metástasis. A la consolidación de tumores a pesar de haber sido sometido a un tratamiento, se le denomina cáncer recurrente. Tomada y modificada de: [2]

Alrededor del 71% de las muertes en el mundo son causadas por enfermedades no transmisibles, entre las más destacadas se encuentra el cáncer. En reportes publicados en 2018 se menciona que en el año 2016 el cáncer, particularmente, de pulmón, tráquea y bronquios, se encontraba en el sexto lugar de las causas más comunes de muertes en el mundo, sin embargo, al compararlo con años anteriores, en el año 2000, este mismo padecimiento se encontraba en el noveno lugar y conociendo la tendencia en aumento que han seguido otros tipos malignidades proliferativas, como se ha visto también en las neoplasias de hígado y estómago [3], es de esperarse que continúe aumentando el porcentaje y proporción de muertes causadas por el cáncer, volviéndolo uno de los problemas de salud pública más relevantes.

2.1.1 Clasificación de cáncer

El nombre que recibe cada tipo de cáncer está en relación directa al órgano o lugar del cuerpo donde se presenta esta enfermedad. Sin embargo, también existe la clasificación del cáncer dependiendo el tipo de células que se ven afectadas; por ejemplo:

Carcinoma: según lo reportado por *Cancer Research UK*, alrededor del 85% del cáncer son carcinomas. Los carcinomas se presentan en el tejido epitelial, este se encuentra recubriendo la superficies externas y cavidades internas del cuerpo [4].

Los carcinomas se subdividen, dependiendo la función y morfología celular, en:

- Carcinomas de células escamosas: también llamadas “células epidermoides”, son células que poseen una morfología plana, se encuentran en la superficie exterior de piel y recubriendo la garganta, esófago, y algunos órganos como la vejiga, pulmones, estómago e intestinos.
- Adenocarcinomas: se presenta en células glandulares exocrinas.
- Carcinomas de células de transición: se presentan en células del tejido de transición, el cual también es denominado como urotelio, ya que se encuentran principalmente en el revestimiento de vejigas uréteres y parte de los riñones.
- Carcinomas de células basales: se genera en las células de la capa más profunda de la epidermis.

Sarcoma: Se presenta en tejidos conectivos y de soporte, presentes en el cuerpo, y se subdividen en:

- Cáncer de hueso
- Sarcoma de tejidos blandos: como son los cartílagos, nervios, tendones, músculos, tejido adiposo y vasos sanguíneos.

Leucemia: es uno de los tipos de cáncer más común en niños, este padecimiento se da en las células de la médula ósea que se encargan de la producción de células sanguíneas, por este motivo los tumores que se desarrollan no son sólidos y, las células transformadas se liberan y acumulan en la sangre.

Linfoma y mieloma múltiple: el linfoma es un tipo de cáncer que comienza con una proliferación descontrolada de linfocitos, los cuales se acumulan, principalmente, en vasos y ganglios linfáticos, y en el caso de encontrarse en diferentes órganos, no pueden realizar sus funciones normales.

En el caso del mieloma múltiple, las células que se afectan se denominan células plasmáticas, las cuales se forman en médula ósea, por lo que se acumulan y generan tumores dentro de los huesos, y al no poseer un correcto funcionamiento, la producción de anticuerpos disminuye notablemente.

Melanoma: se presenta en las células que dan lugar a los meloncitos, principalmente se da en la piel. Sin embargo, se puede desarrollar en otros tejidos pigmentados, como son los ojos [1].

Tumores del sistema nervioso central: se presenta en las diferentes células de las cuales está compuesto el cerebro y la médula espinal. Sí bien, no es de los tipos de cáncer más comunes, si es de los más difíciles de tratar por la localización del tumor [4].

Otros tipos de tumores

- Tumores de células germinativas: se da la alteración en células que generan espermatozoides o los óvulos.
- Tumores neuro-endocrinos: se presenta en células que secretan hormonas en respuesta a señales nerviosas.
- Tumores carcinoides: es un subtipo de los tumores neuro-endocrinos, sin embargo, poseen una capacidad mayor para diseminarse y, secretar prostaglandinas y serotonina [1].

2.1.2 Causas del cáncer

La causa exacta de la aparición del cáncer nunca es la misma y no siempre es posible determinarla, ya que se considera una enfermedad multifactorial, esto se debe a que son necesarias varias condiciones, incluyendo componentes genéticos y/o ambientales, para que se presente este padecimiento. Sin embargo, la alteración de las células que conlleva a la presencia del cáncer está relacionada con cambios en la expresión génica, principalmente

con mutaciones en genes supresores de tumores, genes reparadores del ácido desoxirribonucleico (DNA) y de proto-oncogenes.

Los primeros están relacionados con el control de crecimiento y división celular, estos provocan una disminución de la división celular y se encuentran involucrados en señales de inicio de la apoptosis. Como es el caso de el gen TP53, el cual codifica a la proteína p53, la cual es un factor de transcripción que regula la expresión de genes relacionados con la inducción de la apoptosis, el arresto del ciclo celular, senescencia, cambios en el metabolismo y reparación de DNA.

Si llega a presentarse una alteración en ambos alelos, que dé lugar a una inactivación de estos genes (**Tabla 1**), se bloquearán los mecanismos de inducción de apoptosis y se generará una replicación continua y excesiva, y de manera *in vivo* se reflejará como el crecimiento de tumores y el incremento del potencial metastásico [5, 6].

Tabla 1. Ejemplos de genes supresores de tumores y tipos de cáncer relacionados con su alteración.

Gen	Función de proteína codificada	Síndrome de cáncer familiar	Cánceres por mutaciones esporádicas
p53	Factor de transcripción	Síndrome de Li-Fraumeni (tumores múltiples)	Varios, aproximadamente el 50% de los tumores
RB	Regulación la transcripción	Retinoblastoma	Retinoblastoma, osteosarcoma, carcinoma de mama, pulmón y vejiga
PTEN	Fosfatidilinositol-3-fosfatasa	Síndrome de Cowden	Glioblastoma, Cáncer de próstata, tiroides y endometrio
WT1	Regulación transcripcional	Tumor de Wilms	Cáncer infantil de riñón
APC	Unión y degradación de β -catenina, involucrada en la vía de señalización de Wnt	Poliposis adenomatosa familiar	Carcinoma de colon y estómago
NF1	Actividad Ras-GAP	Neurofibromatosis tipo I	Astrocitoma y carcinoma de colon
VHL	Respuesta a hipoxia	Síndrome de von Hippel-Lindau	Carcinoma de células renales, cerebeloso y hemangiosarcoma

LKB1	Fosforila y activa AMPK para desactivar mTOR	Síndrome de Peutz-Jeghers	Adenocarcinoma de pulmón
-------------	--	---------------------------	--------------------------

Tomada y modificada de: [7]

El material genético de cada una de nuestras células se encuentra expuesto continuamente a diversos agentes de nuestro entorno que logran dañarlo, entre estos se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), la radiación, compuestos intercalantes y múltiples otras sustancias químicas que pueden interactuar con este y afectar su síntesis, así como alterar la información genética, resultando en la producción de proteínas incompletas, modificadas o no funcionales. Por esta razón es que existen un grupo de genes, llamados reparadores de DNA, que al expresarse pueden generar proteínas que tienen la capacidad de reestructurar el DNA y rectificar la secuencia que normalmente debe de presentarse en cada célula, lo que permite eliminar mutaciones que sean causantes de la transformación de las células a células cancerosas.

Entre estos genes se encuentran los que codifican proteínas para los sistemas de: Reparación por escisión de bases (BER, por sus siglas en inglés), reparación por escisión de nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés), reparación por desapareamiento de bases (MMR, por sus siglas en inglés). También existen genes que al expresarse producen proteínas con la capacidad de eliminar daños mayores al promover la recombinación entre dos cadenas de DNA, así como los que codifican para enzimas que eliminan las lesiones causadas por alquilación, principalmente de las guaninas, que son las que tiene un peso más crítico en la modificación de expresión génica, entre estas enzimas se encuentra la O6-metilguanina-ADN-metiltransferasa (MGMT) [8]. Sin embargo, si estos genes se alteran, la protección que confieren se disminuye; generando así una propensión al desarrollo de cáncer por acumulación de daños en el DNA.

En el caso de los proto-oncogenes son genes que se encuentran normalmente en todas nuestras células somáticas o que son insertados por virus al ser infectadas, existen algunos que normalmente están relacionados con crecimiento, supervivencia y división celular (**Tabla 2**), sin embargo, diversas mutaciones pueden dar lugar a oncogenes activos, y con esto se mantiene su expresión sin ninguna regulación, ocasionando una replicación desmedida, aun cuando existan señales inhibitorias de estos procesos, favoreciendo el fenotipo cancerígeno [1, 9, 10].

Tabla 2. Ejemplos de oncogenes y tipos de cáncer relacionados con su expresión.

Oncogen	Identificación	Tipo de neoplasia en la que se expresa	Función proteica
Factores de crecimiento			
INT2	Inserción proviral	Carcinoma mamario	Producción constitutiva de factores de crecimiento fibroblástico (FGF)
HST	Transfección de DNA	Carcinoma estomacal	Producción constitutiva de FGF
Receptores de factores de crecimiento			
EGRF	Amplificación de DNA	Carcinoma de células escamosas	Sobre expresión de receptor de factores de crecimiento epidérmico
MAS	Transfección de DNA	Carcinoma epidermoide	Rearreglo de región no codificante 5'
Transductores de señales			
SRC	Homólogo viral	Carcinoma de colon	Activación constitutiva de tirosin cinasas.
v-YES	Homólogo viral	Sarcoma	Activación constitutiva de tirosin cinasas.
v-MOS	Homólogo viral	Sarcoma	Activación constitutiva de cinasas de serina y treonina.
PIM-1	Mutagénesis de inserción	Linfoma de células T	Activación constitutiva de cinasas de serina y treonina.
Factores de transcripción			
L-MYC	Amplificación de DNA	Carcinoma de pulmón	Desregulación del factor de transcripción.
v-FOS	Homólogo viral	Osteosarcoma	Desregulación del factor de transcripción AP-1
v-JUN	Homólogo viral	Sarcoma	Desregulación del factor de transcripción AP-1
Otros			
BCL2	Translocación cromosomal	Linfoma de células B	Actividad constitutiva de

			proteínas antiapoptóticas
MDM2	Amplificación de DNA	Sarcomas	Generación de complejos de p53

Tomada y modificada de: [11]

2.1.3 Factores de riesgo

Como ya se mencionó anteriormente, para que comience el desarrollo del cáncer es necesario que se presenten varias condiciones. Sin embargo, existen los llamados factores de riesgo, los cuales pueden ser condiciones ambientales, estilos de vida, exposición a ciertas sustancias o radiación de ciertas frecuencias; que son capaces de aumentar la probabilidad y facilidad que presenta un organismo para el desarrollo del cáncer.

Todos estos factores de riesgo se definen generalmente por medio de la epidemiología, con la que se puede investigar si existe algo común a lo que fue expuesta una población que presenta cáncer, y comparado contra una población sana determinar alguna asociación que indique un detonante de este padecimiento. Entre los factores de riesgo más estudiados se encuentran:

- **Antecedentes familiares:** existen mutaciones que presentan ciertas familias, que pueden ser heredadas a la siguiente generación, las cuales causan sobre la descendencia, una predisposición al desarrollo de, generalmente, un tipo de cáncer específico. Cuando esto ocurre se le conoce como síndromes hereditarios de cáncer o cáncer familiar.
- **Dieta:** a lo largo del tiempo se han evaluado diversos alimentos y componentes de la dieta, de las personas que tienen cáncer y de las que no presentan este padecimiento, con el fin de encontrar una relación que indique si alguno de estos aumenta o disminuye el riesgo de padecer cáncer. En estudios previos se ha sugerido que el consumo de vitamina D, calcio, té, verduras con compuestos polifenólicos y otros antioxidantes, pueden reducir la probabilidad de presentar ciertos tipos de cáncer. Por otra parte, el consumo de edulcorantes artificiales, embutidos, comidas fritas o asadas a altas temperaturas, pueden aumentarla. Sin embargo, los estudios que se han realizado hasta el momento no arrojan una alta significancia de la existencia de dicha correlación como la hay para otros factores con mayor peso, que pueden promover o limitar la aparición de neoplasias [80].

- **Alcohol:** a diferencia de muchos otros componentes de la dieta, se ha demostrado que el consumo crónico de elevadas cantidades de etanol presenta una asociación significativa de manera dosis dependiente con el aumento de la probabilidad de desarrollar cáncer. Los mecanismos que generan esta inducción de la presencia de neoplasias aún se encuentran en investigación. Sin embargo, se ha descubierto que el propio metabolismo del etanol puede generar ROS, causantes de estrés oxidativo, también se ha visto que produce inflamación crónica. Otros de los mecanismos estudiados son los relacionados con el acetaldehído, el cual es el compuesto más tóxico derivado del metabolismo del etanol, y que incluyen: la interferencia con la replicación del DNA, daño genotóxico, formación de aductos de DNA, desregulación hormonal, disminución de actividad y viabilidad de células del sistema inmune, el cual normalmente actúa para detener el progreso del cáncer [12].

Existen factores genéticos que predisponen aún más al desarrollo de tumores relacionado con el consumo de alcohol, uno que se encuentra descrito en diversos artículos es un polimorfismo que codifica a una menor cantidad de aldehído deshidrogenasa (ALDH) o para una variante de esta enzima con menor actividad; esta enzima es la responsable de oxidar el acetaldehído a acetato, el cual no es tóxico. Cuando se presenta este polimorfismo causa una acumulación de acetaldehído, incrementando así los daños mencionados anteriormente que puede ocasionar esta molécula.

Se estima que el promedio a nivel mundial de personas que tienen cáncer relacionado con el consumo de alcohol es de 3.6%, siendo alrededor del 5.2% de los casos de cáncer en hombres y 1.7% en mujeres [13]. En estudios realizados por *International Agency for Research on Cancer*, revelan que los 8 tipos de cáncer que tienen una mayor relación con el consumo de etanol son de: colon, recto, hígado, cavidad oral, faringe, laringe, esófago y de mama, este último principalmente en mujeres. También el consumo de alcohol se ha visto íntimamente relacionado con cáncer de estómago, páncreas y pulmón [13].

- **Tabaco:** El uso regular del tabaco y la exposición pasiva a sustancias presentes en esta planta, es uno de los factores de riesgo principales para el desarrollo de cáncer, y es causante del mayor número de muertes, aproximadamente el 30%, ligadas con este padecimiento [14].

Se ha demostrado que la utilización de esta sustancia de abuso, en sus distintas presentaciones, exhibe una estrecha relación con la evolución de diversos tipos de cáncer. En el caso del consumo productos de tabaco que para su utilización es necesaria su combustión para posteriormente ser inhalados, se encuentra asociado al aumento de, principalmente, cáncer de pulmón y tracto aéreo digestivo superior, este último incluye cáncer de cavidad oral, cavidad nasal, laringe, faringe, esófago; sin embargo se ha visto asociado también al aumento en riesgo de presentar cáncer de estómago, recto, colon, cérvix, cuello uterino, riñón, vejiga, páncreas, hígado e incluso leucemia mieloide aguda. El uso de tabaco masticado o en polvo para ser inhalado, se encuentra emparentado en mayor medida con el desarrollo de cáncer de boca, esófago y páncreas [15].

El tabaco contiene diversas sustancias carcinogénicas, sin embargo, en el caso particular del cigarro comercial se han caracterizado más de 60 moléculas que pueden producir cáncer, entre los que se destacan:

- Carcinógenos fuertes: hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs), nitrosaminas y aminas aromáticas [16].
- Carcinógenos moderados y débiles: acetaldehído, formaldehído, benceno, 1,3-butadieno, óxido de etileno, otros compuestos n-nitrosos, compuestos inorgánicos como el cadmio y otras trazas de metales [17].

De los mecanismos más estudiados de promoción del cáncer por consumo de tabaco, son: debilitamiento del sistema inmune impidiendo la eliminación de células neoplásicas [18], metilación inespecífica del DNA, formación de aductos de proteínas o de DNA, translocaciones cromosómicas y mutaciones ocasionadas principalmente por transversiones entre timina y guanina [14].

Existe un efecto de sinergia para el desarrollo de cáncer, entre el consumo de alcohol y tabaco, esto se puede ver en 3 casos principales en el tracto aerodigestivo superior:

- El uso de cigarrillos duplica la concentración de acetaldehído acumulado en las mucosas.
- El alcohol vuelve más permeable a las mucosas generando una mayor absorción de moléculas carcinógenas presentes en el tabaco.
- Incrementa la activación de CYP2E1, el cual es encargado de metabolizar muchas de las sustancias generadas por el alcohol y tabaco, aumentando significativamente el estrés oxidante [13,19].

- **Edad:** Se han realizado diversos meta-análisis para determinar si existe una relación entre el envejecimiento y el desarrollo del cáncer. En estudios realizados en 2009 se determinó que un poco más de la mitad de los cánceres se presentaba en adultos de 65 años o mayores, y que dadas las tendencias se estimaba que, en el 2030, el 70% de los casos de cáncer se presentarán en este intervalo de edad. Sin embargo, también se ha podido observar en los datos recopilados, que, en las personas longevas que tienen alrededor de 90 años o más, es poco común el desarrollo de esta enfermedad.

A partir de diversos estudios se ha logrado determinar que el desarrollo del cáncer no es consecuencia directa del envejecimiento, y tiene una relación más estrecha con otros factores de riesgo como: la acumulación de mutaciones oncogénicas genéticas y epigenéticas, la disminución de la función del sistema inmune, la inflamación crónica y mayor exposición a carcinógenos físicos y químicos del ambiente u ocupacionales. Sin embargo, si se ha visto una relación entre la vida media, aproximadamente los 45 años en adelante, la susceptibilidad a la radiación ionizante y radiación ultravioleta (UV), y a presentar padecimientos crónicos que aumenten las probabilidades de presentar neoplasias, como son: alcoholismo, tabaquismo, diabetes, obesidad, síndrome metabólico e infecciones crónicas.

Teniendo todo lo anterior en cuenta, se logró determinar que la restricción calórica, la realización de ejercicio regularmente, evitar la exposición a carcinógenos y el cuidado especial para prevenir enfermedades hereditarias, conlleva a que el envejecimiento por sí mismo no sea un causante directo de la generación de tumores [20].

- **Hormonas:** El papel que desempeñan las hormonas en el organismo, es de suma importancia, estas son moléculas que tienen la capacidad de regular la mayoría de los procesos básicos, como es el sueño y el hambre; hasta procesos de mayor complejidad como es la reproducción, crecimiento, metabolismo e incluso el estado de ánimo. Por esta razón es que se ha estudiado el efecto que pueden presentar estos mensajeros químicos, sobre la progresión o riesgo para presentar neoplasias. Entre las hormonas, las femeninas, y particularmente los estrógenos se han considerado que son potenciales carcinógenos, principalmente en el desarrollo de tipos de cáncer relacionados con el sistema reproductor, por ejemplo: cáncer de

mama, endometrio, ovario y testículos; teniendo un marcado efecto de inducción sobre la división celular [21]. Además, la deficiencia de estrógenos durante la menopausia, también se ha visto relacionada con un aumento en del riesgo para desarrollar cáncer oral [22].

En la literatura se encuentra descrito que existen otros tipos de cáncer que su desarrollo puede afectarse por la actividad hormonal. En el caso particular del carcinoma oral de células escamosas, la progresión de este se ha asociado a la sobreexpresión y/o sobreactivación de los receptores de estrógeno, ocasionando una mayor supervivencia celular, un incremento en la formación de tumores y metástasis [23, 24].

- **Sistema inmune:** a partir de diversos estudios se ha determinado que el sistema inmune juega un papel de gran relevancia en procesos involucrado con el cáncer. Cuando una célula se vuelve neoplásica, comienza una modificación de su matriz extracelular y membrana plasmática, llegando a exteriorizar antígenos tumorales en su superficie. Por otra parte, la polaridad celular, que hace referencia a que en ciertos tejidos las células presentan una orientación especial que permite el paso de sustancias de manera selectiva y presentan diferentes concentraciones de moléculas en cada parte de la célula, se pierde al convertirse en cancerígenas. Estas modificaciones pueden ser reconocidas por células del sistema inmune innato y adaptativo, y con ello montar una respuesta inmune para eliminar a las células transformadas. Sin embargo, en algunos casos este proceso es un promotor del desarrollo de cáncer, ya que existe un proceso al que se le denomina “escape” en el que se eliminan las células inmunogénicas y se seleccionan a las células cancerígenas más agresivas, que son aquellas que tienen la capacidad de inhibir la expresión de antígenos tumorales y además generar un microambiente antiinflamatorio que evite su reconocimiento y destrucción. También existen células del sistema inmune que se polarizan a pro-tumorales, promoviendo la angiogénesis y la capacidad invasiva. Otro de los procesos relacionados con este factor de riesgo es la inflamación crónica, la cual es asociada al 25% del cáncer que se presenta a nivel mundial. La inflamación crónica provoca un aumento en la fibrosis, angiogénesis, proliferación celular, remodelamiento de la matriz extracelular, evasión del sistema inmune y activación de vías de señalización anti apoptóticas, con el fin de restaurar los tejidos dañados, sin embargo, una activación prolongada puede generar

inestabilidad genómica y esta a su vez, propiciar un descontrol de estos procesos, promoviendo la formación de tumores [25].

La inmunosupresión también es considerada como un factor de riesgo para presentar cáncer, ya que como se mencionó anteriormente el sistema inmune puede prevenir la progresión de esta enfermedad, y si este se encuentra debilitado, se evitará el reconocimiento y destrucción de las células cancerosas, y/o dificultará la eliminación infecciones que aumentan el riesgo de algunos tipos de cáncer [26].

- **Infecciones:** existen múltiples agentes infecciosos que se encuentran relacionados con ciertos tipos de cánceres, estos pueden ser bacterias virus e inclusive parásitos. Los mecanismos por los cuales se promueve la aparición de ciertas neoplasias dependen del tipo de agente. En el caso de los virus, uno de los principales procesos que conllevan al desarrollo de cáncer es la incorporación de su material genético al DNA de las células hospedera para la replicación de estos, ya que puede insertarse en genes importantes para la regulación celular, activando oncogenes, inhibiendo genes supresores de tumores y causando mutaciones en los genes mencionados anteriormente en el apartado de causas.

También los virus, junto con las bacterias y parásitos pueden promover el desarrollo de tumores a partir de la inmunosupresión e inflamación crónica, mencionadas anteriormente.

Entre los agentes infecciosos con más menciones en la literatura se encuentran:

- Virus de Epstein-Barr (VEB): alrededor del 90% de toda la población en el mundo se encuentra infectada por este virus, y se ha visto relacionado con algunos tipos de linfoma y, con cáncer de nariz y garganta.
- Virus de la hepatitis B y C (VHB y VHC) se encuentra relacionado principalmente con el desarrollo de cáncer de hígado, por ser el blanco de infección de este virus.
- Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH): este se encuentra ligado con la promoción de principalmente 3 tipos de cáncer, el de cérvix, sarcoma de Kaposi y el linfoma de células B no Hodgkin. También se ha visto relacionado con otras neoplasias en recto, hígado, cavidad oral, faringe, pulmón, útero y linfoma de Hodgkin. Esta asociación se ha hecho principalmente por la inmunosupresión que genera esta infección más que por inducción directa.

- Herpes virus humano-8: esta infección es relativamente común, sin embargo, si se encuentra concomitante con infección con VIH, se ha visto asociada al incremento de probabilidad de desarrollar sarcoma de Kaposi.
 - Virus del papiloma humano (VPH): existen alrededor de 200 tipos virus en este grupo, y alrededor de 40 son los más fáciles de contagiar. Se ha calculado que cerca del 90% de las personas alrededor del mundo son infectadas en su vida por un virus de este conjunto, sin embargo, el tipo 18 y 16, son considerados VPH de alto riesgo por su relación estrecha con la promoción de diversos tipos de cáncer. Casi el 100% de cáncer en el cuello uterino está relacionado con esta infección. Otros de los cánceres asociados con VPH genotipo 16 son los de ano, vagina, vulva, pene y cánceres orofaríngeos, en la base de la lengua, amígdalas, parte central de la garganta y el paladar.
 - *Helicobacter pylori*: ciertas cepas de esta bacteria tienden a promover el cáncer de estómago, causada por inflamación crónica relacionada al tipo daño que provoca sobre la mucosa estomacal.
 - Gusanos planos: parásitos como *Opisthorchis viverrini* y *Schistosoma hematobium*, promueven cáncer de vías biliares y vejiga, respectivamente [1].
 - Periodontopatógenos: *Tannarella forsythia* y *Porphyromonas gingivalis* son bacterias anaeróbicas y Gram negativas, presentes en la microbiota bucal, y que pueden invadir el tejido periodontal. Esta invasión genera la inducción de la liberación de citocinas proinflamatorias, inmunosupresión por degradación de inmunoglobulinas y sobreexpresión de metaloproteinasas de matriz extracelular; todos estos factores están íntimamente relacionados la aparición de hiperplasias y displasias en este tejido, promoviendo así el desarrollo de cáncer, principalmente en la cavidad oral [27].
- **Radiación:** existen distintos tipos de radiación que puede ser emitida, sin embargo, la llamada radiación ionizante, o de alta energía como los rayos X, rayos gamma o la producida por el decaimiento de elementos radiactivos, puede interactuar con el material genético de las células que son expuestas a esta, dañando directamente el DNA ocasionando mutaciones que promuevan la aparición de tumores malignos [1].

- **Luz solar (Radiación UV):** por el tipo de energía que tiene esta radiación produce desregulación sobre la proliferación celular y supervivencia por mutaciones, principalmente por la formación de dímeros de bases de pirimidina en el DNA, generando uniones tipo ciclobutano, eso se da generalmente en las timinas impidiendo la replicación y transcripción correcta de la información genética. También genera inmunosupresión, inflamación crónica y estrés oxidativo.

En conjunto todos estos efectos que tiene la radiación UV sobre las células dan lugar a la formación y progresión rápida de neoplasias malignas, principalmente en la piel [28].

- **Otras sustancias carcinogénicas:** existen otros contaminantes ambientales, ocupacionales, en el aire, en agua, en alimentos, etc. a las que puede estar expuesta una persona, y que a su vez promueven el desarrollo de cáncer por los diversos mecanismos mencionados anteriormente. Para la mayoría de estas sustancias carcinogénicas, su efecto depende la exposición crónica para lograr la transformación de células normales a cancerígenas. Existen múltiples sustancias, de diferente naturaleza, entre las que podemos mencionar los siguientes ejemplos: benceno, asbesto, arsénico, cadmio, alquitrán, aflatoxinas, óxido de etileno y formaldehído [1].

2.2 Cáncer de cabeza y cuello

El cáncer de cabeza y cuello incluye una serie amplia de neoplasias a lo largo de ambas partes del cuerpo, sin embargo, las presentes en piel, ojos y cerebro, generalmente no son consideradas para este término, por lo que algunas referencias proponen que aplica únicamente para las neoplasias epiteliales de células escamosas que se presentan en el tracto aerodigestivo superior, incluyendo a los tumores en senos paranasales, cavidad nasal, cavidad oral, faringe y laringe, por ser las neoplasias más frecuentes en este sitio anatómico. Para referirse a ellas se usa el término de carcinoma epitelial de células escamosas de cabeza y cuello [29].

2.2.1 Epidemiología

El cáncer de cabeza y cuello, sumando todos los sitios de formación de tumores anteriormente mencionados se encuentra, desde 2015, en el sexto lugar del tipo de cáncer con mayor incidencia a nivel mundial (**Figura 2**) representando así el 3% de todos los tipos de cáncer a nivel mundial [30] y específicamente México, el 17.6% [45]. Este tipo de cáncer

presenta una mayor incidencia en varios países con mayor desarrollo; posiblemente debido a que la población se encuentra con una mayor exposición a contaminantes ambientales carcinogénicos en el aire (**Figura 3**).

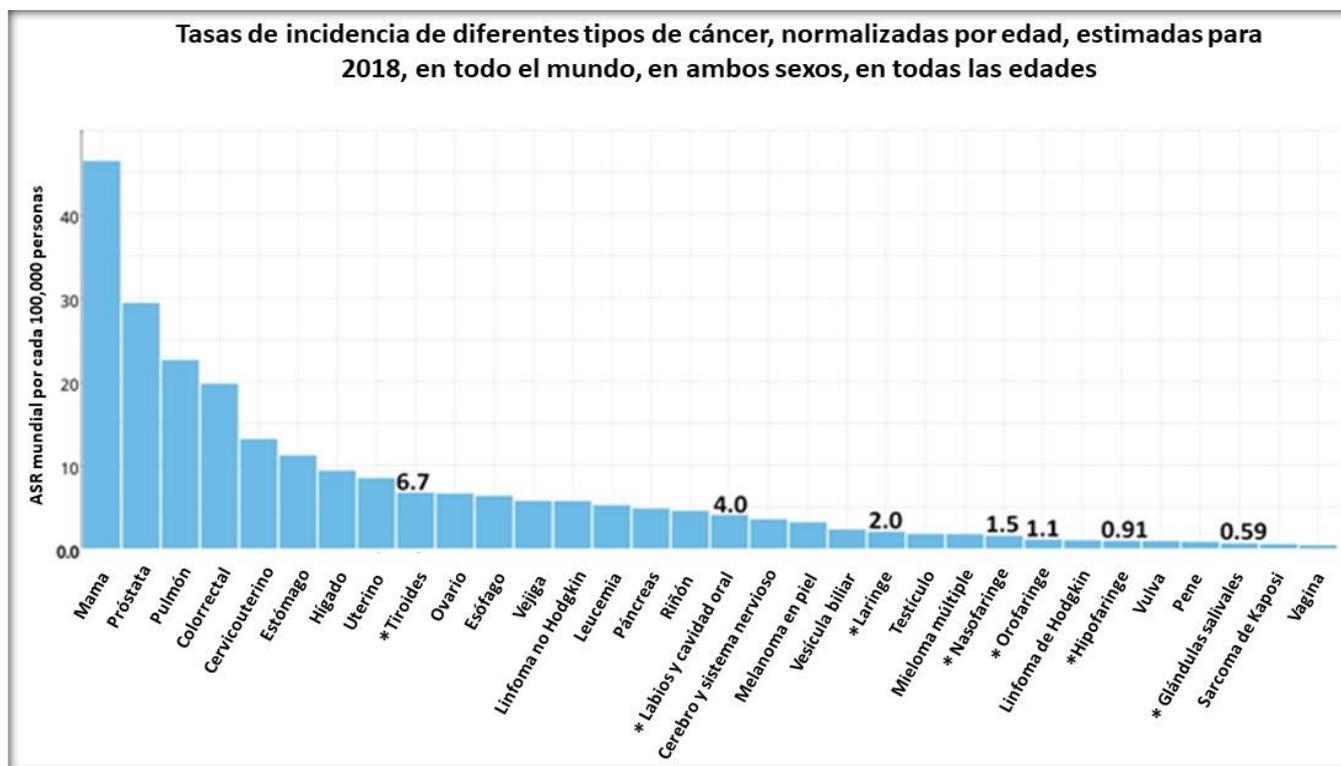


Figura 2. Tasa de incidencia de cáncer. Tasa de incidencia estandarizada por edad, estimada para 100,000 personas por año, realizada por *Globocan* en 2018, de neoplasias más frecuentes (* = Cáncer de cabeza y cuello), en ambos sexos y de todas las edades, alrededor del mundo. (ASR= tasa estandarizada por edad, por sus siglas en inglés) Tomada y modificada de: [31]

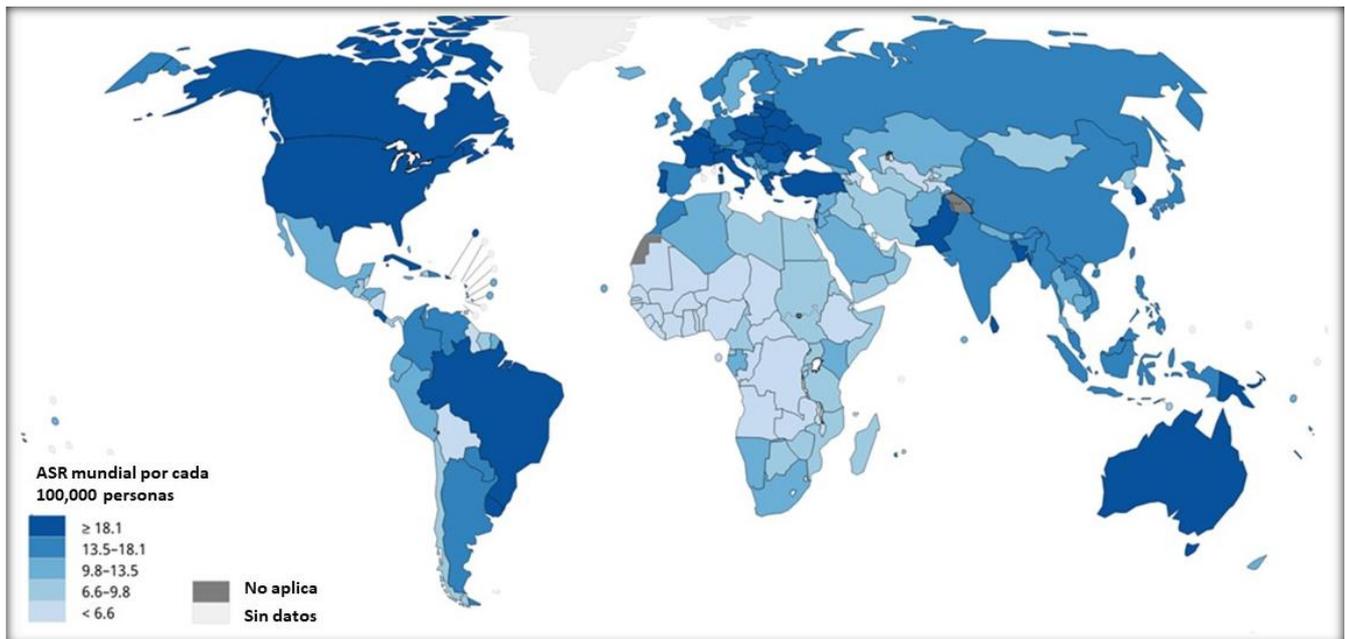


Figura 3. Tasa de incidencia estandarizada por edad, de cada país, estimada para 100,000 personas por año, realizada por *Globocan* en 2018, de neoplasias nasofaríngeas, orofaríngeas, hipofaríngeas, en laringe, labios, cavidad oral y tiroides, en ambos sexos y de todas las edades, alrededor del mundo. (ASR= tasa estandarizada por edad, por sus siglas en inglés) Tomada y modificada de:[31]

Las neoplasias más comunes de este tipo de cáncer se presentan en labios, boca y en la laringe (**Figura 2**), y la mayoría de las personas que las presentan son hombres de edad cercana a los 60 años, sin embargo, conforme ha pasado el tiempo se ha descrito en nuevos estudios clínicos, el aumento de neoplasias en la lengua en adultos jóvenes, principalmente de Estados Unidos y algunos países de Europa [29].

Este tipo de tumores de cabeza y cuello, se encuentran entre los 10 más comunes, teniendo como principal blanco de metástasis los ganglios linfáticos cervicales, y posteriormente las células cancerígenas pueden utilizar el sistema linfático para desplazarse a partes más distantes en el cuerpo. Los órganos que más comúnmente se afectan por tumores secundarios derivados de este tipo de cáncer, son el cerebro y los pulmones, el cáncer en este último órgano mencionado, se encuentra descrita como la malignidad causante de la mayor cantidad de muertes en todo el mundo [31], por lo que es de suma importancia detener lo antes posible la progresión de estos diversos tipos de cáncer en cabeza y cuello. Aproximadamente sólo el 40-50% de los pacientes que los presentan, sobreviven 5 o más años [32], por estas razones es que se considera una de las problemáticas de salud graves en la actualidad en varios de los países alrededor del mundo.

2.2.2 Factores de riesgo del cáncer de cabeza y cuello

Como se mencionó anteriormente, existen diversos factores de riesgo que promueven la proliferación celular descontrolada. En el caso particular del cáncer de cabeza y cuello, se han visto que la inhalación de polvo de madera, exposición a contaminantes presentes en refinерías de níquel y fábricas de fibras textiles, el consumo de alimentos con muchos preservantes o muy salados y la desnutrición, están relacionados con el aumento de la probabilidad a desarrollar neoplasias nasofaríngeas, de laringe y de senos paranasales. La exposición a la radiación está relacionada con cáncer de glándulas salivales y la infección de Epstein-Barr es un factor de riesgo del cáncer nasofaríngeo y de glándulas salivales; además la salud bucal ya sea por falta de higiene o por uso excesivo de enjuague bucal que contiene alcohol, pueden promover la formación de cáncer en la cavidad oral. Sin embargo, todos estos no son considerados los factores de riesgo más importantes. Los 3 los factores más relevantes asociados al cáncer de cabeza y cuello son:

- **Tabaco:** antes de 1964 el consumo de tabaco no se veía relacionado con la propensión a desarrollar neoplasias, en la actualidad se sabe que si se encuentra es ligado estrechamente, principalmente con cáncer de pulmón, cabeza y cuello. La simple irritación crónica causada por el humo en vías respiratorias, puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de cabeza y cuello. Sin embargo, muchas de las sustancias presentes en el tabaco, deben de ser metabolizadas para adquirir su potencial carcinogénico; una vez que entran en el organismo estas moléculas son metabolizadas principalmente por el complejo enzimático citocromo P450, y varias de estas se convierten en moléculas muy electrofílicas, promoviendo que reaccionen con proteínas y/o DNA, generando aductos al unirse de manera covalente. Si las mutaciones generadas no son reparadas de manera correcta, y se presentan en regiones cruciales de oncogenes (**Tabla 2**) como *RAS* y *MYC* o en genes supresores de tumores (**Tabla 1**) como *TP53*, puede ocasionar la pérdida de control del crecimiento y desarrollo celular, y dar lugar a la aparición de tumores [17]. Una de las enzimas de este complejo caracterizada por inducirse durante el metabolismo del tabaco y alcohol, es la CYP2E1, y esta a su vez incrementa la generación de ROS, aumentando la peroxidación de lípidos, estrés oxidativo y otros mecanismos que posiblemente induzcan la tumorigénesis [33].

En los estudios más recientes se ha determinado que moléculas como nicotina y diversas nitrosaminas al unirse con receptores de nicotínicos y de acetilcolina, son

capaces de activar, principalmente, a la proteína cinasa B (AKT) y la proteína cinasa A, las cuales son elementos presentes en vías de señalización que al ser activadas disminuyen la apoptosis e incrementan la proliferación celular, así como la supervivencia y transformación a células cancerígenas. Uno de los efectos que se ha observado que se presenta solamente por la unión de la nicotina con estos receptores, es el aumento de la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés), causando la estimulación de la vasculogénesis y angiogénesis, promoviendo así la metástasis y supervivencia del tumor; aun cuando este efecto se ha presentado solo en modelos animales cuando se encuentran en hiperoxia, se ha considerado la posibilidad de que la nicotina tenga un impacto crucial sobre la promoción de tumorigénesis.

Otros estudios que aún no establecen una relación clara mencionan que el tabaco puede inducir la aparición de neoplasias vía proteína cinasa C (PKC) y proteína activadora 1 (AP1) [17].

- **Alcohol:** el consumo de alcohol alrededor del mundo ha sido un problema de gran relevancia; datos presentados por la Organización Mundial de la Salud, mencionan que el consumo en 2005 era de 5.5 L. *per cápita*, llegando hasta 6.4 L en el 2016 lo que nos indica un incremento significativo en su uso regular [34]; teniendo en cuenta que posee potenciales efectos carcinogénicos, se ha considerado como uno de los factores de riesgo más importantes a nivel mundial, para el desarrollo de diversos tipos de cáncer, entre los cuales se encuentran los de cabeza y cuello.

El alcohol se ha considerado un carcinógeno incompleto, ya que no se ha demostrado que presente una relación directa con las mutaciones detonantes de la transformación celular, sin embargo, si se ha demostrado que puede incrementar el crecimiento de los tumores si es consumido regularmente.

Se mencionó anteriormente el papel que juega el acetaldehído en la inducción de la carcinogénesis, sin embargo, existen otros mecanismos de los cuales se han realizado estudios, en los que el alcohol se encuentra involucrado para el desarrollo de tumores (**Figura 4**). Se ha visto el alcohol puede modificar el metabolismo de retinoides al inducir CYP2E1, estos compuestos se encuentran involucrados en la regulación del crecimiento y diferenciación celular, la apoptosis y se han asociado

también a ciertas vías de señalización de estrógenos, por lo que una alteración de este tipo puede generar la promoción del cáncer [12].

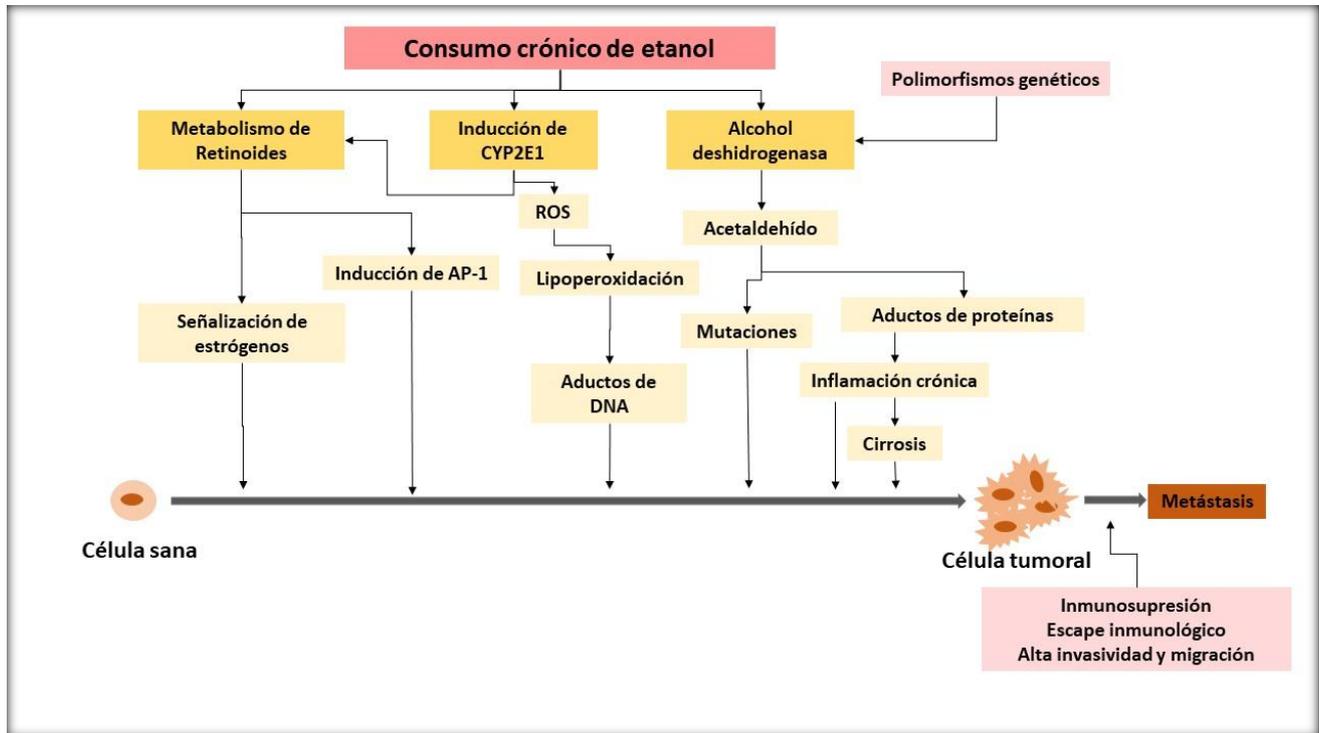


Figura 4. Mecanismos de carcinogénesis propuestos para el consumo de etanol. Tomada y modificada de: [12]

- VPH:** Desde 1983 se obtuvo evidencia que relacionaba el VPH con el cáncer orofaríngeo de células escamosas. En la actualidad se sabe que el 75 al 90% de los pacientes con cáncer han presentado la exposición a este virus, sin embargo, solo el 25% de los cánceres de cabeza y cuello se encuentran íntimamente relacionado con la infección con los subtipos de VPH 16, 18, 31, 33 y 35. En el caso particular del cáncer orofaríngeo se presenta un mayor porcentaje relacionado con el VPH, llegando a un porcentaje mayor al 60%, convirtiéndolo en uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de este cáncer. A partir de la determinación del genotipo del virus, se ha logrado establecer que el subtipo 16 es el que se encuentra en el 90% de los casos de cáncer de cabeza y cuello asociado al VPH y se ha visto que en estos casos los tumores presentan metástasis más agresiva, sin embargo, son más susceptibles a los tratamientos convencionales por no encontrarse queratinizados.

En los últimos 10 años se ha podido observar una disminución de 1.85% en los casos de cáncer de cabeza y cuello relacionados con el consumo de tabaco y un aumento de 0.8% en los que se encuentran relacionados con el VPH [35]. También se ha visto un incremento en la aparición de tumores de cabeza y cuello en adultos 40-55 años de edad, principalmente en hombres. Esta tendencia se ha atribuido a cambios en el comportamiento sexual, reflejadas en el aumento en el número de parejas sexuales y una mayor recurrencia del sexo oral, que al final se traduce en un incremento en la probabilidad de infectarse con VPH.

Entre los mecanismos de carcinogénesis producidos por este virus al integrar su material genético al DNA genómico de la célula infectada, se encuentran la desregulación en la expresión de ciertos oncogenes y la producción de oncoproteínas. Entre las oncoproteínas más estudiadas se encuentra la proteína E6, la cual induce una degradación por proteólisis mediada por ubiquitinación de P53, suprimiendo el arresto del ciclo celular en fase G1, apoptosis y ciertos mecanismos de reparación de DNA; aumentando así la inestabilidad genómica. Otra de las oncoproteínas que se induce su expresión es la E7 la cual se une inactiva al producto de el gen supresor de tumores *RB* (**Tabla 1**) permitiendo la progresión del ciclo celular aumentando la proliferación y la transformación a células cancerígenas. Además, otro de los mecanismos de carcinogénesis planteados para esta infección, se encuentra relacionado con la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), lo que produce una sobre activación de esta vía de señalización provocando así una mayor proliferación celular [36].

2.2.3 Patogénesis

Como se presenta generalmente para el desarrollo y progresión del cáncer, debe de haber una acumulación de alteraciones moleculares en las células sanas. entre estas modificaciones, particularmente para el 90% de los casos de cáncer de cabeza y cuello, podemos destacar las que se muestran en la **Figura 5**.

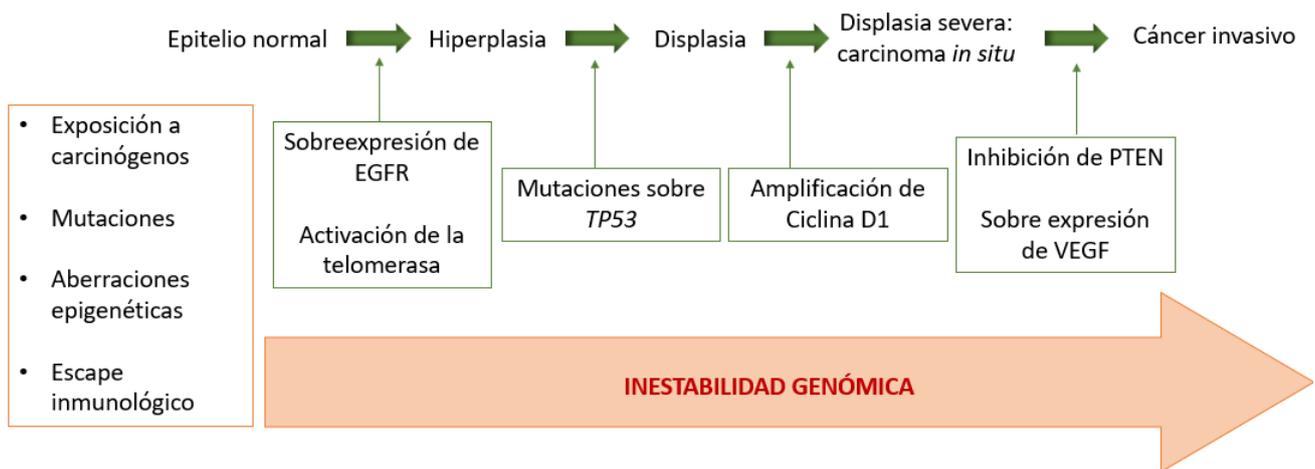


Figura 5. Alteraciones moleculares y progresión del cáncer de cabeza y cuello. Tomada y modificada de: [29]

Estas alteraciones moleculares dan lugar a la activación constante de vías de señalización involucradas en la proliferación celular, supervivencia, migración, invasión, angiogénesis, vasculogénesis y metástasis. Entre las vías más estudiadas por su efecto en la regulación de la supresión de la proliferación celular, se encuentran aquellas en las que están involucradas diversas cinasas; esto se ha podido ver en líneas celulares de leucemia (L1210), cáncer de ovario (OVCA433), de gliosarcoma (9L) y de tumores de células escamosas (HTB43) [37]. Es por este motivo que las vías de interés para este trabajo son las vías de PI3K/AKT y MAPKs, en las que se encuentran cinasas involucradas (**Figura 6**) y son importantes, debido a que se han visto íntimamente relacionadas con varios tipos de cáncer de cabeza y cuello, además, son vías activadas por receptores de tirosin cinasas. En este tipo de cáncer en particular se destaca la activación de estas vías por parte del factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés) y VEGF.

En el 90% de los casos de cáncer de cabeza y cuello se ha podido observar una tendencia en la sobre expresión del EGFR, lo que trae como consecuencia una mayor señal de activación de estas vías. Por este mismo motivo entre los tratamientos más novedosos, se encuentra el uso de antineoplásicos convencionales conjuntos con anticuerpos que reconozcan a EGFR, el receptor de VEGF (VEGFR) o sus ligandos, impidiendo la unión entre estos, y por lo tanto evitando la señal de activación de las vías anteriormente mencionadas.

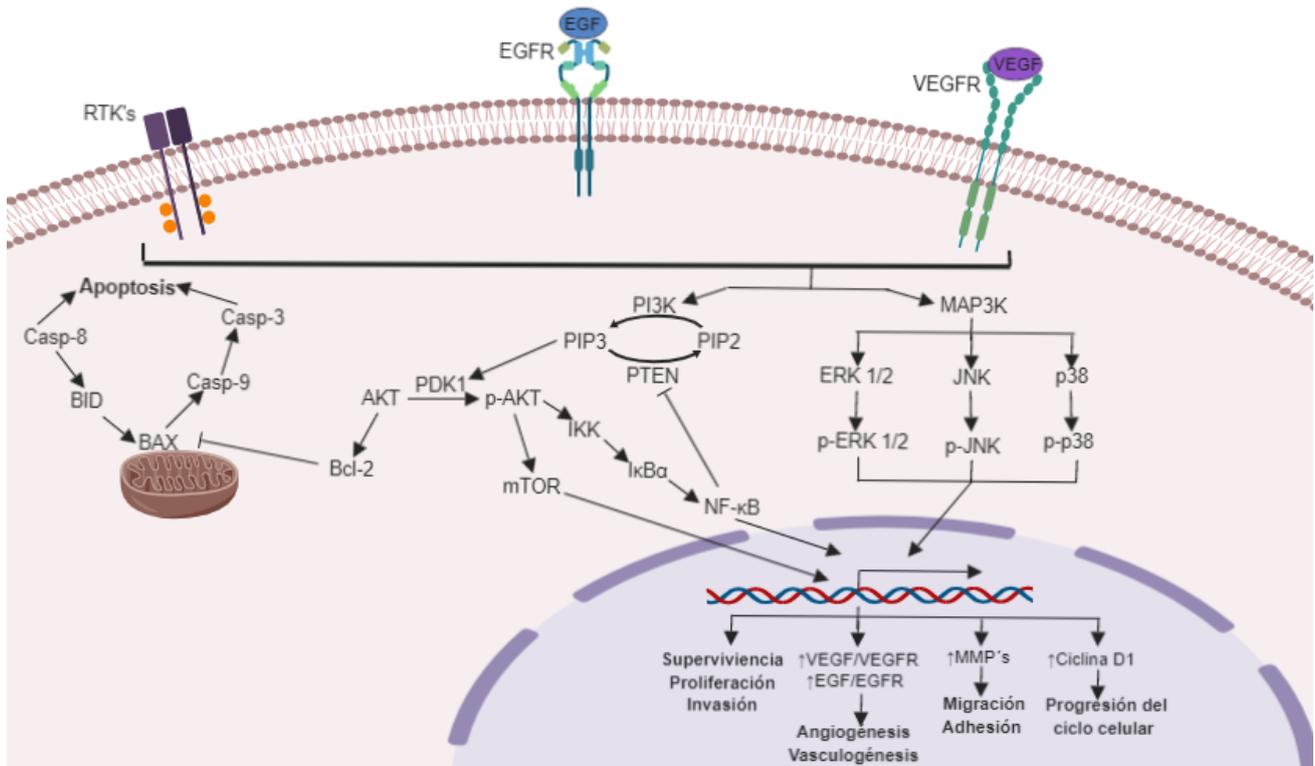


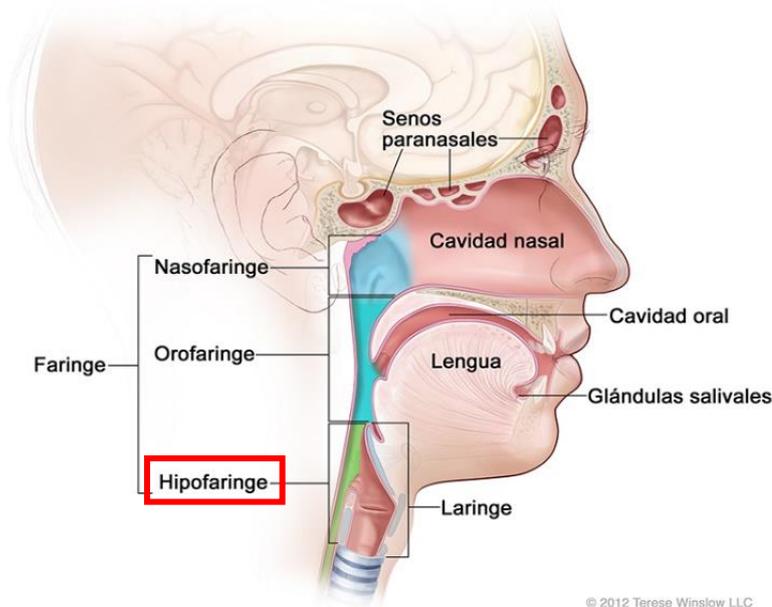
Figura 6. Vías de señalización molecular involucradas en el desarrollo de cáncer de cabeza y cuello.
Tomada y modificada de: [29]

El cáncer de cabeza y cuello generalmente no presenta síntomas en los inicios de la formación de tumores, y la mayoría de las veces se diagnostica cuando se encuentra en etapas avanzadas, en las cuales ya se encuentra diseminado en otras partes del cuerpo, complicando la eliminación de las células cancerígenas. Sus principales blancos metastásicos son los ganglios del cuello, cerebro, pulmón, hígado y huesos [29].

2.3 Cáncer de hipofaringe

Se encuentra incluido en el cáncer de cabeza, sin embargo, es uno de los menos comunes, y sólo representa el 3% de los diferentes tipos de tumores que se pueden presentar en estas regiones. Generalmente los tumores hipofaríngeos están constituidos por células escamosas y se presentan en el epitelio ubicado en la parte inferior de la faringe (**Figura 7**), parte que se encuentra unida al parte superior del esófago.

Regiones en el cáncer de cabeza y de cuello



© 2012 Terese Winslow LLC
U.S. Govt. has certain rights

Figura 7. Regiones en las que se puede presentar los diferentes tipos de cáncer de cabeza y cuello. Resaltando la hipofaringe en rojo. Tomada de: [79]

El cáncer de hipofaringe es de los tipos de cáncer que presentan un peor pronóstico a futuro debido a diversas características que se manifiestan, lo que ocasiona que solo aproximadamente el 30-35% de los pacientes que tienen alguna neoplasia maligna en la hipofaringe lleguen a sobrevivir 5 o más años después de su diagnóstico. Entre estas características, se encuentra frecuentemente la ausencia de síntomas en las primeras etapas de la carcinogénesis. Los signos y síntomas que se llegan a presentar pueden ser confundidos con otros padecimientos como reflujo, infecciones del tracto respiratorio inferior o inclusive pueden ser enmascarados y retardados por el consumo de sustancias de abuso como el tabaco y el alcohol, ya que estos causan irritación de las zonas afectadas. Entre los síntomas inespecíficos que se presentan en el 50% de los pacientes que padecen este tipo de tumores son: la disfagia, dolor de garganta y ronquera, lo que complica su diagnóstico temprano [38], ocasionando que aproximadamente el 6% de los pacientes al ser diagnosticado con tumores hipofaríngeos se encuentren en etapas con metástasis a los tejidos circundantes de la laringe y la epiglotis [39], y metástasis distante en los tejidos mencionados con anterioridad para el cáncer de cabeza y cuello. El 60% de los casos progresen a metástasis durante el tratamiento.

La manera en la que se diagnostica este padecimiento de manera definitiva es con el uso de técnicas más complejas como: laringoscopias, biopsias, tomografías computarizadas, ultrasonidos y tomografía por emisión de positrones. Esto mismo ocasiona dificultad y un retraso significativo para el diagnóstico.

La recurrencia de este tipo de cáncer es muy común, este fenómeno se da aproximadamente en el 50% de los pacientes y generalmente se presenta con metástasis distante, volviendo a estos tumores un padecimiento difícil de erradicar en su totalidad.

2.3.1 Tratamiento contra el cáncer hipofaríngeo

Los tratamientos que existen en la actualidad para este tipo de cáncer son agresivos, invasivos, tóxicos y con baja efectividad, entre los principales se encuentran procesos quirúrgicos para la remoción del tejido afectado o inclusive laringectomía total, seguido de sesiones de radioterapia para eliminar cualquier célula cancerígena que no se haya logrado retirar [40], generalmente el tratamiento con fármacos antineoplásicos al igual que su combinación con la radioterapia, se utilizan cuando se presenta metástasis. Entre los quimioterapéuticos más utilizados para este tipo de cáncer son: el cisplatino, el docetaxel y el 5-fluorouracilo.

En el caso de los procedimientos quirúrgicos acompañados de radioterapia generan pérdidas importantes en funciones normales de esta parte del cuerpo, entre las funciones alteradas se encuentran el sentido del gusto, la respiración y la deglución, teniendo que recurrir en algunos casos a traqueostomía y gastrostomía. Todo esto anteriormente genera una propensión a infecciones, depresión y otros problemas que contribuyen de manera significativa a la mortalidad de los pacientes. A lo largo del tiempo se han mejorado estos procedimientos enfocándose en la conservación funcional de los órganos, y con el uso de nuevas tecnologías e instrumentos, como es la microcirugía con láser y el aumento de la precisión en las zonas que son irradiadas, han logrado reducir el daño que se genera sobre esta área, sin embargo, son pocos los casos en los que se conserva totalmente funcional la laringe.

Se ha demostrado que el uso de los medicamentos anteriormente mencionados se asocian con un incremento en la preservación de la laringe, así como una mejor efectividad para erradicar tumores secundarios, sin embargo, estos son tóxicos principalmente en células de

alta tasa de replicación, inclusive las que se encuentran sanas, causando los efectos secundarios clásicos del uso de este tipo de agentes quimioterapéuticos para tratamiento de neoplasias, entre los que se incluyen: dolor, pérdida del apetito, problemas cardíacos y sanguíneos, cambios de estado de ánimo, caída del cabello, inmunodeficiencias, problemas endocrinos y gastrointestinales, resequedad y aumento en la susceptibilidad a daños en la piel y mucosas. Por estos motivos se han buscado nuevas alternativas, entre las que se encuentra el uso de anticuerpos que se unen a proteínas integrantes de vías de señalización que están involucradas en el cáncer, con el fin de detener la progresión de esta. Otras alternativas en las que en los últimos años se ha destacado su investigación, y que es uno de los puntos claves de este trabajo, es el uso de sustancias que se encuentren naturalmente en las plantas o sustancias innovadoras de las cuales se hayan caracterizado algún efecto benéfico, siempre buscando que estos nuevos fármacos utilizados posean una mayor especificidad sobre células alteradas, un perfil de seguridad mejor y una menor toxicidad sobre células sanas, logrando así una mayor sobrevida, así como la mejora en su calidad de vida, durante y después del tratamiento, para los pacientes que presenten este tipo de tumores [41]. Por tal motivo es que se han evaluado y encontrado efectos anticancerígenos de varios compuestos naturales de la dieta, entre ellos están incluidos: vitamina A, curcumina, isotiocianato, té verde, luteolina, resveratrol, genisteína, kaempferol, licopeno, melón amargo, witaferina A y guggulsterona [42, 43].

2.3.2 Epidemiología del cáncer hipofaríngeo

En informes de la Organización Mundial de la Salud se ha descrito que uno de los factores de riesgo más importantes y que de ser controlado reduciría en gran cantidad los pacientes que desarrollan cáncer, principalmente de pulmón, cabeza y cuello, vejiga, renal y páncreas, es el consumo regular de cigarrillos. Estos informes también pronostican un aumento de aproximadamente un 50% en los pacientes que desarrollen cáncer en los próximos 15-20 años, principalmente en países desarrollados en los que hay una mayor exposición a sustancias carcinogénicas, cambios en los hábitos alimentación y de actividad física, así como por la contaminación que se acumulará en el ambiente [44].

Para el caso particular del cáncer de hipofaringe, como ya se mencionó anteriormente, este tipo de tumores no es muy común, sin embargo, como se puede apreciar en los datos proporcionados por el GLOBOCAN que las tendencias mundiales sugieren que para el 2040

habrá un incremento de aproximadamente 30% en el número de pacientes que presentan este tipo de tumores, comparándolo con el aumento demográfico mundial calculado para este año por la Organización de la Naciones Unidas se puede determinar que existirá un incremento en el riesgo de padecer neoplasias malignas en la hipofaringe [44], lo que genera un punto de interés en la investigación para el desarrollo de fármacos preventivos o tratamientos para este padecimiento.

En México no existen registros completamente confiables de la epidemiología de esta enfermedad, sin embargo, en estudios realizados por el Instituto Nacional de Cancerología se ha descrito que el 17.6% de las neoplasias malignas que se presentan en México son de cabeza y cuello, sin embargo, aun cuando en estas neoplasias no sean mayormente de hipofaringe, se pueden encontrar datos en los que se observa que el cáncer de hipofaringe presenta una letalidad estimada del 94%, solo superado por el bucofaringeo que presenta una mortalidad cercana al 100% [45].

2.4 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de moléculas que se producen naturalmente en las plantas como metabolitos secundarios de bajo peso molecular. En la naturaleza estos metabolitos se encuentran distribuidos en todas las estructuras de las plantas, son evidentes a través de la pigmentación, el olor y el sabor característico, y entre sus múltiples funciones para proveer protección de los distintos factores bióticos y abióticos que les generan estrés, se encuentran: la atracción o repulsión de otros organismos, la protección contra radiación UV, efectos antimicrobianos y plaguicidas, funciones de señalización celular, así como resistencia a la sequía, congelamiento y cambios bruscos de temperatura. Sin embargo, también se ha visto que estos mismos compuestos generan efectos benéficos en animales que los consumen, incluyendo al humano.

Los flavonoides son compuestos polifenólicos derivados de benzo- γ -pirona, que poseen un esqueleto característico de 3 anillos (**Figura 8**) y se dividen en subgrupos dependiendo la unión y los sustituyentes que poseen cada anillo que lo conforma y, el grado de instauración y oxidación que presenta el anillo C (**Figura 9**) [46, 47].

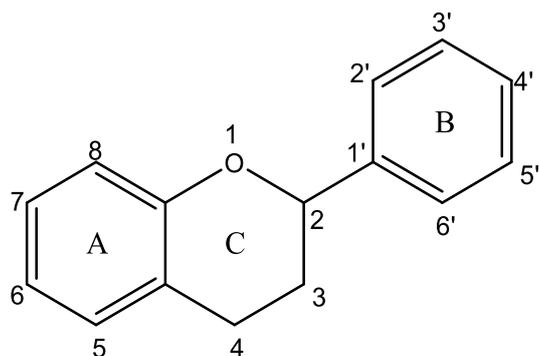


Figura 8. Esqueleto básico de los flavonoides.

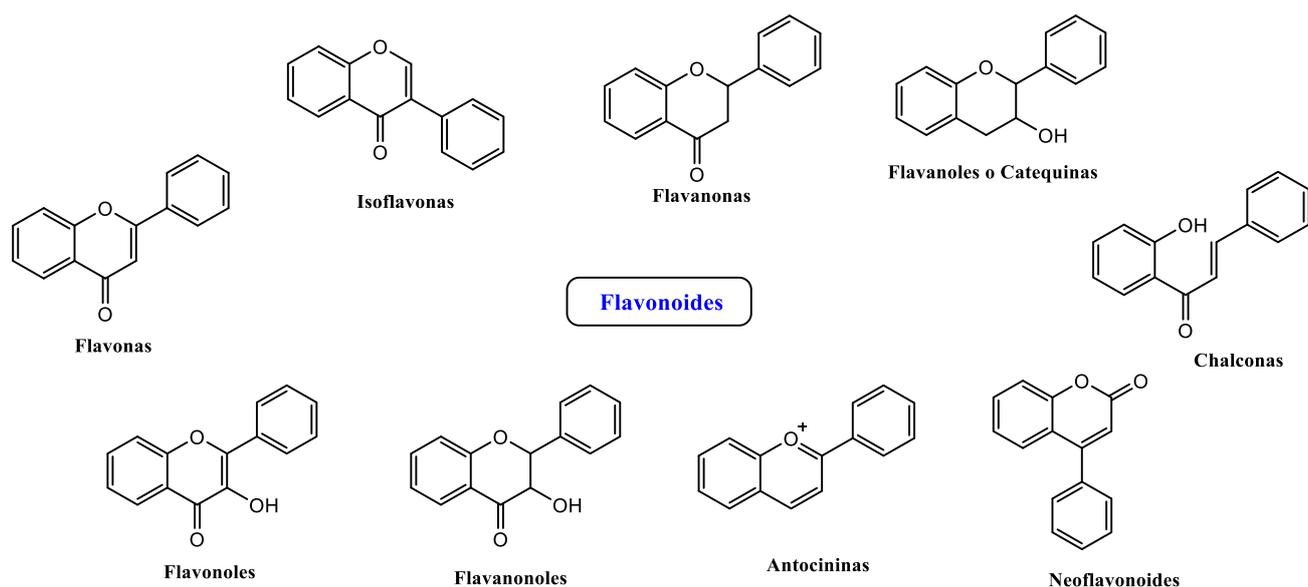


Figura 9. Subdivisiones de los flavonoides. Imagen tomada y modificada de: [78]

Muchos de estos compuestos han sido utilizados a lo largo del tiempo para tratar múltiples padecimientos. La cultura China es ampliamente conocida por su uso en la medicina tradicional, sin embargo, el uso de plantas medicinales no solo se remonta a esta región del planeta, también es bien sabido que, en la cultura mesoamericana, sobre todo en la época prehispánica se usaban las plantas medicinales para curar diversas enfermedades. Actualmente muchas de las plantas utilizadas en la investigación para la obtención de fármacos provienen del conocimiento que fue adquirido por nuestros antepasados sobre estas. En las últimas 2 décadas se ha descubierto diversos de los componentes específicos, pertenecientes a las plantas que pueden ser utilizados para el tratamiento o en la prevención de diversas enfermedades, por su capacidad de modular la función enzimática, las vías de

señalización, el estrés oxidante y otros efectos bioquímicos. Cabe resaltar que entre estos compuestos descubiertos se encuentran alrededor de 5,000 flavonoides [48].

Entre los efectos benéficos caracterizados en los animales, que poseen los flavonoides se pueden destacar:

- **Actividad antiinflamatoria:** Se ha podido determinar con experimentos *in vitro* e *in vivo* que estas moléculas poseen un efecto modulador de la respuesta inmune. En diversos estudios, principalmente estudios *in silico*, utilizando acoplamiento molecular o también conocido como Docking, han demostrado que muchas de estas moléculas tienen la capacidad de interactuar con enzimas proinflamatorias, principalmente con las 2 isoformas de la ciclooxigenasa (COX), generando un efecto inhibitorio de su actividad impidiendo la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, a partir del ácido araquidónico.
- **Modulación de la síntesis de esteroides:** Principalmente las flavanonas poseen una afinidad alta con las enzimas de la vía de señalización de síntesis de esteroides, por lo que puede inhibir la progresión de esta misma al interactuar con dichos integrantes involucrados en la señalización.
- **Actividad antioxidante:** Muchos de los flavonoides son capaces de prevenir diversos padecimientos relacionados con los daños que causan las ROS formadas en el metabolismo normal o inducidas por condiciones externas. Este efecto se debe a que las moléculas de los flavonoides poseen sustituyentes altamente reactivos, generando que puedan ser más fácilmente oxidadas por los radicales libres, en lugar de componentes endógenos del organismo, posteriormente por la deslocalización electrónica que poseen estas moléculas le provee de una mayor estabilidad, esta misma estabilidad genera que los radicales formados sean poco reactivos y no causen más estrés oxidante.
- **Efectos anticancerígenos:** Este tipo de efecto que se caracteriza por la inhibición de la transformación de las células, proliferación, adhesión, invasión, angiogénesis y metástasis, se ha descubierto que puede presentarse utilizando distintos flavonoides y en diversos tipos de cáncer, recientes investigaciones se han esforzado en encontrar el mecanismo por el cual provee de protección y actividad terapéutica [49]. Entre los supuestos mecanismos de acción que generan el efecto anticancerígeno se encuentran: regulación de la expresión génica, principalmente de genes supresores

de tumores y oncogenes, modulación de enzimas de desintoxicación, modulación de la inflamación, actividad antioxidante y eliminación de radicales libres, modulación del metabolismo celular, inhibición de cinasas, modulación de las vías de señalización involucradas en la proliferación y diferenciación celular, inducción del arresto del ciclo celular, así como la inducción de la apoptosis.

- **Otros:** actividad antiparasitaria y antimicrobiana que ayuda a contrarrestar la resistencia a antibióticos, actividades benéficas en enfermedades isquémicas, neurodegenerativas, diabetes e incluso algunas enfermedades virales como la influenza H1N1.

En la dieta normal de los humanos, son consumidos poco más de un gramo por día, de flavonoides, esta cantidad al ser absorbida por el organismo alcanza concentraciones significativas en los fluidos corporales, logrando tener una actividad sobre el organismo [37]. Al considerar este fenómeno de que puede alcanzarse, relativamente fácil una concentración farmacológicamente significativa; teniendo en cuenta los antecedentes de no presentar una alta citotoxicidad y generar múltiples efectos benéficos en el organismo, es que se vuelven moléculas de gran interés farmacológico por lograr efectos deseados sin afectar a otros niveles del organismo.

2.4.1 Luteolina

La luteolina (3',4',5,7-tetrahidroxi flavona) (**Figura 10**) es una molécula de origen natural perteneciente al grupo de los flavonoides, más específicamente al de las flavonas, las cuales se caracterizan por poseer un doble enlace entre el carbono 2 y 3 del anillo C y una cetona en el carbono 4 de anillo C, estas moléculas se encuentran principalmente en las hojas y frutas de las plantas.

La luteolina es un flavonoide que se puede encontrar en frutas, verduras y en hojas de muchas plantas que son utilizadas en la medicina tradicional China para tratar padecimientos como hipertensión, desórdenes inmunitarios y para aprovechar sus propiedades antiinflamatorias, antihistamínicas y antioxidantes, recientemente es que se ha popularizado su uso para padecimientos neurológicos, por su permeabilidad en la barrera hematoencefálica e inclusive para padecimientos como el cáncer.

Se sabe que los flavonoides poseen múltiples mecanismos para generar sus efectos biológicos, sin embargo, uno de los principales obstáculos para una terapia exitosa con

ciertos flavonoides recae en la baja disponibilidad sistémica, baja permeabilidad de la membrana, inestabilidad, degradación oxidativa y transformaciones metabólicas [50]. No obstante, la luteolina se encuentra presente en numerosas plantas en forma glucosilada, por lo cual es hidrolizado durante su absorción dejando libre a la luteolina. Parte de esta luteolina es convertida en glucurónidos y atraviesa la mucosa intestinal con mayor facilidad [51]. Se ha podido determinar que estos derivados glucosilados de la luteolina, como el luteolósido, han presentado efectos antioxidantes y anticancerígenos similares a la luteolina y otros flavonoides en cáncer de pulmón [52]. En comparación con otros flavonoides, como son los flavonoles quercetina y kaempferol, esta se encuentra en las plantas en bajas concentraciones, sin embargo, tiene una mayor termoestabilidad que muchos otros y la pérdida de esta molécula es relativamente baja durante los procesos de cocción o procesamiento industrial [51]. Esta flavona se encuentra más abundantemente y puede ser aislado principalmente de la cáscara de los cacahuates, en el perejil, tomillo, apio, espinacas, alcachofas, lechuga, crisantemo, hojas de la planta de cebolla, zanahorias, pimientos, brócoli, cáscara de manzana y de la planta de la cual se deriva su nombre, llamada *Reseda luteola* [53].

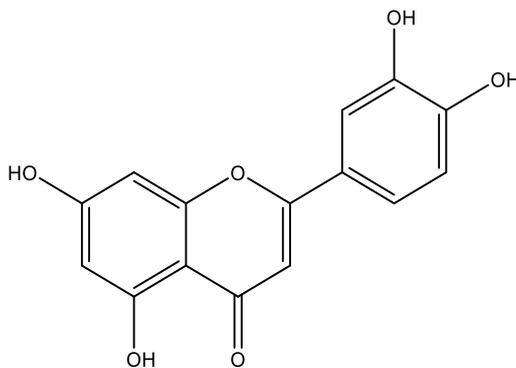


Figura 10. Estructura de la luteolina.

Se sabe que los flavonoides poseen múltiples sustituyentes, los cuales les confieren diferentes propiedades. Se ha visto que algunos de los flavonoides que poseen grupos hidroxilo, como es el caso de la luteolina, presentan un efecto antioxidante 6600 veces mayor, que los que poseen otro tipo de sustituciones. Además, se ha visto que, si estos grupos hidroxilos se encuentran como sustituyentes en los anillos aromáticos en posición *orto*, poseen más actividad citotóxica que los que no presentan esta característica.

Los resultados que arrojan investigaciones previas con flavonoides hidroxilados diferentes a la luteolina y los flavonoides metilados, determinan que los que poseen grupos metilo presentan una mayor absorción oral y, un incremento en la biodisponibilidad y distribución

en los tejidos. Sin embargo, otros flavonoides hidroxilados y metilados presentan en experimentos *in vitro* un efecto similar antiproliferativo en células FaDu y de cáncer de mama (MCF-7) [50].

2.5 Antecedentes

La luteolina, junto con la quercetina, son de los flavonoides con efectos benéficos, más estudiados en cáncer. Sin embargo, varios de los experimentos realizados han arrojado como resultado que posee un mejor perfil de seguridad que muchos otros, esto se debe a que existen evidencias que demuestran que presenta un menor efecto citotóxico sobre células sanas comparado con otros flavonoides y con quimioterapéuticos de uso convencional [54]. Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* realizados con luteolina han generado un gran interés sobre la utilización de este flavonoide para tratar múltiples enfermedades, entre ellas se encuentra el cáncer, estas propiedades que posee la luteolina se han asociado con su efecto antiinflamatorio, la inducción de la apoptosis y la inhibición de la proliferación celular, metástasis y angiogénesis [51].

Se ha visto que luteolina puede suprimir la proliferación de diversos tipos de células tumorales en ensayos *in vivo*, teniendo un rango de dosis entre 3 a 50 μM y se ha podido determinar que existen múltiples mecanismos entre los que se incluye a la supresión de cinasas, regulación del ciclo celular, inducción de la apoptosis y reducción de la señalización de factores de transcripción. En cáncer de mama se ha podido observar que la luteolina reduce el tamaño de los tumores, induce apoptosis y modula negativamente la señalización de estrógenos, que promueve el cáncer y la liberación de VEGF, que por consecuente genera la inhibición de la angiogénesis *in vivo*.

En células MCF-7, de cáncer de mama, luteolina disminuye la proliferación celular, genera el arresto del ciclo celular en fase G1, suprime la fosforilación de AKT, ERK1/2, EGFR, MAPK y los factores de transcripción STAT3, NF- κ B y AP-1 lo que ocasiona que se vea inhibidas estas vías de señalización involucradas en el desarrollo del cáncer [55]. En otras líneas celulares de cáncer de mama como es la MDA-MB-231, la luteolina promueve la biodisponibilidad y aumenta el efecto de otros anticancerígenos como la doxorubicina, cisplatino, paclitaxel y de otros flavonoides, como el galato de epigallocatequina (EGCG) [42]. Al igual que en este tipo de cáncer, la luteolina puede modular el efecto hormonal para

disminuir el cáncer de ovario, disminuye la capacidad invasiva y migratoria que presentan estas células inhibiendo la señalización de EGFR y NF-κB.

La luteolina ha sido probada de manera *in vitro* en células de cáncer de colon, con ello se ha podido asociar el efecto antioxidante y antiinflamatorio como el responsable de suprimir la producción de MMP's, inhibiendo en cierta medida la metástasis.

En el cáncer de piel se ha descubierto que la luteolina puede inhibir la transición epitelio mesenquimal la cual es un proceso que tiene un papel muy importante en la invasividad y metástasis, esto se pudo ver en las líneas celulares A431-III y A431-P en las que se ve una disminución de los marcadores inducidos por el EGF, como es el recambio de E-cadherina a N-cadherina.

Se ha probado de igual manera el efecto de la luteolina sobre cánceres de hígado, en placenta y en el glioblastoma, pudiendo determinar que se encuentra asociado con la inhibición de las vías de señalización PI3K/AKT. Esta inhibición se ve traducida fisiológicamente como una disminución del crecimiento celular, la inducción de la apoptosis, la supresión de migración y de la capacidad migratoria, y un efecto antioxidante.

En la línea celular Jurkat T, de leucemia y en la línea celular PC-3, de cáncer de próstata, la luteolina, la apigenina y la crisina, produjeron un efecto pro-apoptótico, este efecto se consideró selectivo ya que se evaluó en células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés) humanas sanas inmortalizadas, y se pudo observar que no se presentaba ningún efecto similar. Evaluando la actividad individual que cada flavonoide presentaba, se pudo determinar que la luteolina generaba un efecto preventivo contra el cáncer, mayor al de los otros 2 flavonoides evaluados [56].

En el caso particular de cáncer de cabeza y cuello se ha demostrado, que la luteolina tiene *in vivo*, un efecto inhibitorio del crecimiento de tumores en ratones y la regulación a la baja de la expresión de AKT, sin efectos citotóxicos en ratones sanos [42]. En revisiones elaboradas en el 2019 se menciona que su efecto particular sobre el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello presenta un efecto pro-apoptótico al activar a Fas y la inducción de la síntesis de p53, que así mismo induce un arresto del ciclo celular en fase G1, la reducción de la migración celular y la supresión de la acetilación de histonas, lo que causa como consecuencia un menor crecimiento y desarrollo de tumores [48]. De igual manera se ha podido determinar que en las líneas celulares de carcinoma escamoso de lengua, SCC-4 y OC2, la luteolina provoca el arresto del ciclo celular en fase G1, la disminución de la proteína RB, de la expresión de Bcl-2, de las ciclinas 2,4, y 6 dependientes de cinasas, y ciclina D3; también se ha visto involucrada en el aumento de la fragmentación

del DNA, de los niveles de Caspasa 3 y 9, de la expresión de Bax y su consecuente incremento de la apoptosis [57]. Sin embargo, no es muy específica la información sobre la dosis o sobre el mecanismo de acción que esta posee, y a diferencia de otros tipos de cáncer, en el caso del cáncer de hipofaringe no se ha determinado que efectos presentará.

3. Justificación

Como se mencionó anteriormente, el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello corresponde al sexto cáncer más común a nivel mundial [30]. Y en el caso particular del cáncer de hipofaringe, que se encuentra dentro de esta clasificación, si bien no es el tipo más común de este tipo de neoplasias, si es de los más letales, superado solamente por el cáncer bucofaríngeo [45].

Las opciones para el tratamiento de este tipo de cáncer son diversas, sin embargo, muchas de estas presentan efectos adversos graves, impidiendo conservar el correcto funcionamiento de los órganos afectados [41]. Sumado al difícil diagnóstico, presencia de metástasis y recurrencia que presenta, lo vuelve uno de los padecimientos a investigar para encontrar nuevas alternativas de tratamiento o incluso de prevención.

En la actualidad se ha optado por buscar fuentes más accesibles a moléculas complejas para el tratamiento de diversas enfermedades, y por ello es que se han enfocado muchos estudios en plantas, las cuales a partir de su metabolismo secundario dan lugar a compuestos bioactivos con una amplia variedad de aplicaciones. Entre este tipo de moléculas naturales se han podido caracterizar alrededor de 5000 flavonoides [48], de los cuales se han podido evaluar sus actividades anticancerígenas, logrando determinar que varios de estos producen un efecto citotóxico en células cancerígenas, así como la modulación de diferentes procesos que conllevan al desarrollo de tumores y a la progresión del cáncer.

La flavona luteolina, es un flavonoide de los más estudiados para el tratamiento de enfermedades, y se ha logrado determinar que presenta efectos anticancerígenos, sobre múltiples tipos de cáncer, al igual que reportes que lo posicionan como una alternativa menos citotóxica para células sanas [54]. Si bien existen investigaciones que mencionan sus efectos sobre otros tipos de cáncer escamosos, no se han evaluado todas sus actividades en el cáncer de hipofaringe.

Es por este motivo que se planteó la evaluación de los efectos que puede presentar *in vitro*, la luteolina sobre al carcinoma de células escamosas de hipofaringe.

4. Hipótesis

La exposición a un tratamiento con luteolina presentará un efecto modulador en las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK, el cual provocará un efecto citotóxico y una disminución de la liberación de VEGF, la migración e invasividad en una línea celular de carcinoma de hipofaringe.

5. Objetivo

Evaluar *in vitro* el efecto que generará un tratamiento con luteolina sobre las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK, viabilidad celular, liberación de VEGF, migración e invasividad en células FaDu.

5.1 Objetivos particulares

- Cuantificar el efecto citotóxico que se presenta en la línea celular FaDu al ser expuesta a luteolina.
- Evaluar la capacidad migratoria e invasiva de las células FaDu en presencia de luteolina
- Determinar el efecto que tiene la luteolina sobre las vías de señalización de interés y su regulación en células FaDu.
- Evaluar si la flavona luteolina genera una disminución en la liberación o expresión de VEGF
- Evaluar el efecto que ocasiona un tratamiento con luteolina sobre la promoción de la apoptosis en la línea celular FaDu
- Evaluar el efecto que generará un tratamiento con luteolina sobre el ciclo celular en la línea celular FaDu.

6. Materiales y Métodos

6.1 Equipo

Applied Biosystems California, Estados Unidos de América.
Termociclador (Termocycler PCR System).

Bio-Rad: Hercules, California. EUA.
Cámara de transferencia (Remi Dry Transfer Cell).
Fuente de poder (Power Pac)
Cámara de electroforesis vertical (Mini Protean Tetra System)
Contador de células (TC20 Automated Cell Counter).

Biotek Instruments, Inc. Winooski, Vermont, EUA.
Fluorómetro (Synergy HTX)

Carl Zeiss. Oberkochen, Alemania.
Microscopio de Objetivos invertido (Primovert).

Eppendorf. Hamburgo, Alemania.
Biospectrofotómetro

General Electric. Boston, Massachusetts, EUA.
Fotodocumentador (Image Quant LAS 500)

Gilson, Inc. Middleton, WI, EUA.
Micropipetas (Pipetman)

Hoeffer Inc Richmond, CA, EUA.
Cámara de electroforesis vertical (Mighty Small Basic Unit)

Life Technologies Thermo Fisher Scientific. Carlsbad, California, EUA.
Cámara de electroforesis horizontal (Horizon 50).
Microcentrífuga (Micro CL 17R. Microfuge)

Macasys Co., Ltd. Yuseong-Gu, Daejeon, República de Corea.
Espectrofotómetro (Spectrophotometer OPTIZEN POP)

Reichert-Jung. Buffalo, Nueva York, EUA.
Microscopio POLYVAR

Sanyo, Scientific Biomedical Chiyoda-ku, Kanda Nishiki-cho. Japón.
Incubador con CO₂
Ultracongelador (Ultracongelator WIP Series).

The Baker Company. Sanford, Maine. EUA.
Campana de flujo laminar (Biological Safety Cabinet, SterilGARD III)

6.2 Materiales

Bio-Rad: Hercules, California, EUA.

Reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate)

Enzo Life Sciences. Farmingdale, Nueva York, EUA.

Kit *VEGF (human) ELISA*

GE Healthcare Chicago, Illinois, EUA.

Membranas de PVDF

Gibco. Thermo Fisher Scientific. Carlsbad, California, EUA.

Suero fetal bovino (SFB)

Invitrogen. Thermo Fisher Scientific. Carlsbad, California, EUA.

Agarosa (Ultrapure Agarose)

Antibiótico-Antimicótico 100X

Kit *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase*

Reactivo de *TRIZOL™*

J. T. Baker Chemical Co. Phillipsburg, Nueva Jersey, EUA.

Cloroformo isoamílico

Cloruro de sodio

Fosfato de potasio monobásico

Fosfato de sodio dibásico

Fosfato de sodio monobásico

Isopropanol

TritonX-100

Tween 20

Promega. Madison, Wisconsin, EUA.

Kit *DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System*

Santa Cruz Biotechnology. Santa Cruz, California, EUA.

Reactivo de luminol para Western blot

Anticuerpos primarios: anti-fosfo PI3K (Tyr 199), anti-PI3K, anti-fosfoAKT 1/2/3 (Ser 473), anti-fosfoAKT 1/2/3 (Thr 308), anti-AKT 1/2/3, anti-fosfoERK (Tyr 204), anti-ERK 1/2, anti-fosfoJNK (Thr 183 y Tyr 185), anti-JNK, anti-β actina, anti-VEGF

Anticuerpos secundarios acoplados a la peroxidasa de rábano picante: anti-conejo, anti-cabra y anti-ratón

Sigma Aldrich Co. Saint Louis, MO, EUA.

Ácido etilendiaminotetraácetico (EDTA)

Acrilamida

Bis-Acrilamida

Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

Colorante de Giemsa modificado

Diacetato de fluosceína

Dimetilsulfóxido
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)
Fluoruro de sodio
Glicina
Luteolina
Lauril sulfato de sodio
Orto-vanadato de sodio
Persulfato de amonio
Ponceau s solution
Tetrametiletilendiamina o N,N,N',N' (TEMED)
Tris (Trizma)
Tris-HCl (Trizma hydrochloride)

6.2.1. Material biológico

American Type Culture Collection (ATCC). Manassas, Virginia, EUA.
Línea celular FaDu (ATCC® HTB-43™)

6.3 Métodos.

6.3.1 Cultivo celular

La línea celular FaDu (ATCC® HTB-43™) fue adquirida en la empresa ATCC, esta línea es proveniente de un hombre caucásico de 56 años que presentaba carcinoma de células escamosas en la faringe, la morfología que presenta es epitelial y tiene propiedades adherentes [58]. Para el crecimiento y expansión de la línea celular FaDu (**Figura 11**) se utilizó el medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), con rojo de fenol, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y con antibiótico-antimicótico 100X (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 0.25 µg/mL anfotericina B (Fungizone)) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); la incubación se realizó a 37°C, en una atmósfera húmeda y con 5% de dióxido de carbono; posteriormente se procedió a sembrar en cajas de 6, 24 y 96 pozos con el medio antes mencionado suplementado a diferentes concentraciones con SFB dependiendo el ensayo que se realizó.

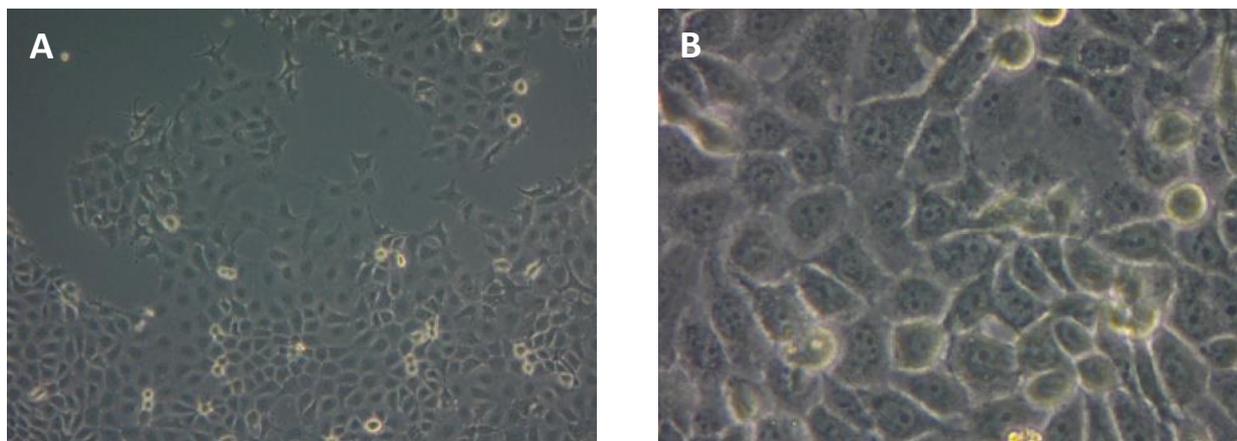


Figura 11. Células FaDu. Fotos de células FaDu tomadas al microscopio **A)** tomada a 10x. **B)** tomada a 40x.

6.3.2 Ensayo de viabilidad celular con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

Se sembraron 2×10^4 células FaDu en cajas de 96 pozos y la placa se incubó durante 24 h permitiendo la adhesión y crecimiento de las células. Se prepararon los tratamientos con diferentes concentraciones, desde 5 a 300 μ M, de luteolina disueltos en DMEM + 10% de SFB, estos tratamientos se agregaron y se incubaron a 24, 48 y 72 h. Posteriormente, se retiró el medio y se incubó con MTT a una concentración de 0.5 mg/mL, durante 4 horas. La reacción se detuvo y las células se lisaron, agregando isopropanol ácido; se mantuvo en agitación hasta a que los cristales formados se disolvieron. Finalmente se midió la absorbancia a 570 nm y se analizaron los resultados utilizando GraphPad Prism 6. Cada tratamiento se realizó en tres ocasiones por separado, las condiciones experimentales se realizaron por sextuplicado.

6.3.3 Ensayo de viabilidad con diacetato de fluoresceína (FDA).

Se sembraron 2×10^4 células y se incubaron durante 24 horas, posteriormente las células se trataron en las mismas condiciones del procedimiento de MTT. Al término se eliminó el medio, se lavó con amortiguador de fosfatos salino (PBS, por sus siglas en inglés) estéril, se agregaron 200 μ L una solución de diacetato de fluoresceína (FDA, por sus siglas en inglés) a 10 μ g/mL disuelto en PBS estéril y se dejó incubar a 37°C, en una atmósfera húmeda con 5% de dióxido de carbono durante 30 min. Finalmente se lavó nuevamente y se añadieron 200 μ L de PBS en cada pozo para realizar la lectura de fluorescencia (λ Excitación=485/20 / λ Emisión=528/20) en el fluorómetro Synergy HTX. El ensayo se realizó por sextuplicado en tres ocasiones por separado.

6.3.4 Ensayo de cierre de herida

Con la finalidad de determinar el efecto que presenta la luteolina sobre la migración celular se sembraron 1×10^6 células en placas de 6 pozos, y se incubó hasta que las células alcanzaron una confluencia de 70%. Posteriormente, se añadió DMEM con 10% de SFB y arabinósido de citosina (Ara C) ($1 \mu\text{M}$), durante 30 min. Se procedió a rasgar la capa de células que se encuentran en el fondo del pozo con ayuda de una punta de micropipeta de $10 \mu\text{L}$. Posteriormente se añadió el tratamiento con luteolina, de 10 a $100 \mu\text{M}$. Se adquirieron diferentes fotografías a 10x, de las heridas realizadas al tiempo 0, 6, 24, 48 y 72 h. utilizando un microscopio de objetivos invertidos Primovert, una vez realizado este paso se procedió a analizar las imágenes con el software ImageJ para determinar la longitud entre los límites de la herida. El ensayo se realizó por triplicado se obtuvo media de las mediciones y obtuvo la desviación estándar y se realizó el análisis de varianza (ANOVA).

6.3.5 Ensayo de migración en Transwell

Para conocer el efecto que tiene la luteolina sobre el proceso de invasión, se colocaron 10,000 células FaDu con medio DMEM sin suero en las cámaras superiores del Transwell con una membrana de poro de $8 \mu\text{m}$. Se trataron con 50 y $100 \mu\text{M}$ de luteolina y en el pozo inferior se colocó DMEM + 10% de SFB, durante 24 h. Una vez pasado este tiempo, se retiró el Transwell se removió el medio y se lavaron 2 veces con PBS. Se fijaron las células con formaldehído al 4% durante 30 min, nuevamente se lavaron 2 veces con PBS, se permeabilizaron las células con metanol durante 20 min, se lavaron con PBS y se procedió a realizar una tinción con Giemsa modificado durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, se hicieron dos lavados con PBS. Con ayuda de un bisturí se cortó la membrana que separaba la cámara inferior del pozo, se colocaron entre un portaobjetos y un cubreobjetos, se tomaron fotos a 10x utilizando un microscopio POLYVAR, posteriormente se analizaron con el programa ImageJ realizando un conteo de las células que se encontraban traspasando la membrana. El ensayo se realizó por triplicado se obtuvo la media y desviación estándar.

6.3.6 Ensayo de TUNEL

Con el objetivo de determinar el efecto que tiene la luteolina sobre la formación de condensaciones en la cromatina, se sembraron células FaDu con medio DMEM + 10% de SFB, las células en cajas de 24 pozos, y se incubaron hasta alcanzar una confluencia del 70%. Se retiró el medio y se colocaron los tratamientos de luteolina a 25 y $50 \mu\text{M}$ en DMEM

+ 10% de SFB durante 24h. Una vez tratadas las células se retiró el medio y se fijaron las células añadiendo 200 μ L de paraformaldehído al 4%, durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron las células 2 veces con PBS a temperatura ambiente y se procedió a permeabilizar las células con una solución de TritonX-100 al 0.2% en PBS durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron 2 veces las células con PBS durante 5 min a temperatura ambiente y se realizó el procedimiento indicado en el inserto del kit *DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System*, Promega. Fuente del inserto: <https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/apoptosis-assays/deadend-colorimetric-tunel-system/?catNum=G7360#protocols>. Posteriormente se tomaron fotos en el microscopio a 100x de cincuenta campos y se colocaron fotos representativas de cada tratamiento. Por último, se cuantificaron las células que daban positivo a la presencia de coloración café con relación a las células totales. El ensayo se realizó en tres ocasiones por separado.

6.3.7 Análisis del ciclo celular

Para determinar el efecto que presenta la luteolina sobre la progresión del ciclo celular se realizó un cultivo de las células FaDu en cajas de 6 pozos, y se incubaron hasta obtener una confluencia de 70%. Una vez alcanzada esa confluencia se sincronizó el cultivo incubando las células en DMEM + 0.1% de SFB durante 48 horas. Posteriormente las células se trataron durante 24 h con luteolina de 10 a 50 μ M, se retiró el medio y se hizo un lavado con PBS estéril. Se añadieron 200 μ L de tripsina distribuyéndolo en toda la superficie del pozo, se esperó a que las células se desprendieran, se agregaron 800 μ L de DMEM con 10% de SFB y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga. Los tubos se centrifugaron los tubos a 600 xg, durante 5 min a temperatura ambiente, luego se retiró el sobrenadante para obtener solo el botón, el cual se resuspendió y se lavó con PBS. Posteriormente se retiró el PBS al botón y se fijaron las células con 500 μ L de etanol frío al 70% para almacenarse o procesarse. El botón celular se lavó y se resuspendió con PBS y se agregaron 15 μ L de ribonucleasa (RNAsa) [100 μ g/mL] dejándose incubar por 5 min a 37°C. Finalmente se hizo un marcaje con 10 μ L de yoduro de propidio durante 1 h a 37°C, en oscuridad, y se corrieron las muestras en el citómetro de flujo. El ensayo se realizó por triplicado.

6.3.8 Western blot

Para evaluar la expresión de proteínas, así como la fosforilación de las cinasas se utilizó la técnica de Western blot. Se sembraron las células FaDu en cajas de 6 pozos y se dejaron

expandir hasta una confluencia del 80%, una vez alcanzado esto se realizó el tratamiento con luteolina variando las concentraciones y/o haciendo ensayos curso-temporales. Una vez terminado el tratamiento, se retiró el medio y se añadió una solución de ortovanadato de sodio [1 μ M] para luego desprender de manera mecánica las células de los pozos con ayuda de un gendarme. La suspensión de células se centrifugó a 14,000 rpm (6000 xg), durante 10 min a 4°C. Posteriormente se lisaron las células en suspensión utilizando amortiguador de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NaF 10 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM, Na_3VO_4 0.4 mM, Nonident P-40 al 1%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, leupeptina 10 μ g/mL, aprotinina 50 μ g/mL, pepstatina 50 μ g/mL) y sonicator por 30 s. Se cuantificó la proteína presente en cada lisado celular por el método de Bradford, utilizando albúmina de suero bovino para la curva patrón. Se realizó la separación de las proteínas que habían sido previamente desnaturalizadas, durante 5 min de calentamiento a 70°C y usando el amortiguador de muestra (Tris 0.5 M, SDS al 10%, glicerol al 15%, Azul de Bromofenol al 0.1%, mercaptoetanol al 1%, disueltos en agua), la separación se realizó con una electroforesis SDS-PAGE. Una vez que fueron separadas las proteínas se transfirieron en una cámara semihúmeda del gel de electroforesis a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PDVF). Posteriormente se bloquearon las membranas utilizando una solución de leche sin grasa al 5% en amortiguador TBS (Tris base 20 μ M, NaCl 0.13 M, TWEEN 20 al 0.2%), una vez bloqueadas las membranas, se realizaron 3 lavados de 5 min con amortiguador TBS y se incubaron con los anticuerpos primarios (dilución 1:10000) durante toda la noche. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-fosfo PI3K (Tyr 199), anti-PI3K, anti-fosfoAKT 1/2/3 (Ser 473), anti-fosfoAKT 1/2/3 (Thr 308), anti-AKT 1/2/3, anti-fosfoERK (Tyr 204), anti-ERK 1/2, anti- fosfoJNK (Thr 183 y Tyr 185), anti-JNK, anti- β actina, anti-VEGF. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 10 min con amortiguador TBS y se adicionó el anticuerpo secundario anti-conejo, anti-cabra y anti-ratón, acoplado a la peroxidasa de rábano picante, según fuera el caso y se incubaron durante 2 horas, para luego realizar 3 lavados de 10 min con amortiguador TBS. Por último, se agregó el reactivo de luminol para Western blot de Santa Cruz Biotechnology y se realizó la detección en placas fotográficas por medio de quimioluminiscencia usando el fotodocumentador ImageQuant LAS 500. Los resultados fueron analizados de manera semicuantitativa cuantificando la densidad de las bandas que se observaban en la membrana.

6.3.9 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para evaluar VEGF.

Se evaluó la liberación de VEGF, para ello se recuperó el medio en el que se encontraban las células FaDu después de ser tratadas con luteolina de 10 a 100 μ M durante 24 h y se realizó la cuantificación de la liberación, siguiendo el protocolo del kit *VEGF (human) ELISA*, de la marca Enzo. Fuente del inserto: http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/files/manual/ENZ-KIT156_insert.pdf (05/11/2018 a las 12:46pm.). El ensayo se realizó por triplicado.

6.3.10 Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCR)

Se sembraron las células FaDu en cajas de 6 pozos y se expandieron hasta llegar a una confluencia del 80%, llegando a este punto se retiró el medio y se añadió el medio con el tratamiento de luteolina de 10 a 100 μ M durante 6 h. Se separó y se purificó el ácido ribonucleico (RNA) utilizando la metodología indicada por el fabricante para el reactivo de *TRIzol™* de Invitrogen. Una vez obtenido el RNA, se realizó la RT-PCR, siguiendo metodología indicada por el fabricante en el kit *SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase*, se usaron los primers para PTEN (sentido) 5'-TTC TAA ACC GTG CAG CCT CTT-3'; PTEN (antisentido) 5'-TTTCTA ACCGTG CAG CCT CTT-3', GAPDH (sentido) 5'- CCA CCC ATG GCA ATT TCC ATG GCA-3', GAPDH (antisentido) 5'-TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC-3'; VEGF (sentido) 5'- GGA GGC TGG CAA CAT AAC AG-3'; VEGF (antisentido) 5'-ACG TCT TGC TGA GGT AGC TC-3'. Posteriormente, se realizó una electroforesis horizontal en geles de agarosa. Los geles se tiñeron utilizando una solución de bromuro de etidio y se realizó un análisis semicuantitativo de la expresión del transcrito utilizando las imágenes tomadas por el fotodocumentador ImageQuant LAS 500.

6.3.11 Análisis estadístico.

El conteo celular y la medición de distancia para los ensayos de migración y capacidad invasiva se realizaron con el programa ImageJ. Para las bandas obtenidas en RT-PCR y Western Blot fueron analizadas por medio de densidad de la coloración utilizando el software Digi Doc-It. Se realizaron pruebas estadísticas de t de student y de análisis de varianza (ANOVA) a una vía, con el programa GraphPrism, fijando un valor de $p < 0.05$ para determinar que tratamientos presentaban un efecto estadísticamente significativo, y los resultados se graficaron y se le colocó el error estándar a cada columna.

7. Resultados

7.1 Efecto de luteolina en la viabilidad celular.

Para comenzar a caracterizar los efectos que presenta la luteolina sobre la línea celular FaDu, se realizó un primer ensayo de viabilidad celular con MTT utilizando concentraciones de luteolina de 50 a 200 μM a 3 diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas), los resultados de este ensayo se presentan en la **Figura 12**. En estos datos, se puede observar que existe una disminución significativa de la viabilidad de las células desde la concentración más baja probada (50 μM) en el tiempo de 72 h, de igual manera en todos los tratamientos con luteolina se puede apreciar una disminución de la viabilidad de manera dependiente de la dosis y del tiempo, mostrando diferencias significativas a las 48 h a una concentración de 100 μM .

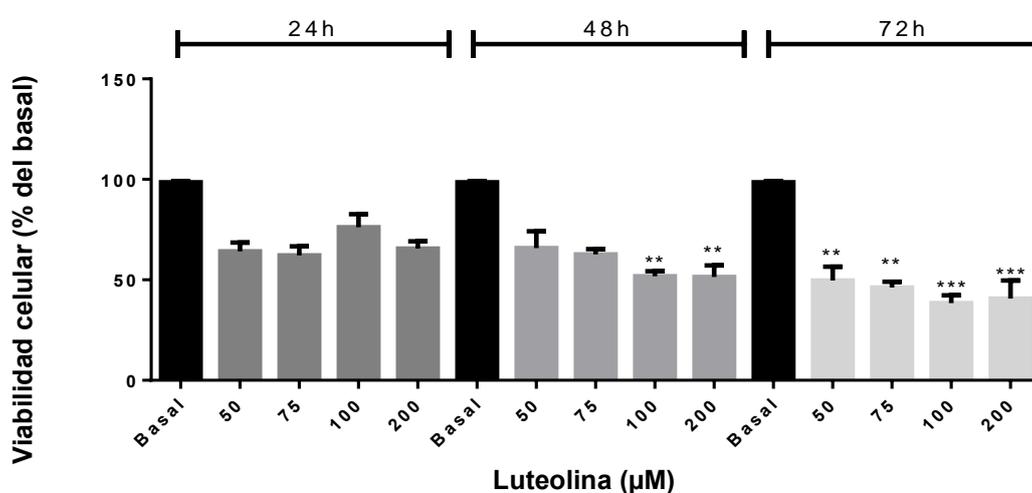


Figura 12. Ensayo de MTT con luteolina en células FaDu. Efecto de la luteolina sobre la viabilidad celular de células FaDu con concentraciones de 50 a 200 μM y en tiempos de 24, 48 y 72 h. Ensayo por sextuplicado (n=3, ANOVA una vía; **, p=0.0070 y ***, p=0.0003)

Posteriormente se realizó un segundo ensayo sobre la viabilidad celular utilizando una técnica de detección por medio de fluorescencia, la cual se realiza con FDA, para ello se utilizaron concentraciones de luteolina de 50 a 300 μM con tiempos de tratamiento de 24, 48 y 72 h. En los resultados que se representan en la **Figura 13 A**, se puede observar que desde la concentración de 50 μM , en el tiempo más corto de exposición (24 h), se presenta una disminución significativa de la viabilidad celular. Igual que en el experimento anterior no se puede distinguir una clara diferencia entre el efecto que tiene cada uno de los tratamientos, sin embargo, se observa una diferencia con el ensayo anterior, en el cual se aprecia una

máxima disminución de la viabilidad aproximadamente en 70%, mientras que en algunos de los tratamientos de este segundo ensayo, se logran reducir la viabilidad en más de un 50% desde los tratamientos a 24 h.

Con el fin de obtener la concentración inhibitoria media (IC₅₀) y las condiciones apropiadas para realizar los demás experimentos, se realizó nuevamente el ensayo de citotoxicidad con FDA a concentraciones menores, de 5 a 50 µM, a tiempos de 24, 48 y 72 h. En los resultados arrojados por este experimento (**Figura 13 B**), se puede apreciar un efecto dependiente dosis-respuesta, en el que a mayor concentración y/o mayor tiempo de exposición a un tratamiento, existe una mayor disminución de la viabilidad celular. Una vez realizadas las repeticiones para cada uno de los experimentos se calculó la IC₅₀ a cada tiempo, obteniendo un resultado de IC₅₀ 24 h=19.59 µM, IC₅₀ 48 h=12.16 µM y IC₅₀ 72 h= 7.917 µM. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se seleccionó este intervalo de concentraciones para los futuros ensayos.

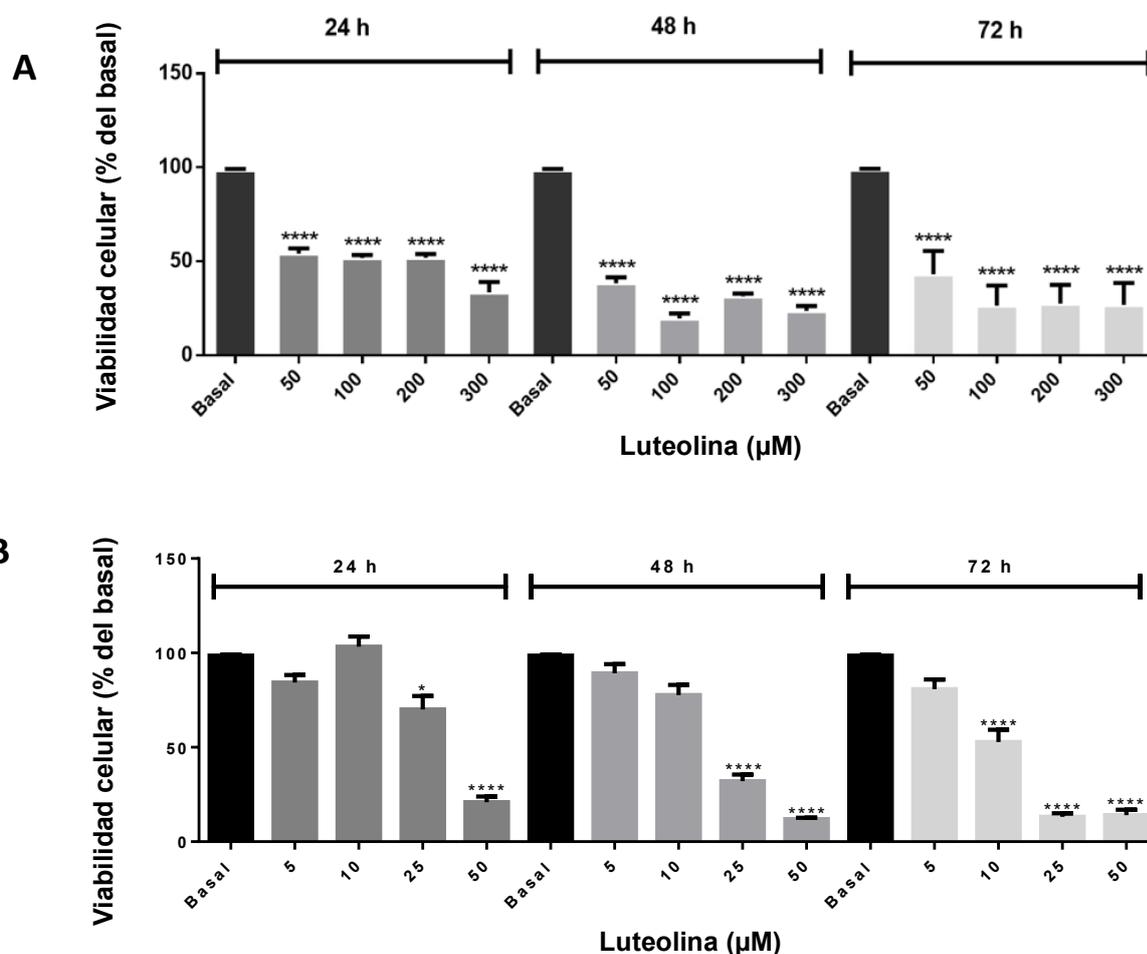


Figura 13. Ensayo fluorométrico de citotoxicidad en microcultivo con luteolina en células FaDu. Efecto de la luteolina sobre la viabilidad celular de células FaDu. A) a concentraciones de 50 a 200 µM y tiempos de

24, 48 y 72 h. **B)** a concentraciones de 5 a 50 μM y tiempos de 24, 48 y 72 h. IC_{50} 24 h: 19.59 μM ; IC_{50} 48 h: 12.16 μM ; IC_{50} 72 h: 7.917 μM . Ensayo por sextuplicado (n=3, ANOVA una vía; *, p=0.0122 y ****, p<0.0001).

7.2 Efecto de la luteolina en el cierre de herida.

En el ensayo de curación de herida (**Figura 14**) se puede apreciar que el cierre de la herida es significativamente menor cuando existe la presencia del flavonoide en el medio de cultivo, comparando con el control, y este efecto que se presenta incrementa al aumentar el tiempo de exposición al tratamiento.

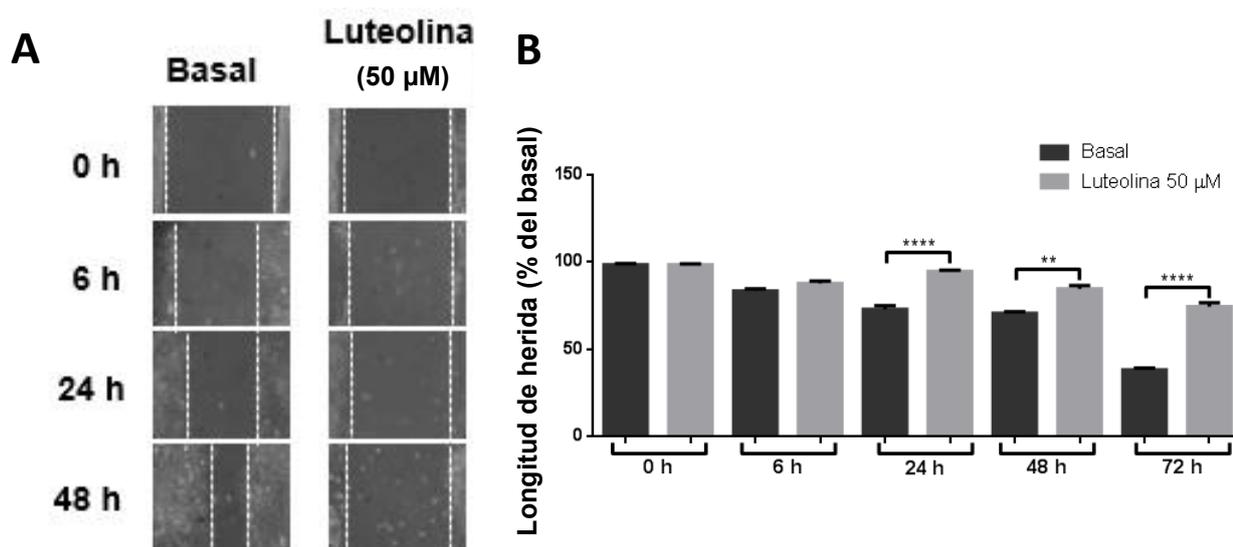


Figura 14. Ensayo de curación de herida. Efecto de la luteolina (50 μM) sobre curación de una herida generada en el cultivo de células FaDu. **A)** Imágenes del cierre de la herida tomadas a tiempos de 0, 6, 24 y 48 h con microscopio de objetivos invertidos a 10x. **B)** Efecto de luteolina (50 μM) sobre la migración celular a tiempos de 0, 6, 24 y 48 h. (n=3 ANOVA una vía; **, p=0.0022 y ****, p<0.0001).

7.3 Efecto de luteolina de la migración celular.

Para evaluar el efecto que tiene la luteolina sobre la migración celular se utilizó el ensayo de Transwell (**Figura 15**). Al observar al microscopio las membranas a 40x, se pudo determinar que desde la concentración de 50 μM de luteolina durante 24 h existe una disminución significativa de la cantidad de células que se encontraban tratando de atravesar a la cámara inferior.

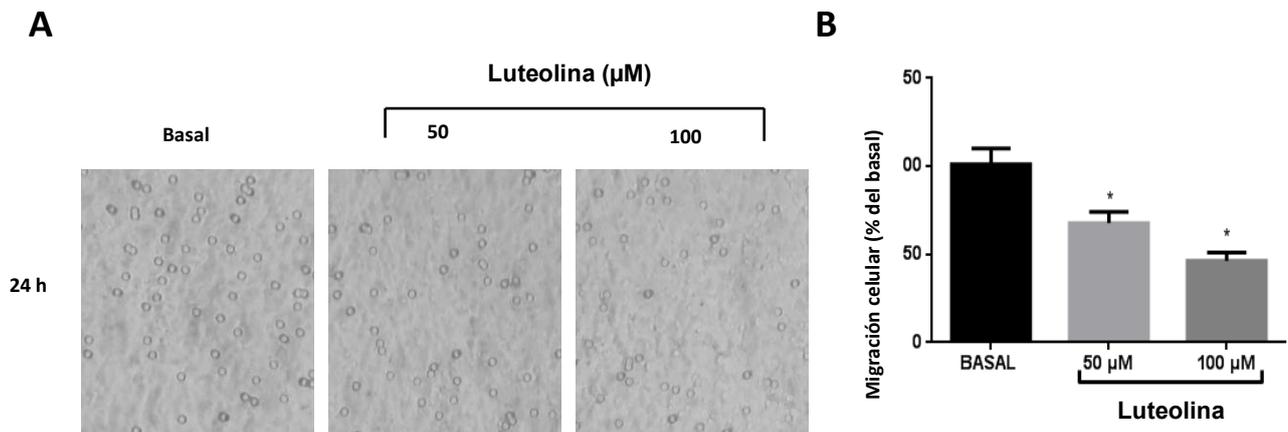


Figura 15. Ensayo de migración celular con Transwell. A) Membranas de la cámara de Transwell vistas a microscopio, a 10x, después de 24 horas de tratamiento con luteolina a 50 y 100 μM a 40x. **B)** Efecto de la luteolina sobre la migración y capacidad invasiva celular. Conteo por sextuplicado ($n=3$, ANOVA una vía; *, $p<0.5$).

7.4 Efecto de luteolina en la angiogénesis.

Una de las proteínas que se encuentra involucrada íntimamente con el proceso de angiogénesis es el VEGF, para evaluar la liberación (**Figura 16**) y la expresión (**Figura 17**) de este factor de crecimiento, así como del efecto que posee la luteolina sobre estos procesos se realizaron los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) y RT-PCR. Se obtuvieron datos que nos indican que a mayor concentración de luteolina existe una mayor inhibición de la liberación de este factor al medio, posiblemente porque existe un decremento en la cantidad de VEGF producido por la célula, así como de la expresión del transc que codifica para esta proteína a una dosis de 25 μM .

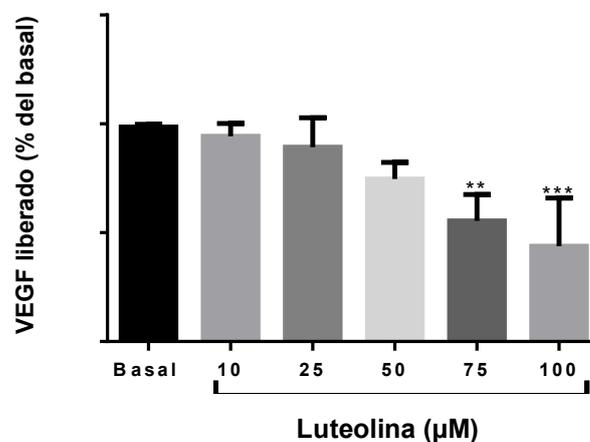


Figura. 16 ELISA para VEGF. Resultados de % VEGF en el medio, con tratamientos a distintas concentraciones de luteolina por 24 h ($n=3$ ANOVA una vía; **, $p=0.0022$ y ***, $p=0.0002$).

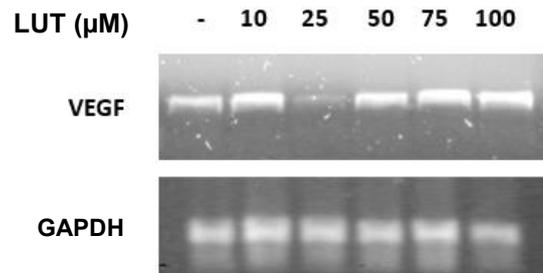
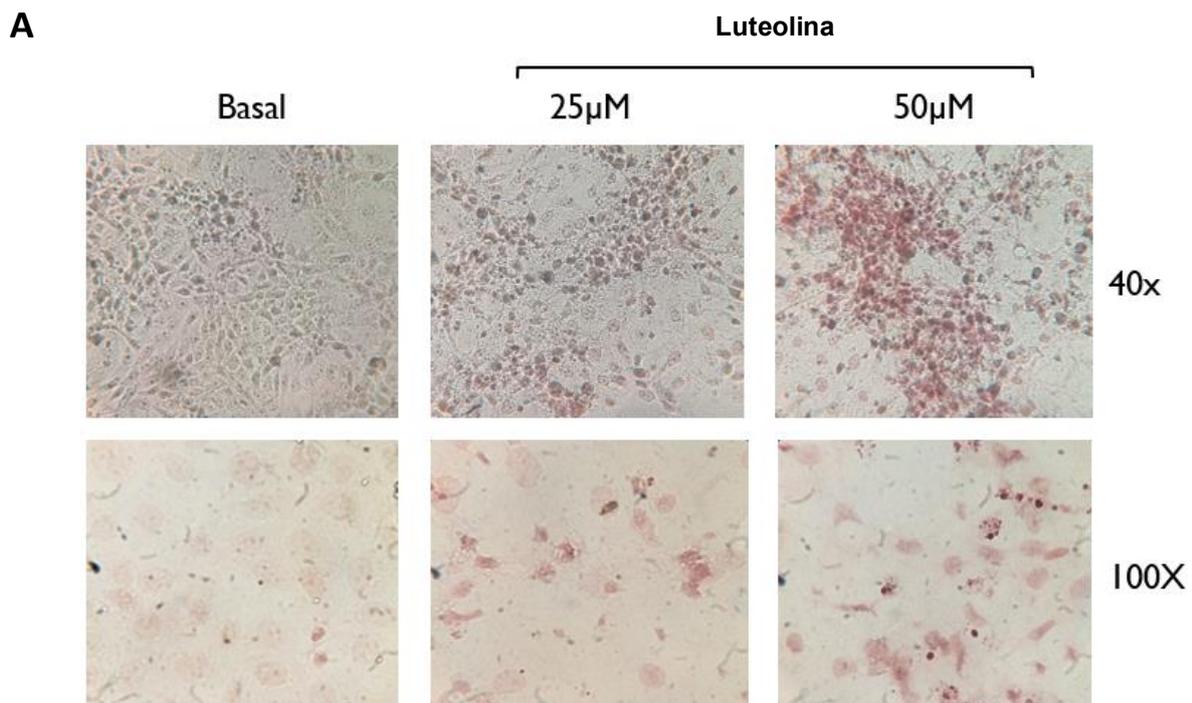


Figura 17. Expresión de VEGF. RT-PCR para evaluar la expresión de VEGF con tratamientos a distintas concentraciones de luteolina durante 24 h.

7.5 Efecto de luteolina en la apoptosis.

Conociendo las concentraciones a las se podía disminuir la viabilidad celular (**Figura 13**) se procedió a hacer el ensayo de TUNEL para evaluar la cantidad de células que presentan ruptura de cromatina, para esto se realizó el tratamiento de 24 horas con luteolina a concentraciones de 25 y 50 μM ; con ayuda de un microscopio, se observaron estas células a 100x. Se pudo apreciar que existe un efecto significativo desde la dosis de 25 μM en el que se ve el aumento de células no viables y al aumentar la concentración a 50 μM disminuían las células viables (**Figura 18**).



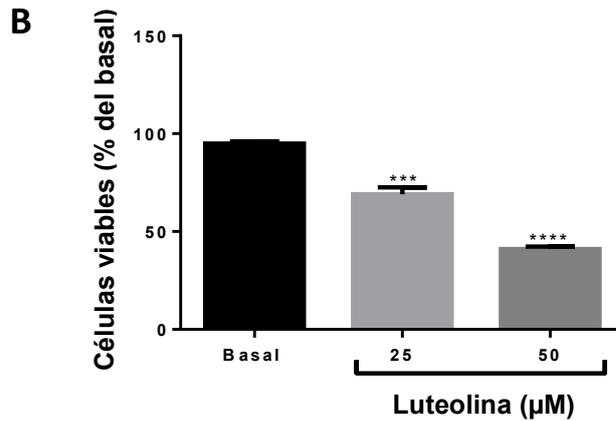


Figura 18. Ensayo de TUNEL. A) Fotos del ensayo de TUNEL a 40x y 100x a las 24 h. **B)** Porcentajes de células viables. (n=3 ANOVA una vía; ***, p=0.0006 y ****, p<0.0001).

7.6 Efecto de luteolina en el ciclo celular.

Con el fin de determinar si luteolina podía detener la progresión del ciclo celular en la línea celular FaDu se realizó un ensayo de citometría de flujo utilizando ioduro de propidio para visualizar la cantidad de DNA que tenía las células después de tratamientos diferentes concentraciones de luteolina, con ello fue posible determinar que la presencia de este flavonoide, generaba un incremento de la cantidad de células que se encontraban en la fase G0/G1 y una disminución notoria en la cantidad de células en fase G2 (**Figura 19**).

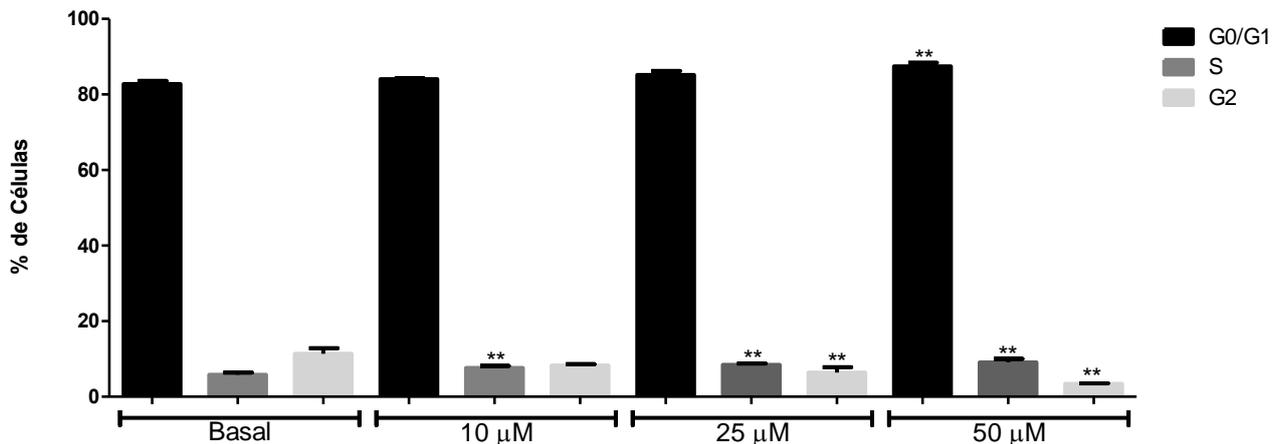


Figura 19. Ensayo de citometría de flujo para evaluar el ciclo celular. Porcentajes de células en las diferentes etapas del ciclo celular con tratamientos de distintas concentraciones de luteolina a las 24 h. (n=3, t de student; **, p<0.07).

7.7 Efecto de luteolina en la vía de señalización PI3K/AKT y MAPK.

Una vez observando los efectos que generaba los tratamientos de luteolina sobre las células FaDu, se optó por realizar Western blots y RT-PCR, para evaluar la activación y expresión de cinasas y la fosfatasa PTEN involucradas en las vías de señalización que modulan estos procesos fisiológicos, con la finalidad de determinar cuáles de estos se afectaban por la presencia del flavonoide. Se realizó un tratamiento curso temporal con luteolina al 50 μM con una duración total de 2 h y posteriormente se realizó un Western Blot. Se pudo observar la disminución evidente en la fosforilación de las cinasas PI3K, ERK y ATK, en sus 2 sitios de fosforilación (**Figura 20**); lo que nos indica que la luteolina posee un efecto modulador en la activación de estas cinasas y por consecuencia una inhibición en la progresión de estas vías de señalización, involucradas en la promoción del cáncer. Posteriormente se realizó un tratamiento dosis-respuesta a 24 h para evaluar el efecto de la luteolina en la expresión de PTEN. Por medio de RT-PCR fue posible determinar que la luteolina podía generar un aumento dosis-dependiente en la expresión de PTEN a concentraciones de 10 y 25 μM , sin embargo, a dosis más altas no se observó un aumento en la expresión del gen que codifica para esta proteína.

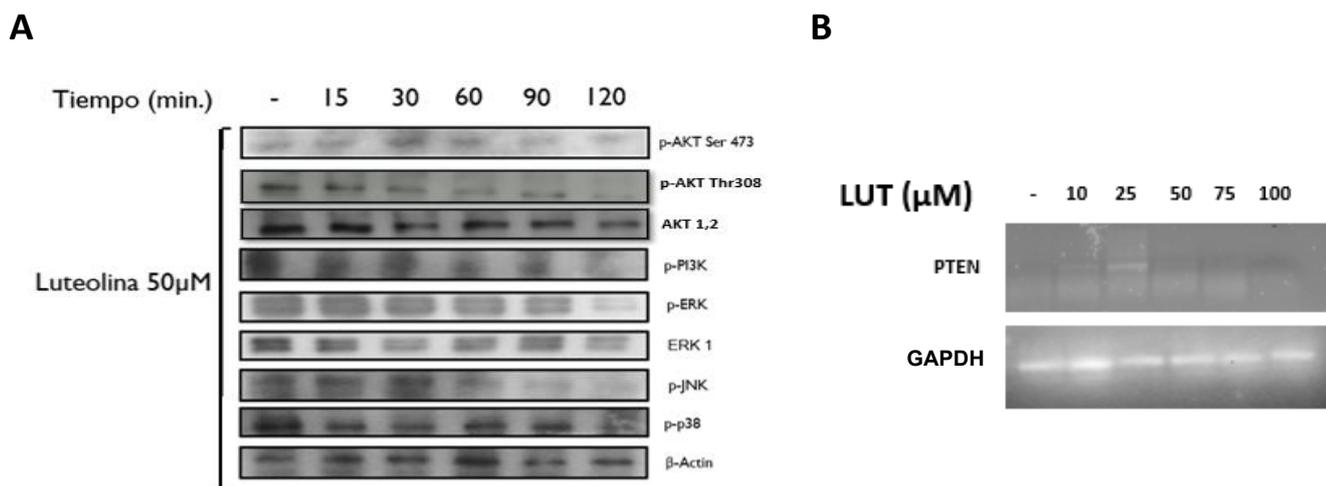


Figura 20. Evaluación de proteínas de las vías MAPK y PI3K/AKT A) Western blots para la determinación del efecto curso-temporal sobre la fosforilación de cinasas AKT, ERK, p38 y PI3K con 50 μM de luteolina durante 2 h. **B)** RT-PCR para evaluar la expresión de PTEN con tratamientos a distintas concentraciones de luteolina durante 24 h.

8. Discusión

Se realizó el ensayo de viabilidad con MTT para determinar el efecto citotóxico que la luteolina presentaba sobre la línea celular FaDu. Con estos primeros resultados fue posible determinar que la luteolina generaba una disminución significativa de la viabilidad celular a concentraciones de 100 y 200 μM a las 48 h, y de 50 a 200 μM con un tiempo de exposición al tratamiento de 72 h.

En experimentos previos realizados en el laboratorio se ha podido determinar, por medio del ensayo de viabilidad con MTT, que la luteolina presentaba un efecto citotóxico sobre las células FaDu [59]. Sin embargo, no se había logrado caracterizar en su totalidad dicho efecto. Por este motivo, al comparar los resultados de las concentraciones y tiempos de exposición que tienen un efecto en experimentos anteriores y en estudios realizados para otras líneas celulares, se ha podido determinar que la concentración y tiempo de exposición necesarios para generar un efecto similar tendría que ser menor. Para descartar algún error experimental y corroborar los datos, se procedió a realizar otro tipo de ensayo que permite la determinación de este mismo efecto. Se investigó sobre el ensayo fluorométrico de citotoxicidad en microcultivo que se encuentra descrito por primera vez, para el uso en células tumorales humanas, en el artículo de Larsson y Nygren [60], y se ha descrito que esta técnica *in vitro* presenta resultados con un patrón de respuesta similar a las respuestas a nivel clínico, por lo que se considera como una técnica rápida y eficiente para la detección de la actividad citotóxica de drogas antitumorales [61]. Usando este protocolo se pudieron obtener nuevos resultados, además, por tratarse de fluorescencia, lo vuelve un método más sensible [62]. A partir de estos nuevos resultados obtenidos se pudo determinar el efecto citotóxico que la luteolina presenta sobre las células FaDu, así como, obtener las IC_{50} para cada uno de los tiempos de tratamiento, con esto se pudo determinar y confirmar que la luteolina presenta un efecto citotóxico sobre esta línea celular. Conociendo las concentraciones a las que luteolina generaba la disminución de la viabilidad celular, se pudieron determinar las condiciones para los posteriores ensayos, en los que se utilizaron concentraciones que presentaban citotoxicidad baja, intermedia y la máxima, lo que permitió determinar los efectos en otros fenómenos fisiológicos.

Conociendo la IC_{50} a las 24 h y comparando con la que se presenta en otras líneas celulares, se puede ver un efecto similar al generado por este mismo flavonoide en cáncer de células escamosas de piel, en el que la IC_{50} determinada fue de 19 μM en la línea celular humana A431 de cáncer de piel obtenida de ATCC [54].

En otros estudios realizados previamente, se ha determinado que la luteolina posee un efecto citotóxico en células de, al menos, 10 tipos de cáncer, y que el efecto que presenta sobre la viabilidad celular *in vitro*, es mayor al que se presenta al usar otros flavonoides como quercetina y tangeritina.

En trabajos previos, se ha obtenido la IC₅₀ sobre la viabilidad celular en presencia de luteolina, para otros tipos de cáncer, entre ellas se destacan: 3.1 µM en las células humanas A 549 de cáncer de pulmón, 2.3 µM en células 4A5 de melanoma de ratón B16, 2.0 µM en linfocitos T humanos que presentan leucemia (CCRF-HSB-2) y 1.3 µM en células humanas TGBC11TKB de cáncer gástrico. También se han determinado la IC₅₀ en cáncer de cérvix, de colon y de vejiga, dando como resultado 27 µM, 32.5 µM y 68 µM, respectivamente. Conociendo estos valores podemos determinar que la luteolina no posee un efecto tan fuerte sobre la línea celular FaDu, como los que se le han atribuido en otros estudios, sin embargo, nos sugiere que presenta una mayor efectividad para disminuir la proliferación que para otros tipos de cáncer en los que se ha probado [54].

Para evaluar el efecto que presenta este flavonoide sobre la migración y capacidad invasiva, se utilizaron el ensayo de curación de herida en el cual se añade Ara C, que es un inhibidor de la proliferación celular, logrando así seleccionar el fenómeno fisiológico en el que se quiere evaluar la presencia de luteolina, junto con el ensayo de Transwell, que nos ayuda a determinar el porcentaje de migración que presentan las células a través de una membrana que posee un tamaño de un poro definido, promovida por un quimio-atrayente, que en este caso fue la concentración de suero fetal bovino. En el ensayo de curación de herida (**Figura 14**) se puede apreciar que el cierre de la herida es significativamente menor cuando existe la presencia del flavonoide en el medio de cultivo, en comparación con el control, y este se incrementa al aumentar el tiempo de exposición al tratamiento. Además, en el ensayo de Transwell como ya se mencionó en los resultados, se puede apreciar que con el tratamiento de luteolina, hay una disminución significativa dosis dependiente de la cantidad de células que se retuvieron en la membrana de manera, lo que nos puede indicar una menor capacidad migratoria gracias a la exposición a este flavonoide.

En estudios previos se ha evaluado el efecto antimigratorio que presenta luteolina sobre otras líneas celulares humana, como son: la línea PC-3 de cáncer de próstata, la línea A431 de cáncer de piel y la línea HepG2, derivada de un carcinoma hepatocelular, en las 3 líneas se pudo determinar que la luteolina inhibía la migración y capacidad invasiva que caracterizaba a este tipo de líneas celulares, incluso en la última línea celular mencionada a

una concentración de 40 μM se mostraba una inhibición total, determinando posteriormente que este efecto estaba relacionado con la inhibición de la fosforilación de cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2) y AKT, y al compararse con inhibidores específicos de MEK (50 μM de PD98059) y de PI3K (200 μM de Wortmanina) se pudo observar que la luteolina presentaba un efecto anti-migratorio y anti-invasivo mayor o igual [54].

El proceso por el cual se generan nuevos vasos sanguíneos o la extensión de estos es llamado vasculogénesis y angiogénesis respectivamente. Existe una molécula llamada VEGF, la cual es considerada como el mediador central de este proceso fisiológico. Esta molécula, al unirse con sus receptores de las células del tejido vascular de un organismo sano provocan la prolongación de vasos sanguíneos para procesos embriológicos, en la curación de heridas, entre otros. Un tumor activo dentro de un ser vivo requiere una mayor cantidad de nutrientes y oxígeno para su crecimiento, por lo que es necesaria la formación de nuevos vasos sanguíneos que lo provean de una mayor irrigación sanguínea para conseguir estos sustratos; el VEGF es una molécula que se ve relacionada íntimamente con este proceso. También se ha logrado determinar que VEGF está involucrado en la evasión del sistema inmune, aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos y en la inhibición de la apoptosis [65]. Por todas estas funciones que realiza VEGF, es que se ha considerado como un blanco terapéutico clave en el cáncer, incluso en la actualidad son utilizados inhibidores de receptores y de la producción de VEGF, así como anticuerpos específicos para esta molécula que le impidan su unión con su receptor [66].

Se ha determinado que luteolina puede inhibir la liberación y expresión de VEGF en diversos tipos de cáncer [42], entre los estudios que se han realizado *in vivo*, destacan en cáncer de mama y cáncer gástrico, y de manera *in vitro* en cáncer de próstata y cáncer de pulmón; estos últimos utilizando concentraciones cercanas a 50 μM [48]. Sin embargo, no se informa la acción que puede tener sobre VEGF en cáncer hipofaríngeo. Para identificar los efectos de VEGF en el cáncer hipofaríngeo, se realizaron los ensayos de ELISA y RT-PCR. Los datos obtenidos por el ensayo de RT-PCR no son suficientes para determinar que luteolina impedía la expresión de VEGF en células FaDu, sin embargo, si se pudo observar una ligera disminución de la concentración liberada de VEGF al medio manera *in vitro*, esto a su vez puede ser el causante de la inhibición de la señalización que promueve la proliferación celular y aumento de la permeabilidad. Comparando los resultados obtenidos en este trabajo con los efectos que ha presentado luteolina en otras líneas celulares, probablemente el

tratamiento *in vivo* podría tener un efecto inhibitorio de la angiogénesis, vasculogénesis y metástasis.

En el ensayo de TUNEL (**Figura 19**), es posible observar que conforme se aumenta la concentración del flavonoide existe un mayor número de células que presentaban positividad, que se hizo evidente por la coloración marrón característica de ensayo. Una característica de este ensayo es que es comercializado como una herramienta para la detección específica de células apoptóticas, sin embargo, en una publicación realizada por Kraupp y colaboradores, se menciona que no debe de ser considerado como un marcador específico de apoptosis ya que se plantean diferentes situaciones de la muerte celular en la que también se presenta la fragmentación del DNA, por lo que generaría falsos positivos en de células que presentan el marcaje de este ensayo [67]. Por lo que podemos concluir que luteolina promueve la fragmentación nuclear de manera dosis dependiente, pero no es posible proponer aún el mecanismo por el que actúa. Existen múltiples evidencias que han determinado que luteolina puede producir un efecto pro-apotótico en diversas líneas celulares de cáncer, incluyendo las de carcinoma oral el cual presenta características y una etiología similar, en el que se ha determinado que la luteolina puede promover el incremento de la expresión de proteínas pro-apoptóticas, disminuir la expresión de proteínas anti-apoptóticas y generar fragmentación nuclear [57]. En concentraciones de 40 μM se ha observado que la luteolina puede inhibir la actividad de la topoisomerasa I, promoviendo así la apoptosis [68], por este motivo, es posible pensar en una relación entre los resultados obtenidos en este trabajo, con los efectos anteriormente reportados.

En diversos experimentos previos se ha demostrado que la luteolina puede causar el arresto del ciclo celular, entre los casos más destacados están los que reportan que la luteolina puede producir el arresto del ciclo celular en fase G1 en células de cáncer gástrico, próstata y melanoma [51], en células de cáncer de colon HT-29 en concentraciones de 20-60 μM se arrestó el ciclo celular en fase G2/M, además utilizando una concentración de 50 μM de luteolina se produjo un arresto en fase S en las células CH27 derivadas de carcinoma de células escamosas de pulmón y en 5 líneas celulares de hepatocarcinoma se logró un arresto del ciclo en fase G0/G1 con una $\text{IC}_{50}=12.5 \mu\text{M}$. En este trabajo, usando citometría de flujo, se pudo determinar el efecto que la luteolina generaba sobre el ciclo celular de las células FaDu, como se observa en las gráficas. Además, se pudo determinar que hay un aumento significativo de la cantidad de células que se encuentran en fase G0/G1 en comparación de

las no tratadas con luteolina y conforme se aumenta la concentración de luteolina, el número de células que se encuentran en esta fase aumenta, con lo que podemos decir que la luteolina posee un efecto dosis-dependiente para evitar la progresión del ciclo celular, similar al que se observó en la línea de carcinoma de células escamosas de pulmón.

El proceso de invasión a otros tejidos, así como la migración a tejidos distantes de las células cancerígenas contribuye en un 90% a la mortalidad causada por el cáncer en los humanos. En estudios realizados desde antes de 1999, se planteaba que la fosforilación y desfosforilación era un mecanismo importante en la acción de las hormonas y factores de crecimiento que promueven muchos de estos procesos celulares, ya que estas se veían involucradas en la activación de las cinasas de tirosina, que serían las moléculas responsables de transmitir los mensajes hacia el interior celular. También se ha visto que las cinasas de tirosina están involucradas en el proceso de transformación de las células de un estado normal a uno maligno, lo cual está relacionado con la sobreexpresión de estas proteínas como consecuencia de la expresión de diversos oncogenes [37].

En estudios tanto *in vitro* como *in vivo* realizados sobre cáncer colorrectal, se pudo determinar que luteolina podía inhibir la proliferación de las células mediada por la señalización de ERK, causar el arresto del ciclo celular, promover la apoptosis, disminuir crecimiento de tumores y la activación de vía PI3K/AKT [63, 64].

En otros estudios se mencionan que luteolina presenta efectos inhibitorios sobre estos procesos involucrados en la metástasis de varios tipos de cáncer, a través del bloqueo de las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK/ERK [42, 51, 69]. Además, se ha observado que esta flavona en concentraciones de 10 a 50 μ M suprime el crecimiento estimulado por EGF, disminuye la viabilidad, la liberación de MMP's e inhibe la actividad de las cinasas al impedir su fosforilación en la línea celular de cáncer de piel A431. En líneas celulares de cáncer hepático, de ovario, mama y próstata, la luteolina genera un efecto inhibitorio de la actividad de las cinasas, similar al que se presenta en la línea celular A431 [37]. En investigaciones realizadas en el Laboratorio de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI) de la UNAM, se ha caracterizado este efecto de inhibición, de las vías anteriormente mencionadas, en la misma línea celular, pero utilizando un flavonoide metoxilado llamado nobiletina, dando como resultado IC₅₀ mayores a las obtenidas para luteolina [70, 71].

Por tal motivo fue importante la evaluación de estas vías en este trabajo, de las cuales se pudo detectar su activación mediante la técnica de Western blot. Para ello se evaluaron ciertas cinasas que se encuentran íntimamente ligadas a los procesos anteriormente mencionados y cuyos resultados se pueden ver en la **Figura 18-A**. Los resultados muestran que la intensidad de las bandas que corresponden a las cinasas ERK1/2 y AKT (en ambos sitios de fosforilación) presentan una disminución conforme hay un aumento en el tiempo de exposición al tratamiento con luteolina, estas cinasas se caracterizan por activarse cuando se encuentran fosforiladas, al bloquear la fosforilación se observa una disminución de los procesos celulares en los que están implicadas como la activación de procesos migratorios, invasivos y de proliferación, sugiriendo una relación estrecha de estas cinasas con el mecanismo de acción que presenta luteolina.

El gen de PTEN es considerado como un gen supresor de tumores ya que su expresión da lugar a la formación de la enzima fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato-3-fosfatasa, esta es una proteína que posee la capacidad de remover grupos fosfato de otras proteínas y fosfolípidos que se encuentran involucrados en vías de señalización como la de PI3K/AKT, generando un efecto inhibitorio en el crecimiento y proliferación celular, disminuyendo la migración, la angiogénesis y promoviendo la adhesión entre células [72]. En la **Figura 18-B** representa resultados preliminares de RT-PCR para evaluar el transcrito de PTEN, en los que se puede observar que a concentraciones de 10 y 25 μM de luteolina, existe un aumento en la expresión del gen PTEN, lo que nos indica que el tratamiento con esta flavona podría aumentar la producción de esta proteína modulando todos los procesos mencionados anteriormente que se encuentran relacionados con el cáncer.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, se genera evidencia que sugiere que el mecanismo de acción que presenta la luteolina para tener un efecto anticancerígeno de manera *in vitro*, es mediante la regulación de la participación de las cinasas PI3K, AKT y ERK, así como una posible participación de la fosfatasa PTEN.

En investigaciones realizadas por Jin Won Hyun y su equipo, sobre el efecto de la luteolina en el cáncer colorrectal, se utilizó la línea celular HT-29 derivada de un humano que presentaba esta afección, se determinó que la luteolina presentaba un efecto anticarcinogénico al inhibir la viabilidad celular y disminuir la proliferación que presentaban estas células con una IC_{50} de 30 μM , sin embargo, al exponer a este mismo flavonoide a células normales de colon se pudo observar que la IC_{50} aumentaba hasta un 65 μM e incluso se

informó que no presentaba un efecto significativo sobre otras líneas celulares sanas de colon [63, 73].

En resultados obtenidos en experimentos realizados con anterioridad en Laboratorio de Bioquímica de la DEPel con el cultivo primario de fibroblastos gingivales (HGF), se observó que la luteolina no presentaba un efecto citotóxico significativo sobre estas células. En los resultados presentados en la tesis de Claudia Bello Álvarez en el 2017 [74], se menciona que el uso de flavonoides, en particular morina, también tiene un efecto citoprotector contra la citotoxicidad generada por quimioterapéuticos convencionales, como es el cisplatino, en líneas celulares no cancerígenas.

En el trabajo de Anja Haveric et al. del 2018 [75], se menciona que la luteolina se ha probado en diversas líneas celulares sanas y cancerígenas, demostrando que induce un efecto apoptótico en células alteradas sin tener efectos adversos sobre las células sanas y en su investigaciones utilizando curcumina y luteolina en líneas celulares de linfocitos sanos y linfocitos de un paciente con leucemia, se pudo observar que la curcumina presentaba una ligera citotoxicidad sobre líneas celulares no alteradas, sin embargo, luteolina no presentaba un efecto letal sobre estas líneas, inclusive se descubrió que a una concentración de 50 μM generaba un efecto protector inhibiendo el efecto genotóxico sobre los linfocitos normales. En otro estudio realizado por Horinaka et al. en el 2005 [76], se menciona que el efecto pro-apoptótico que presentan las células en presencia de luteolina es selectivo a células cancerígenas y fue corroborado utilizando otras líneas celulares, entre ellas células mononucleares periféricas de sangre humana, en las cuales no se presentó la activación de la apoptosis a diferencia de las células de cáncer cervicouterino, de próstata y de otros tipos de tumores en los que fue probada.

Utilizando xenotransplantes en ratones de células de cáncer de pulmón, de ovario, de próstata, hígado y colon, se pudo evaluar el efecto *in vivo* al igual que la toxicidad que presenta la luteolina, en estos cinco tipos de tumores en los que se evaluó y se pudo observar que existía una reducción significativa del crecimiento del tumor sin presentar un efecto adverso sobre el peso del cuerpo del ratón, el consumo de alimentos ni sobre el sistema reproductor [54, 77], lo que nos sugiere que un tratamiento utilizando esta molécula puede presentar menos efectos adversos que los quimioterapéuticos convencionales.

Todo esto nos lleva a que luteolina, al no tener efectos citotóxicos significativos, e incluso disminuir los efectos citotóxicos de otras moléculas bioactivas y potenciar el efecto de otros quimioterapéuticos normales, podría llegar ser una alternativa en el tratamiento de este

padecimiento, evitando utilizar métodos quirúrgicos muy invasivos o ser utilizada como co-tratamiento en este tipo de afecciones, buscando disminuir las dosis de medicamentos convencionales, provocando la menor cantidad de efectos no deseados y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

9. Conclusiones

- Se logró determinar, que la luteolina posee múltiples efectos in vitro sobre la línea celular FaDu.
- Se determinó que luteolina posee un efecto dosis-dependiente en la disminución de la viabilidad celular, obteniendo las IC_{50} a diferentes tiempos (IC_{50} 24 h: 19.59 μ M; IC_{50} 48 h: 12.16 μ M; IC_{50} 72 h: 7.917 μ M) los que confirmó que esta flavona posee un efecto citotóxico en las células FaDu.
- Los resultados nos indican que exposición a esta flavona durante 24 h, en un intervalo de concentraciones de 10 a 100 μ M inhibe significativamente la migración celular, así como la liberación de VEGF.
- Se confirmó el efecto de fragmentación del DNA en presencia de luteolina, al observar una mayor cantidad de células positivas a el ensayo de TUNEL conforme aumentaba la concentración de esta molécula, lo que nos sugiere que la luteolina puede estar induciendo apoptosis.
- Se determinó que los efectos fisiológicos que generaba este flavonoide en la línea celular FaDu presentan relación en la modulación de proteínas involucradas en la vía PI3K/AKT y MAPK, en las que se destacan PI3K, AKT y ERK.

Los resultados obtenidos en este trabajo proponen los posibles efectos benéficos de la luteolina para evitar la progresión del cáncer, metástasis y angiogénesis, además con la baja toxicidad presentada sobre células sanas, es una molécula con potencial para uso terapéutico sobre el cáncer hipofaríngeo, sin embargo, debe de ser evaluada sobre modelos in vivo para determinar y caracterizar correctamente los efectos que presenta en un sistema biológico completo.

10. Perspectivas

Con este trabajo se puede demostrar que el flavonoide luteolina posee múltiples efectos anticancerígenos *in vitro*, sin embargo, aún faltan más experimentos que permitan elucidar completamente el efecto que luteolina tiene sobre todos los integrantes de diferentes vías de señalización, y con el uso de inhibidores, para conocer el efecto de la supresión selectiva de cada una de las cinasas y si existe un efecto de sinergia con los tratamientos de luteolina. Caracterizar si la disminución de la viabilidad celular que ocasiona luteolina sobre esta línea celular es debida a la promoción de la apoptosis, evaluando proteínas pro- y anti-apoptóticas por medio de Western Blot y utilizando los ensayos de Anexina V/Yoduro de propidio y Multitox , que permitan determinar si este efecto y la fragmentación nuclear es debida a la apoptosis o algún otro tipo de muerte celular, y de ser el caso de que sea por apoptosis, determinar cuánto de induce este proceso biológico.

Otra de las perspectivas a futuro, que son importantes para el progreso de esta investigación, es realizar estudios *in silico* con el fin de obtener información del mecanismo específico mediante el cual la luteolina inhibe la actividad de estas cinasas y comparar con otros flavonoides ya estudiados.

Finalmente se podrán seguir realizando experimentos *in vitro* que corroboren que esta molécula posee menor toxicidad en células no cancerígenas, utilizando una línea celular de hipofaringe sana, para posteriormente proseguir con experimentos *in vivo*, que nos permitan conocer como son los procesos de absorción, metabolismo y actividad biológica, en un organismo completo y como cambian al modificar la molécula o la forma de administración.

11. Referencias

1. National Cancer Institute. What Is Cancer? 2015. Página: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (Consultado el 22/08/19 a las 6:00 pm.)
2. De Craene, Bram; Geert, Berx. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 13, 97–110 (2013).
3. World Health Organization. The top 10 causes of death. 2018. Página: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (Consultado el 28/08/19 a las 3:23 pm.)
4. Cancer Research UK. Types of cancer. 2017. Página: <https://www.cancerresearchuk.org/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer> (Consultado el 30/08/19 a las 5:45 pm.)
5. Caldas, C; Venkitaraman, A R. *Encyclopedia of genetics, Chapter of Tumor Suppressor*. 2001.
6. Maher, E; Latif, F. *Encyclopedia of genetics, Chapter of Anti-oncogenes*. 2001.
7. Levine, Arnold J.; Hu, Wenwei; Feng, Zhaohui. *The Molecular Basis of Cancer (3th Edition)*, Chapter 3 - Tumor Suppressor Genes. Páginas 31-38. (2008).
8. Christmann, Markus; Tomicic, Maja T.; Roos, Wynand P.; Kaina, Bernd. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193, 3–34. (2003).
9. Pierotti, Marco A; Frattini, Milo; Molinari, Francesca; Sozzi, Gabriella; Croce, Carlo M. *Holland-Frei Cancer Medicine (9th edition)*, Chapter Oncogenes. Wiley Blackwell. (2017).
10. Croce, Carlo M. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*;358(5):502-11. (2008).

11. Bast, Robert C; Kufe, Donald W; Pollock, Raphael E; Weichselbaum, Ralph R; Holland, James F; Frei, Emil. Holland-Frei Cancer Medicine (8th edition), Chapter Oncogenes. Wiley Blackwell. Páginas 47-69 (2010).
12. Ratna, Anuradha & Mandrekar, Pranoti. Alcohol and Cancer: Mechanisms and Therapies. *Biomolecules*, 7, 6 (2017).
13. Cao, Yin; Giovannucci, Edward L. Alcohol as a risk factor for cancer. *Seminars in Oncology Nursing*, Vol 32, No 3: pp 325-331. (2016).
14. Vineis, P; Alavanja, M; Buffler, P; Fontham, E; Franceschi, S; Gao, YT; Gupta, PC; Hackshaw, A; Matos, E; Samet, J; Sitas, F; Smith, J; Stayner, L; Straif, K; Thun, MJ; Wichmann, HE; Wu, AH; Zaridze, D; Peto, R; Doll, R. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst*. 21;96(2):99-106. (2004).
15. National Cancer Institute. Tobacco. 2017. Página: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/tobacco> (Consultado el 01/09/19 a las 2:40 pm.)
16. Ma, Y; Li, M D. Establishment of a Strong Link Between Smoking and Cancer Pathogenesis through DNA Methylation Analysis. *Sci Rep*;7(1):1811. (2017).
17. Hecht, Stephen S. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature Reviews Cancer*. Volume 3, Páginas 733–744. (2003).
18. Centers for Disease Control and Prevention. How Is Smoking Related to Cancer? 2018. Página: https://www.cdc.gov/tobacco/basic_information/health_effects/cancer/ (Consultado el 01/09/19 a las 4:00 pm.)
19. Centers for Disease Control and Prevention (US); National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US); Office on Smoking and Health (US). *How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General*. 2010.

20. White, MC; Holma, DM; Boehm, JE; Peipins, LA; Grossman, M; Henley, SJ. Age and cancer risk: a potentially modifiable relationship. *Am J Prev Med.*;46(3 Suppl 1). (2014).
21. Key, Timothy J.A. Hormones and cancer in humans. *Mutation Research* 333; 59-67. (1995).
22. Suba, Zsuzsanna. Gender-related hormonal risk factors for oral cancer. *Pathol Oncol Res*;13(3):195-202. (2007).
23. Ishida, H; Wada, K; Masuda, T; Okura, M; Kohama, K; Sano, Y; Nakajima, A; Kogo, M; Kamisaki, Y. Critical role of estrogen receptor on anoikis and invasion of squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.*;98(5):636-43. (2007).
24. Russo, J; Russo, I H. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*;102(1-5):89-96. (2006).
25. Gonzalez, H; Hagerling, C; Werb, Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev.* 1;32(19-20):1267-1284. (2018).
26. National Cancer Institute. Immunosuppression. 2015. Página: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/immunosuppression> (Consultado el 05/09/19 a las 9:54 pm.)
27. Malinowski, B; Węsierska, A; Zalewska, K; Sokołowska, MM; Bursiewicz, W; Socha, M; Ozorowski, M; Pawlak-Osińska, K; Wiciński, M. The role of *Tannerella forsythia* and *Porphyromonas gingivalis* in pathogenesis of esophageal cancer. *Infect Agent Cancer.* 30;14:3. (2019).
28. Narayanan, DL; Saladi, RN; Fox, JL. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol.* ;49(9):978-86. (2010).
29. Argiris, A; Karamouzis, MV; Raben, D; Ferris, RL. Head and neck cancer. *Lancet.* 17;371(9625):1695-709. (2008).

30. Gallegos-Hernández, José Francisco. Head and neck cancer. *Gaceta Mexicana de Oncología*. Vol. 14. Núm. 1. Páginas 1-2. (2015).
31. World Health Organization. Cancer today. 2019. Página: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&population_s=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&gro (Consultado el 16/09/19 a las 1:35 pm.)
32. Leemans, CR; Braakhuis, BJ; Brakenhoff, RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*;11(1):9-22. (2011).
33. Purohit, V; Rapaka, R; Kwon, OS; Song, BJ. Roles of alcohol and tobacco exposure in the development of hepatocellular carcinoma. *Life Sci*. 17;92(1):3-9. (2013).
34. World Health Organization. Global status report on alcohol and health. Chapter 3- Alcohol Consumption. 2018.
35. Spence, T; Bruce, J; Yip, KW; Liu, FF. HPV Associated Head and Neck Cancer. *Cancers (Basel)*. 5;8(8). (2016).
36. Marur, S; D'Souza, G; Westra, WH; Forastiere, AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*;11(8):781-9. (2010).
37. Huang, YT; Hwang, JJ; Lee, PP; Ke, FC; Huang, JH; Huang, CJ; Kandaswami, C; Middleton, E Jr; Lee, MT. Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. *Br J Pharmacol*;128(5):999-1010. (1999).
38. Vokes, E E; Weichselbaum, R R; Lippman, S M; Hong W K. Head and neck cancer. *N Engl J Med*; 328(3):184-94. (1993).

39. Spector, G J. Distant metastases from laryngeal and hypopharyngeal cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*; 63(4):224-8. (2001).
40. Cognetti, David M., Weber, Randal S.; Y. Lai, Stephen. Head and Neck Cancer: An Evolving Treatment Paradigm, *Cancer*; 113(7 0): 1911–1932. (2008).
41. Garneau, JC; Bakst, RL; Miles, BA. Hypopharyngeal cancer: A state of the art review. *Oral Oncol*; 86:244-250. (2018).
42. Crooker, K; Aliani, R; Ananth, M; Arnold, L; Anant, S; Thomas, SM. A Review of Promising Natural Chemopreventive Agents for Head and Neck Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*;11(8):441-450. (2018).
43. Sak, K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn Rev*;8(16):122-46. (2014).
44. Organización de la Naciones Unidas. World population projected to reach 9.8 billion in 2050, and 11.2 billion in 2100. 2017. Página: <https://www.un.org/development/desa/en/news/population/world-population-prospects-2017.html> (Consultado el 20/09/19 a las 5:55 pm.).
45. Tirado, Laura; Granados, Martín. Epidemiología y Etiología del Cáncer de la Cabeza y el Cuello. *Cancerología 2*: 9-17. (2007).
46. Matsuo, M; Sasaki, N; Saga, K; Kaneko, T. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biol Pharm Bull*; 28(2):253-9. (2005).
47. Panche, AN; Diwan, AD; Chandra, SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.*; 5:e47. (2016).
48. Imran, M; Rauf, A; Abu-Izneid, T; Nadeem, M; Shariati, MA; Khan, IA; Imran, A; Orhan, IE; Rizwan, M; Atif, M; Gondal, TA; Mubarak, MS. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomed Pharmacother.*; 112:108612. (2019).

49. Zhang, Hong-Wei; Hu, Jin-Jiao; Fu, Ruo-Qiu; Liu, Xin; Zhang, Yan-Hao; Li, Jing; Liu, Lei; Li, Yu-Nong; Deng, Qin; Luo, Qing-Song; Ouyang, Qin; Gao, Ning. Flavonoids inhibit cell proliferation and induce apoptosis and autophagy through downregulation of PI3K mediated PI3K/AKT/mTOR/p70S6K/ULK signaling pathway in human breast cancer cells. *Scientific Reports*. volume 8: 11255 (2018),
50. Lewandowska, U; Fichna, J; Gorlach, S. Enhancement of anticancer potential of polyphenols by covalent modifications. *Biochem Pharmacol*; 109:1-13. (2016).
51. Lin, Yong; Shi, Ranxin; Wang, Xia; Shen, Han-Ming. Luteolin, a flavonoid with potentials for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets*; 8(7): 634–646. (2008).
52. Zhou, M; Shen, S; Zhao, X; Gong, X. Luteoloside induces G0/G1 arrest and pro-death autophagy through the ROS-mediated AKT/mTOR/p70S6K signalling pathway in human non-small cell lung cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*;494(1-2):263-269. (2017).
53. Seelinger, G; Merfort, I; Schempp, CM. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Med*;74(14):1667-77. (2008)
54. Seelinger, Günter; Merfort, Irmgard; Wölfle, Ute; Schempp, Christoph M. Anti-carcinogenic Effects of the Flavonoid Luteolin. *Molecules*; 13(10): 2628–2651. (2008).
55. Cook, Matthew T. Mechanism of metastasis suppression by luteolin in breast cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press)*; 10:89-100. (2018).
56. Chen, Di; Chen, Marina S.; Cui, Qiuzhi Cindy; Yang, Huanjie; Dou, Q. Ping. Structure-proteasome-inhibitory activity relationships of dietary flavonoids in human cancer cells. *Front Biosci*; 12:1935-45. (2007).

57. Gutiérrez-Venegas, G; Sánchez-Carballido, M A; Delmas Suárez, C; Gómez-Mora, J A; Bonneau, N. Effects of flavonoids on tongue squamous cell carcinoma. *Cell Biol Int*;44(3):686-720. (2020).
58. Rangan, S R. A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer*; 29(1):117-21. (1972).
59. González Salguero, Ricardo. Tesis: Luteolina, Naringina y Quercetina como flavonoides inductores de apoptosis sobre la línea celular de carcinoma hipofaríngeo FaDu. UNAM. 2017.
60. Larsson; R; Nygren; P. A rapid fluorometric method for semiautomated determination of cytotoxicity and cellular proliferation of human tumor cell lines in microculture. *Anticancer Res*;9(4):1111-9. (1989).
61. Nygren, Peter; Fridborg, Helena; Csoka, Katalin; Sundström, Christer; De la Torre, Manuel; Kristensen, Jörgen; Bergh, Jonas; Hagberg, Hans; Glimelius, Bengt; Rastad, Jonas; Tholander, Bengt; Larsson, Rolf. Detection of tumor-specific cytotoxic drug activity in vitro using the fluorometric microculture cytotoxicity assay and primary cultures of tumor cells from patients. *Int J Cancer*;56(5):715-20. (1994).
62. Lindhagen, E; Nygren, P; Larsson, R. The fluorometric microculture cytotoxicity assay. *Nat Protoc*;3(8):1364-9. (2008)
63. Kang, K A; Piao, M J; Ryu, Y S; Hyun, Y J; Park, J E; Shilnikova, K; Zhen, A X; Kang, H K; Koh, Y S; Jeong, Y J; Hyun, J W. Luteolin induces apoptotic cell death via antioxidant activity in human colon cancer cells. *Int J Oncol*; 51(4):1169-1178. (2017).
64. Pandurangan, A K; Esa, N M. Luteolin, a bioflavonoid inhibits colorectal cancer through modulation of multiple signaling pathways: a review. *Asian Pac J Cancer Prev*;15(14):5501-8. (2014).
65. Ferrara, Napoleone. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology*; 69 Suppl 3:11-6. (2005).

66. Wu, J B; Tang, Y L; Liang, X H. Targeting VEGF pathway to normalize the vasculature: an emerging insight in cancer therapy. *Onco Targets Ther*; 11:6901-6909. (2018).
67. Grasl-Kraupp, B; Ruttkay-Nedecky, B; Koudelka, H; Bukowska, K; Bursch, W; Schulte-Hermann, R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology*; 21(5):1465-8. (1995).
68. Chowdhury, AR; Sharma, S; Mandal, S; Goswami, A; Mukhopadhyay, S; Majumder, HK. Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biochem J*. 1;366(Pt 2):653-61. (2002).
69. Tuorkey, Muobarak J. Molecular targets of luteolin in cancer. *Eur J Cancer Prev*; 25(1): 65–76. (2016).
70. Ruiz Romero, Alejandra. Tesis: Efecto del flavonoide nobiletina en la vía de señalización AKT/PI3K y la expresión de VEGF en la línea celular de cáncer de faringe FaDu. UNAM. 2017.
71. Contreras Astudillo, Roberto León. Tesis: Evaluación de la supervivencia del carcinoma hipofaríngeo (FaDu) tratado con nobiletina. UNAM. 2020.
72. Baker, Suzanne J. PTEN enters the nuclear age. *Cell*;128(1):25-8. (2007).
73. Kang, KA; Piao, MJ; Hyun, YJ; Zhen, AX; Cho, SJ; Ahn, MJ; Yi, JM; Hyun, JW. Luteolin promotes apoptotic cell death via upregulation of Nrf2 expression by DNA demethylase and the interaction of Nrf2 with p53 in human colon cancer cells. *Exp Mol Med*; 51(4):40. (2019).
74. Bello Álvarez, Claudia. Tesis: Efecto citoprotector de la morina contra el daño por cisplatino en las células Llc-Pk1. UNAM. 2017.

75. Haverić, Anja; Goletić, Šejla; Durgut, Selma; Hadžić, Maida; Haverić, Sanin. Effects of curcumin and luteolin on viability and cell death induction in NFS-60 cell line. *Genetics & Applications* Vol.2(No.2). (2018).
76. Horinaka, M; Yoshida, T; Shiraishi, T; Nakata, S; Wakada, M; Nakanishi, R; Nishino, H; Matsui, H; Sakai T. Luteolin induces apoptosis via death receptor 5 upregulation in human malignant tumor cells. *Oncogene*; 24(48):7180-9. (2005).
77. Seydi, E; Salimi, A; Rasekh, H R; Mohsenifar, Z; Pourahmad, J. Selective Cytotoxicity of Luteolin and Kaempferol on Cancerous Hepatocytes Obtained from Rat Model of Hepatocellular Carcinoma: Involvement of ROS-Mediated Mitochondrial Targeting. *Nutr Cancer*;70(4):594-604. (2018).
78. Bahadur Gurung, Rit; Prasad Pandey, Ramesh; Kyung Sohng, Jae. Apigenin and Naringenin Natural Sources, Pharmacology and Role in Cancer Prevention. Chapter 7: Role of Apigenin in Cancer Prevention. Nova Science Publishers. (2015).
79. Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades. Cánceres de cabeza y cuello. Página: <https://www.cdc.gov/spanish/cancer/headneck/index.htm> (Consultado el 20/09/19 a las 6:00 pm.)
80. Key TJ, Bradbury KE, Perez-Cornago A, Sinha R, Tsilidis KK, Tsugane S. Diet, nutrition, and cancer risk: what do we know and what is the way forward? *BMJ*. Mar 5;368:m511. (2020)