



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO DE MORINA Y NOBILETINA EN LA MIGRACIÓN
Y VIABILIDAD EN LA LÍNEA CELULAR FADU,
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DERIVADO DE
HIPOFARINGE.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A:

VALERIA FERNANDA SANTAMARIA MARTINEZ

TUTOR: Dra. GLORIA GUTIERREZ VENEGAS



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.

Agradecimientos

A la dra Gloria Gutiérrez, titular del laboratorio de bioquímica en el posgrado de la facultad de odontología, por haberme aceptado en el laboratorio, por todo su apoyo y paciencia a lo largo de la elaboración de este proyecto, por su guía y enseñanzas.

Al laboratorio de bioquímica y a la facultad de odontología, por ser los espacios donde yo, al igual que mis compañeros, podemos desarrollarnos académicamente. Gracias por las herramientas sin las cuales este trabajo no habría sido posible

Al señor Antonio, quien siempre me apoyó con el uso del material dentro del laboratorio.

A Itzel, nuestra compañera foránea, muchas gracias por ayudarme con la elaboración de esquemas.

A Marisol, quien también me ayudó a entender los procedimientos de los experimentos.

En general, a la UNAM, por ser esta institución pública que permite la formación de profesionistas.

Y por último, gracias a Alexandra Elbakyan, sin su trabajo esta tesis habría quedado incompleta de información. El conocimiento debe ser de acceso universal.

Dedicatoria.

A mis padres, esencialmente. Gracias por el apoyo que a su manera me brindaron, En honor también a todas las dificultades que tuvieron que atravesar, de forma indirecta, en beneficio de mi desarrollo académico.

A aquellos familiares y amigos que, de vez en cuando y dentro de sus posibilidades, de igual forma ayudaron a que yo siguiera adelante.

Y también a mis compañeros, actuales y futuros. Y espero que este trabajo pueda servir, de mínimo, como una guía para aquellos alumnos que se encuentren en dificultades para encontrar información.

ÍNDICE.

Resumen	1
Introducción	2
Compuestos fenólicos y flavonoides	2
Clasificación de los flavonoides	3
2.2.1 Estructura química.....	3
2.2.2 Flavonoides clasificación.....	4
2.2.3 Flavonoides y nutrición	6
2.3.- Cáncer.....	7
2.3.1.- Factores de riesgo	7
2.3.3 Evolución del cáncer.....	9
2.3.4 Marcas del cáncer.....	11
2.3.5 Señal de proliferación sostenida.....	12
2.3.6 Activación de invasión y metástasis	12
2.3.7 Transición epitelio-mesénquima.....	13
2.3.8 Factor de crecimiento transformante beta (TGF β)	16
2.3.9 Inducción de Angiogénesis.....	18
2.3.10. Metaloproteinasas de la matriz extracelular.....	18
2.3.11 Resistencia a muerte celular.....	19
2.4.1 Cáncer de cabeza y cuello.....	20
3.3 Diagnóstico y tratamiento	21
3.4 Efecto de morina en el tratamiento de cáncer	25
3.5 Efecto de nobiletina en el tratamiento de cáncer.....	31
4. JUSTIFICACIÓN.....	34
5. Objetivo general.....	34
5.1 Objetivos particulares.....	34
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
6.1 Cultivo celular.....	35
6.2 Ensayo de viabilidad celular con MTT.....	36
6.3 Ensayo de cicatrización de herida.....	36
6.4 Western blot.....	37
7. RESULTADOS.....	38
7.1- Efecto de la morina y nobiletina en la viabilidad celular.....	38
7.2 Ensayo de cicatrización herida.....	38
7.3 Efecto de morina y nobiletina en expresión de E-cadherina.....	39
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	40
9. Perspectivas futuras	41
10. Conclusiones	42
11. Referencias	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	2
Figura 2	3
Figura 3	5
Figura 4	6
Figura 5	8
Figura 6	9
Figura 7	11
Figura 8	12
Figura 9	14
Figura 10	25
Figura 11	26
Figura 12	27
Figura 13	20
Figura 14	31
Figura 15	33
Figura 16	38
Figura 17	38-39
Figura 18	39
Figura 19	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	4
Tabla 2	5
Tabla 3	21
Tabla 4	21
Tabla 5	28-29

1. RESUMEN

El cáncer es un padecimiento que presenta una alta incidencia y ocasiona una elevada mortandad. En particular el carcinoma de cabeza y cuello ocupa el sexto lugar de incidencia entre los diferentes tipos de cáncer; en países como Estados Unidos de América ocupa el tercer lugar. El cáncer de cabeza y cuello muestra una evolución sin síntomas característicos específicos, motivo por el cual cuando es diagnosticado ya ha progresado a una etapa en que las probabilidades de obtener resultados alentadores son muy limitadas. La etiología del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC) está asociada a hábitos como el consumo de tabaco y a la ingesta de alcohol, además de infecciones por papilomavirus, mala nutrición y predisposición genética. Al igual que los diferentes tipos de cáncer las células tumorales muestran características particulares como proliferación sostenida, resistencia a la apoptosis, invasión, metástasis, activación de vías de señalización intracelular y angiogénesis. Los tratamientos para este tipo de cáncer incluyen cirugía, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y la combinación de estos. Estos tratamientos presentan bajas expectativas de supervivencia a los cinco años de iniciados, posterior al diagnóstico. La agresividad, invasividad y las bajas expectativas de éxito de todos los procedimientos antes mencionados ha motivado a que gran número de equipos de investigación se hayan abocado en la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de CCECC. Los compuestos polifenólicos son una alternativa, como la morina, la cual es una flavona de color amarillo que muestra un amplio espectro de efectos fisiológicos y la nobiletina que es una polimetoxiflavona que, debido a su alta hidrofobicidad ha sido ampliamente estudiada para determinar sus efectos anti-tumorales. Por todo lo anterior en la presente investigación nos proponemos evaluar el efecto de estos flavonoides en la inhibición de la transición epitelio mesénquima (EMT) en la línea celular FaDu obtenida de un carcinoma de células escamosas de hipofaringe. Para evaluar el efecto de estos flavonoides en la inhibición de la EMT, las células se trataron con el factor de crecimiento transformante ($TGF\beta$) a fin de inducir la EMT y se incubaron con ambos flavonoides para comparar sus efectos en la inhibición de marcadores de la EMT y metástasis. Nuestros resultados mostraron que nobiletina muestra una más alta actividad en la inhibición de marcadores de transición como en la morfología y en la expresión del marcador E-cadherina. En conclusión, nuestros resultados sugieren que la hidrofobicidad del flavonoide está en relación directa con la efectividad en la inhibición de EMT y metástasis.

2.- INTRODUCCIÓN

2.1 Compuestos fenólicos y flavonoides

Los compuestos fenólicos son moléculas de gran importancia en el reino vegetal a pesar de que no forman parte los metabolitos primarios. Tienen un papel sustantivo en la supervivencia y adaptación de las plantas en los diferentes entornos medioambientales. Es por este motivo el papel tan preponderante que tienen en sostener la vida del planeta que hasta la fecha se han identificado más de 5000 moléculas, que se encuentran presentes en todas las plantas: en los frutos, hojas, tallos y se han identificado en semillas y bebidas como el vino.

Los flavonoides son derivados fenólicos cuyo nombre deriva de *flavus*: amarillo y en el reino vegetal tienen funciones como la fotoprotección de las plantas a los rayos ultravioleta, al ataque de herbívoros, patógenos, supervivencia a las heladas, los contaminantes y cambios abruptos en la composición de los suelos (1-7). En el año de 1665, el noble irlandés Robert Boyle, quien se interesó en la coloración de las plantas (Fig. 1) seleccionó algunas plantas y las colocó en agua, tras lo cual observó la aparición de aceites provenientes de ellas. Debieron transcurrir tres siglos hasta que en 1928 Albert Szent Györgyi, un fisiólogo húngaro, obtuvo a la citrina de la cáscara del limón y, aunque fue el primer flavonoide aislado en ese momento, por sus propiedades fisiológicas de aumentar la permeabilidad capilar, se estableció como vitamina E, concepto que posteriormente se descartó porque los flavonoides son metabolitos secundarios en plantas.

A



a)

<https://medicoplus.com/biografias/robert-boyle>

B



B)

<https://www.biografiasyvidas.com/biograf>

Figura 1. Perspectiva histórica del descubrimiento de los flavonoides. A) Imagen de Robert Boyle padre de la química moderna, trabajó como asistente de Robert Hooke y se avocó a estudiar los efectos de la elasticidad del aire y postuló de la ley de Boyle-Mariotte. B) Szent Györgyi húngaro, de formación fisiólogo que en 1937 obtuvo el premio Nobel por sus investigaciones relacionadas con la combustión biológica y el papel de la vitamina C.

Por otra parte, los flavonoides han sido utilizados por la medicina tradicional china desde tiempos muy remotos, encontrando que además de sus bondades en el reino vegetal y en el reino animal muestran un amplio espectro de funciones como agentes anti-inflamatorios, anti-tumorales, anti-oxidantes, anti bacteriano y muestran también actividad biológica para combatir la diabetes y enfermedades cardiovasculares (8-12).

2.2 Clasificación de los flavonoides.

2.2.1 Estructura química

Son una sustancia polifenólica con una organización C6-C3-C6, que radica en dos anillos aromáticos denominados A y B y unidos por una cadena alifática de tres carbonos condensada para formar un pirano o furano. (Fig 2)

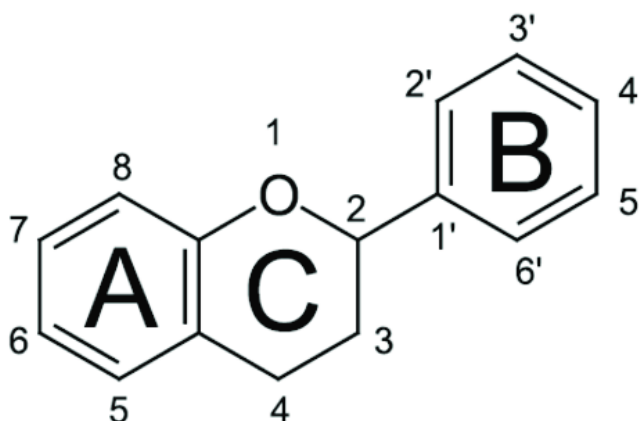


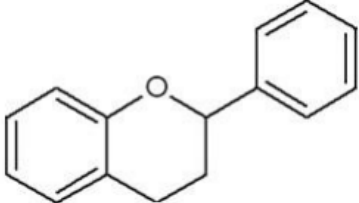
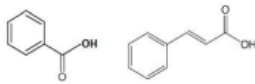
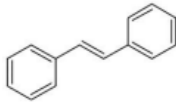
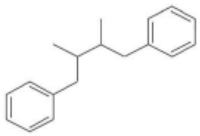
Figura 2 Estructura general de los flavonoides. Formado por tres anillos de benzopirano e hidroxilados comúnmente en posiciones 5 y 7. Puede contener grupos metoxi. El anillo C es un heterociclo derivado de la pirona. Tomado de: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602014000200006

Entre sus propiedades fisicoquímicas se encuentran:

Fórmula molecular: C₁₅H₁₀O₂; punto de ebullición 185°C; punto de fusión: 98°C, solubilidad varía según su concentración en agua, alcohol o dimetilsulfóxido.

Según la estructura de los grupos fenólicos se pueden dividir en dos grandes grupos, a saber, flavonoides y no flavonoides. (Tabla I)

Tabla I Clasificación de los compuestos fenólicos.

Flavonoides	No flavonoides	
	Ácidos fenólicos	
	Estilbenos	
	Lignanos	

Tomado de: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/63790/1/T42048.pdf>. En la imagen se muestran las estructuras químicas de diferentes compuestos fen+ólicos, cuya clasificación se basa en la disposición de los carbonos y sus grupos hidroxilo

2.2.2 Flavonoides clasificación

Como mencionamos en líneas anteriores son moléculas que contienen dos anillos aromáticos unidos entre sí por una cadena alifática de tres carbonos formando un total de 15 carbonos. (Fig 2)

Se clasifican en:

- 1.- Flavonoles: la quercetina es una molécula ampliamente caracterizada con un anillo carbonilo en posición 4 y un grupo hidroxilo en el carbono 3 del anillo C
- 2.- Flavonas: morina con un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C
- 3.- Flavanoles catequina grupo hidroxilo en el carbono tres del anillo C.
- 4.- Flavanonas: naranjenina, grupo carbonilo en carbono 4, no presente doble enlace en los carbonos 3 y 4 del anillo C.
- 5.- Antocianidinas: delphinidina, grupo hidroxilo en posición 3 y doble enlace en carbonos 3 y 4 del anillo de C.
- 6.- Isoflavonoides: genisteína, grupo carbonilo en carbono cuatro, anillo B ligado en posición 3,

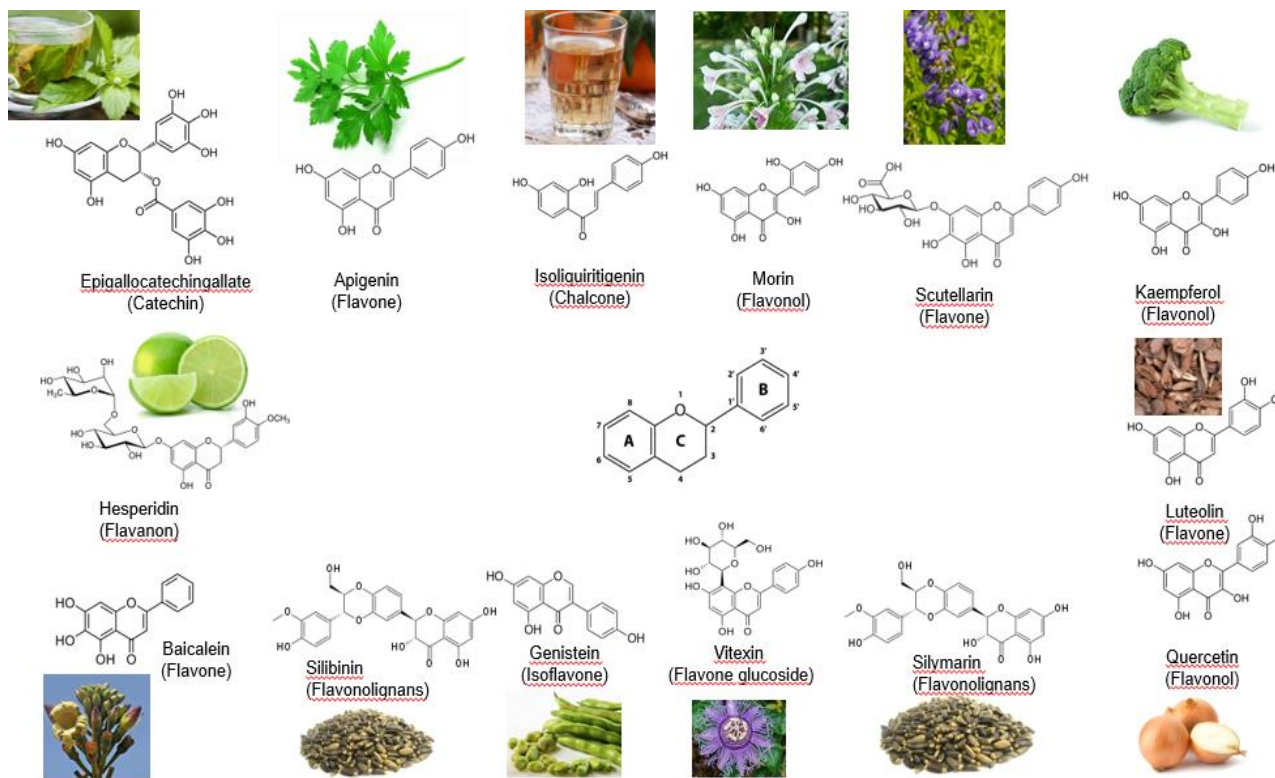


Figura 3. Estructura y fuentes de diferentes flavonoides. Fuente: <https://www.redalyc.org/journal/4577/457754907018/html/>

En la imagen se aprecian diferentes fuentes, en su mayoría vegetales, de diferentes flavonoides, en conjunto con la estructura química del flavonoide que predomina en cada vegetal/semilla.

Flavonoles

Tabla II Estructura representativa de flavonoles

	R1	R2	R3	R4	R5
Flavonoles					
Datiscetina	OH	H	OH	OH	H
Quercetina	OH	H	OH	OH	H
Miricetina	OH	H	OH	OH	OH
Morina	OH	OH	H	OH	H
Kemferol	OH	H	H	OH	H

Modificado de: <http://www2.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n62ne/flavonoi.pdf>

Se compara la estructura representativa de diferentes compuestos fenólicos, de entre los que se destaca la morina, uno de los compuestos estudiados en el presente trabajo.

Los grupos hidroxilo de los flavonoides presentan uniones con moléculas de azúcar formando estructuras glucosiladas, o bien metilados, sulfatos, acetilados, isoprenilados o dimerizados.

Polimetoxiflavonas

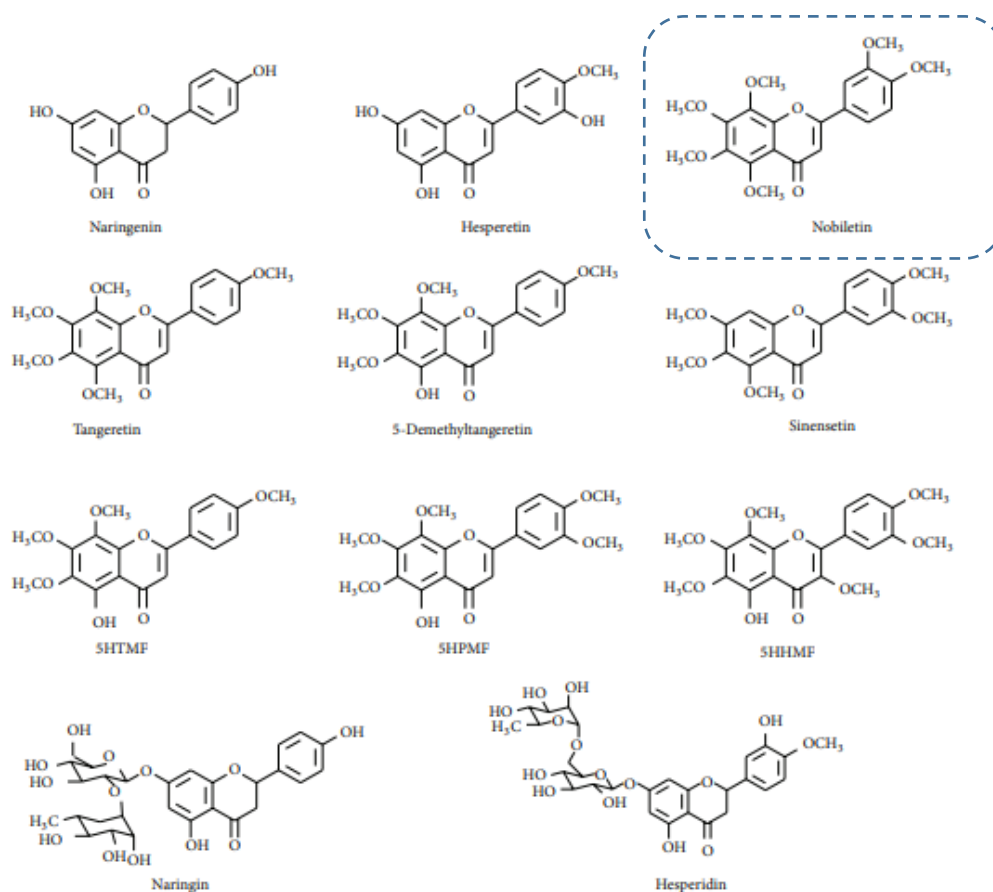


Figura 4. Estructura química de compuestos fenólicos, de entre el que se destaca la nobiletina

2.2.3 Flavonoides y nutrición

La dieta diaria consiste en la ingesta de diferentes alimentos entre los que se encuentran incluidos los flavonoides de los que consumimos entre 150 a 300 miligramos diarios de estos compuestos **(13)**, la fuente principal del consumo de flavonoides proviene en un diez por ciento a partir de la ingesta de jugos entre los que se encuentran los cítricos y frutos rojos, que contienen un total de 3 a 8 miligramos, además de los flavonoides encontrados en el té, el café y diversos vegetales y, a pesar de que se consideran agentes no nutritivos (como parte de los macro o micronutrientes, tales como las proteínas, carbohidratos, minerales) por todos sus efectos fisiológicos, existe un gran interés por sus acciones contra

el cáncer. Por este motivo en líneas posteriores desarrollaré las acciones de morina y nobiletina contra el cáncer.

2.3.- Cáncer.

Es una enfermedad que muestra un proceso de crecimiento acelerado y diseminación descontrolada de células anormales como resultado de una alteración en la codificación de su material genético, formando un tumor o neoplasia que puede crecer, invadir tejidos aledaños y producir metástasis en diferentes sitios, de acuerdo a la definición de la Organización Mundial de la Salud.

2.3.1.- Factores de riesgo:

El cáncer es resultado de la sumatoria de cambios genéticos y epigenéticos presentes en la célula que se manifiestan como una acumulación cromosomal, aberraciones moleculares e inestabilidad genética, motivo por el cual la etiología del cáncer es un abanico de una muy amplia sucesión de cambios moleculares y sus diversas causas. De acuerdo a la organización mundial de la salud el cáncer puede ser ocasionado en al menos un 35% por el estilo de vida en la que se incluye consumo de alcohol, uso de tabaco, exposición a radiación, infecciones, terapia hormonal y obesidad. **(14-23).**

Factores físicos: Entre los factores físicos más relevantes se encuentran la exposición a campos electromagnéticos de alta frecuencia (pertenecen al espectro de radiación ionizante e incluye a los rayos gamma y X) que están asociados al incremento a padecer leucemia en niños (24-28); La **radiación ionizante** es de los cancerígenos más mencionados y asociado al desarrollo de tumores en pulmón, vejiga y tiroides **(29).**

Factores químicos: Aquí se encuentran el **consumo de tabaco**, que como resultado de la combustión se producen derivados como nitrosamina, 4-metilnitrosamino, (3-piridil)-butanona, hidrocarburos aromáticos policíclicos, en específico benzopirenos, acetaldehído y formaldehído **(30-33).** Todos los productos del tabaco antes mencionados, están asociados al desarrollo de tumores hematopoyéticos, carcinomas escamosos de laringe, boca, garganta, cerebro, vejiga, ano y estómago **(32,34).** De igual manera, otro factor químico causal de tumores es el **consumo de alcohol**, que está asociado a cáncer de boca, garganta, faringe, laringe, hígado y mama **(35,36).** Finalmente, los niños son altamente sensibles a otros químicos entre los que se encuentran los de uso agrícola como **pesticidas, desechos tóxicos, contaminantes, derivados de estriestrol**, derivados del benceno, ácidos fenoxiacéticos derivados de antibióticos mielosupresores **(37,38)**

Agentes biológicos: están en relación directa con la formación de tumores malignos, como la dieta (carente de nutrientes y abundante en ultra procesados) y obesidad en civilizaciones desarrolladas, siendo factores de cáncer de endometrio, esófago, riñón, colón, renal, pancreático y mama **(38,39)**.

Actividad física: poca o nula actividad física está en asociación directa con el desarrollo de cáncer, debido a que la liberación de estrógenos, andrógenos, insulina y factores de crecimiento semejantes a la insulina altera el metabolismo y la función celular. La falta de actividad física provoca un incremento de las glándulas mamarias a hormonas de ovario y la retención de alimentos en el intestino grueso debido a la baja motilidad por deficiencias de fibra incrementa la duración de efectos mutagénicos en el revestimiento intestinal **(40,41)**,

Presencia de mutágenos en los alimentos, como micotoxinas producidas por el almacenaje de maíz y cacahuates **(42)**.

Las infecciones, por *Helicobacter pylori*, está asociado al cáncer gástrico, *C. pneumoniae*, al cáncer de pulmón y *Chlamydia* al cáncer cervical. Virus como Epstein-barr es causal de carcinomas nasofaríngeos, amígdala palatina, cáncer de lengua y linfoma de Burkitt, cáncer gástrico y linfoma de Hodgkin. *Salmonella typhi* y *Enterococcus bovis* con el cáncer colorrectal. La espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, asociado a linfomas. Herpes virus están asociados con sarcoma de Kaposi y Papillomavirus con carcinomas de células escamosas **(43-45)**. Todos los factores de riesgo antes mencionados están asociados a que para el año 2030 tumores invasivos afectarán a 2.3 millones de americanos.

Tumores:

El cáncer afecta todas las regiones del cuerpo; en 2018 se reportaron 18 millones de casos y de estos 555, 027 en mortandad y en 2020 trescientos mil casos (Fig. 2)

Estimated number of new cases in 2020, all cancers, both sexes, all ages

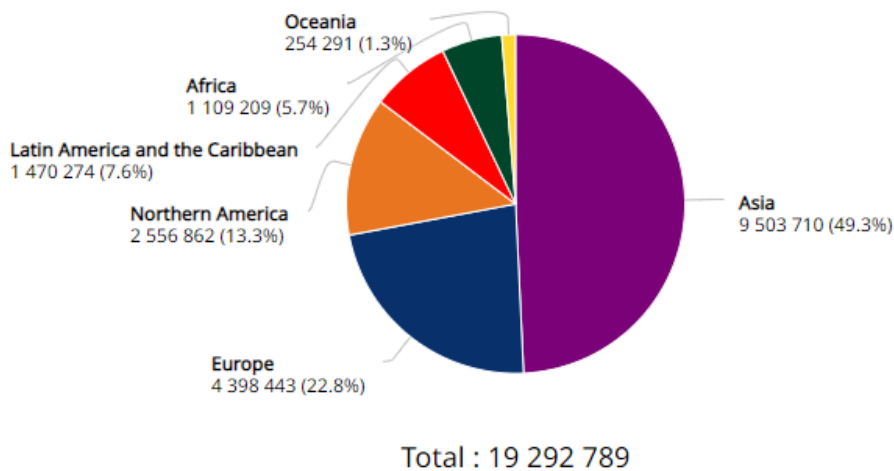


Figura 5. Número de casos de cáncer en el mundo en 2020. Tomado de Globocan.

https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=totall&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=7&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&half_pie=0&donut=0

En México hubo una incidencia de 190,667 casos nuevos, para ambos sexos y todas las edades, de los cuales, 85,616 son hombres y 105,051 mujeres; el número de muertes a causa de cáncer en el país es 83,476, de los cuales, 40,509 fueron hombres y 42,967 mujeres. Los tipos de cáncer más comunes en México son de mama con un 14.3% y próstata con 13.1%. (Fig. 3)

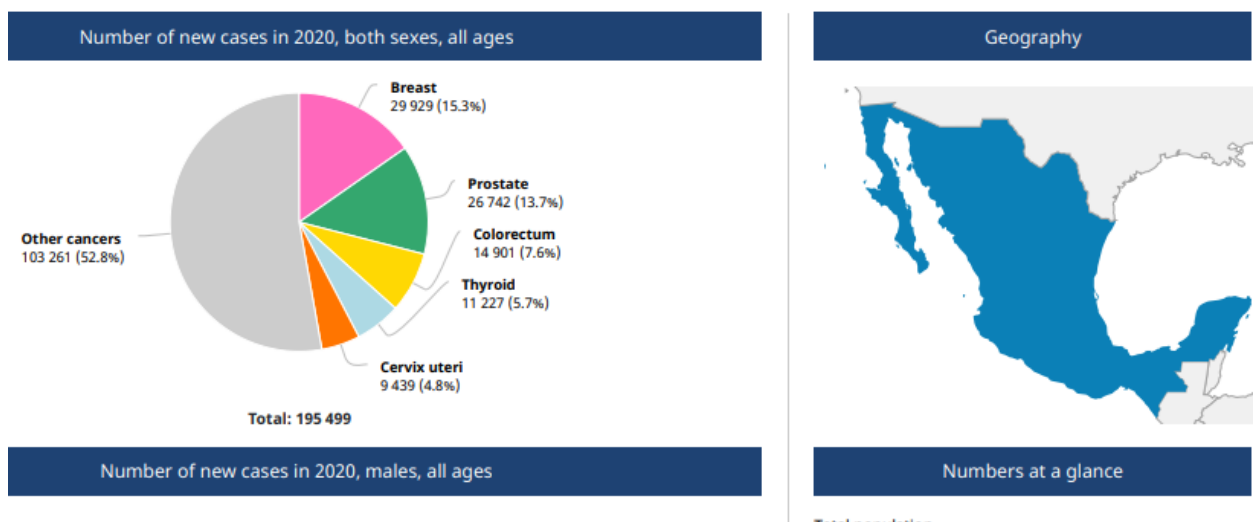


Fig 6 Cáncer en México. Tomado de <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-factsheets.pdf>

2.3.3 Evolución del cáncer.

De manera normal, las células que conforman a los tejidos reciben señales específicas (internas y externas) sobre las funciones que deben realizar, si necesitan reproducirse, permanecer en latencia o morir. Estas señales que provienen del medio están conformadas por hormonas, enzimas, diversos polipéptidos, etc. y de manera interna el metabolismo celular está regulado por el ADN. Cuando se suscita alguna alteración o falla en todo el proceso de comunicación y transducción de señales, causado por daño, desórdenes genéticos (herencia), u otros factores, las células dejan de funcionar de forma adecuada.

Una célula sana no se reproduce a menos que reciba indicaciones para hacerlo, la mayoría de ellas se mantienen en su sitio conformando un tejido, y poseen un mecanismo llamado “apoptosis”, es decir, muerte programada, el cual hace que la célula se destruya una vez ha cumplido su ciclo.

Sin embargo, ante la presencia de daño o alteración, las células pueden empezar a crecer, reproducirse, proliferar e incluso migrar sin que hayan recibido indicaciones para ello. Se da paso a la formación de un tumor o neoplasia, el cual puede ser benigno o maligno. Un tumor es un crecimiento anormal causado por una rápida proliferación celular en un determinado sitio. Se le considera benigno o maligno dependiendo de las características morfológicas e histológicas que presente. Los tumores benignos presentan un grado bajo de alteraciones en la morfología celular y nuclear, suelen mantenerse bien delimitados en la zona donde han aparecido y no hacen metástasis, además de que, una vez extirpado, en la mayoría de ocasiones no hay recidiva, y si bien en apariencia son mayoritariamente “inofensivos” algunos llegan a causar sintomatología dolorosa o molesta y complicaciones severas dependiendo del área afectada.

Por el contrario, los tumores malignos, mejor conocidos con el nombre de cáncer, en su mayoría tienen un crecimiento más descontrolado y acelerado, el grado de degeneración celular es más marcado, con pérdida de la morfología original, hay pérdida de la adhesión intercelular, evasión de la apoptosis y de las células del sistema inmunológico, además de la creación de nuevas vías que le permitan a la neoplasia recibir nutrientes y excretar desechos (angiogénesis)

El cáncer da inicio con la presencia de una célula propiamente mutada que es la responsable de comenzar el desarrollo de tumores, que toda vez que se ha establecido forma displasia o hiperplasia y se declara el cáncer *in situ*, que evoluciona con el tiempo en un cáncer invasivo y el progreso del proceso patológico. (46) Formado el tumor se desarrolla un entorno específico denominado microambiente tumoral que presenta una composición celular diversa que incluye células T, epiteliales, fibroblastos, células T, macrófagos y neutrófilos. En este entorno se sintetizan y liberan diferentes factores de crecimiento, pH y presión parcial de oxígeno característica.

Histológicamente la OMS ha establecido una serie de criterios para determinar grados del cáncer:

-Grado I: Pleomorfismo celular, pleomorfismo nuclear en baja medida, perlas epiteliales, abundante queratina, pocas células gigantes multinucleadas, mitosis atípicas inferiores a 2 observadas por campo de aumento. (36)

-Grado II: Queratinización celular, de 2 a 4 mitosis por campo, pocas perlas epiteliales, pocas células gigantes multinucleadas, pleomorfismo celular y nuclear moderado. (36)

-Grado III: más de 4 mitosis observadas por campo, marcado pleomorfismo celular y nuclear, abundantes células gigantes multinucleadas, nula queratinización del epitelio.

En otro orden de ideas, el carcinoma oral de células escamosas (OSCC, por sus siglas en inglés) inicialmente muestra displasia en la que presenta resistencia a la apoptosis, incremento en la actividad proliferativa y de vías de señalización que posteriormente puede evolucionar a la lesión maligna.

A continuación, se muestra una imagen de un tipo de cáncer de piel, para ejemplificar las etapas de desarrollo del mismo.


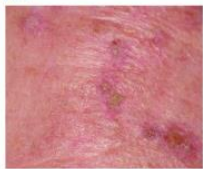


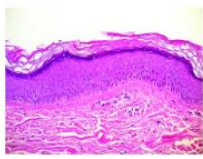
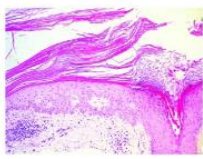

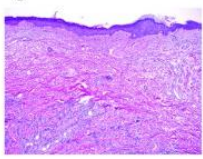
	Piel normal	AK	cSCC	cSCC metastático
Descripción clínica				
Histopatología				
Descripción histológica	Estrato basal, espinoso y granuloso bien definidos con escamas ortoqueratóticas	Queratinocitos atípicos agrandados confinados a la epidermis con escamas paraqueratinizadas	Queratinocitos atípicos agrandados invadiendo la dermis	Queratinocitos agrandados y atípicos en la dermis, los ganglios linfáticos o los órganos internos, por lo general sin conexión epidérmica.
Aumento de la señalización: activación, sobreexpresión o amplificación		ras Fyn/SFKs bcl-2	ras Fyn/SFKs c-myc bcl-2 STAT-3 β-1 integrin MMP	En adición a alteraciones de cSCC: VEGF (ras) MMP2 MMP7 MMP12 (ras)
Señalización disminuida: desactivación, depresión transcripcional o traduccional, o delección génica.		p53 Srcasm	p53 Srcasm Notch (p53) PKC δ E-cadherin	En adición a alteraciones de cSCC E-cadherin P-cadherin
Cambios genómicos		Inestabilidad genética con algunas alteraciones cromosomales	Inestabilidad genómica aumentada, resultando en translocaciones cromosomales, isocromosomas, delecciones génicas y amplificaciones	

Figura 7. Tomada de <https://www.uv.es/derma/CLindex/CLcancer/CLprecancer.html> Traducida.

2.3.4 Marcas del cáncer.

Los científicos Hanahan, D. y Weinberg, R. publicaron un diagrama que muestra las distintivas que presentan las células tumorales y que les permiten su supervivencia, alterando importantes vías de señalización. Algunas de dichas características se presentan brevemente a continuación (Fig 4)



Figura 8. Marcadores tumorales. Tomado y modificado (traducido) de Hanahan D, Weinberg RA, Pan KH, et al. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell. 2011;144(5):646-74

2.3.5 Señal de proliferación sostenida.

En el entorno tumoral la liberación de factores de crecimiento ocasiona la activación de señales autócrinas y parácrinas que conducen a la activación de vías de señalización sostenidas como la vía de la fosfatidilinositol-3 cinasa / proteína cinasa B, la vía mTOR, de las Smad y que son reguladas por receptores con actividad de tirosina cinasa, que rompen la homeostasis medioambiental estimulando la transición epitelio-mesénquima en donde las células, en particular las epiteliales, cambian su polaridad y cambia el patrón de expresión de moléculas como E-cadherina, ocludina, twist, β -catenina, etc. que conduce a un cambio de la morfología celular y metástasis. Estas vías de señalización se retroalimentan, de ahí que se mantenga de forma activa la proliferación celular necesaria para que la tumoración pueda crecer y expandirse (Fig. 5)

2.3.6 Activación de invasión y metástasis

La matriz extracelular (ECM) consiste en una red tridimensional, de soporte celular, presente y característica de todos los tejidos, cada uno de los cuales tiene una composición particular en su ECM. Se compone de colágeno, proteoglicanos, laminina y fibronectina, siendo el primero el de mayor abundancia, con hasta 28 subtipos.

La ECM regula el crecimiento celular, supervivencia, motilidad y diferenciación, ya que sus componentes son los ligandos de ciertos receptores específicos, como son los de integrinas, sindecanos y discoidina. En el caso de las integrinas, estas sufren un cambio conformacional en su dominio citoplasmático, lo que causa la activación de diferentes vías de señalización, regulando así las propiedades antes mencionadas. (2, 4 y 5).

Además de esto, la ECM da soporte a los tejidos y regula la disponibilidad de citocinas y factores de crecimiento, entre los que se encuentran el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β); mantiene la hidratación y pH del microambiente local, es decir, su homeostasis. (4, 5).

2.3.7 Transición epitelio-mesénquima (EMT)

La transición epitelial mesenquimal es un fenómeno complejo presente de forma normal en diversos procesos del cuerpo, especialmente durante la gestación y la cicatrización/reparación.

Sin embargo, en situaciones anormales resulta en un factor clave del desarrollo de neoplasias y, consecuentemente, de la metástasis en el cáncer.

Debido a que este proceso favorece la motilidad celular es de suma importancia en el desarrollo del embrión pues permite que las células componentes de las 3 láminas del desarrollo puedan migrar y posteriormente diferenciarse en tejidos especializados; a la EMT que se presenta con este fin se le conoce como tipo 1, mientras a la que aparece en los procesos de cicatrización y reparación es el tipo 2. Por último, cuando se presenta como resultado de un cambio anormal en tejidos maduros se considera un proceso neoplásico y es clasificada como EMT tipo 3

En la literatura se concuerda que los principales pasos para la EMT son: cambios en las vías de señalización y transducción que desembocarán en pérdida de las conexiones intercelulares, reestructuración del citoesqueleto, pérdida de la polaridad apical-basal, posterior producción de matriz extracelular y ruptura de la membrana basal, lo cual daría como resultado en un proceso metastático.

El orden en la secuencia de pasos suele ser el siguiente:

-Pérdida de la polaridad celular: se rompen las uniones estrechas, difuminándose los componentes de la región basal y la baso-lateral. El núcleo pierde su localización (originalmente en la región basal de la célula), hay menos producción de claudinas y ocludinas.

-Menor producción de marcadores epiteliales: al afectarse más vías de transducción los componentes normales en las células epiteliales se pierden, como la E-cadherina, y en consecuencia se rompen las uniones intercelulares en la región latero-apical, rompiendo con esto la integridad/continuidad del epitelio, creando brechas entre las células que dará espacio a la formación de matriz extracelular.

-Desintegración de la membrana basal: al desintegrarse la membrana basal se permite que las células cancerígenas, ahora con fenotipo mesenquimal, pierdan la contención en su sitio de primera aparición y finalmente puedan desplazarse a otras regiones.

Para entender la forma en que la EMT induce la migración celular es importante primero señalar cuáles son las características de las células epiteliales en su estado normal y, cuando han malignizado, pero siguen presentes en el tejido afectado, sin romper la membrana basal (carcinoma in situ).

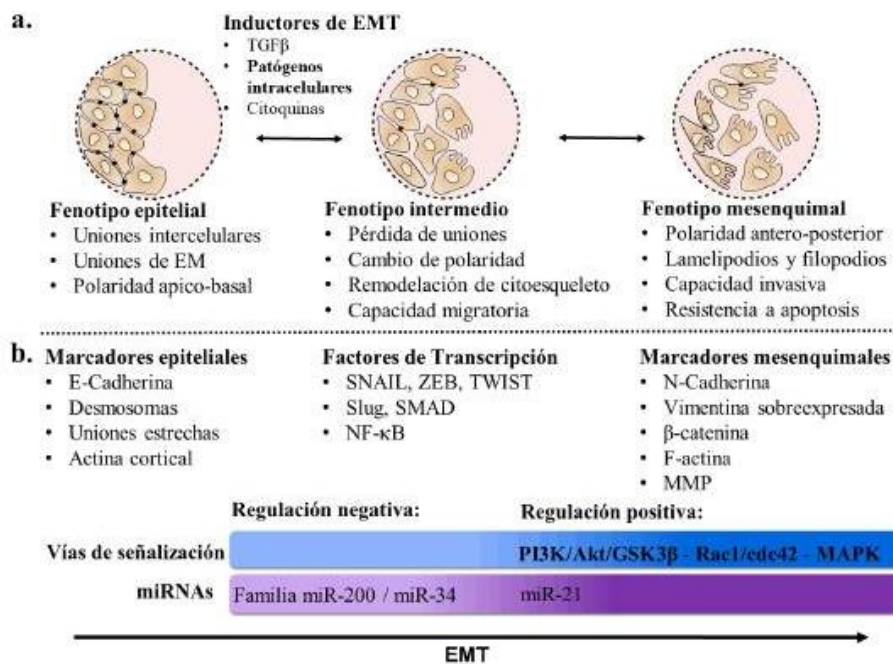


Figura 9. Inductores en la transición epitelio-mesénquima.

Tomado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2021000100105

-Características de un epitelio normal:

La cavidad oral, laringe, faringe y esófago tienen diversos tipos de epitelio, como son el epitelio escamoso estratificado, epitelio escamoso queratinizado, epitelio

especializado, etc. La presencia de epitelio queratinizado suele limitarse a las áreas donde se realice el acto masticatorio, como lo son las encías, el paladar duro y parcialmente la lengua, pues en ella se encuentra principalmente el epitelio especializado conformado por las papilas gustativas. El resto de estructuras tienen un revestimiento de epitelio no queratinizado.

Para mantener la integridad del epitelio se cuenta con la presencia de distintas proteínas de unión que sirven como anclaje celular, además de ser considerados marcadores. Algunas de estas proteínas son: Claudina, ocludina, E-cadherina, integrinas, ZO, actina, etc.

Existen diferentes tipos de unión intercelular, y de estas uniones no sólo depende la adherencia de las células y la integridad del tejido, sino también la propia polaridad celular y la comunicación entre células.

-Uniones estrechas: compuestas por proteínas transmembranales (también llamadas intrínsecas de membrana o integrales), junto con proteínas citoplasmáticas que unen a dichas proteínas transmembranales a los filamentos de actina del citoesqueleto. Algunos ejemplos de proteínas que conforman este tipo de unión son las claudinas y ocludinas, las cuales se unen a las proteínas de la *Zónula Occludens* (OZ). (27)

-Uniones adherentes: suceden entre proteínas homólogas (del mismo tipo), formando interacciones homofílicas entre células vecinas (27); un buen ejemplo de estas proteínas son las de la familia de las cadherinas, como son las E-, N-, P-, siendo la E-cadherina la principal proteína de estas uniones, por lo que una baja expresión de la misma está asociada a la aparición de EMT. Las cadherinas son glicoproteínas transmembranales en cuyo dominio extracelular se encuentra el oligosacárido de las mismas, además son dependientes de calcio y ayudan a determinar la estructura del epitelio. En su porción intracelular se unen a los filamentos de actina del citoesqueleto gracias a un grupo de diversos factores en el citosol. Durante el desarrollo, estas uniones aparecen antes que las uniones estrechas, además de parecer que las uniones estrechas dependen de la previa existencia de las uniones adherentes, de ahí la importancia en su participación para mantener la adherencia celular (29)

-Uniones gap: Uniones tipo canal producto de la unión de hexámeros de conexina. Debido a su forma tubular (con una luz dentro del complejo proteico) permite, además de la unión intercelular, el intercambio de moléculas de bajo peso molecular, así como diversos iones entre las células.

-Desmosomas: Están mediadas por otro tipo de cadherinas: desmogleínas y desmocollinas. Son uniones que forman una especie de remache en zonas específicas de la célula, sin abarcar mayores áreas a diferencia de las uniones adherentes y estrechas. En la porción extracelular se unen a su homóloga mientras que en la porción citosólica se une a los filamentos intermedios del citoesqueleto. (29)

-Hemidesmosomas y uniones focales: conformados por integrinas, permiten que las células se unan a la matriz extracelular y, en la porción basal, a la unión con dicha lámina. Si bien son considerados “la mitad de un desmosoma” (lo que da pie al nombre otorgado) en realidad están compuestos por integrinas cuya estructura dista bastante, por lo que algunos autores las consideran proteínas diferentes.

Características de epitelios con neoplasias malignas:

Aquel epitelio en donde se ha formado un tumor no suele mostrar alteraciones más allá de la lesión misma, por lo que su organización e integridad son los mismos. Sin embargo, dentro de la neoplasia la situación difiere. Generalmente se puede observar pleomorfismo celular, es decir, irregularidad en las células en cuanto a tamaño y forma, además de variaciones en los núcleos y nucléolos, los cuales se muestran numerosos, hipercromáticos debido a la rápida síntesis de material genético. Por ende, es sencillo observar mitosis atípicas. La neoplasia en etapas tempranas suele mantener el crecimiento celular se da en varias direcciones sin que esto rompa la integridad de la lámina propia, sin embargo, llega a suceder que las células cancerosas empiezan a traspasar dicha lámina. (31)

En el tejido del tumor comienza a haber pérdida de las uniones intercelulares debido a que las células cancerígenas empiezan a expresar proteínas que fomentan la creación de matriz extracelular (48) la cual suele ser escasa en los epitelios), además de que al modificarse la forma de las células estas van perdiendo polaridad y, con ello, su fenotipo de célula epitelial y, por consiguiente, su adherencia.

2.3.8 Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

El factor de crecimiento transformante beta es una citocina que funge como factor de transcripción, el cual se une a receptores celulares tipo I y II, desencadenando varias vías de señalización intracelular.

En condiciones normales el TGF- β es un importante factor de crecimiento que, durante el desarrollo embrionario permite la correcta diferenciación celular y formación de órganos, específicamente en mamíferos superiores (y en combinación con otros componentes como el BMP –proteínas morfogenéticas de hueso, por sus siglas en inglés-) estimula a las células de la tercera capa germinativa del embrión, el mesodermo, para proliferar hacia los sitios necesarios en donde posteriormente deberá ocurrir el proceso contrario (MET) para que las células puedan diferenciarse en una estirpe más especializada y cumplir sus funciones estructurales y fisiológicas.

Ejemplificando, se ha observado que el TGF- β es crucial para el correcto desarrollo de estructuras como el corazón, en donde permite que se mantenga una continuidad en las células mesenquimales durante la formación de dicho

órgano, o durante el cierre de las placas óseas palatinas, al promover un adecuado cierre junto con el tabique nasal durante el desarrollo del macizo facial. En estudios realizados en ratones se encontró que aquellos especímenes carentes de TGF- β había casos serios de paladar fisurado. Por el contrario, en organismos adultos el TGF- β puede alterar las vías de señalización normales en tejidos maduros, resultando en fibrosis, tras un intento de reparar algún tejido, o en el desarrollo de neoplasias. (ya que es una molécula que ayuda a evitar/frenar la proliferación de las células epiteliales, favoreciendo a las mesenquimales.

Para que esto se lleve a cabo son necesarios diversos factores de transcripción, como Slug, Snail, la familia TGF, Wnt, etc.

Familia TGF- β

Se ha descubierto que TGF- β consta de una familia extensa constituida por 33 polímeros (en secuencias ya identificadas de mamíferos), que incluyen a los TGF- β en sus diferentes isoformas, las proteínas óseas morfogenéticas (MBPs), miostatina, activina, nodal, entre otros factores y proteínas, siendo las isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 las más estudiadas debido a la importancia que tienen en el control de ciertas funciones celulares, como la apoptosis y proliferación celular. (11)

La familia de los TGF- β fue aislada y clonada, junto con sus mediadores, en 1985, luego de la caracterización del ADN complementario que codifica para TGF- β 1 en humanos. A partir de esto se fueron identificando otros polímeros con características similares hasta conformar a la actual familia de este tipo de compuestos. (11, 12)

Receptores

Este grupo de factores necesita de determinados receptores celulares para poder inducir reacciones dentro de las células. Sus principales receptores son las cinasas de Serina Treonina, del tipo I y II, también llamados TGFBR I y II, los cuales activan dos vías de señalización intracelular, las cuales se detallarán más adelante. Dichos receptores son cruciales en procesos como la proliferación celular, migración, metabolismo, supervivencia, etc, de ahí que su afección detone en una mala función celular, tornándose cancerígena.

Pertenece a un enorme grupo de enzimas que se encargan de catalizar el grupo hidroxilo de serina y/o treonina en algunas proteínas.

Como se mencionó antes, existen 2 vías por las cuales el TGF- β inicia las cascadas de señalización intracelular:

-Vía canónica: Más ligado a SMADs. Hay una fosforilación del extremo C de la proteína SMAD.

-Vía no canónica: Requiere de la participación de otras proteínas diana del TGF- β otras y su activación va a depender del complejo al que se unió el ligando.

Para comprender más a detalle la vía canónica debe saberse la función de los Smads.

Durante estudios realizados con moscas de la fruta (*Drosophila*) se encontró un gen que participa en las vías de señalización y que, al presentar una mutación, inhibe dichas vías. Este gen fue llamado “*Mothers against dpp*” o MAD, mientras que en *C. elegans* se encontraron 2 genes parecidos y que codifican receptores de quinasa transmembranales de serina-treonina específicos para la familia TGF- β como daf-1 y daf-4, los cuales también mostraron genes mutados, llamados Sma-2, 3 y 4.

Por su parte, en humanos, ratones y otros animales se encontraron genes similares tanto a MAD como Sma, resultando en que se les otorgara el nombre de SMAD.

La característica más llamativa, que distinguía a las dos citocinas en ese momento, era que el TGF-b es un dímero unido por disulfuro de 25 kd que se reduce a una banda de 12,5 kd en geles después del tratamiento con agentes reductores, por ejemplo, b- mercaptoetanol, mientras que el TGF-a era una proteína monomérica de menor tamaño

2.3.9 Inducción de Angiogénesis

Angiogénesis es el proceso mediante el cual se forman nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos pre-existentes, mientras que la vasculogénesis se refiere a la formación *de novo*. La regulación de la angiogénesis es controlada por factores pro- y anti-angiogénicos, entre los que se encuentran los siguientes factores de crecimiento: de fibroblastos (FGF), de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF), angiopoyetina, transformante beta 1 (TGF- β 1), transformante alfa (TGF- α), epidermal (EGF) y el vascular endotelial (VEGF), siendo este último el más caracterizado y considerado de mayor importancia durante el proceso de angiogénesis; también conocido como VEGFA, funciona como un mitógeno para células endoteliales y es un potente inductor de la permeabilidad vascular.

2.3.10. Metaloproteinasas de matriz extracelular

Las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) conforman una familia de enzimas proteolíticas dependientes de zinc y son las encargadas principales de la degradación de los componentes de la ECM. (1, 4) Inicialmente se clasificaron en colagenasas, gelatinasas, estromelisininas y matrilisininas, de acuerdo con el sustrato de la ECM que degradaban, sin embargo, la clasificación se ha adaptado de acuerdo a su estructura; hay ocho tipos de clases estructurales de MMPs, cinco son secretadas y tres son asociadas a la membrana (MT-MMPs).;

hay ocho tipos de clases estructurales de MMPs, cinco son secretadas y tres son asociadas a la membrana (MT-MMPs). (43). Las MT-MMPs están unidas covalentemente a la membrana celular, aunque las MMPs secretadas también pueden unirse a la superficie celular al interactuar con las integrinas o con CD44 (44-45).

Su actividad debe ser baja en condiciones normales, sin embargo, incrementa cuando hay procesos de reparación, remodelación, enfermedad o inflamación del tejido. Se sintetizan como zimógenos (pro-MMPs) y se mantienen de esa manera al interactuar con el grupo sulfhidrilo de una cisteína en el dominio propeptídico y el ion zinc del dominio catalítico. Su activación se lleva a cabo en el espacio extracelular y requiere de la remoción proteolítica del dominio propeptídico, por serin proteasas o alguna otra MMP. (46) Las MMPs pueden modular la disponibilidad de factores de crecimiento y la función de receptores de superficie celular; también pueden contribuir a la supervivencia celular al activar indirectamente a la serina-treonina cinasa Akt (PKB) al interactuar con los receptores EGFR e IGF

Ya que las metaloproteinasas de matriz extracelular son las encargadas de regular la degradación de la ECM y ésta a su vez de regular la homeostasis celular, cuando hay una sobreexpresión de las MMPs, hay mayor degradación de la ECM, causando así un cambio en el microambiente normal de las células. Se ha observado que en ensayos de trasplantes los tumores benignos se convierten en malignos cuando la expresión de MMPs aumenta. De igual manera se ha observado que la expresión y actividad de las MMPs incrementa en varios tipos de cáncer, lo cual está relacionado con un incremento en la invasión, metástasis y un menor pronóstico de supervivencia (7).

2.3.11 Resistencia a muerte celular

El término apoptosis es una forma activa y especializada de muerte celular, que es estrictamente regulada y que resulta en una forma ordenada de la remoción de células dañadas. Puede desencadenarse por vías extrínsecas, es decir, dependiente de receptores de superficie de muerte o intrínsecas, por la liberación mitocondrial del citocromo c, por diferentes causas o eventos de estrés.

El primer tipo va a desencadenar apoptosis preferentemente por la vía mitocondrial; por el contrario, los estímulos externos suelen dirigir la apoptosis por la vía externa, es decir, por medio de la activación de los receptores de muerte que se encuentran en la superficie celular, así como de vías externas que causan estrés celular, por ejemplo: radiación, fármacos y químicos que interfieren con el metabolismo celular, alguna infección por virus o un factor de privación de crecimiento o supervivencia. (47)

Defectos en los mecanismos de la apoptosis juegan un papel importante en la patogénesis del tumor, lo cual permite la supervivencia de las células dañadas (neoplásicas) por mayor tiempo, alterando la necesidad de factores de supervivencia exógenos y dando protección contra el estrés oxidativo e hipoxia a medida que la masa tumoral se expande. Mientras todo este proceso ocurre,

las alteraciones genéticas se acumulan y causan la desregulación de la proliferación celular, diferenciación, promoción de angiogénesis e incrementan la invasividad durante la progresión del tumor. Otros defectos en la apoptosis pueden permitir la supervivencia de células epiteliales en un estado de suspensión, sin estar unidas a la ECM, lo cual facilita el proceso de metástasis (47).

Las células tumorales pueden adquirir resistencia a la apoptosis por la expresión de proteínas anti-apoptóticas o por la regulación a la baja o mutación de proteínas pro-apoptóticas, las cuales veremos un poco más adelante. Otra familia de proteínas, conocida como caspasas, es activada en las etapas tempranas de la apoptosis. Estas proteínas adhieren componentes celulares clave que se requieren para la función celular normal, incluyendo a las proteínas que dan estructura en el citoesqueleto y proteínas nucleares como las enzimas que reparan el DNA.

Las células que sufren apoptosis presentan ciertas características y cambios morfológicos y bioquímicos específicos de células en apoptosis, entre las que se encuentra: un encogimiento de citoplasma, unión de lamininas y filamentos de actina en el citoesqueleto, formación de vesículas (budding) de la membrana plasmática, translocación de la fosfatidilserina (PS) hacia el lado extracelular, condensación de la cromatina y fragmentación del DNA. Otra característica muy representativa es que la membrana plasmática se mantiene intacta durante todo el proceso. La exposición de PS permite que la célula sea reconocida por macrófagos, que realizan fagocitosis, pero sin la liberación de componentes celulares pro-inflamatorios. En la última etapa de este proceso ocurre la formación de blebs (blebbing) en la membrana, hay una modificación estructural de organelos citoplasmáticos y pérdida de la integridad de la membrana, aunque, usualmente, las células fagocíticas engullen a las células apoptóticas antes de la formación de cuerpos apoptóticos, de lo contrario, estos son removidos por fagocitos profesionales y células vecinas. Además de esto, la apoptosis es caracterizada por la pérdida del contacto célula – célula o a la matriz extracelular, desprendimiento, encogimiento celular a causa de pérdida del ion potasio (K+) y agua y escisión del DNA internucleosomal por proteólisis específica.

Como ya sabemos, el cáncer es un conjunto de enfermedades, muy complejo, que se da como resultado de la mutación de oncogenes o genes supresores de tumores, la cual puede desarrollarse a causa de la alteración en vías de señalización.

Se conocen principalmente 3 formas de muerte celular: apoptosis, autofagia y necrosis, siendo la primera la que más ocurre cuando el daño en el DNA es irreparable. Hay dos vías centrales que llevan a apoptosis: vía intrínseca y extrínseca, también conocidas como vía mitocondrial y vía de los receptores de muerte, respectivamente.

2.4.1 Cáncer de cabeza y cuello

El cáncer de cabeza y cuello es una entidad que conjunta a todos los tipos de cáncer del tracto aerodigestivo superior, presenta una incidencia de 3 % en Estados Unidos de América (EUA) y 4 % en Europa. De acuerdo a Globocan (2018) el cáncer de hipofaringe presenta una incidencia y mortalidad que se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 3.

Región	Incidencia (ASR)*	Mortalidad (ASR*)
EUA	0.48	0.09
Latinoamérica y el Caribe	0.37	0.16
Europa	1.3	0.70

*: ASR: tasa estandarizada por edad.

De entre los cánceres de cabeza y cuello el más común es el carcinoma oral de células escamosas (COCE), en el cual no se incluyen las lesiones de origen glandular.

Una de las zonas donde es común la aparición de COCE, además de la cavidad oral, es la faringe e hipofaringe y que, por su localización y difícil acceso en consultas ambulatorias, suelen detectarse hasta que presentan síntomas notorios y, por ende, ya se encuentra en un estado avanzado.

Los factores de riesgo del cáncer de hipofaringe son el consumo de alcohol, uso de tabaco, una dieta no balanceada, problemas digestivos como reflujo esofágico pues tanto el esófago como la faringe no cuentan con el moco protector necesario para resistir el ácido estomacal, y por último el virus del papiloma humano (VPH), que es el segundo agente infeccioso causante de cáncer, de acuerdo a Globocan

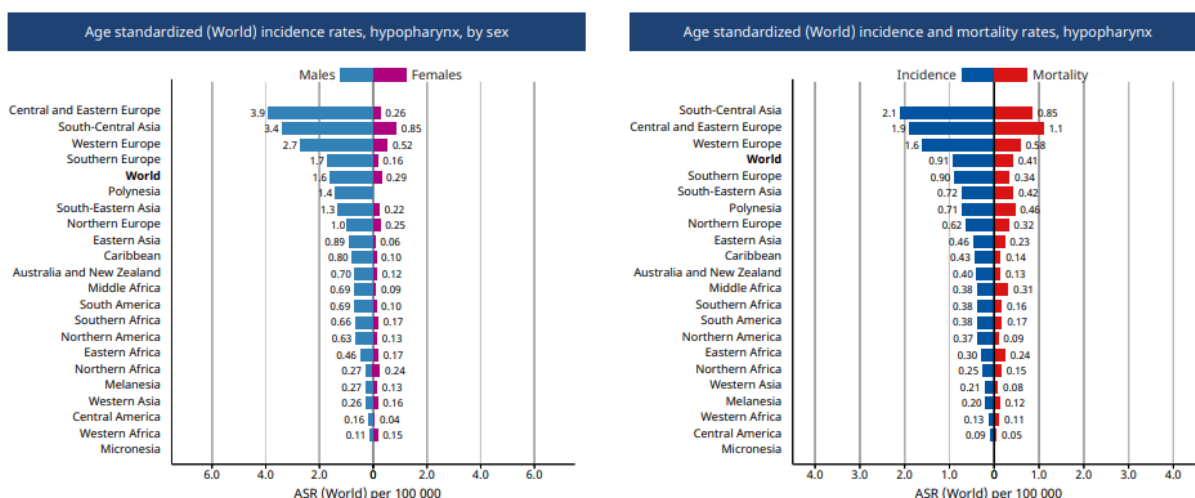


Tabla 4. Tomado del Observatorio Mundial del Cáncer.

3.3 Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico oportuno es esencial para prevenir el mayor progreso de la enfermedad, aminorar los efectos secundarios y reducir el riesgo de reincidencia, así como prolongar la esperanza de vida. Para ello hay signos y síntomas importantes a considerar:

- Dolor de garganta, irritación, dificultad para deglutir.
- Manchas blancas, rojizas o combinadas en alguna región de la mucosa bucal (y que previamente no estaban)
- Úlceras que no cicatrizan en más de 15 días
- Aumentos de volumen (nódulo)
- Alteraciones en la voz.
- Pérdida de piezas dentales

El tamizaje es el procedimiento que se realiza para determinar la presencia o ausencia de lesiones malignas o premalignas, y consta de una revisión (visual y palpación) de todas las estructuras de la cavidad oral, sumado a la revisión de presencia de nódulos en las cadenas ganglionares de cabeza y cuello.

Los tejidos y órganos localizados en cavidad oral y áreas circundantes, de manera normal, se caracterizan mayoritariamente por tener una coloración rosada y lisa en la mucosa yugal que recubre los carrillos, en arcos palatinos, piso de boca, cara ventral de la lengua, paladar blando, faringe, laringe, hipofaringe, o con puntilleo para el caso de la encía, o papilar en el área dorsal de la lengua. Deberán considerarse las variaciones anatómicas y otras condiciones médicas para no confundirlas en el diagnóstico con una posible neoplasia.

A continuación, se muestran algunos ejemplos:

- Melanosis gingival: También conocida como pigmentación melánica fisiológica. La acumulación de melanina en la mucosa de la encía y otras áreas causa cambios en la coloración, observándose como áreas de color marrón o violáceo. No tiene repercusiones clínicas más allá del aspecto estético. (56)
- Mursicatio bucarum: área blanquecina, generalmente bien delimitada sobre la mucosa yugal como consecuencia de la fricción con los dientes ya sea por una

maloclusión o por mordedura constante. No es desprendible al tacto e histológicamente no arroja resultados anormales.

- Glándulas sebáceas ectópicas
- Perlas epiteliales de Epstein
- Torus palatino y lingual
- Várices linguales
- Glositis romboidal media
- Lengua geográfica

Es importante, por ende, conocer bien las diferencias entre cualquier otra alteración y/o condición normal (pero cuyo aspecto llegue a preocupar al paciente) y considerar usar técnicas que ayuden al diagnóstico diferencial, como el uso de imagenología y biopsias, siendo esta última, la biopsia, el elemento diagnóstico más eficaz pues permite conocer las características histológicas de la muestra, ayudando a determinar la estirpe celular, el tipo de lesión y el estadio de evolución de la misma.

Las principales lesiones que deberán tomarse a consideración para evaluarlas como posibles tumores malignos son: úlceras, especialmente si no han resuelto en más de 2 semanas, máculas rojas, blancas, o la combinación de estas últimas.

Estudios han demostrado que hay un mayor índice de malignización en lesiones rojas, llamas eritroplasias, o en leucoeritroplasias (la combinación de ambas)

Ante la presencia de un cambio que indique sospecha siempre es recomendable tomar una biopsia, la cual determinará de forma segura el estado del epitelio.

Tratamiento: Toda vez que se ha establecido con certeza el carcinoma oral de células escamosa mediante los estudios pertinentes (exploración, biopsia), el tumor debe extirparse y proseguir con tratamientos tópicos.

Cuando existe el riesgo de posible invasividad se procede a curetaje y electrodesecación mediante el raspado con aguja eléctrica siempre y cuando sea

de dimensiones muy pequeñas. Por otra parte, la terapia láser y congelación con nitrógeno líquido, se utiliza para lesiones superficiales.

Otro tratamiento es mediante la terapia fotodinámica que hace uso de fotosensibilizadores y luz que utiliza un medicamento líquido. Cuando el carcinoma es invasivo se pueden realizar escisión simple se realiza la extirpación del tejido canceroso y circundante o cirugía de Mohs en la que realiza la examinación capa por capa o radioterapia combinada con quimioterapia o inmunoterapia.

Por todo lo anterior, diversas investigaciones están en la búsqueda de terapia alternativas como son los productos naturales. Los flavonoides como ya mencionamos con anterioridad son una alternativa en el tratamiento contra el cáncer.

Se han determinado un gran número de flavonoides con actividad biológica contra el cáncer como las catequinas, kaempferol, luteolina, quercetina, morina y nobiletina. Estos dos últimos no se han estudiado sus efectos en el carcinoma oral de células escamosas.

3.4 Efecto de morina en el tratamiento de cáncer

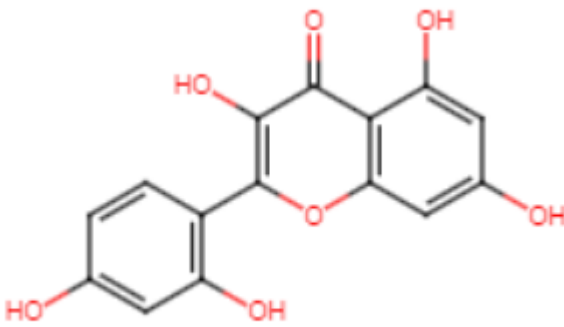
MORIN	
	
Sinónimos	5
2',3,4',5,7-pentahydroxyflavone / 2-(2,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one / Morin hydrate	
Nombre según la IUAPC	
2-(2,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one	
Isomeric SMILE	
<chem>C1=CC(=C(C=C1O)O)C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O)O)O)O</chem>	
Propiedades fisicoquímicas	
Formula	C15H10O7
Peso molecular	302.24 g/mol
No. Átomos pesados	22
No. Átomos aromáticos	16
Aceptores de enlace de hidrogeno	1
Donantes de enlace de hidrogeno	7
Refractividad molar	5
	78.03
Log P _{o/w}	1.20

Fig 10 Propiedades físico – químicas de la morina. Imagen realizada en: <http://www.swissadme.ch/>

La morina es un flavonol que está presente en algunos cereales, frutos y es abundante en diversas plantas medicinales (49). Es particularmente abundante en *Ficus arica*, *Maclura pomifera* y almendra (50), en el té y café (Haddad, Sheta y Boshra 2018).

Según su estructura la morina se denomina 3,5,7,2',4' pentahidroxi flavona. Estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* señalan se considera una molécula útil en tratamiento de enfermedades de tipo crónico ocasionadas por estrés oxidativo y procesos inflamatorios (Caselli et al 2011; Sobiraja, AndrabiDuna y Ventkatabalasubramanin 2021). Otras de sus propiedades son sus actividades neuroprotectoras, anti-trombóticas, anti-virales, antibacterianas y anti-cáncer (51, 52), Diversos estudios señalan que la morina no muestra efectos tóxicos en ratas F344 (Cho et al 2006).

En la naturaleza se presenta de manera deglicosilada (Caselli et al 2016) y las formas glicosiladas son absorbidas por los enterocitos y entra en intestino como forma aglicona donde puede ser absorbida y de rápida excreción y su biodisponibilidad es muy reducida debido a su baja solubilidad en agua. Se ha reportado que la morina inhibe la carcinogénesis en cáncer de mama, en cáncer de lengua inducido por 4-nitroquinoline 1-oxido en ratas se ha encontrado que reduce el índice PCNA en la porción anterior de la lengua. Kawabata et al 1999, inhibe la carcinogénesis hepatocelular. Entre sus efectos moleculares se encuentra la inhibición de la activación de la vía NFκB, factor de necrosis tumoral (TNFα interleucina-6 (IL-6) y de prostaglandina E2 (PGE2). De igual manera, sobre-expresa a la proteína Bax y degrada a la proteína Bcl-2, lo que sugiere que tiene un importante papel en la inducción de la apoptosis, en particular en hígado (Sivaramakrishnan y Bevaraj 2010) y activa a las caspasas-9 y -3, como se muestra en la figura siguiente:

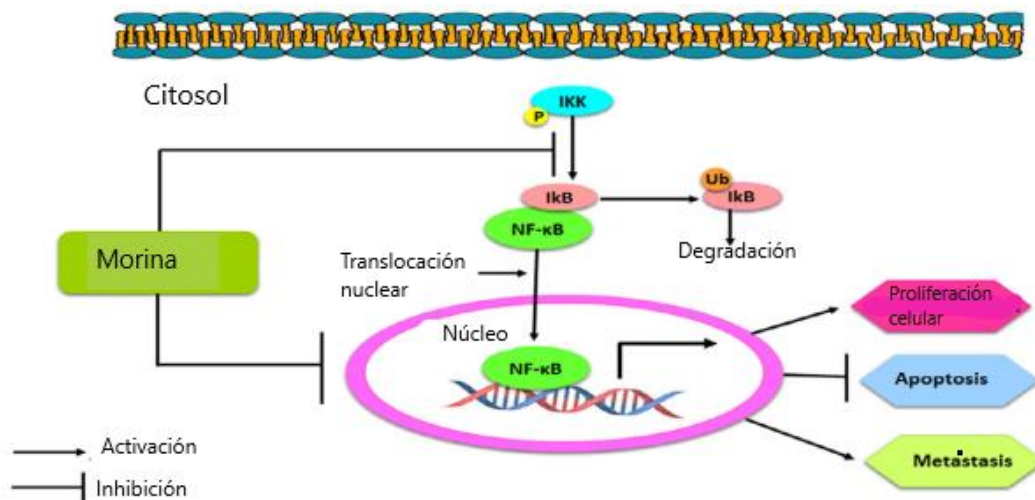


Fig. 11

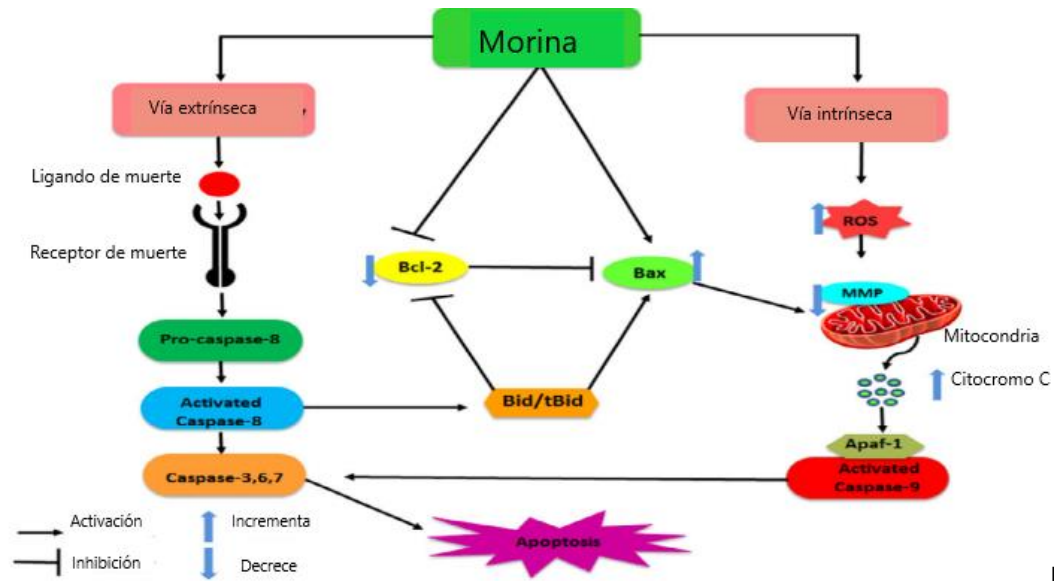


Fig 12

Figuras 11 y 12. Tomadas y traducidas de: Yun-Yi Chena, Jiao-Jiao Lianga, Deng-Liang wangb, Jie-Biao Chena, Jin-Ping Caoa, Yue wanga and Chong-De Sun, 2022. Nobiletin as a chemopreventive natural product against cancer, a comprehensive review. Taylor & Francis online.

Vías de señalización en las que interfiere la morina.

Tipo de cáncer	Línea celular	Dosis	Mecanismos moleculares	Referencias
Cáncer colorrectal	Línea celular SW480	150, 200, y 250 μ M	Inducción a la apoptosis a través de la producción de ROS, pérdida de MMP, regulación a la alza de Bax, regulación a la baja de Bcl-2, activación de las caspasas 8, 9 y 3, y adhesión de PARP.	Sithara et al. (2017)
Cáncer colorrectal	Línea celular HCT-116	15, 30, y 60 mg/L	Por inhibición de la vía de señalización NF- κ B	Chen y Zhang (2019)
Carcinoma cervical.	Línea celular HeLa	100, 200, 300, 400, y 500 μ M	Inducción a la apoptosis a través de la producción de ROS, sobreexpresión de DR3, DR5, FasL, FADD, Bax, bad, citocromo C y Apaf-1; activación de las caspasas 9 y 10 y anclaje de PARP. Inducción a la detención del ciclo celular por la sobreexpresión de la vía de p53 y p21 y la baja regulación de ciclina D1, CDK1, Cdc25c y CHK2. Por regulación a la baja de la expresión de la vía NF- κ B.	Zhang et al. (2018)
Leucemia	Línea celular HL-60	100, 200, 300, 400, 500 μ M	Inducción de la apoptosis a través de generación de ROS, colapso de MMP, sobreexpresión de Bax, regulación a la baja de Bcl-XL y activación de la caspasa 9 y caspasas 3. Inducción de la detención del ciclo celular por un incremento en la expresión de p21 y Wee1 y el decremento de la expresión de Cdc25c, ciclina A y ciclina B1.	Kuo et al. (2007)
Leucemia mieloide crónica	Línea celular KBM-5	10, 25, 50 y 100 μ M	Por inhibición de la translocación nuclear y la fosforilación de NF- κ B	Manna, Aggarwal, Sethi, Aggarwal, y Ramesh (2007)
Leucemia mieloide crónica	Líneas celulares KCL22 y K562	25 y 50 μ mol/L	Por regulación a la baja de la expresión de miR-188-5p. Por inhibición de la víaPI3K/Akt	Nie et al. (2019)
Cáncer de próstata	Línea celular LNCaP	25, 50, 75 μ M	Inducción a la apoptosis por activación de las caspasas 3 y 7	Li et al. (2017)
Melanoma	Líneas celulares G361 y SK-MEL-2	50, 100, 200, 300, 400 μ M	Inducción a la apoptosis mediante la producción de ROS, sobreexpresión de Bax y PUMA, regulación a la baja de Mcl-1 y Bcl-2 y activación de la caspasa 3	Lee et al. (2019)
Melanoma	Líneas celulares MV3 y MV14	50 μ M	Por mejoramiento de la expresión de miR-216a	Hu, Guo, y Yang (2018)
Cáncer de vejiga	Línea celular EJ	300, 450, 600, 800 μ M	Inducción de la detención del ciclo celular por el mejoramiento de la expresión de p21WAF1 y el atenuamiento de la expresión de ciclina D1, ciclina E, CDK2 y CDK4. Por decremento de la expresión de MMP-9 a través de la inhibición de NF- κ B. Por mejoramiento de la fosforilación de ERK1/2 y el la disminución de la fosforilación de JNK	Shin et al. (2017)

Tabla 5 (continúa)

(Continuación tabla 5)

Nbn

Tipo de cáncer	Líneas celulares	Dosis	Mecanismos moleculares	Referencias
Mieloma múltiple	Líneas celulares U-266, RPMI-8226 y MM.1S	5, 10, 25, y 50 μ M	Inducción de la apoptosis mediante sobreexpresión de FasL, regulación a la baja de Bcl-2, Bcl-xL, survivina y c-IAP2 y activación de las caspasas 8, 9 y 3. Inhibición de la vía STAT3	Gupta et al. (2013)
Carcinoma hepatocelular	Línea celular HepG2	20 y 40 μ M	Inducción de la apoptosis mediante la sobreexpresión de Bax y PUMA; regulación a la baja de Bcl-2, pérdida de MMP, liberación del citocromo C y activación de las caspasas 9 y 3. Por mejoramiento en la fosforilación de p38 y JNK	Singh et al. (2019)
Cáncer de mama	Línea celular MDA-MB-231	10, 50, 100, y 200 μ M	Por regulación a la baja de la expresión de MMP-9 e inhibición del proceso de EMT a través de la supresión de la vía Akt	Jin et al. (2014)
Cáncer de mama	Línea celular MCF-7	25, 50, 100, 150, 200 μ M	Al suprimir la vía Akt y por baja regulación de la expresión de MMP-9, MMP-7, uPA, uPAR y fibronectina	Lee, Nam, Baek, Kim, y Nam (2020)
Carcinoma oral de células escamosas	Línea celular BICR56	25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 y 300 μ M	Vía de activación de JNK y p38. Por regulación a la baja de la expresión de p-Akt	Brown et al. (2003)
Cáncer de pulmón	Línea celular A549	50 μ M	Por regulación a la baja de miR-135b	Yao, Cui, Zhou, Guo (2017)
Carcinoma de células escamosas de lengua	Línea celular CAL27	50, 100, y 150 μ M	Al activar la vía de señalización del hipotálamo e inhibición de la translocación nuclear y la actividad transcripcional de YAP	Ji et al. (2018)
Cáncer de ovario	Líneas celulares OVCAR3 y SKOV3	15, 30, y 60 mg/mL	Por supresión de la vía NF-kB	Xu y Zhang (2019)

Tabla 5. Tomada y traducida de: Mottaghi, S., & Abbaszadeh, H. (2021). The anticarcinogenic and anticancer effects of the dietary flavonoid, morin: Current status, challenges, and future perspectives. *Phytotherapy Research*, 35(12), 6843–6861. <https://doi.org/10.1002/ptr.7270>

Otros de los efectos asociados al morina incluyen su regulación y arresto de ciclo celular en fase G2/M y regulación de la expresión de ciclinas (Zhang 2018, Shin 2017).

Por otra parte, es un potente regulador de metástasis regulando la expresión de metaloproteinasas de matriz extracelular, regula la vía de fosfatidilinositol 3 quinasa/ proteína cinasa B (PI3K/AKT) /Pulloski-Gross y Cao 2015) y la transición epitelio mesénquima degradando a E-cadherina y la vía de TGF- β , Wnt- β -catenina y Notch. (Sing 2017), (Jin 2014). En resumen es importante realizar más estudios con el propósito de definir el papel de la morina en la regulación de metástasis y caracterizar los blancos moleculares.



Figura 13. Tomada y traducida de: Mottaghi, S., & Abbaszadeh, H.(2021). The anticarcinogenic and anticancer effects of the dietary flavonoid, morin: Current status, challenges, and future perspectives. *Phytotherapy Research*, 35(12), 6843–6861. <https://doi.org/10.1002/ptr.7270>

En dicha figura se señala los mecanismos de acción de la morina, indicando con flechas las vías que son activadas o inducidas, mientras que las franjas horizontales indican inhibición de la mismas.

3.5 Efecto de nobiletina en el tratamiento de cáncer.

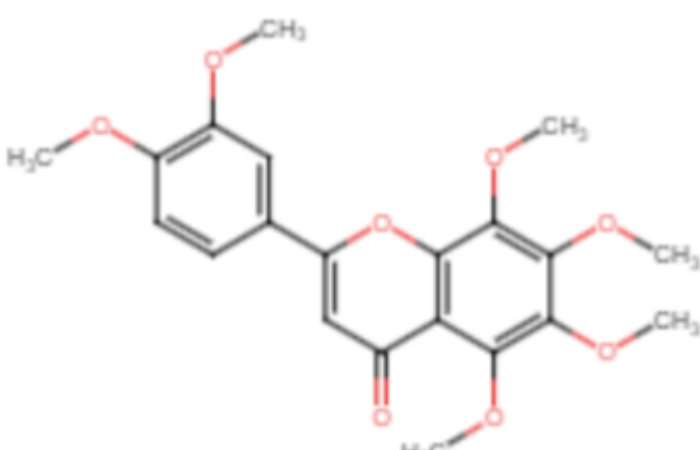
NOBILETINA	
	
SINONIMOS	
478013 / Hexamethoxyflavone / 3',4',5,6,7,8- Hexamethoxyflavone/ 5,6,7,8,3',4'-Hexamethoxyflavone	
NOMBRE SEGÚN LA IUPAC	
2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5,6,7,8-tetramethoxychromen-4-one	
Isomeric SMILE	
<chem>COC1=C(C=C(C=C1)C2=CC(=O)C3=C(O2)C(=C(C=C3OC)OC)OC)OC</chem>	
Formula	C ²¹ H ²² O ⁸
Peso molecular	402.39 g/mol
No. Átomos pesados	29
No. Átomos aromaticos	16
Aceptores de enlace de hidrogeno	8
Donantes de enlace de hidrogeno	0
Refractividad molar	106.87
Log P _{o/w}	3.96

Figura 14. Características bioquímicas de la nobiletina. Imagen realizada en: <http://www.swissadme.ch/>

La nobiletina es uno de los flavonoides más estudiados debido a su amplia distribución en frutas como mandarinas, naranja, algunos híbridos de la naranja, en las hojas y tallos de muchas plantas medicinales, incluyendo al té (53)

Al igual que el resto de compuestos pertenecientes a la familia de flavonoides, la nobiletina ha demostrado tener diversas propiedades benéficas en los organismos, de entre los cuales su capacidad sobre el desarrollo del cáncer es la que nos atañe en este caso, y el cual logra prevenir, detener e incluso (en ciertas ocasiones), revertir, a través de mecanismos como la inducción a la apoptosis de células malignas, por detención del ciclo celular, inhibición de la proliferación celular, disminuyendo o frenando la invasión (metástasis) o contrarrestando la resistencia contra los fármacos, sensibilizando así a las

células diana hacia los medicamentos empleados convencionalmente en quimioterapia (53)

Sin embargo, la nobiletina presenta algunos problemas iniciales, los cuales son su elevada hidrofobicidad (disminuyendo así su solubilidad en agua) y una biodisponibilidad oral baja, menor al 1%, además de una rápida metabolización (54). Para solucionar eso algunos autores han conjugado a la nobiletina con compuestos como CAGE (Ácido geránico y colina, por sus siglas en inglés, en adición a agua ionizada) (54)

Una vez que la nobiletina ingresa al organismo esta es transformada en metabolitos, como 5-dimetilnobiletina (5-DMN) y 4'-dimetilnobiletina (4'-DMN), los cuales muestran mayores propiedades anticancerígenas que su compuesto predecesor (53)

La nobiletina tiene varios mecanismos mediante los cuales el desarrollo del cáncer se disminuye, detiene o revierte, como lo son:

-Apoptosis: Este proceso que consta de la muerte celular programada es posible gracias a varias vías de señalización, como ya se mencionó anteriormente en el apartado de morina, y que primordialmente son la vía extrínseca y la vía intrínseca. La apoptosis es considerada la mejor forma de evitar el desarrollo del cáncer pues no tiene grandes efectos adversos, como la inflamación y daño a los tejidos sanos que se encuentran en torno al tumor (53) La nobiletina induce este tipo de muerte celular por vías como la de la mitocondria, el retículo endoplásmico o por la vía del receptor de muerte.

- Detención del ciclo celular: El ciclo celular consta de varias fases, como la fase G1 (previo a la replicación), S (replicación del DNA), G2 (posterior a la síntesis del DNA) y M (mitosis). Hay puntos de restricción entre las fases G1 y S, y G2-M con el fin de tener un buen control del ciclo celular. Si en alguno de estos puntos ocurre un error podría determinar en daño celular o mutación. LA nobiletina tiene la capacidad de inducir el arresto celular principalmente en la fase G1 en la mayoría de líneas celulares al inhibir la acción de ERK1/2 y por sobreexpresión de ciclina D1 y p21 (53)

- Inhibición de la invasión y migración: Tanto la migración como la invasión son indicativo de un mal pronóstico en los pacientes debido a que gracias a ellos surge la metástasis y disminuye la esperanza de supervivencia. Estos procesos comúnmente de desarrollan mediante las vías de señalización MAPK/MEK, PI3K/AKT, p38/NF- κ B/Nrf2, TGF- β 1/Smad3, ERK/JNK y AKT/GSK-3 β / β -catenina (53) en donde las metaloproteinasas de la matriz extracelular son esenciales inductoras de estas vías. La nobiletina ha mostrado su efecto de anti-invasivo y antimigratorio al inhibir a las pro-metaloproteínas de la matriz y sobreexpresando el inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1, además de mejorar la fosforilación de JNK, un factor de señalización que inhibe la vía PI3K/AKT.

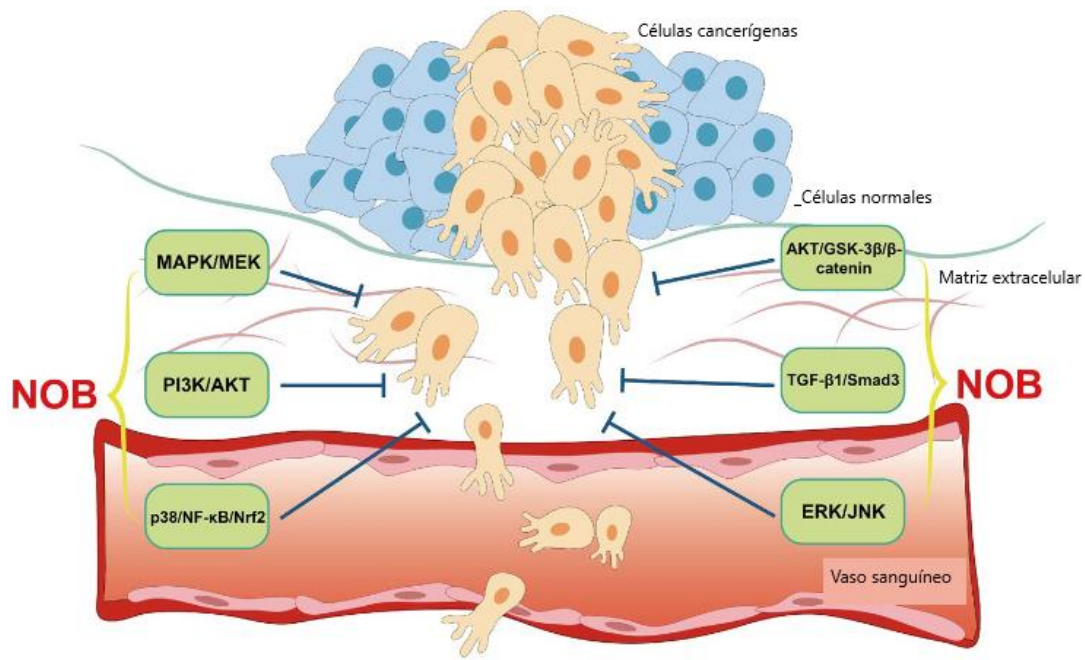


Figura 15. Tomada y traducida de: Yun-Yi Chena, Jiao-Jiao Lianga, Deng-Liang wangb, Jie-Biao Chena, Jin-Ping Caoa, Yue wanga and Chong-De Sun, 2022. Nobiletin as a chemopreventive natural product against cancer, a comprehensive review. Taylor & Francis online. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2030297>

4. JUSTIFICACIÓN.

El cáncer de células escamosas de cabeza y cuello es la sexta causa de cáncer en el mundo, con una mortalidad del 40 a 50%. Hasta el momento la supervivencia de los pacientes afectados con este padecimiento ha mejorado pero los procedimientos quirúrgicos, radio y quimioterapia disminuyen la calidad de vida de los pacientes por lo que un gran grupo de investigadores se han abocado a la búsqueda de estrategias alternativas que mejore la calidad de vida y nutrición de los pacientes afectados con esta enfermedad. Las moléculas obtenidas de productos naturales son alternativas para el tratamiento del cáncer y un gran número de investigaciones apuntan a que los flavonoides son una alternativa en el tratamiento del carcinoma oral de células escamosas.

5. Objetivo general.

Evaluar el efecto de morina y nobiletina en la línea celular de células escamosas de hipofaringe, *FaDu*.

5.1 Objetivos particulares.

- Evaluar el efecto de morina y nobiletina en la viabilidad celular de células FaDu con el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol).
- Caracterizar el efecto de morina y nobiletina sobre la migración celular con los ensayos de cicatrización de herida (wound healing)
- Determinar morina y nobiletina en la transición epitelio mesénquima mediada por el factor de crecimiento transformante.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

Materiales

Autoclave (Cristofoli)

Balanza analítica (Ohaus)

Baño seco (Thermolyne)

Bomba de vacío portátil (Barnant)

Cajas de cultivo celular (Falco, de 6, 24 y 96 pozos) (Corning)

Cámara de electroforesis vertical (Amersham Biosciences Hoefer)

Cámara de transferencia (Bio-Rad)

Campana de flujo (NUAIRE)

Centrífuga (Thermo Scientific)

Congelador a -20°C (Nieto)

Espectrofotómetro (Optizen)

Lector de placas (Synergy BioTek)

Micropipetas (Eppendorf, Gilson)

Microscopio de objetivos invertidos (Olympus CK2)

Potenciómetro (Denver Instrument)

Shaker (Fisher Scientific)

Sonicador (Ultrasonic processor)

Tubos clínicos de 15 y 50 mL (Corning)

Membranas de PVDF (GE Healthcare)

6.1 Cultivo celular.

La línea celular utilizada para esta investigación es *FaDu*; línea celular derivada de un carcinoma de células escamosas de hipofaringe proveniente de un paciente caucásico, de 56 años de edad, de la India y la cual se obtuvo de la de American Type Culture Collection (ATCC, (Manassas, VA, USA). El cultivo celular se mantuvo en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (SBF, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 10%, inactivado por calor, y adicionado con estreptomycin [1000 µg/mL], penicilina [100 U/mL] y fungizona [1 mg/mL] (Sigma) en una atmósfera a 37°C y 5% CO₂. El medio se cambió cada tercer día y se trypsinizó cuando las células alcanzaron una confluencia ≥85% y se colocaron en cajas de 6, 24 y 96 pozos para realizar

los experimentos. Se realizó el tratamiento con morina o nobiletina (Sigma) de un stock a 1 mM disuelto en sulfóxido de dimetilo (DMSO, Sigma).

6.2 Ensayo de viabilidad celular con MTT.

Con el objetivo de evaluar la viabilidad celular frente a la exposición a morina y nobiletina, se realizó mediante el ensayo con la sal de tetrazolio MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), se cuantificaron 5×10^4 células por pozo, utilizando el Automated cell counter TC20 (Bio-Rad Hercules Ca USA) en cajas de 96 pozos. Se realizó el tratamiento a diferentes dosis de morina o nobiletina a diferentes tiempos 24, 48 y 72 h. Al término se añadió 0.5 mg/mL de MTT (Sigma) y se incubó por 4 horas, posteriormente se disolvieron las sales de formazán con una solución de isopropanol-ácido clorhídrico (0.1 N) y se midió la absorbancia a 570 nm en el equipo Synergy BioTek (Shoreline WA USA). El experimento se realizó en tres ocasiones por separado.

Tratamiento celular.

Curso temporal.

Se utilizaron células FaDu en cajas de 6 pozos que tuvieran una confluencia $\geq 85\%$; todos los pozos, con excepción del basal, se trataron con TGF- β a concentración 300 pM durante dos días. Al término las células se trataron a dosis de 50 μ M de morina ó nobiletina calculado para un volumen final de 1 mL en cada uno de los pozos, a 15, 30, 60, 90 y 120 minutos.

Dosis-respuesta.

Se utilizaron células FaDu en cajas de 6 pozos que tuvieran una confluencia $\geq 85\%$. Se trataron con TGF- β (300 pM) y posteriormente se incubaron a diferentes dosis del flavonoide (0, 10, 25, 50, 100 y 200 μ M) a 24 horas.

6.3 Ensayo de cicatrización de herida.

Con el objetivo de evaluar el efecto de morina o nobiletina sobre la migración celular se realizó el ensayo de cicatrización de herida, para el cual se utilizaron cajas de 6 pozos con 10,000 células FaDu por pozo, con una confluencia $\geq 90\%$; se retiró el medio, se trataron las células con TGF- β (300 pM) por dos días y se añadió medio nuevo con citarabina (Sigma) y se realizaron las heridas con ayuda de una punta para micropipeta de 0.1 – 10 μ L, se incubó durante 15 minutos y posteriormente se cambió nuevamente el medio, añadiendo diferentes concentraciones de cada uno de los flavonoides calculadas para un volumen final de 1 mL con araC y medio. Se capturaron imágenes en microscopio (Carl Zeiss Rudolf Eber Oberkochen Germany) al tiempo 0 y 24 h. Posteriormente se analizaron las imágenes con el programa ImageJ. El experimento se realizó por triplicado en diferentes ocasiones.

6.4 Western blot.

Una vez finalizado el tratamiento con el flavonoide se retiró el medio o. Se añadió una solución de ortovanadato de sodio 1 mM y se rasparon con ayuda de un gendarme, posteriormente se recuperaron en tubos eppendorf, se centrifugaron a 15,000 rpm, durante 10 minutos, se retira el sobrenadante y se añade buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, 1% Nonidet P-40, leupeptina 10 µg/mL, aprotinina 50 g/mL, Na₃VO₄ 0.4 Mm, NaF 10 mM y Na₃P₂O₇ 10 mM) para después sonicar las células en hielo, 30 s a pulsaciones continuas, se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm, 10 minutos, se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford utilizando albúmina sérica bovina (BSA 15 µg/mL) a una longitud de onda de 595 nm. Se calculó la cantidad de proteína y agua necesarias para una cantidad final de 30 µg de proteína en cada una de las muestras, añadiendo además 6 µL de buffer de muestra (azul de Coomassie 5%, β-mercaptoetanol), se desnaturalizaron en un baño seco a 70°C durante 5 minutos y se corrieron en geles SDS-PAGE al 7.5 o 10% en una cámara de electroforesis (Amersham biosciences) de 70-90 V durante aproximadamente 1 h. Se transfirieron las proteínas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (GE Healthcare) a 30 V durante 1 h en una cámara semihúmeda, se bloqueó con una solución TBS (Tris-HCl 5 M pH 7.5 y NaCl 1.5 M) con leche al 5%, sin grasa y tween-20 (0.1 %) durante 1 h en un hematocrito. La membrana se lavó con buffer de lavado (NaCl 20 mM, TRIS 137 mM y 2 mL de Tween 20) en tres ocasiones durante 10 minutos cada uno en un orbital shaker y posteriormente se incubó con una solución del anticuerpo monoclonal primario de interés en buffer de anti-E cadherina, a 4°C durante toda la noche. Se lavó nuevamente la membrana con buffer de lavado y se incubó con la solución del anticuerpo secundario (conjugado a HRP) correspondiente durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Se realizaron lavados y se procedió a detectar las bandas con ayuda del kit de quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotechnology) y se expuso en placas fotográficas (GE Healthcare). La intensidad de la banda de proteína se determinó por medio del programa. Se consideró al basal como el 100% y se calculó el resultado con su basal correspondiente.

7. RESULTADOS.

7.1- Efecto de la morina y nobiletina en la viabilidad celular.

Con el propósito de evaluar el efecto del morina y nobiletina en la viabilidad de la línea celular *FaDu*, se realizó el ensayo de MTT. Se encontró que ambos flavonoides disminuyen la viabilidad celular a una concentración de 200 μM a las 48 horas y a todas las dosis a 72 horas, de manera significativa, siendo a 100 μM y 72 horas que se observa el mayor efecto, respecto al basal. (Figura 9).

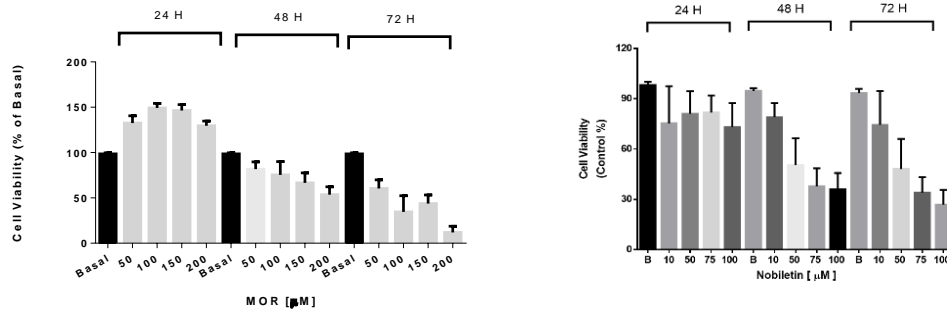


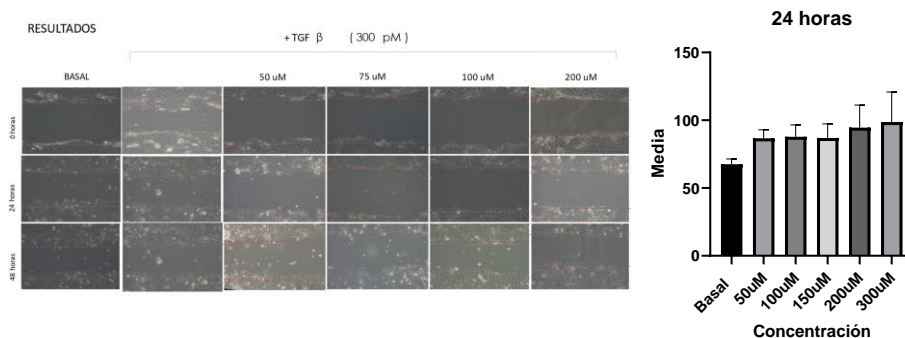
Figura 16. Efecto de morina y nobiletina en la viabilidad de la línea celular *FaDu*.

Se colocaron 1,000,000 de células en cada pozo de una caja de 96 pozos para evaluar la viabilidad celular. Una vez adheridas, se colocó el tratamiento con quercetina (25, 50, 100 y 200 μM) a los diferentes tiempos (24, 48 y 72 h). Los resultados se presentan como media \pm DE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

7.2 Ensayo de cicatrización herida.

Para conocer el efecto de los flavonoides morina y nobiletina en la migración celular, se llevó a cabo el ensayo de cicatrización de herida. Se encontró que estos flavonoides disminuyen la migración celular al mantener la herida abierta, opuesto al basal.

A Morina



B Nobiletina

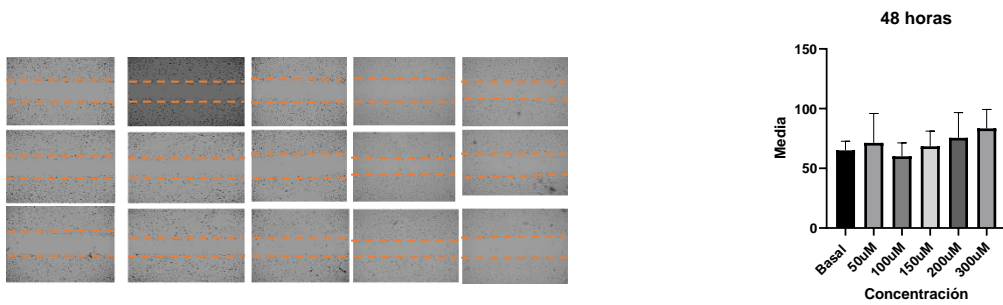


Figura 17. **Efecto de morina y nobiletina en la migración de células *FaDu*.**

Se colocaron las células *FaDu* en una caja de 6 pozos y se esperó a que el cultivo estuviera confluyente. En presencia de TGF beta 300 pM. Posteriormente se añadió el tratamiento (10, 25, 75 y 100 µM) de quercetina y se incubó por 24 horas. A) Morina y B) Nobiletina. Los resultados se presentan como media \pm DE.

7.3 Efecto de morina y nobiletina en la expresión de E-cadherina.

Para evaluar el efecto de morina y nobiletina en la expresión de E-cadherina las células se trataron con TGF 300 pM y se incubaron con los flavonoides. A) Se determinó el efecto de morina y B) nobiletina

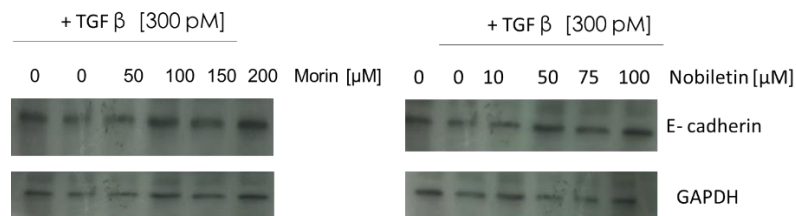


Figura 18

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Como se mencionó anteriormente, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto de los flavonoides morina y nobiletina en la línea celular de células escamosas de hipofaringe, *FaDu*. En los experimentos encontramos que morina y nobiletina inducen un efecto inhibitorio sobre la migración y transición epitelio-mesénquimal inducida por TFG- β .

Se observó mayor actividad del flavonoide nobiletina, la cual es una metoxiflavona en donde los grupos hidroxilo son sustituidos por grupos metoxi en las posiciones 5,6,7,8, 3' y 4' (55). Entre las propiedades físico – químicas de la nobiletina se encuentra su lipofilicidad, lo que implica al acceso a blancos moleculares particulares y es motivo por el cual es muy efectiva contra el cáncer de sistema respiratorio (nasofaríngeo, pulmón); sistema nervioso (glioma y neuroblastoma); sistema urinario (riñón y vejiga urinaria), osteosarcoma, fibroblastoma y de piel; cáncer digestivo (oral, gástrico, pancreático, hígado y colon); sistema reproductor (ovario, coriocarcinoma, cervical, próstata) y sistema circulatorio (leucemia), debido a su fácil acceso a través de las membranas celulares. En modelos *in vitro*, regula el ciclo celular promoviendo el arresto en fase G2/M y G1/S. De igual manera inhibe la migración e invasión; por otra parte, nuestros resultados muestran que en la transición epitelio mesénquima inhibe con mayor efectividad que la morina la EMT inducida por TGF β a concentraciones de 50 a 100 μ M.

Otros reportes señalan que la efectividad de la nobiletina oscila en el rango de 0.01 a 200 μ M. Sus efectos los desarrolla mediante la regulación de vías MAPK y MEK, PI3K/AKT, NF κ B y ERK/JNK, resultados similares a los hallazgos reportados en nuestro laboratorio. En nuestra investigación encontramos que regula el patrón de expresión de cadherina. Sin embargo, más investigaciones deberán realizarse a fin de caracterizar el blanco molecular específico.

Por otra parte, la morina presenta una menor hidrofilicidad y muestra un amplio espectro en actividades anti-oxidantes, anti-inflamatorias, anti-artríticas, gastroprotectoras, neuroprotectoras, hepatoprotectoras, anti-diabetes y anti-cancerígenas. En sus efectos de inhibir las acciones contra el cáncer se encuentra la inducción de apoptosis promoviendo la sobre-expresión de Bcl2 y la degradación de citocromo C. De igual manera, reprime uPAR y disminuye la expresión de marcadores de transición como N-cadherina y de MMP-9.

9. Perspectivas futuras.

Como se muestra en el esquema que se presenta a continuación, se deberá revisar caracterizar un mayor número de marcadores molecular a fin de identificar el blanco molecular en la regulación de estos flavonoides en la transición epitelio-mesénquima.

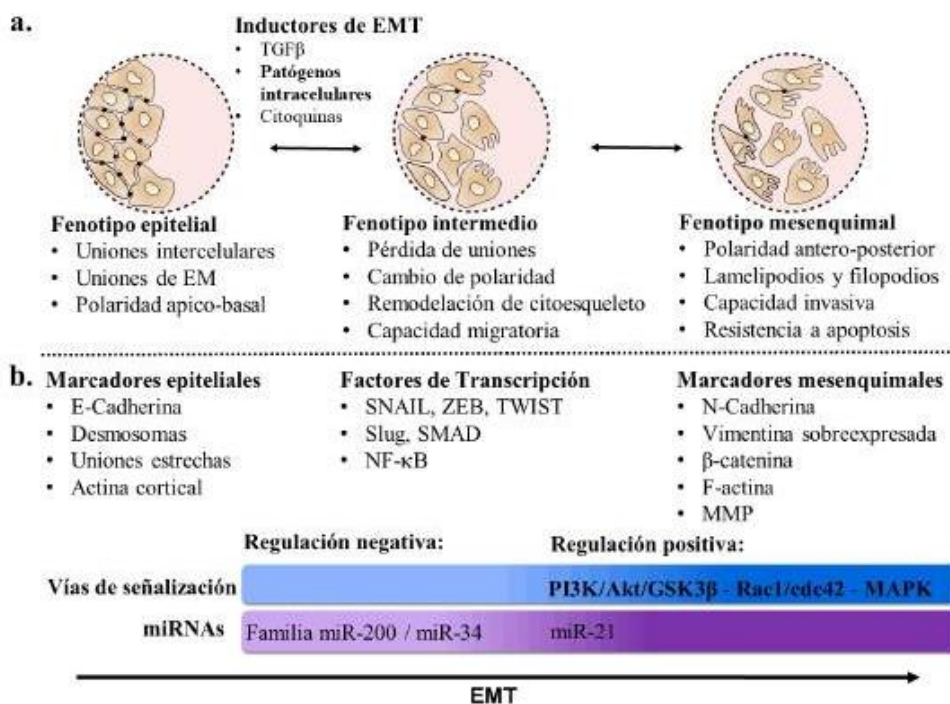


Figura 19 Tomado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2021000100105

En dicho esquema se observan los principales marcadores de interés para seguir desarrollando más investigaciones. Dado que el uso de los flavonoides fue óptimo sobre marcadores epiteliales y mesenquimales, además de varias vías de señalización, se aprecia la ruta a seguir. Es menester que futuras investigaciones ahonden en el mecanismo específico sobre los puntos clave donde los compuestos polifenólicos actúan sobre las biomoléculas participantes de dichas vías y procesos patológicos.

10. Conclusiones

Los flavonoides han demostrado, a través de diversos y amplios estudios, ser una buena elección como tratamiento alternativo o coadyuvante a diversos padecimientos, particularmente inflamatorios o relacionados a la oxidación celular, ya sea como tratamiento de primera elección o como agregado a otros fármacos, teniendo como enfoque al cáncer en el presente trabajo.

Se concluye que, *in vitro*, ambos flavonoides (nobiletina y morina) tienen un notorio efecto anticancerígeno al inhibir las rutas de señalización que interfieren en dicho proceso, además de incentivar mecanismos de regulación celular, como es el caso de la activación del Citocromo C para la morina.

Se encontró mayor efectividad de la nobiletina, dicha efectividad está ligada a su alta hidrofiliidad, lo que le confiere la capacidad de traspasar las membranas celulares fácilmente y llegar a sus dianas, a diferencia de la morina que, si bien es efectiva, su desventaja en relación a la morina recae principalmente a que es más hidrófoba.

Si bien aún falta más investigación, particularmente *in vivo*, en donde los resultados aún no son óptimos para diversos compuestos polifenólicos, la actual información, sumado a los propios resultados obtenidos *in vitro*, da pie a que se les contemple como una buena opción por sus ya comprobadas propiedades inhibitorias de los diversos procesos del cáncer, además de los diversos tipos del mismo.

11. Referencias

1. Kapoor C, Vaidya S, Wadhwan V; Hitesh; Kaur G, Pathak A. Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *J Cancer Res Ther.* 2016 Jan-Mar;12(1):28-35. doi: 10.4103/0973-1482.157337. PMID: 27072206.
2. de la Peña S, Sampieri CL, León-Córdoba K. Metaloproteasas de la matriz extracelular como marcadores moleculares en cáncer gástrico [Matrix metalloproteinases as molecular markers in gastric cancer]. *Med Clin (Barc).* 2010 Feb 6;134(3):123-6. Spanish. doi: 10.1016/j.medcli.2009.09.031. Epub 2009 Nov 27. PMID: 19944435.
3. Niland S, Riscanevo AX, Eble JA. Matrix Metalloproteinases Shape the Tumor Microenvironment in Cancer Progression. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 23;23(1):146. doi: 10.3390/ijms23010146. PMID: 35008569; PMCID: PMC8745566.
4. Fontanil T, Mohamedi Y, Cobo T, Cal S, Obaya ÁJ. Novel Associations Within the Tumor Microenvironment: Fibulins Meet ADAMTSs. *Front Oncol.* 2019 Aug 22; 9:796. doi: 10.3389/fonc.2019.00796. PMID: 31508361; PMCID: PMC6714394.
5. Noguera R, Burgos-Panadero R, Gamero-Sandemetro E, de la Cruz-Merino L, Álvaro Naranjo T. Una visión integral del cáncer (I). Microambiente tumoral: estudio, clasificación y reprogramación [An integral view of cancer (I). The study, classification and reprogramming of the tumoral microclimate]. *Rev Esp Patol.* 2019 Apr-Jun;52(2):92-102. Spanish. doi: 10.1016/j.patol.2018.11.003. Epub 2019 Feb 10. PMID: 30902384.
6. Benedetti, I, Reyes, N. Transición epitelial-mesenquimal en la progresión del adenocarcinoma prostático. 2015. *Iatreia*, 28(4), Pp.420-433. <https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.v28n4a07>
7. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010 Apr 2;141(1):52-67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015. PMID: 20371345; PMCID: PMC2862057.
8. Chen HT, Liu H, Mao MJ, Tan Y, Mo XQ, Meng XJ, Cao MT, Zhong CY, Liu Y, Shan H, Jiang GM. Crosstalk between autophagy and epithelial-mesenchymal transition and its application in cancer therapy. *Mol Cancer.* 2019 May 24;18(1):101. doi: 10.1186/s12943-019-1030-2. PMID: 31126310; PMCID: PMC6533683.
9. Mak MP, Tong P, Diao L, Cardnell RJ, Gibbons DL, William WN, Skoulidis F, Parra ER, Rodriguez-Canales J, Wistuba II, Heymach JV, Weinstein JN, Coombes KR, Wang J, Byers LA. A Patient-Derived, Pan-Cancer EMT Signature Identifies Global Molecular Alterations and Immune Target Enrichment Following Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Clin Cancer Res.* 2016 Feb 1;22(3):609-20. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0876. Epub 2015 Sep 29. PMID: 26420858; PMCID: PMC4737991.

10. Gundamaraju R, Lu W, Paul MK, Jha NK, Gupta PK, Ojha S, Chattopadhyay I, Rao PV, Ghavami S. Autophagy and EMT in cancer and metastasis: Who controls whom? *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2022 Sep 1;1868(9):166431. doi: 10.1016/j.bbadis.2022.166431. Epub 2022 May 6. PMID: 35533903.
11. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016 May 2;8(5): a021873. doi: 10.1101/cshperspect. a021873. PMID: 27141051; PMCID: PMC4852809.
12. Peng D, Fu M, Wang M, Wei Y, Wei X. Targeting TGF- β signal transduction for fibrosis and cancer therapy. *Mol Cancer.* 2022 Apr 23;21(1):104. doi: 10.1186/s12943-022-01569-x. PMID: 35461253; PMCID: PMC9033932.
13. Syed V. TGF- β Signaling in Cancer. *J Cell Biochem.* 2016 Jun;117(6):1279-87. doi: 10.1002/jcb.25496. Epub 2016 Feb 11. PMID: 26774024.
14. Ansell P, Johnston T, Simpson J, Crouch S, Roman E, Picton S. BrainTumor Signs and Symptoms: Analysis of Primary Health Care Records from the UKCCS. *Pediatrics.* 2010; 125: 112–119, <https://doi:10.1542/peds.2009-0254>.
15. Kim CH, et al. Exposure to secondhand tobacco smoke and lung cancer by histological type: a pooled analysis of the International Lung Cancer Consortium (ILCCO). *Int J Cancer.* 2014; 135(8): 1918–30. <https://doi:10.1002/ijc.28835>.
16. Sifri R, Gangadharappa S, Acheson LS. Identifying and testing for hereditary susceptibility to common cancers. *CA Cancer J Clin.* 2004; 54(6): 309–26. 4. Weiderpass E. Lifestyle and cancer risk. *J Prev Med Public Health.* 2010 Nov; 43(6): 459–71. doi: 10.3961/jpmph.2010.43.6.459.
17. Andersson TM, Engholm G, Brink AL, Pukkala E, Stenbeck M, Tryggvadottir L, Weiderpass E, Storm H. Tackling the tobacco epidemic in the Nordic countries and lower cancer incidence by 1/5 in a 30-year period-The effect of envisaged scenarios changing smoking prevalence. *Eur J Cancer.* 2018; 29(18): 30239–9. <https://doi: 10.1016/j.ejca.2018.02.031>.
18. Huang T, Yang B, Zheng J, Wahlqvist ML, Li D. Cardiovascular disease mortality and cancer incidence in vegetarians: a meta-analysis and systematic review. *Ann Nutr Metab.* 2012; 60(4): 233–240, <https://doi.org/10.1159/000337301>.
- 19 Crowe FL, Appleby PN, Travis RC, Key TJ. Risk of hospitalization or death from ischemic heart disease among British vegetarians and nonvegetarians: results from the EPIC-Oxford cohort study. *Am J Clin Nutr.* 2013; 97(3): 597–603, <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.044073>.
20. Schulz M, Hoffmann K, Weikert C, Nöthlings U, Schulze MB, Boeing H. Identification of a dietary pattern characterized by high-fat food choices associated with increased risk of breast cancer: The European Prospective

- Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Br J Nutr.* 2008; 100(5): 942–946, <https://doi.org/10.1017/S0007114508966149>.
21. Szyfter K, Jarmuż M. Determination of genetic risk of cancer using the bleomycin test. *Contemporary Oncology.* 1999; 3(5): 188–190.
22. Chen YC, Hunter DJ. Molecular Epidemiology of Cancer. *Onkologia po Dyplomie.* 2005; 2(2): 36–45.
- 23.. Arico M, et al. Clinical outcome of children with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated between 1995 and 2005. *J Clin Oncol.* 2010; 28(31): 4755–61, <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.1325>.
24. Burger M, et al. Epidemiology and Risk Factors of Urothelial Bladder Cancer. *European Urology.* 2013; 63(2): 234–241, <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.07.033>.
25. Bonfa R, Bonfa R, Furian R, Bonamigo R, Duro K, Zelmanowicz A. Early diagnosis of cutaneous melanoma: an observation in southern Brazil. *An Bras Dermatol.* 2011; 86(2): 215–221.
26. Peplowska B, Szeszenia-Dąbrowska N. Occupational Risk Factors for Breast Cancer in the Epidemiological Studies. *Med Pr.* 2001; 52(6): 483–495.
27. Szmigielski S. Risk of neoplastic diseases in conditions of exposure to power magnetic fields – epidemiological investigations. *Med Pr.* 2009; 60(3): 223–233.
28. Oeffinger KC, Hudson MM. Long-term complications following childhood and adolescent cancer: foundations for providing risk-based health care for survivors. *Onkologia po Dyplomie.* 2004; 1(5): 25–48.
29. Oeffinger KC, Hudson MM. Long-term complications following childhood and adolescent cancer: foundations for providing risk-based health care for survivors. *Onkologia po Dyplomie.* 2004; 1(5): 25–48. Postrzech K, Welz K, Kopyra J, Reich A. Impact of Ultraviolet B
30. Leon ME, Peruga A, McNeill A, Kralikova E, Guha N, Minozzi S, Espina C, Schüz J. European Code against Cancer, 4th Edition: Tobacco and cancer. *Cancer Epidemiol.* 2015; 39(1): 20–33. <https://doi: 10.1016/j.canep.2015.06.001>.
31. Carroll Chapman SL, Wu LT. E-cigarette prevalence and correlates of use among adolescents versus adults: a review and comparison. *J Psychiatr Res.* 2014; 54: 43–54. <https://doi: 10.1016/j.jpsychires.2014.03.005>
32. World Health Organization International Agency for Research on Cancer, Smokeless tobacco and some tobacco-specific N-nitrosamines. *IARC Monogr Eval Carcinog. Risks Hum.* 2007; 89: 1–592.
33. Diethelm PA, Farley TM. Refuting tobacco-industry funded research: empirical data shows decline in smoking prevalence following introduction of plain packaging in Australia. *Tob Prev Cessation* 2015; 1(6): 2459–3087. <https://doi.org/10.18332/tpc/60650>.

34. Becher H, Belau M, Winkler V, Aigner A. Estimating lung cancer mortality attributable to second hand smoke exposure in Germany. *Int J Public Health*. 2018 Apr; 63(3): 367–375. [https://doi: 10.1007/s00038-017-1022-1](https://doi.org/10.1007/s00038-017-1022-1).
35. 1920, <https://doi.org/10.1002/ijc.29218.40>. Chang JS, Straif K, Guha N. The role of alcohol dehydrogenase genes in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis of ADH1B and ADH1C. *Mutagenesis* 2012; 27(3): 275–86. <https://doi:10.1093/mutage/ger073>.
36. Franceschi S, Bidoli E, Herrero R, Muñoz N. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues. *Oral Oncol*. 2000 Jan; 36(1): 106–15.
37. Fung TT, Hu FB, Hankinson SE, Willett WC, Holmes MD. Lowcarbohydrate diets, dietary approaches to stop hypertension-style diets, and the risk of postmenopausal breast cancer. *Am J Epidemiol*. 2011; 174(6): 652–660, <https://doi.org/10.1093/aje/kwr148>.
37. O'Mahony M, Hegarty J. Help seeking for cancer symptoms: a review of the literature. *Oncol Nurs Forum*. 2009; 36(4): 178–84, <https://doi.org/10.1188/09.ONF.E178-E184>.
38. Lajous M, Lazcano-Ponce E, Hernandez-Avila M, Willett W, Romieu I. Folate, vitamin B (6), and vitamin B(12) intake and the risk of breast cancer among Mexican women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006; 15(3): 443–8, <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0532>.
39. Gil J, Stembalska A, Łaczmajska I, Sądziak M. Sporadic colorectal cancer – factors modulating individual susceptibility to cancer. *Contemporary Oncol*. 2010; 14(3): 211–216.
40. Przybylska D, Kurowska M, Przybylski P. Obesity and overweight in the adolescent population. *Hygeia Public Health*. 2012; 47(1): 28–35.
41. Peterson E, Prithwish D, Nuttall R. BMI, diet and female reproductive factors as risks for thyroid cancer: a systematic review. *PLoS One*. 2012; 7(1), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029177>.
- 42.- Peterson E, Prithwish D, Nuttall R. BMI, diet and female reproductive factors as risks for thyroid cancer: a systematic review. *PLoS One*. 2012; 7(1), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029177>.
43. Pierce ES. Could *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease, ulcerative colitis and colorectal cancer? *Infect Agent Cancer*. 2018 Jan 4; 13: 1 <https://doi.org/10.1186/s13027-017-0172-3>.
44. Delbue S, Comar M, Ferrante P. Review on the role of the human Polyomavirus JC in the development of tumors. *Infect Agent Cancer*. 2017; 3(12): 10–20. doi: 10.1186/s13027-017-0122-0.

45. Maginnis MS, Atwood WJ. JC virus: an oncogenic virus in animals and humans? *Semin Cancer Biol.* 2009 Aug; 19(4): 261–9. doi: 10.1016/j.semcancer.2009.02.013
46. Bram De Craene, Geert Berx. 2013. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Reviews Cancer.* Volume 13, pages 97–110.
47. Kawamoto Y, Nakajima YI, Kuranaga E. Apoptosis in Cellular Society: Communication between Apoptotic Cells and Their Neighbors. *Int J Mol Sci.* 2016 Dec 20;17(12):2144. doi: 10.3390/ijms17122144. PMID: 27999411; PMCID: PMC5187944.
48. Troncoso D, Madarriaga I, Aldana S, Herreño A, Chaparro V, Molina M, Rey L, Ramírez A, Montoya C, Valderrama A, Cañas A, Rojas A. Transición epitelio mesénquima: de lo molecular a lo fisiológico. *Univ Med.* 2017;58(4): xx-xx. doi: <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed58-4.temm>
49. Gutiérrez, R. M. P., Mitchell, S., & Solis, R. V. (2008). Psidium guajava: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 117(1), 1–27
50. Yao G, Qi J, Li X, Tang X, Li W, Chen W, Xia N, Wang S, Sun L. Mesenchymal stem cell transplantation alleviated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus through reducing MDSCs. *Stem Cell Res Ther.* 2022 Jul 18;13(1):328. doi: 10.1186/s13287-022-03002-y. PMID: 35850768; PMCID: PMC9290280.
51. Jong Wook Lee, Flore Sicre de Fontbrune, Lily Wong Lee, Viviani Pessoa, Sandra Gualandro, Wolfgang Füreder, Vadim Ptushkin, Scott T. Rottinghaus, Lori Volles, Lori Shafner, Rasha Aguzzi, Rajendra Pradhan, Hubert Schrezenmeier, Anita Hill; Ravulizumab (ALXN1210) vs eculizumab in adult patients with PNH naive to complement inhibitors: the 301 study. *Blood* 2019; 133 (6): 530–539. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-876136>
52. Amin, M.U., Khurram, M., Khattak, B. *et al.* Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Complement Altern Med* 15, 59 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0580-0>
53. Yun-Yi Chena, Jiao-Jiao Lianga, Deng-Liang wangb, Jie-Biao Chena, Jin-Ping Caoa, Yue wanga and Chong-De Sun, 2022. Nobiletin as a chemopreventive natural product against cancer, a comprehensive review. Taylor & Francis online. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2030297>
54. Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Saberifar S, Hashemi F, Hushmandi K, Hashemi F, Moghadam ER, Mohammadinejad R, Najafi M, Garg M. “Nobiletin in Cancer Therapy: How This Plant Derived-Natural Compound Targets Various Oncogene and Onco-Suppressor Pathways”. *Biomedicines.* 2020; 8(5):110. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8050110>

55. Hao Huang, Lifu Li, Weimei Shi, Hai Liu, Jianqiong Yang, Xiaoliang Yuan, Longhuo Wu, "The Multifunctional Effects of Nobiletin and Its Metabolites In Vivo and In Vitro", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2016, Article ID 2918796, 14 pages, 2016.

<https://doi.org/10.1155/2016/2918796>

56. Castro Rodríguez Y, Garánados-Pomariano S. Tratamiento de la melanosia gingival y evaluación de la repigmentación melánica. Reevaluación clínica al cabo de 2 años. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*. Vol. 18, núm. 2. Elsevier, pp 143-143. 2015.

DOI: 10.1016/j.piro.2015.06.001