



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

CARRERA DE BIÓLOGO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR
Y CÁNCER

LABORATORIO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR
Y MOLECULAR DEL CÁNCER

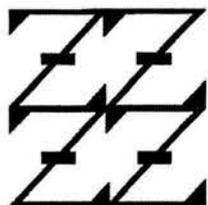
“Determinación de la actividad antitumoral del compuesto 5,7-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona y la de su derivado 5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina, sobre la proliferación de células provenientes de cáncer cérvico-uterino HPV-18: CaLo, HeLa e InBl”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :

JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO
EJE
DE NUESTRA REFLEXIÓN

DIRECTOR DE TESIS
M. EN C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

MÉXICO, D.F.

2004



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.

*No se estudia con el propósito de acumular
conocimientos sin contenido humano. La causa como
estudiante es la del conocimiento crítico
que impugna, contradice, controvierte, refuta, transforma y
revolucionaria la realidad social, política, cultural y científica.*
CNH-FC

*Vivid en la serenidad de los laboratorios y bibliotecas,
y preguntaos: ¿Qué he hecho por instruirme?
Y después al ir progresando ¿Qué he hecho por mi patria?
Hasta que llegue el día en que podrás sentir la íntima
satisfacción en que de alguna manera habéis contribuido al
progreso y bienestar de la humanidad.*

L. Pasteur

A mi madre
Por su ejemplo y enseñanza que me han impulsado
con rectitud y respeto.
A su coraje y valor que me han hecho hombre.
Al apoyo brindado en los momentos más difíciles de mi lucha.
gracias

A Jimmy, Israel, Viridiana y Samuel

A Norma

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
CaCu	Cáncer cérvico-uterino
CAM	5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina
CDK	Del inglés Cinasas dependiente de ciclinas
CKI	Del inglés Inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas
E2F	Factor de transcripción que activa genes para la progresión del ciclo celular
GL	Glabranina: 5,7-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona
NIC	Neoplasia Intraepitelial cervical
p53	Proteína de 53 Kda reguladora del ciclo celular y de la inducción de muerte por apoptosis
p73	Proteína de 73 Kda homóloga a p53 regula el ciclo celular
RB	Proteína del retino blastoma
RPMI-1640	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
VPH	Virus del papiloma humano

ÍNDICE

TEMA	PÁGINA
Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico	3
La célula	3
Proliferación celular	4
Ciclo celular	5
Muerte celular	8
Apoptosis	8
Necrosis	9
Cáncer	12
Cáncer cérvico-uterino	14
Flavonoides	18
Planteamiento del problema	22
Justificación	23
Hipótesis	24
Objetivo general	25
Objetivos específicos	25
Método	26
Resultados	29
Discusión	44
Conclusiones	46
Referencias	47
Apéndice	53

RESUMEN

El cáncer cervical es un problema de salud pública importante ya que es el segundo cáncer más común en mujeres en el mundo, solo después del cáncer de mama y es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas. Dentro de las estrategias de prevención y tratamiento del cáncer se ha contemplado la valoración de compuestos de origen vegetal y el caso del carcinoma de cérvix no es la excepción. En el presente trabajo se realiza una evaluación de la actividad antitumoral de la flavanona 5,7-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (GL) y de su derivado 5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina (CAM), sobre cultivos *in vitro* de las líneas celulares provenientes de cáncer cérvico-uterino positivas al virus del papiloma humano tipo 18. La valoración de la actividad biológica de estos compuestos contempló el efecto sobre el potencial proliferativo de las células tumorales, encontrándose una IC₅₀ de 26 µg/ml (P<0.1) de GL para las células CaLo y HeLa y de 30 µg/ml de GL para las células InBl (P<0.1), para CAM se obtuvo una IC₅₀ de 30 µg/ml (P<0.1) en las tres líneas celulares CaLo, HeLa e InBl. La disminución del potencial proliferativo no se debe a una detención del ciclo celular como lo indica la evaluación de la distribución de ADN realizada por citometría de flujo para las células CaLo y HeLa, sin embargo induce una detención en la fase G₂/M en las células InBl. Se propone como mecanismo de disminución del potencial proliferativo una inducción de muerte celular por necrosis de acuerdo a los datos obtenidos de viabilidad celular, prueba realizada por exclusión molecular del colorante azul tripano, donde se revela un 47 % de muerte celular para las células CaLo (P<0.1), 43 % de muerte para las células HeLa (P<0.1) y un 49 % de muerte para las células InBl (P<0.1). Sin embargo, se observó un pequeño porcentaje de cuerpos apoptóticos evaluado por tinción con yoduro de propidio indicando una posible muerte por apoptosis.

INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvico-uterino es el carcinoma de mayor incidencia en México y es la primera causa de muerte por cáncer de mujeres mexicanas. Los factores de riesgo involucran el inicio a edad temprana de relaciones sexuales, la promiscuidad, haber tenido varias parejas sexuales y el haber padecido enfermedades de transmisión sexual. Además los hábitos de higiene deficientes, consumo de tabaco, alcohol o anticonceptivos son las principales causas en la adquisición, manifestación y progresión de éste cáncer (Lira, 2001). El carcinoma de cérvix, en un 99%, es originado por la infección del Virus de Papiloma Humano (VPH) y en particular los tipo 16 y 18 acumulan el 70% de los casos de este cáncer, el resto de los casos presentan VPH 31 y 45 (Muños & Bosch, 1997) y solo un mínimo porcentaje (1%) del cáncer cérvico-uterino es negativo a VPH. El estudio de la biología del cáncer cérvico-uterino ha arrojado el conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales se desarrolla y manifiesta, sin embargo, pese a los esfuerzos encaminados a combatir este cáncer, no se tiene un proceso adecuado para disminuir su incidencia en la población mexicana.

Dentro de las estrategias para combatir al cáncer en general, se tiene que en los últimos años la investigación básica ha explorado el papel de compuestos de origen vegetal para su uso como agentes terapéuticos o como preventivos en el desarrollo de esta enfermedad, entre tales elementos se tiene a los flavonoides. Existen antecedentes de la actividad antitumoral de los flavonoides sobre líneas celulares de cáncer de mama, próstata, pulmón así como de cérvix. Actualmente se han descrito más de 6 000 flavonoides y aunque se tiene registros bien detallados de la actividad antitumoral de flavonoides como apigenina, (-)-epigallocatequina galate, genisteina, vitexicarpina y quercetina (Brownson *et al*, 2002) se tienen pocos datos sobre la actividad de estos compuestos sobre líneas provenientes de carcinoma de cérvix. El estudio de la actividad de estos compuestos de origen vegetal sobre carcinoma de cérvix contempla evaluaciones de líneas celulares normales, inmortalizadas, transformadas y carcinogénicas (Gupta *et al*, 2001).

MARCO TEÓRICO

LA CÉLULA

La célula es la unidad estructural de la vida, es el elemento básico con la cual todos los organismos están compuestos y en donde se reconocen todas las funciones de los organismos vivos. Ésta se auto-reproduce y experimenta procesos de desarrollo, diferenciación y muerte. En organismos pluricelulares las células guardan una estrecha interrelación entre si, organizándose en una estructura jerarquizada y colaborando para mantener un estado de homeostasis en donde las condiciones de un ambiente relativamente constante son sostenidas para la sobrevivencia (Anthony & Thibodeau, 1991). Sin embargo cada uno de los diferentes linajes de células que conforman al organismo tienen un micro ambiente particular en el cual se reúnen las condiciones necesarias para el establecimiento de una densidad celular requerida para conservar la estructura de un tejido o de un órgano (Alberts *et al*, 1994).

El mantenimiento de la estructura que constituye a un organismo pluricelular requiere de señales celulares que permitan a un tejido u órgano crecer o detener su crecimiento. Estas señales guardan un equilibrio entre proliferación, diferenciación y muerte celular, procesos que están enmarcados dentro de lo que se denomina ciclo celular (Callen, 2000).

PROLIFERACIÓN CELULAR

La proliferación, propiedad constitutiva dominante de las células, se regula mediante señales químicas que la activan o inhiben. Las células tienen ritmos de proliferación variables, lo cual depende del tejido del que forman parte. Además de las células especializadas que no se dividen después de su diferenciación se tienen a otras que se dividen de manera regular y a ritmo acelerado, entre estos dos extremos se observan células que se dividen muy lentamente o que no se dividen pero que pueden ser estimuladas por factores de crecimiento secretados por células vecinas o localizadas en tejidos u órganos distantes y que actúan de manera autocrina, paracrina o endocrina.

La proliferación celular está gobernada por la influencia de factores activadores e inhibidores. Ambos factores interaccionan con receptores localizados en la superficie celular para influir sobre el metabolismo y la decisión final de las células para dividirse o no (Johnson, 1994). En ambos casos se tiene la activación de genes reguladores normales, estos se clasifican en aquellos cuyos productos ayudan a estimular la proliferación celular y aquellos cuyos productos ayudan a inhibirla, estableciéndose una estrecha relación en el proceso de activación celular y los puntos de control del ciclo celular (Sonnenschein & Soto, 1999).

CICLO CELULAR

Los procedimientos por los cuales una célula eucariota se divide están agrupados en el ciclo celular el cual consiste de fases bien distinguibles: G_1 , S, G_2 y M. Éste es un proceso altamente ordenado que termina con la duplicación y transmisión de la información genética de una generación celular a otra. La fase G_1 es el periodo que sigue a la mitosis y la separa de la fase S, en ella se desencadena el compromiso de división por lo que especialmente al principio de esta fase se presenta una activa síntesis de ARN y proteínas, además de otros componentes celulares por lo que la célula aumenta de tamaño. La fase S es un periodo que transcurre con la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN), está culmina con la duplicación del ADN, formándose una copia exacta. La replicación del ADN no modifica el aspecto del núcleo celular. La fase G_2 es el periodo que sigue a la fase S y la separa de la mitosis, en este estadio tiene lugar un crecimiento ulterior, pero además actúa como un periodo de seguridad durante el cual la célula controla y verifica que todo el ADN se haya duplicado en forma correcta antes de comenzar la mitosis. M es la fase que sigue a G_2 y designa a la mitosis, esta es la fase donde se presenta la división del material genético y la división celular siguiendo una serie de pasos progresivos: profase, metafase, anafase y telofase. Como producto de esta división se obtendrán dos células hijas con idéntico contenido genético. G_0 se refiere a las células que se encuentran temporal o permanentemente fuera del ciclo (figura 1).

Durante el ciclo celular se deben completar los eventos de cada fase antes de pasar a la siguiente, por lo que existen puntos de control que monitorean la integridad del ADN y se encuentran en puntos estratégicos del ciclo celular, como son en la fase tardía de G_1 y en la interfase G_2/M , para prevenir la propagación de células dañadas o mutadas (Mathews and van Holde, 1998). Se deben respetar los puntos de verificación donde se reparen las anormalidades que pudiesen presentarse, esto para que se guarde la integridad genómica, así como para una duplicación celular adecuada que respete la disponibilidad de espacio, así como el tiempo de duplicación

característico, y que contribuya al mantenimiento de la especialización estructural y funcional del tejido correspondiente (Garrod, 1976).

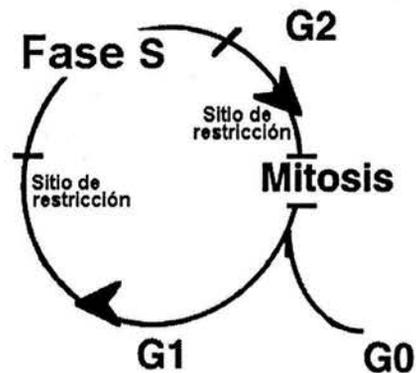


Figura 1. Fases del ciclo celular

Las células normales dependen de estímulos externos, tales como factores de crecimiento, para salir de G_0 hacia G_1 respondiendo con una cascada de fosforilaciones intracelulares en donde las ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs por sus siglas en inglés) adquieren una papel fundamental desencadenando señales positivas o negativas que regulan la progresión del ciclo celular. Los complejos CDK-ciclina permiten la transición del ciclo y los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKI por sus siglas en inglés) y las proteínas RB —regulador negativo de factores de transcripción—, p53 —induce detención de ciclo celular por daño en ADN y activa genes promotores de apoptosis— y p73 —proteína homóloga de p53— frenan el desarrollo del ciclo celular (López-Marure *et al*, 2000; John-Sup *et al*, 2001). Los complejos ciclina/CDK fosforilan sustratos proteicos específicos, moviendo a la célula a través del ciclo celular con una activación de síntesis de ADN y formación de componentes estructurales específicos asociados a la mitosis (Zentella *et al*, 1993; López-Marure *et al*, 2000). El ciclo avanza por G_1 con un incremento de la expresión de las ciclinas D que se asocian con CDK4 y CDK6, resultando en su fosforilación y activación, estos ya activados fosforilan la proteína RB (retinoblastoma) que tiene una papel crítico en la regulación de la progresión del punto de restricción de G_1 . Los miembros de la familia RB pueden capturar a E2F

evitando su actividad transcripcional. Cuando CDK4/6 fosforila a RB, ésta se disocia de E2F y el ciclo continúa. Cuando la célula avanza por G₁ tardía hay también un aumento de la expresión de la ciclina E que se asocia con CDK2 para la transición de G₁ a S, en esta transición, aumenta la expresión de ciclina A y persiste durante la fase S. La ciclina A es capturada por CDK2 y procede a la síntesis del ADN (Figura 2).

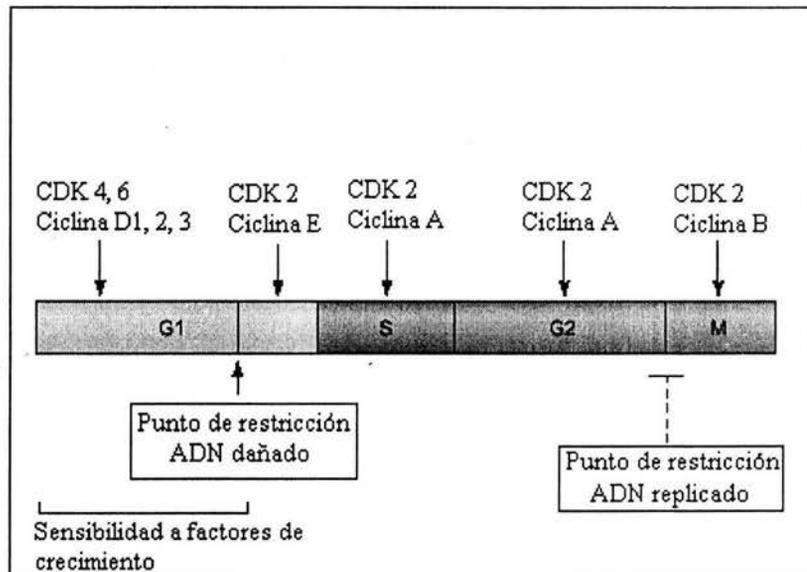


Figura 2. Presencia de ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas durante el ciclo celular (McLaughlin *et al*, 2003).

MUERTE CELULAR

La muerte celular es un fenómeno conceptualmente independiente del control de la proliferación celular que contribuye al mantenimiento de la homeostasis. Basados en diferencias distintivas de la morfología, cambios químicos y moleculares de las células muertas, se han descrito dos tipos de muerte celular, apoptosis y necrosis.

Apoptosis

La apoptosis es un tipo particular de muerte celular, la cual puede ser distinguida por un patrón característico de cambios morfológicos y moleculares. Debido a una deshidratación rápida, las células originalmente redondeadas llegan a presentar una forma elongada o convolucionada y disminuyen su tamaño. La condensación y pérdida de la estructura distintiva de la cromatina se presentan al mismo tiempo de la contracción celular, inicia en la periferia del núcleo y es seguida por la fragmentación nuclear. Los fragmentos nucleares junto con los constituyentes del citoplasma, incluyendo organelos intactos son empacados en los llamados cuerpos apoptóticos, los cuales, envueltos en la membrana plasmática, se separan de la célula muerta (Figura 3). En vivo estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por las células vecinas sin provocar una respuesta inmune.



Figura 3. Las características morfológicas distintivas de la apoptosis son la condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos (Tomado y modificado de Bianchi & Manfredi, 2004).

El incremento en la concentración de calcio citoplasmático y la activación de las proteasas, así como endonucleasas, las cuales degradan el ADN en las secciones internucleosomales, son también eventos característicos de la apoptosis. También es típica la activación de algunos genes que se sugiere, sus productos son requeridos para que la apoptosis se presente. Cuando los estados de la apoptosis avanzan, la integridad estructural y funcional de la membrana celular, la mitocondria y lisosomas es preservada. Considerando todos los cambios que ocurren en la célula que experimentan apoptosis la característica más común de éste proceso es la participación activa de la célula en su muerte. La célula activa una cascada de eventos moleculares que resultan en una degradación ordenada de los constituyentes celulares con un impacto mínimo en las células vecinas (Studzinski, 1995).

Necrosis

La necrosis es definida frecuentemente como un fenómeno pasivo y degenerativo que es una consecuencia de un trauma ambiental. El evento primario en la necrosis es un hinchamiento de la mitocondria seguida de la ruptura de la membrana plasmática y liberación del contenido citoplasmático. Involucra cambios en la membrana plasmática conduciendo a una pérdida en el balance de los iones Ca^{++} y Na^+ , que presentan un influjo al tiempo que se presenta una pérdida de K^+ , seguido por una acidosis, un trauma osmótico, condensación de cromatina y los patrones característicos de picnosis nuclear. El cambio inicial resulta en la dilatación del retículo endoplasmático y un incremento del volumen celular. Las células alteran su forma y pueden formar un abultamiento en la superficie probablemente como un resultado de cambios en la concentración de Ca^{++} afectando los componentes del citoesqueleto. En éste estado la mitocondria pierde la matriz granulosa llegando a presentar una apariencia densa y la membrana interna se contrae alejándose de la membrana externa. Hay un agrupamiento de la cromatina nuclear característica de picnosis y un declive de la síntesis de proteínas. Esta fase reversible de hinchamiento

hídrico es seguida por un rápido cambio irreversible que involucra un hinchamiento de alta amplitud de la mitocondria. Tanto los compartimentos interno como externo de la mitocondria llegan a estar muy distendidos y aparecen deposiciones de lipoproteínas de la matriz. La activación de fosfolipasas unidas a membrana por el calcio es probablemente la principal causa de perturbación celular durante la fase final de muerte celular necrótica (Studzinski, 1995) debido a una pérdida precipitada de fosforilación oxidativa y un descenso en la producción de ATP con la consecuente pérdida de la capacidad sintética y homeostática. Una sobrecarga de calcio conduce a la disfunción de la membrana mitocondrial guiando finalmente a un estado de daño irreversible. La Autolisis secundaria sigue involucrando hinchamiento de los lisosomas, dilatación y vesiculación del retículo endoplasmático, una pérdida de enzimas y proteínas y una pérdida resultante de compartimentalización celular (Bowen & Bowen, 1990).

La necrosis se presenta generalmente en repuesta a un daño severo y es inducida frecuentemente por una sobredosis de agentes citotóxicos o por agentes dañinos como hipoxia, hipertermia, hipotermia, infecciones virales líticas y venenos, observándose que ciertos tipos celulares responden a concentraciones farmacológicas de algunos medicamentos. Tal estímulo letal incrementa generalmente la permeabilidad de la membrana plasmática con cambios estructurales que afectan los poros y canales de la membrana o por inhibición de las bombas de iones de la membrana (Figura 4). Mientras que una participación activa de la célula afectada involucra la síntesis de proteínas de *novo*, característica esencial, en la apoptosis, la necrosis es un fenómeno degenerativo, cuya consecuencia final es la liberación del contenido citoplasmático hacia el exterior, con la consecuente respuesta inflamatoria (Bowen & Bowen, 1990).

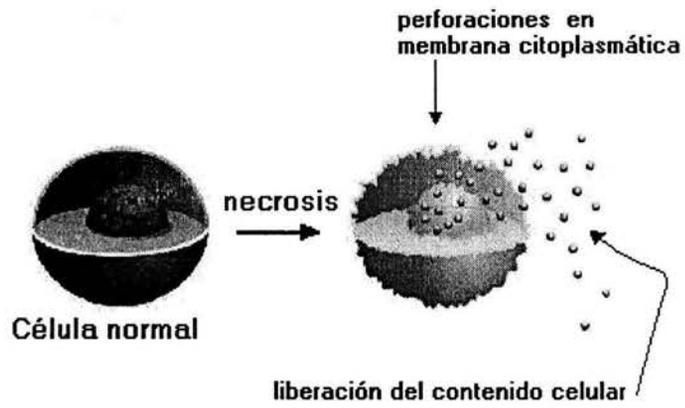


Figura 4. Las características distintivas de la necrosis celular son perforaciones en la membrana celular con la consecuente liberación del contenido plasmático celular al medio extracelular (Bianchi & Manfredi, 2004).

CÁNCER

Cuando la estructura y función de un tejido u órgano son modificadas los cambios se pueden deber a alteraciones a nivel celular. Tales cambios en la célula son provocados por la acumulación de alteraciones genéticas inducidas por agentes físicos, químicos, biológicos o virales (Yocota, 2000), tales como radiación ultravioleta, emisiones radiactivas e infección recurrente con organismos patógenos, así como la exposición a compuestos químicos carcinogénicos (Weinberg, 1996). El desarrollo de una célula con crecimiento y características anormales puede generar un tumor, el cual derivará a partir de una célula que presenta alteraciones que han sido seleccionadas y transmitidas y que provocan un descontrol en el ritmo de la división celular, así como una mejor adaptación a condiciones de bajas concentraciones en nutrientes y cambios en las características morfológicas debidas a una perturbación de los procesos de diferenciación, alterando con ello, la homeostasis del organismo (Alberts *et al*, 1994).

El desarrollo de los diferentes tipos de tumores depende del tipo de tejido en el que progresan estos sitios de crecimiento anormales, y éstos pueden ser benignos o malignos. Los tumores malignos derivan en cáncer y estos se clasifican en sarcomas para el tejido conjuntivo y el muscular, leucemias en el tejido hematopoyético y linfoide, así como carcinomas en el tejido epitelial (Pardo, 1998). El desarrollo de cáncer deriva de una célula que presenta alteraciones que han sido seleccionadas y que son transmitidas generando células con características fenotípicas diferentes de aquellas células de la cual provino la célula originaria del nuevo linaje y con las cuales guarda una correspondencia.

En general el cáncer de tejidos sólidos es una enfermedad neoplásica, constituida por una masa anormal de células cuyo crecimiento lo hace sin respetar el mantenimiento de la estructura del tejido y sin respetar la disponibilidad de espacio con respecto a las células normales vecinas.

Ésta enfermedad neoplásica persiste de manera excesiva luego de cesar el estímulo que desencadenó su transformación (Fidler, 1999). El sitio de crecimiento donde empieza a emerger esta masa celular se le denomina tumor primario, el cual no ha desarrollado aun su capacidad de infiltrar, invadir o generar metástasis a diferentes tejidos u órganos (Welch *et al*, 2000). En cambio un tumor invasivo consiste de una masa celular que ha logrado destruir la lámina basal y a través de un proceso de migración celular invade, penetra y lesiona progresivamente los tejidos adyacentes (Wienberg, 1996; Keleg *et al*, 2003). Un tumor secundario connota el desarrollo de implantes celulares, los cuales carecen de continuidad con los sitios de crecimiento primarios, ya que después de penetrar e ingresar a los vasos sanguíneos viaja a través del torrente sanguíneo llegando a colonizar otros órganos lejanos. A este tumor secundario se le denomina metastásico.

Entre los tumores malignos sólidos, la formación de lesiones a nivel de la región cérvico-uterina es la segunda causa de muerte en mujeres por cáncer a nivel mundial y la primera a nivel nacional. (Muñoz & Bosch, 1997).

CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es el carcinoma de mayor incidencia en México y es la primera causa de muerte por cáncer de mujeres mexicanas (Muños & Bosch, 1997). Los factores de riesgo involucran el inicio a edad temprana de relaciones sexuales, la promiscuidad, haber tenido varias parejas sexuales y el haber padecido enfermedades de transmisión sexual, además los hábitos de higiene deficientes, consumo de tabaco, alcohol o anticonceptivos, así como una detección tardía, son las principales causas en la adquisición, manifestación y progresión del CaCu. (Lira, 2001). Los eventos tisulares en la progresión del cáncer cervical se clasifican en los diferentes estadios de esta enfermedad. Se inicia con el cáncer *in situ* denominado Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC), donde se presentan varios estados de desarrollo. La NIC-I es una lesión Intraepitelial de bajo grado y es una displasia leve. La NIC-II es una displasia moderada y junto con la NIC-III, displasia grave, son consideradas lesiones intraepiteliales de alto grado. Presentándose de ésta manera un cáncer *in situ*. Posteriormente se pasa a un estado de cáncer invasor denominado cáncer metastásico (de Vita *et al*,1993; Alonso *et al*, 2000).

El carcinoma de cérvix, en un 99%, es originado por la infección del Virus de Papiloma Humano (VPH) y en particular los tipo 16 y 18 acumulan el 70% de los casos de este cáncer, el resto de los casos presentan VPH 31 y 45 y solo un mínimo porcentaje (1%) del cáncer cérvico-uterino es negativo a VPH. No obstante, la infección del VPH no es causa suficiente para la malignidad, se necesita de la colaboración de cofactores para la progresión y persistencia de la infección. Estos incluyen factores del hospedero como respuesta inmunológica, influencia de hormonas y otras infecciones transmitidas sexualmente (Muños & Bosch, 1997). De esta forma la asociación de la infección con VPH y el desarrollo de cáncer no es absoluta, ya que la mayoría de las mujeres infectadas con este virus no padecen cáncer cervical (Lira, 2001).

Actualmente se han descrito más de 130 tipos diferentes de VPH que son catalogados como de bajo riesgo —tipos cuya infección no provoca patologías malignas— y de alto riesgo —aquellos tipos que provocan malignidad. Treinta de los tipos de VPH identificados están relacionados con lesiones anogenitales (Tajachayeb *et al*, 1996). Tales VPH son específicos de tejido y especie, ya que pueden infectar epitelio húmedo o seco de diferentes mamíferos (Guzmán-Rojas *et al*, 1998). La infección por VPH en los epitelios escamosos, secos y húmedos, se inicia en las células basales del epitelio y es en este lugar en donde se tiene el desarrollo del ciclo de vida del VPH, el cual está relacionado al programa de diferenciación de la célula hospedera con la producción de partículas virales maduras restringida a las células suprabasales diferenciadas (figura 5). La infección por VPH se presenta a través de microheridas en el epitelio que exponen células de la lámina basal a la infección viral. Las células de la lámina basal son células que están en constante división y proveen un reservorio de células para la región suprabasal. La infección viral activa la maquinaria celular para producir de 20 a 100 copias extracromosomales del ADN viral por célula. Entre las primeras proteínas virales expresadas se tienen factores de replicación como las proteínas E1 y E2 que forman complejos que se unen a secuencias en el origen de replicación viral y que utilizan las polimerasas celulares y proteínas accesorias para mediar la replicación. Las proteínas E4 y E5 se piensa están involucradas en la regulación de funciones virales posteriores. Las proteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo actúan como oncoproteínas que han de provocar que la célula hospedera entre continuamente a ciclo celular y se divida. Como el VPH infecta células basales que se dividen regularmente, el genoma viral es transmitido a las células hijas, una de las cuales ha de permanecer en la lámina basal y la otra ha de migrar hacia los estratos superiores al tiempo que experimenta diferenciación. En un epitelio normal con células no infectadas, las células salen del ciclo celular conforme se han alejado de la lámina basal, al tiempo que se presenta una pérdida del núcleo. Por el contrario, todas las células infectadas con VPH conservan la propiedad de dividirse aún en los estratos suprabasales. Las proteínas L1 y L2 son ensambladas posteriormente y forman espontáneamente una cápside icosaédrica que ha de

contener al virión que ha de ser liberado de las capas superiores del epitelio (Longworth & Laimins, 2004).

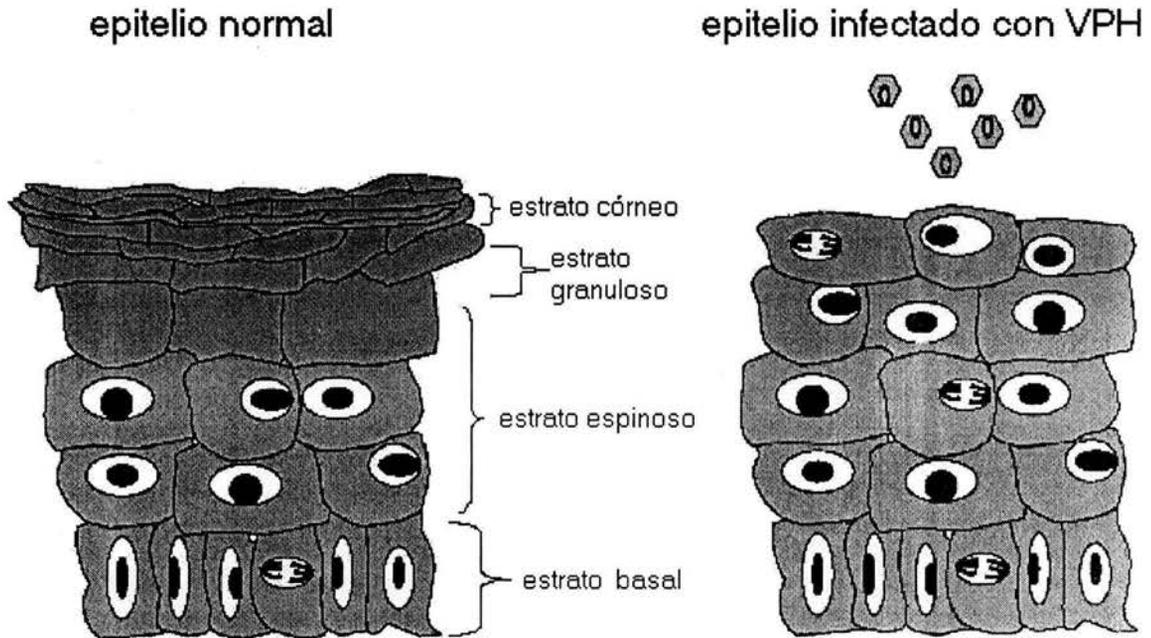


Figura 5. El epitelio infectado presenta células nucleadas y en división en los estratos suprabasales. Tomado y modificado de Longworth & Laimins, 2004.

La caracterización de estirpes celulares malignas de esta región cérvico-uterina ha llevado a identificar líneas celulares que difieren en estado clínico, como por ejemplo Calo (Carcinoma epidermoide IIB), HeLa (Adenocarcinoma IVB metastásico) e InBl (Carcinoma epidermoide IVB) las cuales presentan infección con VPH-18 (Monroy *et al*, 1992), además existen líneas celulares infectadas con VPH-16 como SiHa y CasKi y otras líneas celulares negativas VPH como ViBo y C33. La expresión de un fenotipo maligno depende de la expresión de los oncogenes E6 y E7 del VPH para mantener las características de inmortalización y transformación celular (John-Sup *et al*, 2001). Las líneas celulares que presentan infección con el Virus del Papiloma Humano y que provienen de cáncer cérvico-

uterino presentan una transformación e inmortalización relacionada a la interferencia que realizan las proteínas virales E6 y E7 con las proteínas celulares supresoras de tumor p53, p73 y RB, impidiendo la detención del ciclo celular en los puntos de restricción y esquivando la verificación de la integridad genómica, ocasionando la acumulación de alteraciones a este nivel. El estudio de la biología del cáncer cérvico-uterino ha arrojado el conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales actúan estas oncoproteínas, sin embargo, pese a los esfuerzos encaminados a combatir este cáncer, no se tiene un proceso adecuado para disminuir su incidencia en la población mexicana.

VPH	16	18	31-45	Cualquier VPH
Ciudad				
México	52 %	12 %	5 %	
España	19			7 0%
Colombia				63

Incidencia de VPH (Muños & Bosch, 1997).

FLAVONOIDES

Dentro de las estrategias para combatir al cáncer en general, se tiene que en los últimos años la investigación básica ha explorado el papel de compuestos de origen vegetal para su uso como agentes terapéuticos o como preventivos en el desarrollo de esta enfermedad, entre tales elementos se tiene a los flavonoides (figura 6) entre otros (Herber & Go, 1999).

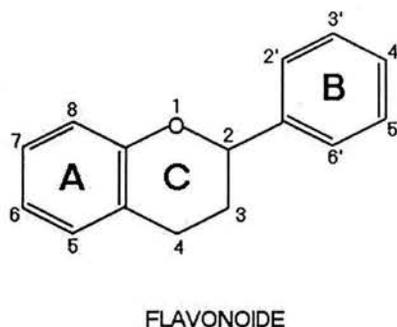


Figura 6. Flavonoide. Estructura general mostrando los tres anillos y las posiciones donde se localizan los sustituyentes (Vera, 2002).

Los flavonoides son compuestos polifenólicos relacionados estructuralmente de origen vegetal y constituyen uno de los grupos más característicos y extensos de los metabolitos secundarios de las plantas superiores siendo reconocidos como pigmentos (Harborne & Williams, 2000; Lea & Leegood, 1993; Azcon-Bieto & Talon, 1993). Los flavonoides en la célula vegetal son sintetizados a partir de subunidades suministradas por las vías metabólicas del acetato y el ácido shiquímico, en tal proceso la fenilalanina es precursora de la unidad p-cumaril la cual es condensada en chalconas (Mann, 1987) dando origen a la gran variedad de estructuras de estos compuestos, los cuales se acumulan en las vacuolas y se les encuentra localizadamente en el mesófilo y epidermis de las hojas, en la cutícula epidérmica de los frutos y en otros órganos jóvenes como las flores, estructuras que presentan poca

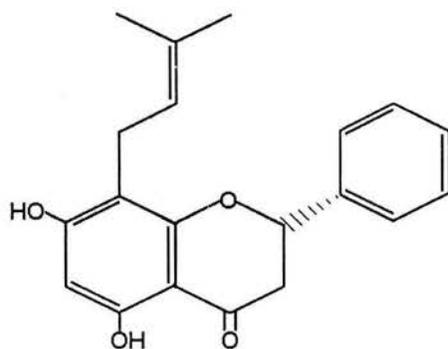
o nula actividad fotosintética, además puede estar restringida a etapas específicas del desarrollo, a tipos específicos de células especializadas y a periodos de estrés causados por la deficiencia en nutrientes o por el ataque de organismos.

En el más amplio sentido el término flavonoide se aplica a estructuras muy diversas: 2-fenilcromonas (flavonas, flavonoles, flavanonas y biflavonoides), 2-fenilcromanos (flavanos, catecoles, 3,4-flavandioles), flavilios (antocianos), calconas, acronas (Bruneton,1991). Todos estos compuestos presentan un núcleo polifenólico de tres anillos también conocido como núcleo de fenilbenzopirona. El anillo A se une a una cadena de tres carbonos la cual es una ramificación del anillo B. El grupo propano puede presentarse de forma abierta (chalconas) o cerrada utilizando un enlace éter en cuyo caso se forma el anillo C. Las diferencias entre éstos es por tanto en la estructura básica, en el grado de polimerización y en el tipo de conjugación con glucósidos, ésteres malónicos y ésteres sulfato. Se han registrado ya más de 6400 flavonoides aislados a los cuales se les ha determinado su estructura y de los cuales existe referencia de su actividad biológica que van desde las bioquímicas hasta las ecológicas. Por otro lado, los flavonoides son parte importante de la dieta humana y se ha determinado que su consumo, hasta de 1 g por día, está relacionado en la prevención de enfermedades entre las que se encuentra el cáncer (Herber & Go,1999; Frankel *et al*, 1993; Hertog *et al*, 1993) por lo que se les ha considerado como fitoquímicos en las terapias de quimiopreención (Sizer & Witney, 2000), asignándoles propiedades antitumorales (Wang *et al*, 1998; You *et al*, 1998), antiinflamatorias (Wang *et al*, 1999; Williams *et al*, 1999), antimicrobianas (Haraguchi *et al*, 1998; Harborne, 1999), antiviral (Kim *et al*, 1998; Li *et al*, 1997; Lin *et al*, 1997), antioxidante (Miyase *et al* 1999; Arora *et al*, 2000), analgésica y antihepatotóxica (Xu *et al* 1997; Chen *et al*, 1999)

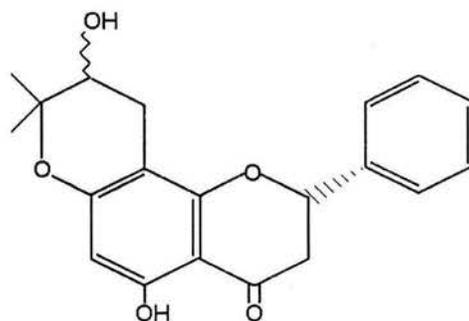
Estudios recientes han evaluado la actividad biológica de estos compuestos de origen vegetal sobre líneas celulares provenientes de la región cérvico-uterina, tanto normales, inmortalizadas, transformadas y carcinogénicas en modelos *in vitro* (Yokoyama *et al*, 2004). En particular han mostrado tener actividades como la

disminución de actividad telomerasa, detención del ciclo celular (Beniston & Campo, 2003) e inducción de muerte celular por apoptosis (Ahn *et al*, 2003).

El compuesto 5,7-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona también denominada glabranina (GL) (Mitscher *et al*, 1983; Cano, 2000) es una flavanona prenilada en su posición 8, presentando además dos grupos hidróxido en las posiciones 5 y 7 en el anillo A (figura 7). Ésta pertenece al grupo de flavanonas a las que se les ha descrito actividad antiviral, antimicrobiana y antitumoral (Shing-Chuan *et al*, 2004). Específicamente la glabranina presenta una actividad antiviral (Sánchez *et al*, 2000), sin embargo no hay registro de estudios que evalúen su actividad antitumoral. Los diversos grupos funcionales que se pueden localizar en el núcleo de fenilbenzopirona son responsables de las actividades biológicas que presentan los flavonoides y para la exploración de tal relación se tiene la elaboración de derivados en donde se realizan modificaciones en las posiciones, alteraciones de estructura, cambiando, agregando o eliminando grupos funcionales, estableciendo una relación con una actividad biológica particular. En este contexto el compuesto 5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina, denominado CAM, es un derivado de la glabranina a la cual se le ha hecho una ciclización al grupo prenilo de la posición 8 (figura 7), éste es uno de los derivados que presenta actividad antimicrobiana contra *Micrococcus luteus*, propiedad que no tiene la glabranina (Vera, 2002).



Glabranina



CAM

Figura 7. Glabranina, grupo prenilo en posición 8. CAM, Ciclización del grupo prenilo desde la posición 8 a la 7 (Cano, 1998).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro de las estrategias para combatir al cáncer en general, en los últimos años se ha explorado la actividad de compuestos de origen vegetal para su uso como agentes terapéuticos o preventivos en el desarrollo de esta enfermedad, entre tales compuestos figuran los flavonoides.

Estudios de la actividad biológica de los flavonoides sobre líneas celulares carcinogénicas provenientes de la región cérvico-uterina han mostrado que éstos pueden tener actividad antitumoral; sin embargo, son pocos los flavonoides que han sido bien estudiados y a los que se les ha determinado el mecanismo por el cual ejercen su efecto antitumoral, por lo que resulta de gran interés realizar una valoración de la actividad biológica de las flavanonas 5,7-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona y 5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina en líneas celulares provenientes de cáncer cérvico-uterino, de tal manera que se aporte información que determine si estas flavanonas afectan el potencial proliferativo así como determinar el mecanismo por el cual ejercen su actividad.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer cérvico-uterino es la principal causa de muerte en mujeres mexicanas siendo responsable del 30% de las muertes por cáncer. El virus del papiloma humano, tipos 16 y 18, están asociados a un 70 % de los casos. Pese a los resultados obtenidos en el estudio de la biología del carcinoma de cérvix, éste ha mantenido su incidencia en la población mexicana.

Además, el número creciente de resultados en investigación básica que emplean compuestos de origen vegetal y que han sido propuestos en terapias alternativas están orientados hacia la quimioprevención del cáncer. Dentro de este grupo de compuestos se encuentran los flavonoides a los cuales se les ha atribuido un efecto citotóxico e inhibitorio de la proliferación de células tumorales; sin embargo, se tienen pocos estudios sobre la actividad biológica de éstos sobre el carcinoma de cérvix, por lo que es necesario generar información acerca de la actividad de flavonoides sobre células tumorales de cáncer cérvico-uterino.

HIPÓTESIS

Es conocido que los flavonoides presentan actividad antifúngica, antibacteriana, antiviral e incluso antitumoral, particularmente se conoce que ciertos flavonoides como la quercetina y (-)-epigallocatequina galate presentan actividad antitumoral mediada por la detención del ciclo celular, disminución de la actividad telomerasa e inducción de muerte celular por apoptosis, sobre líneas celulares provenientes de carcinoma de cérvix. Considerando que el compuesto 5,7-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona es un flavonoide y que el compuesto 5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina es su derivado, se espera que ambos compuestos presenten un efecto antiproliferativo sobre las líneas celulares provenientes de cáncer cérvico-uterino CaLo, HeLa e InBl.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si los compuestos 5,7-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona y 5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina, afectan el potencial proliferativo de las células tumorales provenientes de cáncer cérvico-uterino: CaLo, HeLa e InBl.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Establecer cultivos de células tumorales provenientes de cáncer cérvico-uterino: CaLo, HeLa e InBl.
- b) Determinar la concentración media que indica el 50% de densidad celular, a través de la realización de curvas dosis-respuesta (concentración vs proliferación), para cada una de las líneas celulares con los compuestos: 5,7-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona y 5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina.
- c) Determinar la viabilidad celular en cultivos de células tumorales CaLo, HeLa e InBl tratadas con flavanonas 5,7-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona y 5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina.
- d) Determinar si las flavanonas 5,7-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona y 5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina detienen el ciclo celular de las líneas tumorales CaLo, HeLa e InBl.
- e) Determinar si hay evidencia de muerte celular por apoptosis en las líneas tumorales CaLo, HeLa e InBl inducida por las flavanonas 5,7-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona y 5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina.

MÉTODO

Cultivo de células tumorales. Las células provenientes de cáncer cérvico-uterino son sembradas en cajas petri de cristal de 10 mm (Pirex USA), en 10 ml de medio RPMI-1640 (Laboratorios Microlab) suplementado con L-glutamina y bencilpenicilina (Grünenthal, Lakeside) y sin rojo de fenol, al 10% de suero fetal bovino (SFB) desactivado a 56 °C por 30 minutos (Gibco BRL). Los cultivos fueron mantenidos a 37° C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda a saturación en un incubadora (Nuair US Autoflow). Para la realización de los ensayos los cultivos se desarrollan hasta un 60-70% de saturación de la caja de cultivo (Morgan y Darling, 1993).

Preparación de los flavonoides. Los compuestos son suministrados en sólido y se solubilizan para su uso de acuerdo a lo siguiente: CAM en etanol (J. T. Baker) (5 mg/ml) y GL en metanol (J. T. Baker) (5 mg/ml). Las soluciones son filtradas usando un filtro para jeringa de 26 mm y 0.20 µm (Corning Inc.).

Actividad biológica de GL y CAM sobre el potencial proliferativo de células de cáncer cérvico-uterino. Las líneas celulares son sembradas en cajas de plástico de 98 pozos (Corning Inc.), 5000 células/pozo, en 100 µl de medio RPMI al 10 % de SFB, por 24 h. Posteriormente se retira el medio de cultivo y se adiciona el compuesto a probar en RPMI fresco (10% de SFB) a las concentraciones 1, 10, 15, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35 µg/ml de GL o 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µg/ml de CAM. El ensayo control contemplará la cantidad de vehículo (disolvente) utilizada en la concentración máxima a probar. En estas condiciones se mantiene el cultivo por 48 h más dando un tiempo total de cultivo de 72 h. La medición de la proliferación celular se realiza con la técnica de tinción de cristal violeta de acuerdo a Kueng *et al* (1989). Se retira el medio de cultivo. Se deja secar al aire. Las células son fijadas con glutaraldehído al 1.1% (Sigma Chemical Co.) por 10 minutos, al cabo de los cuales se retira el fijador y se deja secar al aire. Se tiñe con

colorante cristal violeta al 0.1% (Sigma Chemical Co.) por 10 min, al cabo de los cuales se retira el exceso de colorante lavando con agua desionizada (Milli-Q plus Millipore). Se deja secar al aire. Se adiciona ácido acético (J. T. Baker) al 10 % en agitación por 20 min. Se mide la absorbancia a 570 nm (Image Tecan Spectra). Los resultados de los grupos estimulados se comparan con el respectivo control.

Evaluación de detención del ciclo celular. La cantidad ADN presente en las células se determinada utilizando citometría de flujo de acuerdo al método descrito por Vindelot et al, 1985. Las células son sembradas con una densidad de 500 000 células por caja de 5 ml en cajas de plástico (35 x 10 mm, Corning Inc.), en RPMI al 10% de SFB. Se deja el tiempo necesario para que las células se adhieran al piso de la caja (24 h), después de lo cual son estimuladas con GL a concentraciones de IC_{50} , 26 $\mu\text{g/ml}$ para las células CaLo y HeLa, y 30 $\mu\text{g/ml}$ para las células InBl. Para CAM se utiliza una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$. Las concentraciones anteriores son preparadas en medio fresco, RPMI al 10% SFB y en estas condiciones se mantiene el cultivo por 24 h. El grupo control contempla la cantidad de vehículo empleado en el IC_{50} en RPMI al 10 % de SFB, un control sin estímulo contempla RPMI al 10% de SFB. Para la evaluación por citometría de flujo, las células son despegadas de las cajas de cultivo con verseno, centrifugadas y lavadas con un buffer salino de fosfatos, pH = 7.2 (PBS). El botón celular es fijado y resuspendido en 1 ml de metanol al 50% en PBS, pasados 20 min se centrifuga y lava con PBS. El botón es resuspendido en 200 μl de ARNasa (2.5 U/ml) y se incuba a 37° C por 30 minutos. Posteriormente se adiciona 750 μl de una solución de yoduro de propidio (200mg/l), se mezcla y se incuba en hielo por 15 min protegiendo los núcleos de la luz. Finalmente se analizan las muestras en un FACS (Coulter,USA) (Unidad de Biología Molecular del Instituto de fisiología Celular-UNAM: Dr. Alejandro Zentella).

Viabilidad celular. 5000 células/pozo fueron sembradas en una placa de 96 pozos por 24 h en RPMI al 10% de SFB. Se retiró el medio de cultivo y se adiciono medio fresco conteniendo GL o CAM a una concentración de IC_{50} y el estímulo se mantuvo por 48 h. Se realizó una tinción con azul tripano (Sigma, cell culture reagents) contando el número de células teñidas y el número de células totales.

Tinción con yoduro de propidio. 500 000 células son sembradas en cajas petri de plástico (35 x 10 mm, Corning Inc.) por 24 h un RPMI al 10% de SFB. Se retiro el medio de cultivo y se adiciono medio fresco conteniendo GL o CAM a una concentración de IC_{50} y el estímulo se mantuvo por 48 h. Las células son despegadas con verseno, centrifugadas y resuspendidas en PBS a una proporción 10^6 / ml. Se preparan laminillas en Cytospin (Shandon Souther) con botones de 10^6 células, se dejan secar y se fijan con metanol al 50% en PBS. Las preparaciones son teñidas con yoduro de propidio 0.2 mg/ml por 5 minutos.

Análisis estadístico. Los valores medios fueron sometidos a un análisis de varianza, ANDEVA, con una significancia de 0.1, seguida de una prueba de Tukey.

RESULTADOS

Actualmente, la búsqueda de compuestos antitumorales ha despertado un gran interés, sobre todo, aquellos que son de origen biológico y específicamente los de origen vegetal. En el caso particular de los flavonoides, se ha reportado que algunos de ellos presentan actividad antiviral y antitumoral entre otros efectos. Por ejemplo, la apigenina, un isoflavonoide extraído de la soya, se ha reportado como un inductor de apoptosis en células tumorales de próstata (Gupta et al, 2001). Sin embargo, poco se conoce de cuántos y cuáles flavonoides pudieran presentar actividad antitumoral. Al respecto, en nuestro grupo de trabajo se ha logrado purificar la flavanona glabranina, de la cual se han obtenido derivados, CAM entre ellos. De ambos compuestos se desconocen sus propiedades antitumorales, por lo que es de interés la evaluación de su efecto antiproliferativo sobre líneas celulares tumorales provenientes de cáncer cérvico-uterino. Al respecto se evaluó si GL afectan el potencial proliferativo de las células CaLo, HeLa e InBl (Figura 8).

Como se puede apreciar la flavanona glabranina provoca un descenso en la densidad celular de las tres líneas celulares de cáncer cérvico-uterino, observándose una disminución de la densidad con el incremento de la concentración de GL, efecto dependiente de la concentración. En el caso de las células CaLo, GL presenta actividad sobre la proliferación celular entre las concentraciones de 20 y 35 $\mu\text{g/ml}$ con una disminución de la proliferación de 10 % a 90 % respectivamente, estableciéndose una IC_{50} a 26 $\mu\text{g/ml}$. Para las células HeLa el intervalo en el cual GL presenta su efecto sobre la proliferación está entre las concentraciones 10 y 35 $\mu\text{g/ml}$ con un descenso de la densidad celular de 10 % a 90 % respectivamente. Al igual que las células Calo, se tiene una IC_{50} en 26 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, las células InBl, parecieran ser más resistentes al efecto de GL, ya que se registró una IC_{50} aproximada a 30 $\mu\text{g/ml}$, presentando actividad biológica desde los 26 $\mu\text{g/ml}$ con 10 % de disminución de la densidad celular hasta 35 $\mu\text{g/ml}$ con disminución de un 80.

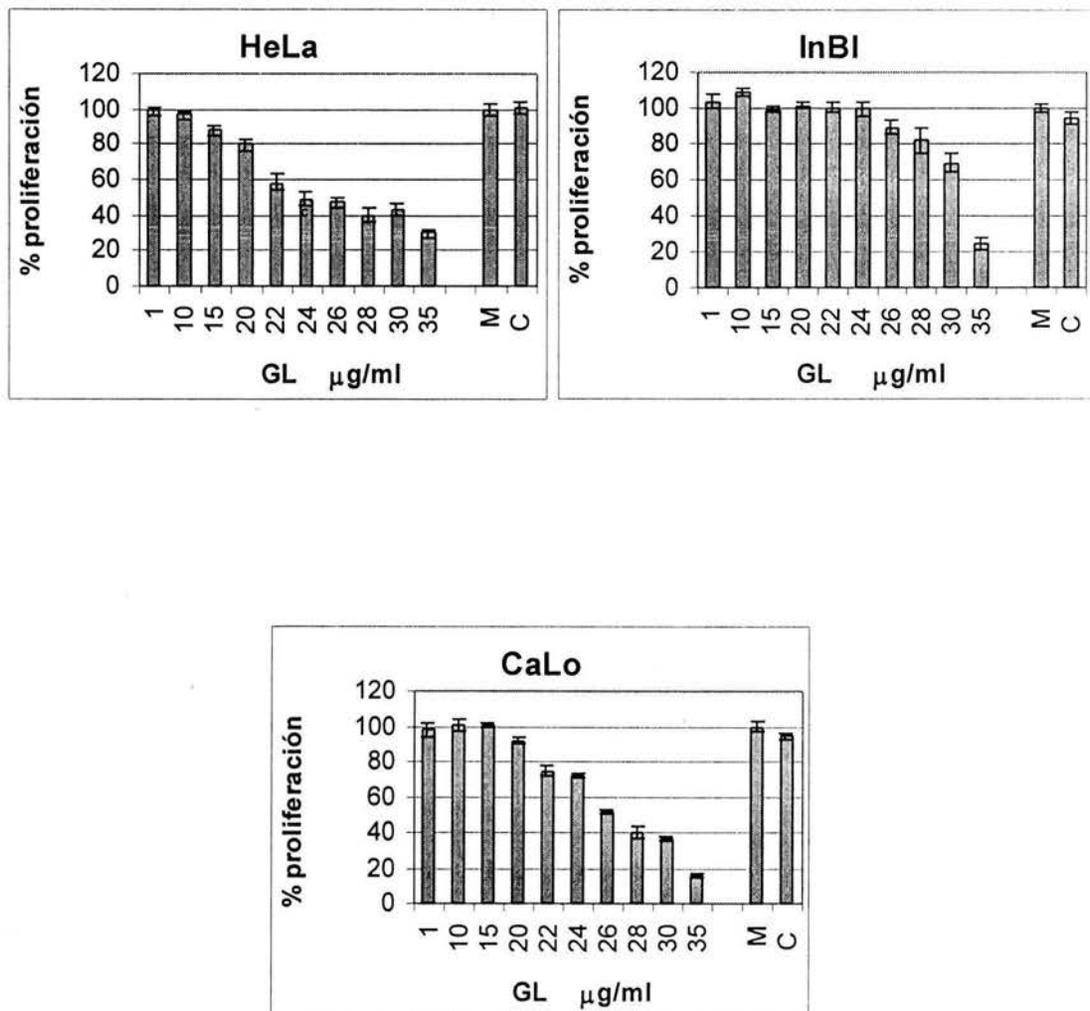


Figura 8. Efecto de la flavanona GL sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares provenientes de tumores de cáncer cérvico-uterino CaLo, HeLa e InBI. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (5000 células/pozo) por 24 horas para adherencia y estimuladas con GL por 48 h. El número celular fue evaluado con la técnica de cristal violeta. Las gráficas representan uno de los tres experimentos realizados por separado con 6 repeticiones por condición. M=metanol, C=control.

Para saber si el decremento en el número celular es causado por muerte celular, la viabilidad de las células fue evaluada con el colorante azul de tripano el cual es excluido cuando las células están vivas, y cuando las células están muertas éstas se colorean de azul (Tabla 1).

	GL	MeOH	CAM	EtOH	Control
	%	%	%	%	%
CaLo	47	95	47	95	99
HeLa	43	94	50	93	98
InBl	49	99	48	95	99

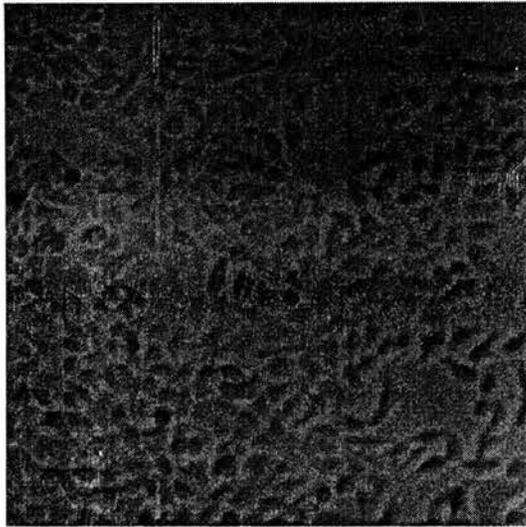
Tabla 1. Viabilidad de las células estimuladas con GL y CAM. 5000 células/pozo fueron sembradas en una placa de 96 pozos en RPMI al 10% de SFB. A las 24 horas se retiró el medio de cultivo y se adicióno medio fresco conteniendo GL o CAM a una concentración de IC₅₀ y el estímulo se mantuvo por 48 horas. Se realizó una tinción con azul tripano contando el número de células teñidas y el número de células totales (P<0.1).

La prueba de viabilidad establece que el decremento en el número celular observado es causado parcialmente por una muerte aparentemente necrótica, ya que el tamaño de la molécula del colorante azul tripano es muy grande (960 g/mol), sugiriendo que al penetrar en las células, la membrana de éstas se encuentra dañada. Con el propósito de determinar si las células sufren una alteración en su morfología debido a muerte por necrosis, las células fueron estimuladas con GL a diferentes concentraciones y observadas con un microscopio invertido para determinar cambios en su forma (figura 9a). En los tratamientos con GL entre 30 y 35 µg/ml a 24 h de estímulo se observa un decremento en el número de células con respecto a los controles, además una parte pequeña de la población (10%) de células presenta una forma esférica, lo que indica pérdida de adherencia celular. Hacia las 48 h de estímulo se aprecia que la mayoría de las células (80%) presenta una forma esférica

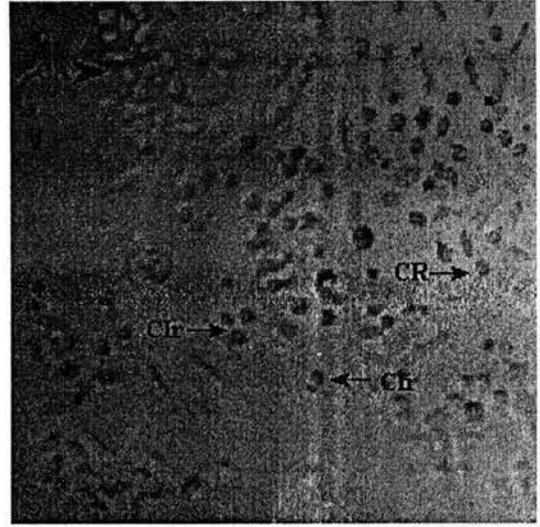
con contorno bien definido en algunas y contornos irregulares en otras indicando un efecto sobre la membrana plasmática. Estas células de forma esférica, la mayoría permanece aun adheridas al piso de la caja de cultivo y el resto están suspendidas en el medio de cultivo, además de éstas, se presentan también células aun adheridas y extendidas pero en pequeña proporción. Las concentraciones de 20 y 28 $\mu\text{g/ml}$ a las 48 h se presentan células que adoptan una forma esférica de contorno irregular y otras con contornos bien definidos .

El hecho de observar células extendidas con contornos bien definidos y sin teñirse con el colorante azul tripano, sugiere la presencia de células con membranas íntegras, como lo indican las células que fueron tratadas con GL (IC_{50}) pero sin descartar la posibilidad de presentar muerte por apoptosis donde las membranas plasmáticas no pierden su continuidad. Para esclarecer un poco este último punto, las células tumorales de las tres líneas celulares fueron estimuladas con GL (IC_{50}), y teñidas con yoduro de propidio y observadas en un microscopio de epifluorescencia con el objeto de encontrar cuerpos apoptóticos, los cuales se sabe son indicativos de una muerte apoptótica (figura 10a). Las imágenes revelan que los núcleos de las células HeLa están más dañados ya que se presentan cuerpos apoptóticos pero además se distingue una afectación mayor del núcleo que no es característica de la apoptosis. En las células CaLo e InBl los cuerpos apoptóticos son más evidentes pero están en menor cantidad, observándose núcleos mejor conservados, lo que indica que las células HeLa son más sensibles al efecto provocado por GL. En las células CaLo e InBl al observar que existen células con núcleos completos sin mostrar cuerpos apoptóticos y al relacionar esta observación con la presencia de células aun adheridas que no se tiñen con azul tripano, sugiere que las células no son afectadas al mismo tiempo y que pudiera deberse a la progresión del ciclo celular. Para determinar, si la GL detiene a las células en alguna fase del ciclo celular, las células fueron estimuladas con GL (IC_{50}) y posteriormente fueron teñidas con yoduro de propidio y la distribución del ADN fue evaluada por citometría de flujo con un citómetro de flujo FAC-Scalibur (Tabla 2, figura 11 a). Los resultados revelan que para las líneas celulares CaLo y HeLa no hay cambio en la progresión del ciclo celular (solo se

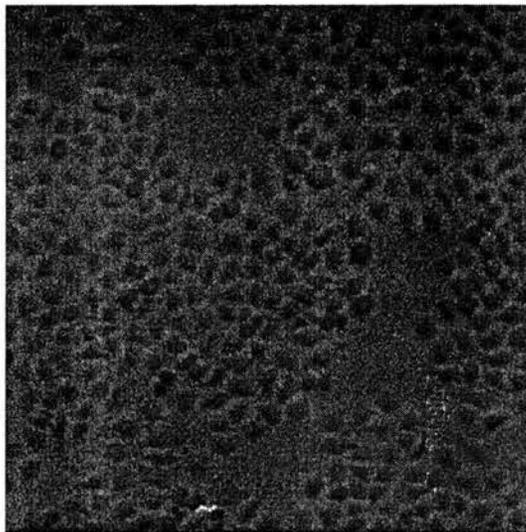
muestran los datos de CaLo, HeLa se comporta de manera idéntica), mientras que para la línea InBl, se presenta un ligero incremento en la fase G2/M, sugiriendo una detención del ciclo en dicha fase, aunque en una pequeña proporción.



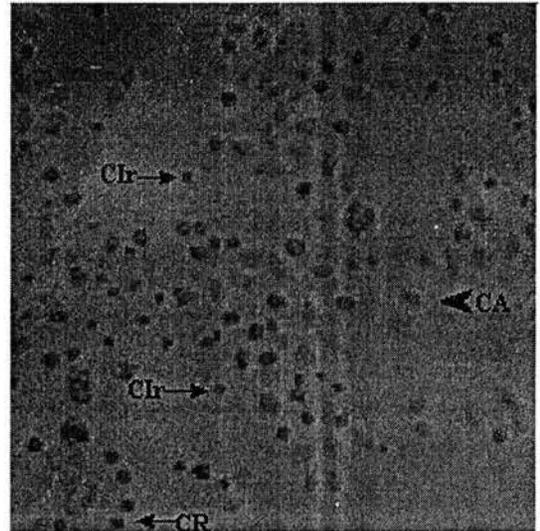
CaLo: RPMI -10% SFB -MeOH



CaLo: RPMI -10% SFB - 26 µg/ml GL

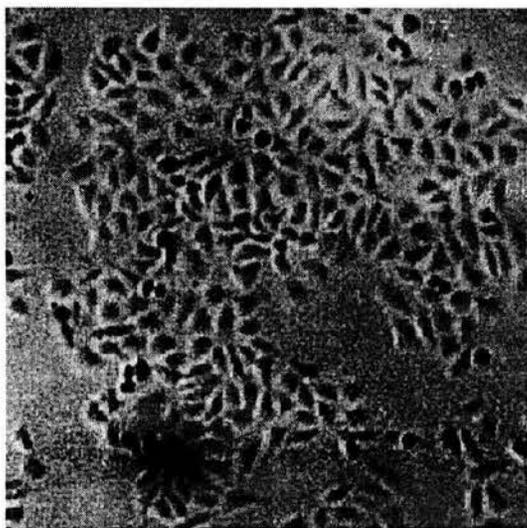


HeLa: RPMI - 10% SFB - MeOH

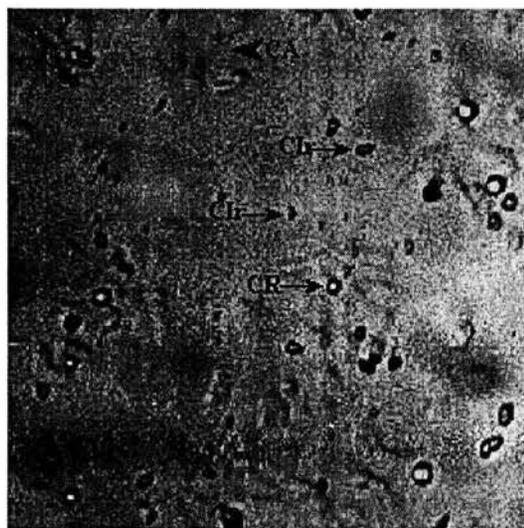


HeLa: RPMI - 10% SFB 26 µg/ml GL

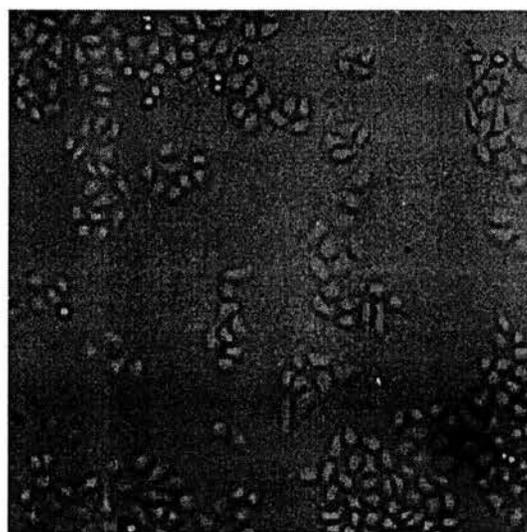
Figura 9 a. La flavanona GL induce cambio en la forma celular de las líneas tumorales provenientes de tumores de cáncer cérvico-uterino CaLo, HeLa, InBl presento el mismo comportamiento. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (5000 células/pozo) durante 24 h posteriormente fueron estimuladas con la GL y observadas a las 48 h con un aumento de 10X. CA=Célula adherida, CR=Célula de contorno regular, CIr=Célula de contorno irregular.



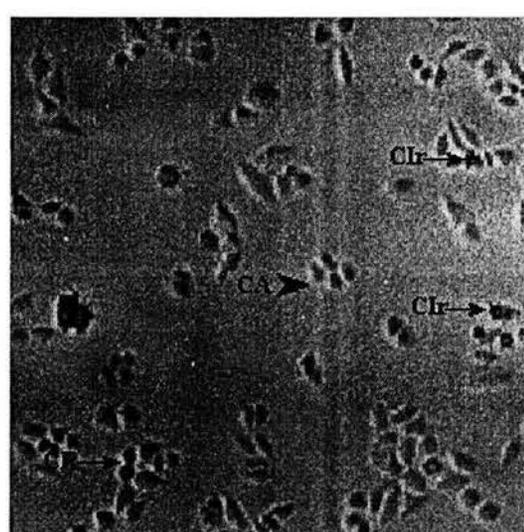
InBl: RPMI - 10 % SFB - EtOH



InBl: RPMI - 10 % SFB - CAM 30 µg/ml

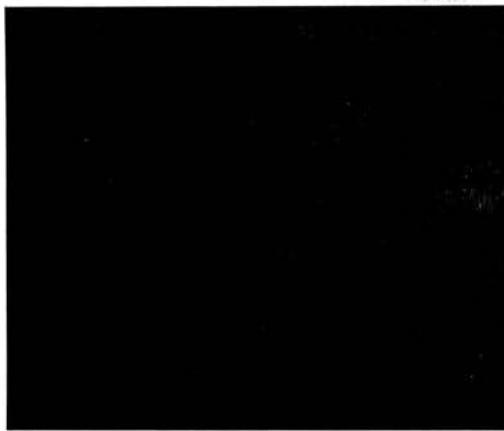


HeLa: RPMI - 10 % SFB - EtOH

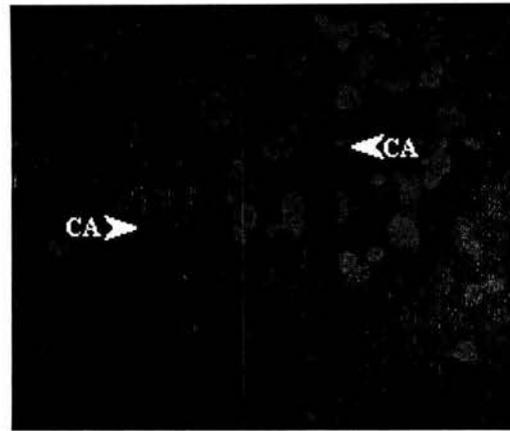


HeLa: RPMI - 10 % SFB - CAM 30 µg/ml

Figura 9 b. La flavanona CAM induce cambio en la forma celular de las líneas tumorales provenientes de tumores de cáncer cérvico-uterino HeLa y InBl, CaLo presento el mismo comportamiento. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (5000 células/pozo) durante 24 h posteriormente fueron estimuladas con la CAM y observadas a las 48 h con un aumento de 10X. CA=Célula adherida, CR=Célula de contorno regular, CIR=Célula de contorno irregular.



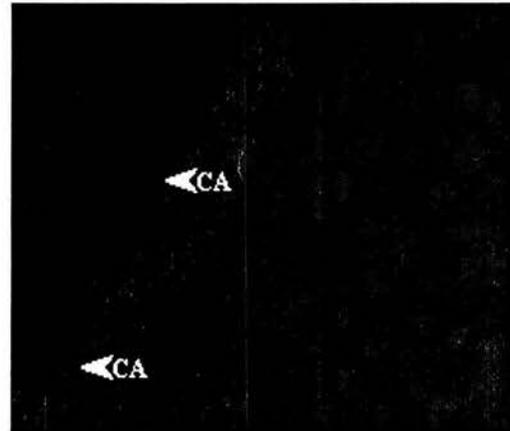
HeLa: RPMI-10% SFB-MeOH



HeLa: RPMI-10% SFB-26 µg/ml GL



CaLo: RPMI-10% SFB-MeOH



CaLo: RPMI-10% SFB-26 µg/ml GL

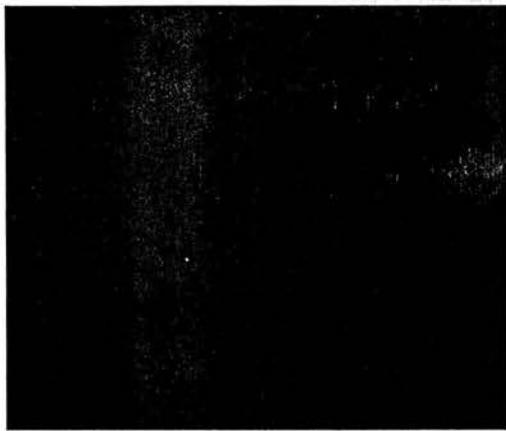


InBl: RPMI-10% SFB-MeOH

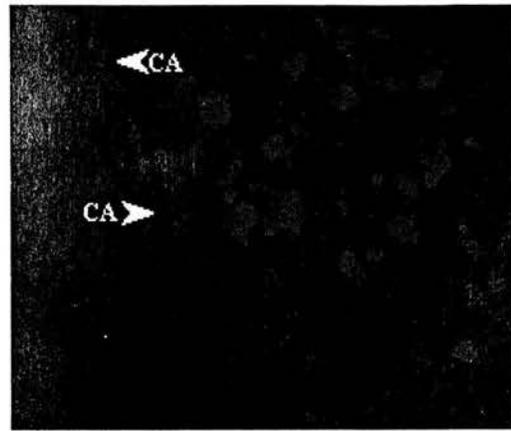


InBl: RPMI-10% SFB- 30 µg/ml GL

Figura 10 a. La glabranina induce muerte celular por apoptosis. 500 000 células son sembradas en cajas petri de plástico (35 x 10 mm, Corning) por 24 h en RPMI al 10% de SFB. Se retiro el medio de cultivo y se adicono medio fresco conteniendo GL a una concentración de IC₅₀, el estímulo se mantuvo por 48 h. Las preparaciones son teñidas con yoduro de propidio 0.2 mg/ml por 5 minutos. CA=Cuerpos apoptóticos



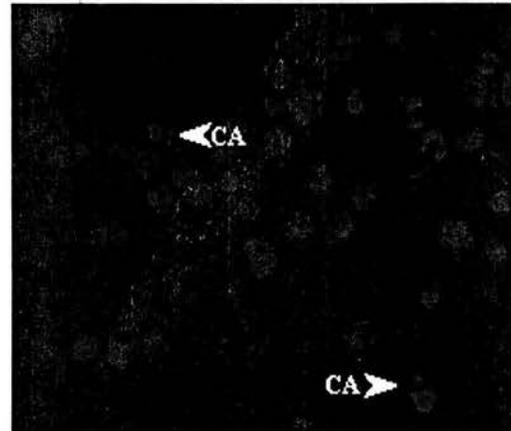
HeLa: RPMI-10% SFB-EtOH



HeLa: RPMI-10% SFB-30 µg/ml CAM



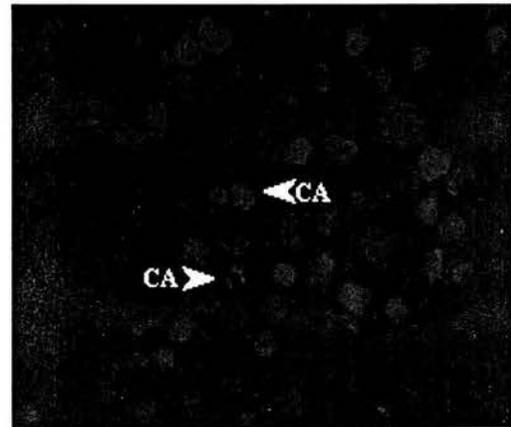
CaLo: RPMI-10% SFB-EtOH



CaLo: RPMI-10% SFB-30 µg/ml CAM

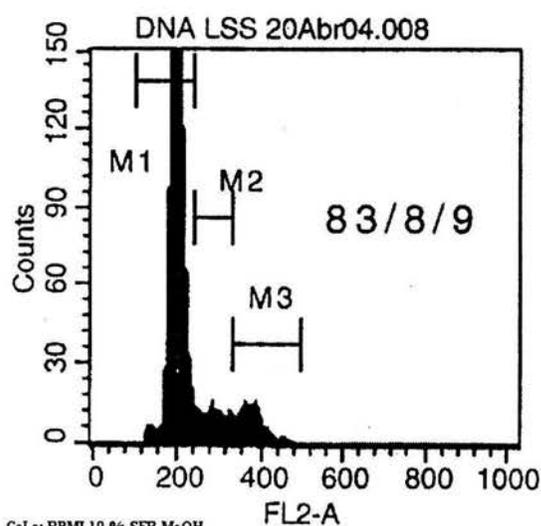


InBl: RPMI-10% SFB-EtOH



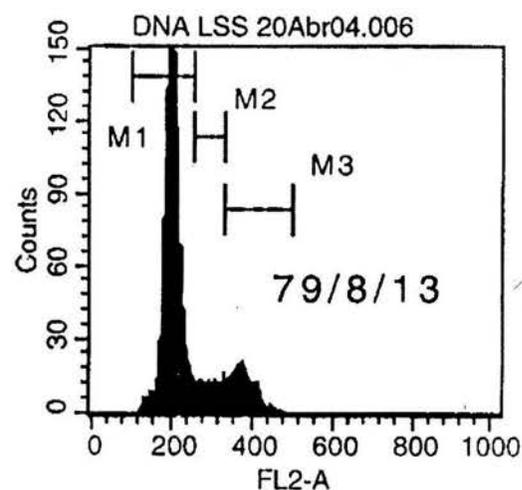
InBl: RPMI-10% SFB- 30 µg/ml CAM

Figura 10 b. CAM induce muerte celular por apoptosis. 500 000 células son sembradas en cajas petri de plástico (35 x 10 mm, Corning) por 24 horas un RPMI al 10% de SFB. Se retiro el medio de cultivo y se adiciono medio fresco conteniendo CAM a una concentración de IC_{50} , el estímulo se mantuvo por 48 horas. Las preparaciones son teñidas con yoduro de propidio 0.2 mg/ml por 5 minutos.



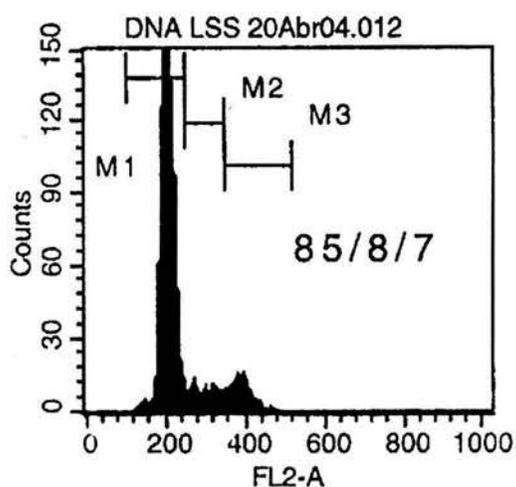
CaLo: RPMI-10% SFB-MeOH

CaLo: RPMI-10% SFB-MeOH



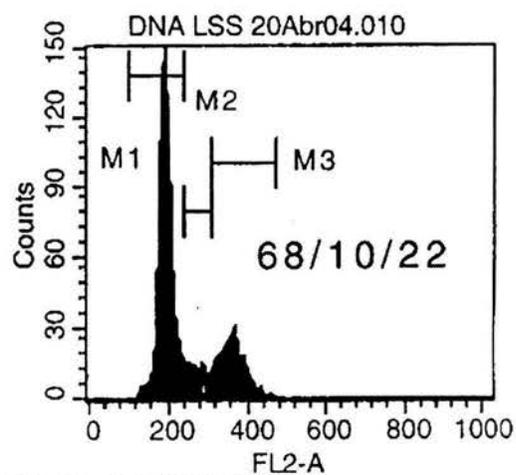
CaLo: RPMI-10% SFB- GL 26 μ g/ml

CaLo: RPMI-10% SFB-26 μ g/ml GL



InBl: RPMI-10% SFB-MeOH

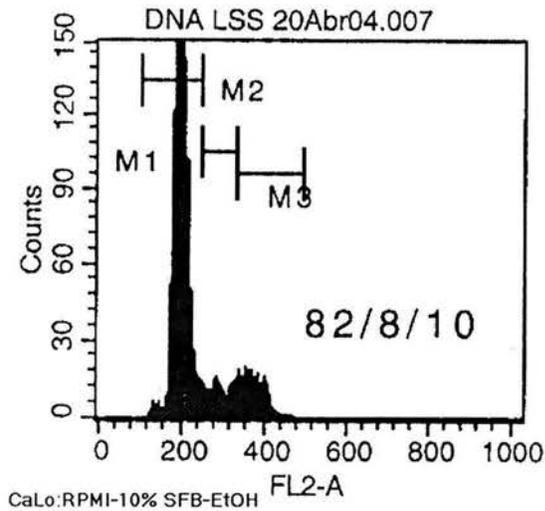
InBl: RPMI-10% SFB-MeOH



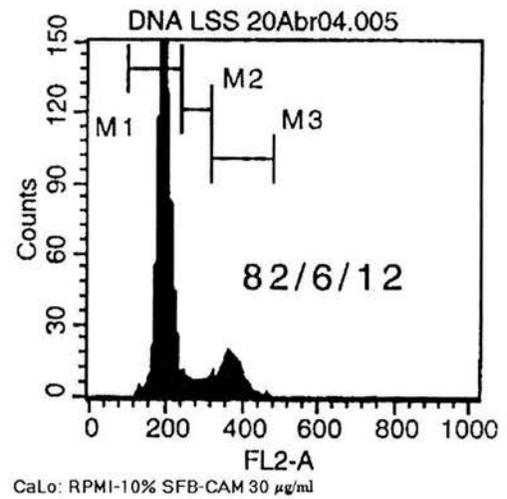
InBl: RPMI-10% SFB-GL 30 μ g/ml

InBl: RPMI-10% SFB- 30 μ g/ml GL

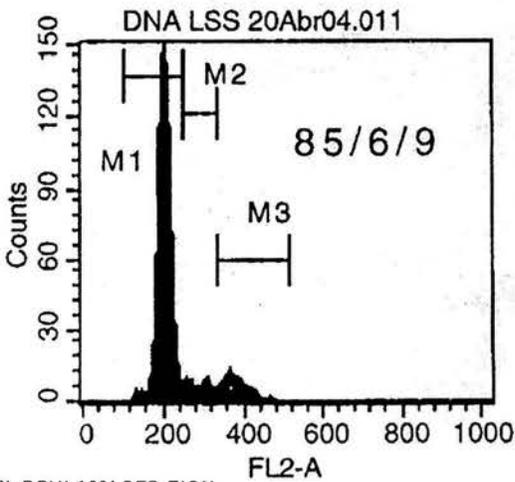
Figura 11 a. Efecto de GL sobre la progresión del ciclo celular de las líneas celulares Calo, HeLa e InBl. 500 000 células fueron sembradas en cajas de plástico de 35 X 10 mm durante 24 h. Se retiró el medio y se agregó medio fresco con GL IC₅₀, por 48 h. Las células fueron teñidas con yoduro de propidio y evaluadas con citómetro de flujo.



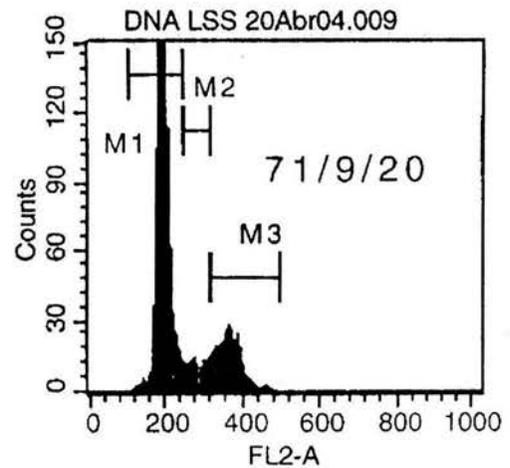
CaLo: RPMI-10% SFB-EtOH



CaLo: RPMI-10% SFB-30 µg/ml CAM



InBl: RPMI-10% SFB-EtOH



InBl: RPMI-10% SFB- 30 µg/ml CAM

Figura 11 b. Efecto de CAM sobre la progresión del ciclo celular de las líneas celulares Calo, HeLa e InBl. 500 000 células fueron sembradas en cajas de plástico de 35 X 10 mm durante 24 h. Se retiró el medio y se agregó medio fresco con CAM IC₅₀, por 48 h. Las células fueron teñidas con yoduro de propidio y evaluadas con citómetro de flujo.

	CaLo			HeLa			InBl		
	G ₁	S	G ₂	G ₁	S	G ₂	G ₁	S	G ₂
MeOH	83	08	09	73	16	11	85	08	07
GL	79	08	13	73	20	07	68	10	22
EtOH	82	08	10	77	14	09	85	06	09
CAM	82	06	12	74	15	11	71	09	20

Tabla 2. GL y CAM no afecta el progreso del ciclo celular en las células CaLo y HeLa, pero provocan una ligera detención en la fase G2 en células InBl.

Con respecto a la flavanona CAM, ésta se comporta de manera similar a la flavanona GL, observándose una disminución de la densidad celular con el incremento de su concentración. Al igual que GL, el efecto es dependiente de la concentración (Figura 12).

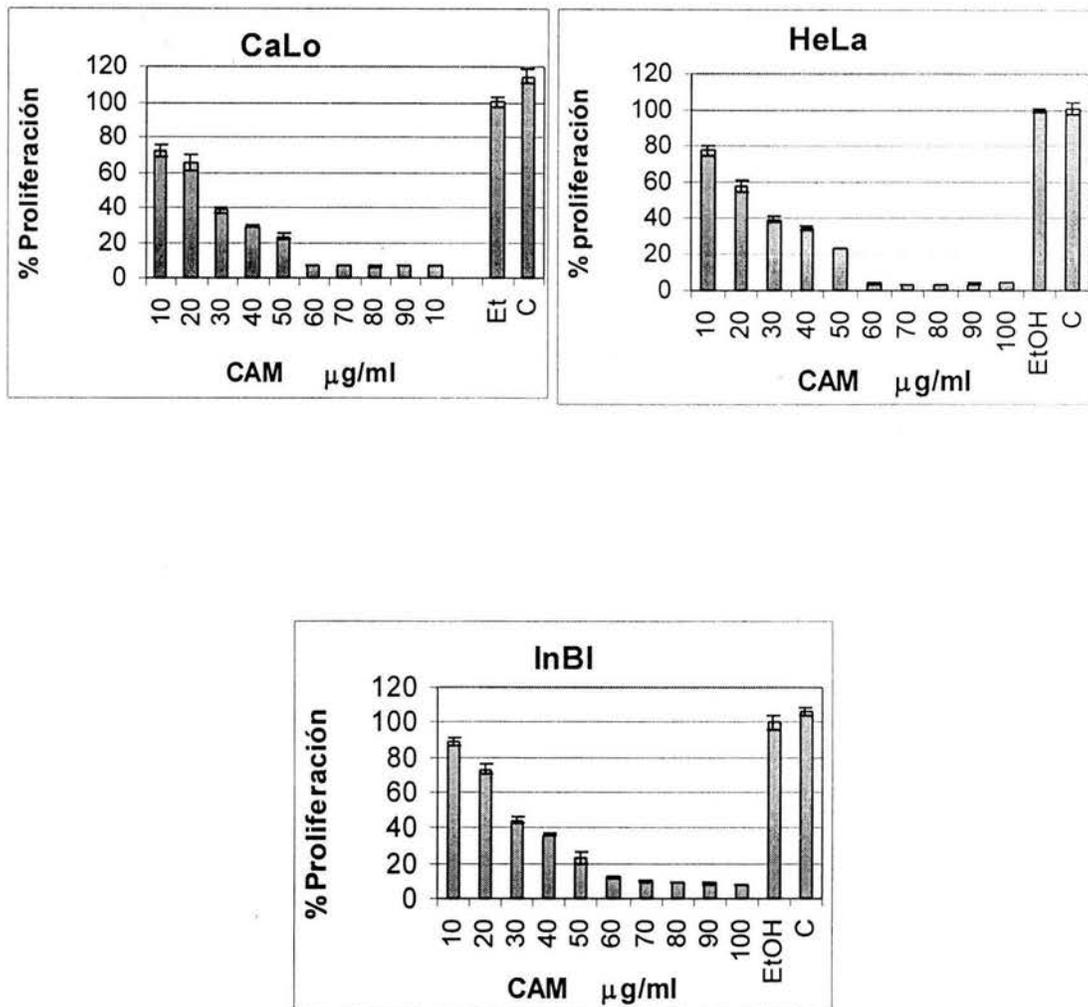


Figura 12.- Efecto de la flavanona CAM sobre el potencial proliferativo de las líneas celulares provenientes de tumores de cáncer cérvico-uterino CaLo, HeLa e InBl. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos (5000 células/pozo) por 24 h para adherencia y estimuladas con CAM por 48 h. El número celular fue evaluado con la técnica de cristal violeta. Las gráficas representan uno de los tres experimentos realizados por separado con 6 repeticiones por condición. EtOH=etanol, C=control.

En las células CaLo, CAM presenta actividad sobre la proliferación celular entre las concentraciones de 10 y 60 $\mu\text{g/ml}$ con una disminución de la proliferación de 15 % a 90 % respectivamente, estableciéndose una IC_{50} a 30 $\mu\text{g/ml}$. Para las células HeLa el intervalo en el cual CAM presenta su efecto sobre la proliferación esta entre las concentraciones 10 y 60 $\mu\text{g/ml}$ con un descenso de la densidad celular de 20 % a 70 % respectivamente, con IC_{50} en 30 $\mu\text{g/ml}$. Al estimular las células InBl con CAM, al igual que en la líneas celulares CaLo y HeLa, se tiene un intervalo de actividad entre las concentraciones 10 y 60 $\mu\text{g/ml}$ con disminución de la densidad celular de 20 % a 70 %, pero con IC_{50} en 30 $\mu\text{g/ml}$. Las pruebas de viabilidad celular indican que el decremento de la densidad celular causado por CAM se debe posiblemente en parte a una muerte celular necrótica (Tabla 1 y figura 9 b). Al igual que en GL, las células tumorales presentan alteraciones en la forma celular presentando una forma esférica irregular con contornos definidos en pequeña proporción (30 $\mu\text{g/ml}/24$ hrs). A 70 $\mu\text{g/ml}$ la mayor parte de la población presenta una forma esférica irregular pero aun permanecen adheridas al plato de cultivo. A las 48 h de estímulo desde 60 $\mu\text{g/ml}$ la totalidad de la población presenta la forma esférica irregular así como perdida de adherencia. Esto indica la presencia de células con membranas citoplasmáticas dañadas por necrosis pero no se descarta la presencia de células que hayan muerto por apoptosis por lo que se realizó una tinción con yoduro de propidio para determinar la presencia de cuerpos apoptóticos (figura 10 b).

Las imágenes revelan la presencia de cuerpos apoptóticos que indican un efecto apoptótico del CAM. Al igual que GL, las células HeLa presentan núcleos mas alterados, mientras que las células CaLo e InBl presentan condensación de cromatina. Esto indica que las células HeLa son más sensibles a CAM. Sin embargo la presencia de células adheridas en cultivos de las tres líneas celulares sugiere una inhibición de la proliferación celular, por lo que fue necesario realizar un análisis de la distribución del DNA por citometría de flujo con el propósito de evaluar si existe un paro en alguna de las fases del ciclo celular (figura 11 b).

Como se puede apreciar al igual que el efecto provocado por GL, las células tumorales HeLa (los datos de distribución de ADN son idénticos a los de CaLo) y CaLo no fueron afectadas en su ciclo celular por CAM, sin embargo, en la línea InBl, CAM indujo un ligero incremento en la población de células que se encuentran en la fase G2/M (figura 10 b, tabla 2).

DISCUSIÓN

La valoración de la actividad biológica de compuestos de origen vegetal ha llevado en los últimos años a una exploración de estos compuestos en varios campos de la salud humana. Datos epidemiológicos muestran que el tipo de dieta esta relacionada con el progreso y desarrollo de diversas patologías ya sea contribuyendo al aumento o disminución de su incidencia en una población determinada (O'Prey *et al*, 2003). Los flavonoides han sido asociados en estos estudios con una reducción significativa en enfermedades como el cáncer entre otras. El efecto de protección contra cáncer se ha demostrado en modelos animales en donde son administrados en concentraciones no tóxicas (Verma *et al*, 1988) obteniéndose resultados favorables en la disminución del desarrollo de ciertos tipos de cáncer. Además de la evaluación de estos compuestos naturales hay un interés en la síntesis de compuestos derivados de flavonoides para su evaluación como fármacos anti-cancerígenos (Wang, 2000). Los datos obtenidos de la evaluación de estas flavanonas revelan que tanto la glabranina como su derivado CAM tienen actividad antitumoral sobre las células de cáncer cérvico-uterino CaLo, HeLa e InBl. Las concentraciones IC₅₀ están en el rango de concentraciones reportados por Yokoyama *et al*, 2004, Beniston & Campo, 2003 y Ahn *et al*, 2003, sin embargo, y basados en que esta células están infectadas con el HPV tipo 18, sería interesante determinar si el efecto antitumoral es conservado en células de cáncer cervical infectadas con el virus HPV del tipo 16 o sin HPV con el propósito de establecer si la sensibilidad al compuesto presenta alguna relación con el tipo de virus. Las diferencias en las concentraciones utilizadas (IC₅₀) para inducir el decremento en el número celular podría ser debido a la diferencia de estadios clínicos al que pertenecen cada línea, ya que HeLa es un adenocarcinoma IVB metastásico, CaLo un carcinoma epidermoide IIB e InBl es un Carcinoma epidermoide IVB. Ésta última al presentar una mayor concentración de IC₅₀ hace pensar que este tipo de carcinoma epidermoide presenta mayor resistencia a la flavanona GL. El hecho de observar que el derivado de la glabranina, CAM, presentó un efecto antitumoral similar al del compuesto madre, sugiere que el cambio en el grupo prenilo no altera la actividad original, indicando que la actividad biológica de la glabranina no se debe al

grupo prenilo exclusivamente o que el grupo prenilo y el cuarto anillo formado inducen una actividad semejante. Faltaría determinar si existen diferencias en la respuesta celular a estos dos compuestos, evaluando otros parámetros de funcionalidad celular, como lo son respiración celular, o algunas rutas metabólicas como la glucólisis entre otras.

La progresión del ciclo celular no es afectada por GL y CAM, lo que corrobora que, pese a la modificación estructural realizada a GL esta conserva su actividad, sin embargo se tiene una diferencia de respuesta entre las líneas celulares, ya que InBl presenta una detención en la fase G₂/M, lo que hace pensar que InBl presentaría otras características que no presentan CaLo y HeLa y que se pueden deber al estado y tipo del carcinoma epidermoide. Del análisis de ciclo celular surge la interrogante si el tipo de neoplasia que presentan las células CaLo, HeLa e InBl es determinante para la respuesta a GL y CAM por lo que sería conveniente en el futuro una evaluación más consistente que permita concluir tajantemente este punto, como se ha reportado para otros flavonoides (Lee, 2004; Kee-Lung, 2004). Con respecto al decremento en el número celular, junto con la evaluación de viabilidad, se sugiere que las células de las tres líneas tumorales presentan por un lado una posible muerte necrótica (ya que el colorante azul tripano al teñir el interior de las células revela que la membrana se encuentra dañada), y una inducción de muerte apoptótica como lo revela la presencia de cuerpos apoptóticos observados en las tres líneas, por lo que se debe establecer con mayor precisión utilizando marcadores de membrana celular para apoptosis en conjunto con pruebas de exclusión de colorantes para determinar la proporción de células que están experimentando apoptosis por un lado y necrosis por otro.

Es necesario realizar una caracterización completa de las propiedades antitumorales que pudiera presentar la glabranina para poder hacer una valoración correcta de su uso como agente terapéutico o preventivo en el desarrollo del carcinoma cervical así como aportar evidencia de sus propiedades antitumorales que pudieran ser de utilidad para su empleo en el tratamiento de otros tipos de cáncer.

CONCLUSIONES

- La glabranina y su derivado inducen una disminución de la densidad celular en cultivos *in vitro* de células provenientes de cáncer cérvico-uterino.
- La glabranina presenta una IC₅₀ de 26 µg/ml para las células CaLo y HeLa y de 30 µg/ml para las células InBl.
- CAM presenta una IC₅₀ de 30 µg/ml en las tres líneas celulares CaLo, HeLa e InBl.
- GL y CAM no inducen detención del ciclo celular en las líneas celulares CaLo y HeLa.
- GL y CAM inducen detención del ciclo celular en la línea celular InBl.
- La actividad citotóxica de GL no se altera con la modificación de su grupo prenilo como lo demuestra la valoración que se hace de CAM.
- GL y CAM inducen muerte celular por necrosis y apoptosis.

REFERENCIAS

1. Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Raberts & J. D. Watson. 1994. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing inc. New York. pp. 1294.
2. Alonso, P., E. Lazcano y M. Hernández. 2000. Cáncer cérvico-uterino: diagnóstico, prevención y control. Editorial Médica Panamericana. México. pp 254.
3. Ahn, W. S., S. W. Huh, S-M. Bae, I. P. Lee, J. M. Lee, S. E. Namkoong, Ch. K. Kim, J-I. Sin. 2003. A Major Constituent of Green Tea, EGCG, Inhibits the Growth of a Human Cervical Cancer Cell Line, CaSki Cells, through Apoptosis, G1 Arrest, and Regulation of Gene Expression. DNA and Cell Biology, 22 (3): 217-224.
4. Anthony, C. P. & G. A. Thibodeau. 1991. Anatomía y fisiología. 10ª Edición. Nueva Editorial Interamericana. México. pp. 724.
5. Arora, A., T. M. Byrem, M. G. Nair & G. M. Strasburg. 2000. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. Archives of Biochemistry and biophysics, 373: 102-109.
6. Azcon-Bieto, J. & M. Talon. 1993. Fisiología y bioquímica vegetal. Interamericana-McGraw-Hill. pp 581.
7. Beniston, R. & Campo, M. 2003. Quercetin elevates p27(Kip1) and arrests both primary and HPV16 E6/E7 transformed human keratinocytes in G1. Oncogene, 35: 5504-14.
8. Bianchi, M. E. & A. Manfredi. 2004. Chromatin and cell death. Biochimica et Biophysica Acta, 1677: 181-186.
9. Biondi, D.M., C. Rocco & G. Ruberto. 2003. New dihydrostilbene derivates from leaves of *Glycyrrhiza glabra* and evaluation of their antioxidant activity. Journal of Natural Products, 66: 477-480.
10. Bowen, I. & Bowen S. M. 1990. Programmed cell death in tumor and tissues. Chapman and Hall, London. pp 268.
11. Brownson, D. M., N. G. Azios, B. K. Fuqua, S. F. Dharmawardhane & T. J. Mabry. 2002. Flavonoid effects relevant to cancer. Journal of Nutriology, 132: 3482S-3489S.
12. Bruneton, J. 1991. Elementos de fitoquímica y farmacognosia. Editorial Acribia. Zaragoza. pp 171.

13. Callen, J-C. 2000. *Biología celular: de las moléculas a los organismos*. CECSA. México. pp 488.
14. Cano, Arturo. E. 1998. Estudio químico de tres especies vegetales mexicanas del género *Esenbeckia* (Rutaceae). Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
15. Chen, T., J. Li, J. Cao, Q. Xu, K. Komatsu & T. Namba. 1999. A new flavanone isolated from *Rhizoma smilais ssp glabrae* and the structural requirements of its derivatives for preventing immunological hepatocyte damage. *Planta Medica*, 65: 56-59.
16. de Vita, T., A. R. Steven & H. Samuel. 1993. *Principles and practice oncology*. 4a edition, USA Company. New York. pp 989.
17. Fidler, I.J., G. Zhang, R. D. Radinsky, T. Fujimaki. 1999. The biology of melanoma brain metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 18(3): 387-400.
18. Frankel, E. N., A. L. Waterhouse & J. E. Kinsella. 1993. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet*, 342: 1103-1104.
19. Garrod, D.R. 1976. *La base celular del desarrollo*. Ediciones Omega S. A. Barcelona. pp 72.
20. Gupta, S., F. Afaq & H. Mukhtar. 2001. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287: 914-920.
21. Haraguchi, H., K. Tanimoto, Y. Tamura, K. Mizutani & T. Kinoshito. 1998. Mode of antibacterial action of retrohalones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, 48: 125-129.
22. Harborne, J. B. 1999. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27: 335-368.
23. Harborne, J. B. & C. A. Williams, 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55: 481-504
24. Herber, D. and G.L.W. Go. 1999. *Nutritional Oncology*. Cancer Treatment Research, Academic Press. San Diego. pp 632.
25. Hertog, M. G. L., E. J. M. Feskens, P. C. H. Hollma, M. B. Katan & D. Kromhout. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and the risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*, 342: 1007-1011.

26. Jang, D. S., M. Cuedent, M. E. Hawthorne, L. B. S. Kardono, K. Kawanishi, H. H. S. Fong, R. G. Mehta, J. M. Pezzuto & A. D. Kinghorn. 2002. Prenylated flavonoids of the leaves of *Macaranga conifera* with inhibitory activity against cyclooxygenase-2. *Phytochemistry*, 61: 867-872.
27. John-Sup, P., K. Eun-Joo, L. Jung-Youn, S. Hong-Sig, N. Sung-Eun & U. Soo-Jong, 2001. Functional inactivation of p73, a homolog of p53 tumor suppressor protein, by human papillomavirus E6 proteins. *International Journal of Cancer*, 91: 822-827.
28. Johnson T.C. 1994. Negative regulators of cell proliferation. *Pharmacology Therapy*, 62: 247-265.
29. Keleg, S., P. Büchler, R. Ludwin, M. W. Büchler & H. Fries. 2003. Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Molecular Cancer*, 2(14): 1-7.
30. Kee-Lung, Ch., K. Mei-Lang, Ch. Nan-Haw & S. Shu-Jem. 2004. Genistein arrest hepatoma cells at G2/M phase: involvement of ATM activation and upregulation of p21^{waf1/cip1} and Wee1. *Biochemical Pharmacology*, 67: 717-726.
31. Kim, H. J., E. R. Wood, C. G. Shin & H. Park. 1998. A new flavonol gallate ester from *Acer* and its inhibitory activity against HIV-1 integrase. *Journal of Natural Products*, 61: 145-148.
32. Kueng, W., E. Silver & V. Eppenberg. 1989. Quantification of cells cultured on 96-wells plates. *Analytical Biochemical*, 186: 16-19.
33. Lea, P. J. & R. C. Leegood. 1993. *Plant biochemistry and molecular biology*. John Wiley & Sons. England. pp 312.
34. Lee, R., Y. J. Kim, Y. J. Lee & H. W. Chung. 2004. The selective effect of genistein on the toxicity of bleomycin in normal lymphocytes and HL-60 cells. *Toxicology*, 195: 87-95.
35. Li, B. Q., T. Bu, Y. D. Yan, N. W. Baylor, F. W. Ruscetti & H. F. Kung. 1997. Inhibition of HIV by baicalin. *Cellular Molecular Biological Research*, 39: 119-124.
36. Lin, Y. M., H. Anderson, M. T. Flavin & Y. H. Pai. 1997. In vitro anti-HIV activity of biflavonoids from *Rhus succedanea*. *Journal of natural products*, 60: 884-888.
37. Lira, H. H. 2001. Análisis de la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I en ocho líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino. Tesis de licenciatura. FES-Zaragoza. UNAM. México.

38. Longworth, M. S. & L. A. Laimins. 2004. Pathogenesis of human papilloviruses in differentiating epithelia. *Microbiology and molecular Biology Reviews*, 68: 362-372.
39. Lopéz-Marure, R., L. Sánchez, M. A. Chávez y B. Weiss. 2000. Participación de las proteínas supresoras de tumor (RB y p53) y los complejos CDK-Ciclina en el control del ciclo celular. *Boletín de Educación Bioquímica*, 17(2): 69-78.
40. Mann, J. 1987. *Secondary metabolism*. 2a edition. Oxford Science Publication. Great Britain. pp 374.
41. Mathews, C. K. y K. E. van Holde. 1998. *Bioquímica*. McGraw-Hill Interamericana. España. pp 1283.
42. McLaughlin, F., P. Finn & N. B. La Thangue. 2003. The cell cycle, chromatin and cancer: mechanism-based therapeutics come of age. *Drug Discovery Today*, 8: 793-802.
43. Mitscher, L. A., G. S. Raghev-Rao, Y. Khanna, T. Veysogw & S. Drake. 1983. Antimicrobial agents from higer plants: prenilated flavonoids and other phenols from *Glycyrrhiza lepidota*. *Phytochemistry*, 22: 573-576.
44. Miyase, T., M. Sano, H. Nakai, M. Muraoka, M. Nakazawa, M. Suzuki, K. Yoshino, Y. Nishihara & T. Tanai. 1999. Anti-oxidants from *Lespedeza homoloba*. (I). *Phytochemistry*, 52: 311-319.
45. Morgan, S. J. y D. C. Darling. 1993. *Cultivo de células animales*. Editorial Acribra. España. pp 159.
46. Monroy, A., R. Rangel, L. Rocha, C. Trejo, J. L. Ramírez, R. Dario & B. Weiss. 1992. Establecimiento de siete estirpes celulares provenientes de biopsias de cérvix normal y con cáncer cérvico-uterino y sus diferentes contenidos y localizaciones de desmogleina-1. *Oncología*, 7: 69-76.
47. Muñoz, N. & X. Bosch. 1997. Cervical cancer and human papillomavirus: Epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud Publica México*, 39: 174-282.
48. O'Prey, J., J. Brown, J. Fleming & P. R. Harrison, 2003. Effects of dietary flavonoids on major signal transduction phatways in human epithelial cells. *Biochemical Pharmacology*, 66: 2075-2088
49. Pardo, F. J. 1988. *Anatomía, patología general y especial de las neoplasias*. Editorial Científico-Médica. España. pp 355.
50. Sánchez, I., F. Gómez-Garibay, J. Taboada, & B. H Ruiz. 2000. Antiviral Effect of Flavonoids on the Dengue Virus. *Phytotherapy Research*, 14(2): 89-92.

51. Shing-Chuan, S., K. Ching, T. Shi-Wen, T. Shu-Huei & C. Yen-Chou. 2004. Structurally related antitumor effects of flavanones in vitro and in vivo: involvement of caspase 3 activation, p21 gene expression, reactive oxygen species production. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 197: 84-95.
- 52.Sizer, F. S. & E. N. Witney. 2000. Nutrition, concepts and controversies. Wadsworth Thompson Learning. United States of America. pp 428.
53. Sonnenschein, C. & A. M. Soto. 1999. The society of cells: cancer and control of cell proliferation. Bios Scientific Publishers. New York. pp 154.
54. Studzinski, G. P. 1995. Cell growth and apoptosis. Oxford University Press. New York. pp 269.
55. Vera, R. I. 2002. Obtención y evaluación biológica de los derivados químicos de la glabranina, producto natural de *Esebeckia berlandieri ssp acapulcensis*. Tesis licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
56. Verma, A. K., A. J. Johnson, M.N. Gould & M. A. Tanner. 1988. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene y N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Research*, 48(20): 5754-5758.
57. Wang, H.-K. 2000. The therapeutic potential. *Expert Opinion Investigation Drugs*, 9(9): 2103-2119.
58. Wang, H.-K., Y. Xia, Z.-Y. Yang, Morris, S. L. Natschke & K.-H. Lee. 1998. Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumour and anti-HIV agents. *Advances in Experimental Medical Biology*, 439: 191-225.
59. Wang, H., M. G. Nair, G. M. Strasburg, Y.-C. Chang, A. M. Booren, J. I. Gray & D. L. Dewitt. 1999. Antioxidant and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglycone, cyaniding, from tart cherries. *Journal of Natural Products*, 62: 294-296.
60. Weinberg, R. A. 1996. How cancer arises. *Scientific american*, 275(3): 62-70.
61. Welch, P.R., P. S. Steeg & W. R. Rinker-Schnefer. 2000. Molecular biology of breast cancer metastasis: Gene regulation of human breast carcinoma metastasis. *Breast Cancer Research*, 2: 408-416.
62. Williams, C.A., J. B. Harborne, H. Geiger & J. R. S. Houtl. 1999. The flavonoids of *Tenacetum parthenium* and *T. Vulgare* and their anti-inflammatory properties. *Phytochemistry*, 51: 417-423.

63. Xu, Q., K. Yuan, J. Lu, R. Wang & F. Wu. 1997. A new strategy for regulating the immunological liver injury-effectiveness of DTH-inhibiting agents on DTH-induced liver injury to picryl chloride. *Pharmacological Research*, 36: 402-409.
64. Yocota, J. 2000. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 21(3): 497-503.
65. Yokoyama, M., M. Noguchi, Y. Nakao, A. Peter & T. Iwasaka. 2004. The tea polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate effects on growth, apoptosis, and telomerase activity in cervical cell lines. *Gynecologic Oncology*, 92: 197-204.
66. You, K. M., K. H. Son, H. W. Chang, S. S. Kang, & H. P. Kim. 1998. Vitexicarpin, a flavonoid from the fruits of *Vitex rotundifolia*, inhibits mouse lymphocyte proliferation and growth of cell lines *in vitro*. *Planta Medica*, 64: 546-550.
67. Zentella, A., R. López-Marure, E. Gómez, R.E. Paredes y Ma. de J. Ibarra. 1995. El ciclo celular y su regulación: la interacción entre las proteínas cinasas CDKs y la familia de las ciclinas. *Boletín de Educación Bioquímica*, 15(1): 4-12.

APÉNDICE

RPMI 1640

Componente	mg / l
L-arginina (base libre)	200
L-asparagina	50
Ácido L-aspártico	20
L-cistina	50
Ácido L-glutámico	20
L-glutamina	300
Glicina	10
L-histidina (base libre)	15
L-hidroxiprolina	20
L-iso-leucina	50
L-leucina	50
L-lisina HCl	40
L-metionina	15
L-fenilalanina	15
L-prolina	20
L-serina	30
L-treonina	20
L-triptofano	5
L-tirosina	20
L-valina	20
Biotina	0.2
D-Ca pantotenato	0.25
Cloruro de colina	3
Ácido fólico	1
i-inositol	35
Nicotinamida	1
Riboflavina	0.2
Tiamina HCl	1
Vitamina B12	0.005
Piridoxina HCl	1
Ácido p-aminobenzoico	1
KCl	400
MgSO ₄ 7 H ₂ O	100
NaCl	6 000
NaHCO ₃	2 200
Na ₂ HPO ₄ 7 H ₂ O	1 512
CaNO ₃ 4 H ₂ O	100
D-glucosa	2 000
Glutation reducido	1
CO ₂ fase de gas	5 %

Verseno

EDTA (Sigma Chem. USA)	0.40 g
NaCl (Sigma Chem. USA)	8.00 g
KCl (Sigma Chem. USA)	0.40 g
Tris (Sigma Chem. USA)	3.04 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.7 con HCl 1N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza a una presión de 1.20 kg/cm² durante 15 minutos. Se almacena a 4 °C.

Amortiguador salino de fosfatos (PBS)

MgCl ₂ (Sigma Chem. USA)	0.10 g
CaCl ₂ (Sigma Chem. USA)	0.10 g
NaCl (Sigma Chem. USA)	8.00 g
KCl (Sigma Chem. USA)	0.20 g
Na ₂ HPO ₄ (Sigma Chem. USA)	2.16 g
KH ₂ PO ₄ (Sigma Chem. USA)	0.20 g

El MgCl₂ y CaCl₂ se disuelve en 100 ml de agua bidestilada. Las sales restantes, por separado se diluyen en 800 ml de agua bidestilada y después se mezclan ambas soluciones. Se ajusta el pH a 7.2 utilizando HCl 1 N y se afora a 1000 ml. Se esteriliza usando filtro (Millipore) de poro de 0.22 µm y se almacena a 4 °C.

Glutaraldehído

A 1.57 ml de glutaraldehído (70 % v/v) se le agrega 98.43 ml de agua bidestilada, Se almacene a 4 °C.

Colorante azul tripano

Para pruebas de viabilidad celular se emplea colorante azul tripano (Sigma, chem. USA) al 0.3% en PBS. Antes de su uso el colorante es filtrado en papel Whatman No. 2.

Solución cristal violeta (0.1 %)

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

NaOH (Sigma Chem. USA)	3.96 g
Ácido fórmico (Sigma Chem. USA)	4.28 ml
Cristal violeta (Sigma Chem. USA)	1.00 g

Solución de ácido acético (10 %)

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

Desactivación de suero fetal bovino (SFB)

El SFB es descongelado a temperatura ambiente, posteriormente es puesto a baño de agua a 56° C durante 30 minutos. Posteriormente se preparan alícuotas de 40 ml en tubos cónicos de plástico.