



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO DEL FLAVONOIDE MORINA SOBRE EL CICLO CELULAR EN UN
MODELO *IN VITRO* DE CÁNCER DE FARINGE.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARIANA CAMACHO SANTANA



Ciudad Universitaria, CDMX

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARINA GAVILANES RUIZ.
VOCAL: GLORIA GUTIERREZ VENEGAS.
SECRETARIO: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA.
1er. SUPLENTE: GERARDO DAVID ANAYA EUGENIO.
2° SUPLENTE: ITZEL SUSANA DE LA ROSA LARA.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA EN LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN, DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Gloria Gutiérrez Venegas

SUSTENTANTE (S):

Mariana Camacho Santana

índice

ÍDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	III
ABREVIATURAS.....	V
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1 Cáncer.....	2
2.1.1 Definición de neoplasia, cáncer y metástasis.....	2
2.1.2 Clasificación.....	2
2.1.3 Desarrollo de cáncer.....	2
2.1.4 Causas de cáncer.....	4
2.1.5 Genes y cáncer.....	5
2.1.6 Fenotipo de células malignas.....	5
2.2 Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.....	6
2.3 Ciclo Celular.....	7
2.3.1 Fases del ciclo celular.....	7
2.3.1.1 Interfase.....	8
2.3.1.2 Mitosis.....	9
2.3.2 Regulación del ciclo celular.....	11
2.3.2.1 Señales extracelulares.....	11
2.3.2.2 Señales intracelulares.....	11
2.3.2.3 Complejos Ciclina-CDK.....	13
2.3.2.3.1 Ciclina H.....	14
2.3.2.3.2 Ciclina D y ciclina E.....	15
2.3.2.3.3 Ciclina A.....	18
2.3.2.3.4 Ciclina B.....	19
2.3.2.4 Inhibidores de CDK.....	23
2.3.2.4.1 p53.....	25
2.3.3 Ciclo celular y cáncer.....	28
2.3.4 Ciclo celular como blanco terapéutico contra el cáncer.....	30
2.4 Alternativas terapéuticas para el CACYC.....	31
2.5 Flavonoides.....	31
2.5.1 Estructura química, síntesis y clasificación de los flavonoides.....	31
2.5.2 Actividades biológicas de los flavonoides.....	34
2.5.3 Absorción y metabolismo de los flavonoides.....	34
2.6 Morina.....	34
2.6.1 Características y localización.....	35
2.6.2 Actividades biológicas de morina.....	35
3. ANTECEDENTES.....	36
3.1 Flavonoides y cáncer de faringe.....	36
3.2 Flavonoides, cáncer y arresto del ciclo celular.....	37
3.3 Morina, cáncer y arresto del ciclo celular.....	38

4. JUSTIFICACIÓN.....	40
5. HIPÓTESIS.....	41
6. OBJETIVOS.....	42
6.1 Objetivo general.....	42
6.2 Objetivos particulares.....	42
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
7.1 Material y equipo.....	43
7.2 Softwares.....	43
7.3 Metodología.....	43
7.3.1 Cultivo celular de cáncer de faringe.....	43
7.3.2 Viabilidad celular.....	43
7.3.3 Migración celular.....	44
7.3.4 Tratamiento celular para curso temporal.....	44
7.3.5 Western Blot.....	44
7.3.6 Análisis estadístico.....	45
8. RESULTADOS.....	47
8.1 Efecto de la morina sobre la viabilidad en la línea celular FaDu.....	47
8.2 Efecto de la morina sobre la migración celular de FaDu.....	48
8.3 Efecto de la morina sobre los niveles de la ciclina D1 y su forma fosforilada Thr 286 en la línea celular FaDu	50
8.4 Efecto de la morina sobre los niveles de la ciclina A en la línea celular FaDu.....	52
8.5 Efecto de la morina sobre los niveles de la ciclina B1 en la línea celular FaDu...	53
8.6 Efecto de la morina sobre los niveles de p53 en la línea celular FaDu.....	54
9. DISCUSIÓN.....	55
10. CONCLUSIONES.....	61
11. REFERENCIAS.....	62
ANEXO A.....	69
ANEXO B.....	70

Índice de figuras y tablas

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Etapas principales de la generación de cáncer.....	3
2. Etapas para el desarrollo de cáncer.....	4
3. Regiones de generación del cáncer de cabeza y cuello.....	6
4. Fases del ciclo celular.....	8
5. Progresión de la interfase en el ciclo celular.....	9
6. Progresión de la mitosis en el ciclo celular.....	10
7. Señales que intervienen en el control del número celular.....	11
8. Puntos de control en el ciclo celular.....	12
9. Expresión de las ciclinas durante el ciclo celular.....	13
10. Fosforilación de una proteína diana por el complejo CDK-ciclina.....	14
11. Señales exógenas y vías de señalización.....	15
12. Regulación negativa del ciclo celular.....	16
13. Funciones de la ciclina D1 independientes de CDK.....	17
14. Regulación de los niveles de ciclina B en el ciclo celular.....	19
15. Regulación de la activación e inhibición del complejo ciclina B- Cdk1 en el ciclo celular.	20
16. Translocación de la ciclina B mediada por la fosforilación en el ciclo celular.....	21
17. Activación e inhibición de la ciclina B1.....	22
18. FPM induce cambios nucleares y citoplasmáticos en proteínas estructurales.....	23
19. Regulación de la transición de G1 a S por Cip/Kip.....	24
20. Papel de las proteínas INK4 y la pérdida de Rb y Cip/Kip en el ciclo celular.....	24
21. Blancos sobre los que actúa p53 y su regulación post traduccional de p53.....	27
22. Estructura química básica de los flavonoides.....	32
23. Estructura química de los flavonoides.....	32
24. Estructura química de la morina.....	34
25. Efecto de la morina sobre la viabilidad en la línea celular FaDu.....	47
26. Efecto de la morina 100µM sobre la migración celular de FaDu.....	48
27. Gráfico del porcentaje de migración celular en grupo control y con tratamiento.....	49
28. Efecto de la morina sobre los niveles de la ciclina D1 y su forma fosforilada en la línea celular FaDu.....	50
29. Efecto de la morina sobre los niveles de la ciclina A en la línea celular FaDu.....	52
30. Efecto de la morina sobre los niveles de la ciclina B en la línea celular FaDu.....	53
31. Efecto de la morina sobre los niveles de p53 en la línea celular FaDu.....	54
32. Mecanismo de motilidad celular.....	56
33. Efecto de la morina 150µM sobre la migración celular de FaDu.....	69
34. Efecto de la morina sobre la forma fosforilada de la ciclina B1 en la línea celular FaDu..	70

ÍNDICE DE TABLAS

1. Ejemplos de virus causantes de cáncer.....	4
2. Inhibidores selectivos de CDKs de segunda generación.....	30
3. Estructura química de diferentes grupos de flavonoides y ejemplos.....	32
4. Morina, cáncer y arresto del ciclo celular.....	39
5. Diluciones de anticuerpos.....	45
6. Porcentajes de migración celular.....	49

Abreviaturas

APC/C	Anaphase Promoting Complex o Cyclosome
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
Akt	Protein kinase B (PKB)
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
CACYC	Carcinoma de cabeza y cuello
CAKs	Cinasas activadoras de Cdk
CBP	Proteína de unión a CREB
Cdc25c	Fosfatasa 3 inductora de fase M
CDC6	Cell division cycle 6
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas
CKIs	Inhibidores de CDK
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA-PK	Double-stranded DNA-dependent protein kinase
ECG	Epicatequin galato
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal
ERK	Extracellular signal–regulated kinases
FPM	Factor Promotor de Mitosis
G0	Gap 0
G1	Gap 1
G2	Gap 2
GSK-3 β	Glucógeno sintasa cinasa-3 β
HATs	Histonas acetiltransferasas
HVSK	Herpes asociado con sarcoma de Kaposi
LIMK1	LIM kinase-1
M	Mitosis
MCM	Proteínas de mantenimiento de mini-cromosomas
MDM2	Murine doble minute 2
MOMP	Permeabilidad de membrana externa mitocondrial
OMS	Organización Mundial de la Salud
PI3-K	Phosphoinositide-3 kinase

Plk1	Polo-like kinase1
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
RB	Retinoblastoma
ROCK	Rho-associated kinase
RPA	Proteína de replicación A
S	Síntesis
SAC	Punto de control de la mitosis o también punto de control del ensamblaje del huso
Ser	Serina
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
VEB	Virus de Epstein-Bar
VPH	Virus de papiloma humano

1. Resumen

El carcinoma de cabeza y cuello (CACYC) es un conjunto de diferentes tipos de cáncer que se origina en células escamosas que recubren las mucosas de vías aerodigestivas superiores como la faringe. México se encuentra entre los primeros 5 lugares de América Latina en CACYC y, a pesar de que existen alternativas terapéuticas, sólo la mitad de las personas afectadas sobreviven. Existen diferentes genes cuya mutación induce al desarrollo de tumores y están relacionados con el control del ciclo celular, por ejemplo: genes que codifican para las CDKs, ciclinas, CKIs y proteínas involucradas en los puntos de control. Por esa razón, el ciclo celular representa un posible blanco terapéutico para el tratamiento de diversos tipos de cáncer y la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas se ha convertido en el principal objetivo de estudio de diferentes grupos de investigadores. Por ejemplo, los flavonoides son compuestos naturales de los cuales se han reportado diversas actividades biológicas entre las cuales podemos mencionar su actividad anti-cancerígena. La morina pertenece a este grupo de compuestos, es un flavonol encontrado en diferentes especies de plantas de la familia *Moraceae* y se tienen reportes donde suprime la proliferación en diferentes células tumorales; sin embargo, la información en cáncer de faringe es escasa. Por esta razón, el objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto citotóxico de este compuesto en la línea celular *FaDu* por medio de un ensayo de viabilidad celular (MTT). Por otro lado, también se evaluó el efecto del flavonoide sobre la migración celular en diferentes tiempos y, por un ensayo de Western blot, se evaluó el nivel de proteínas relacionadas con la regulación del ciclo celular. Con base en los resultados obtenidos podemos sugerir que el efecto citotóxico que el flavonoide presenta, se debe a un arresto en el ciclo celular durante la transición G2/M en tiempos largos y concentraciones bajas; sin embargo, esta concentración no es suficiente para observar un efecto sobre la migración celular. Por otro lado, con concentraciones mayores (200µM), morina puede inducir un arresto en las fases G1 y S. Esto se sugiere ya que en los resultados se observó una baja en la expresión de las ciclinas D1, A y B así como en la fosforilación de la ciclina D1. Además, la expresión del supresor de tumores, p53, no se vio afectada, lo que nos sugiere que no está relacionado con el efecto del flavonoide morina. Con este trabajo se concluye que la morina posee un efecto anti-cancerígeno en la línea celular de cáncer de faringe: *FaDu*; y da lugar a nuevos proyectos que profundicen en el mecanismo de acción de este compuesto, con lo cual se podría favorecer el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos contra el cáncer de faringe de células escamosas.

2. Introducción

2.1 Cáncer.

2.1.1 Definición de neoplasia, cáncer y metástasis.

Las enfermedades que se caracterizan por un crecimiento o alteración en las células de los tejidos generando un aumento en su volumen se denominan neoplasias o tumores, los cuales pueden ser benignos o malignos [1].

Se conoce como cáncer a las neoplasias malignas y se caracteriza por la presencia de células anormales que tienen la capacidad de multiplicarse e invadir tejidos cercanos e incluso pueden diseminarse a otras partes del cuerpo a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático. Al proceso por el cual las células tumorales invaden y destruyen órganos y tejidos se le denomina metástasis [1].

El cáncer es un proceso que consta de diferentes fases donde se involucran una serie de eventos que pueden darse por la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que permiten la transformación de células sanas [2]. Dentro de las características de una célula maligna se pueden mencionar: la proliferación independiente de factores de crecimiento, la evasión de apoptosis y la capacidad de generar metástasis y angiogénesis [2].

2.1.2 Clasificación

Con base en el tipo celular, los tumores malignos pueden ser clasificados y nombrados como [3]:

- a. Carcinomas: corresponden al 90 % de los tipos de cáncer y se da en células epiteliales.
- b. Sarcomas: son tumores sólidos poco comunes en tejido conjuntivo como músculo, hueso, cartílago y tejido fibroso.
- c. Leucemias y linfomas: abarcan el 8 % de los diferentes tipos de cáncer. Son alteraciones en células de la sangre y del Sistema Inmunitario.

2.1.3 Desarrollo del cáncer.

Es un proceso que consta de diferentes pasos y se da principalmente en dos tiempos: la conversión y el desarrollo neoplásico. Estos a su vez abarcan tres etapas: iniciación, promoción y progresión (Figura 1). En la etapa de iniciación se dan alteraciones en el ácido desoxirribonucleico (DNA), las cuales pueden ser reparadas o expresadas. Si son expresadas, se desarrollan las células neoplásicas. Cuando empiezan a crecer y existen fallas en el sistema inmunitario, se promueve la aparición de tumores benignos que pueden transformarse a malignos hasta llegar a metástasis [4].

El proceso del desarrollo de cáncer va desde mutaciones y selección de células con alta capacidad proliferativa hasta la supervivencia e invasión [3].

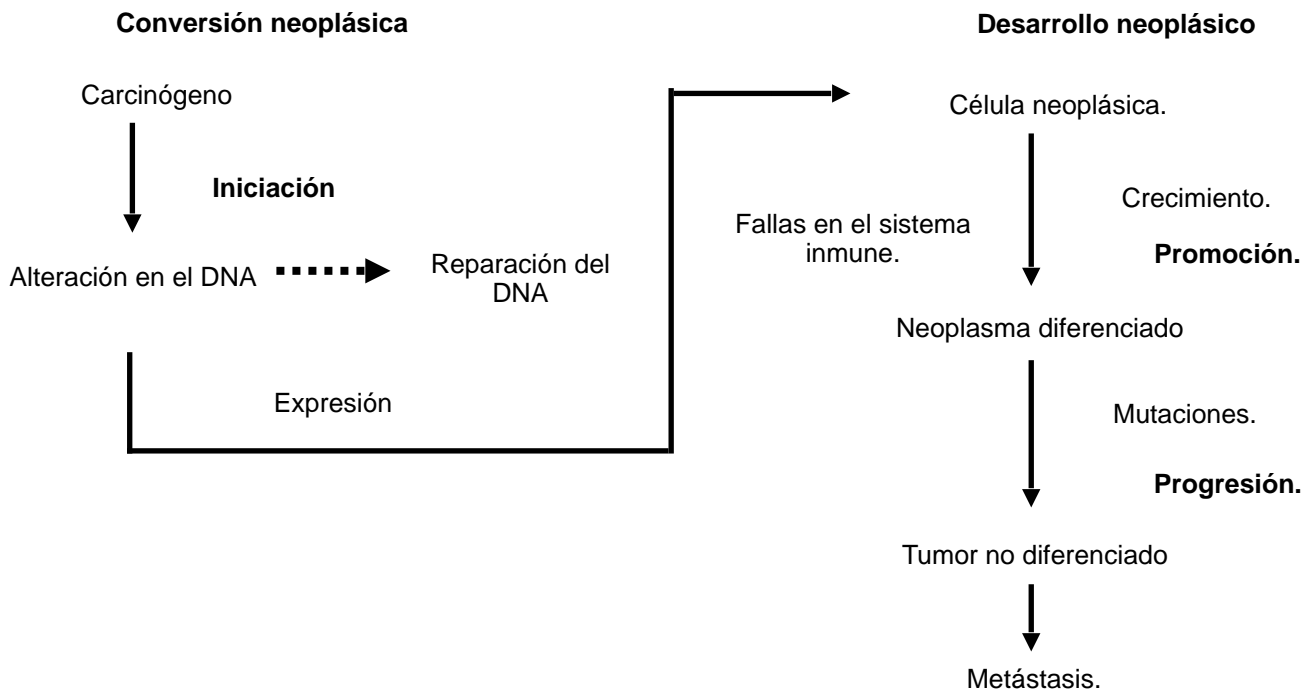


Figura 1. Etapas principales de la generación de cáncer. (Modificado de Hernández Luis, F., et al. 2014. Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM) [4].

En la figura 2 se ilustran las etapas por las que tiene que pasar alguna neoplasia [3,6]:

1. Inicio de la formación del tumor, donde se observa la expresión de mutaciones favoreciendo la división anormal de la célula.
2. Las células alteradas proliferan incrementando el tamaño de órganos y tejidos, a este proceso se le conoce como hiperplasia. Aquí las células pueden experimentar nuevas alteraciones genéticas aumentando su capacidad proliferativa.
3. En la displasia se observa una alteración en forma, tamaño y organización de las células.
4. En este punto las células ya son anormales tanto en su crecimiento como en su morfología. Hay una displasia severa y se tiene un "carcinoma *in situ*" ya que el tumor continúa en el lugar de origen.
5. Pueden experimentarse nuevas mutaciones que le permitan a las células migrar e invadir otros tejidos. En este caso, el tumor es maligno y con capacidad de invasión, generando metástasis.

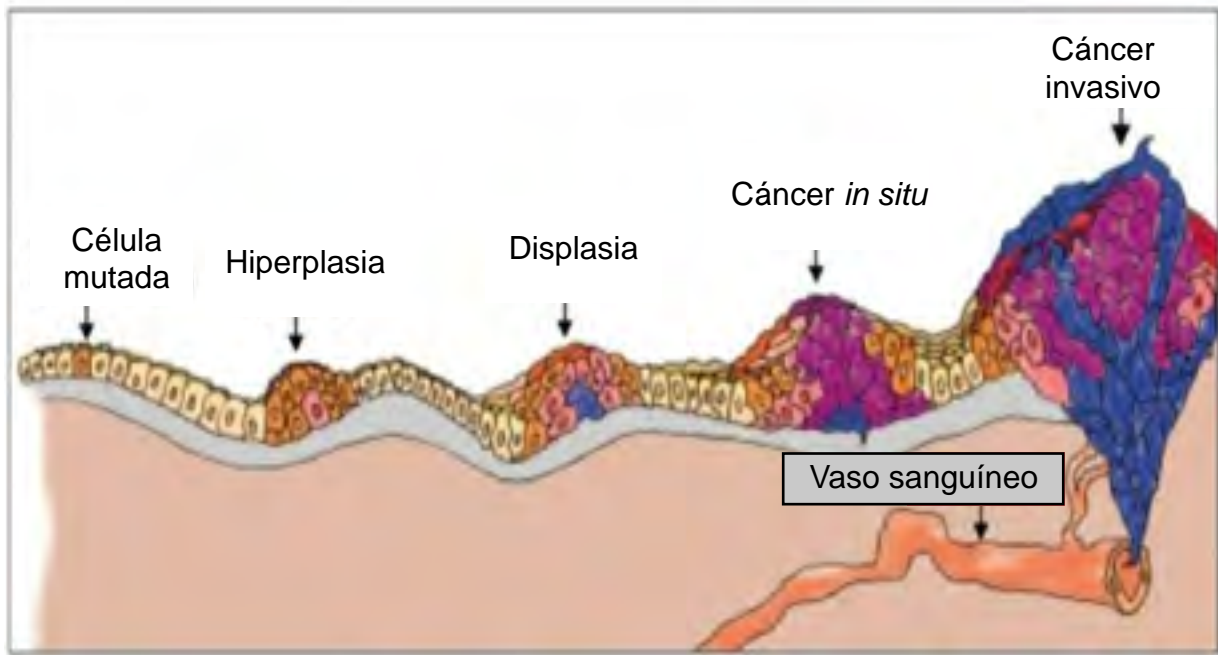


Figura 2. Etapas para el desarrollo de cáncer. (Modificado de National Institutes of Health, 2007) [95].

2.1.4 Causas de cáncer

Las causas del cáncer pueden agruparse en:

- Factores ambientales.
- Factores ambientales que interactúan con predisposición genética.
- Factores desconocidos.

Sin embargo, la predisposición genética influye en pocos tipos de cáncer, siendo los factores ambientales los responsables del 90 al 95 % de estas enfermedades [5].

Se conocen como carcinógenos a los agentes capaces de generar cáncer. Entre estos podemos encontrar algunos agentes virales, sustancias químicas y agentes físicos [3].

En la tabla 1, se mencionan algunos de los virus que pueden ser causantes de cierto tipo de cáncer.

Tabla 1. Ejemplos de virus causantes de cáncer.

Virus	Cáncer
Virus de Epstein-Bar (VEB).	Linfoma de Burkitt
Virus de papiloma humano (VPH).	Cáncer cervical y cáncer de faringe.
Virus de la hepatitis.	Cáncer de hígado.
Herpes asociado con sarcoma de Kaposi (HVSK).	Sarcoma de Kaposi.

Modificada Hernández Luis, F., et al. (UNAM) [4].

Por otro lado, en el caso de los agentes químicos y físicos podemos mencionar que la radiación y la exposición a ciertas sustancias inducen el daño al DNA favoreciendo la aparición de mutaciones [3]. Un ejemplo son los carcinógenos presentes en el humo del cigarro como el benzopireno, benzoantraceno y componentes con níquel. Se sabe que el cigarro es una de las principales causas de cáncer ya que es responsable de casi un 80 % de los cánceres de pulmón, cavidad oral, faringe y laringe [3].

Sin embargo, no todos los componentes que participan en el desarrollo de cáncer son agentes mutagénicos. Existen otros carcinógenos, conocidos como promotores de tumores, que contribuyen con el desarrollo de estas neoplasias, estimulando la proliferación celular [4].

2.1.5 Genes y cáncer.

Dentro del conjunto de genes asociados al desarrollo del cáncer se encuentran los que controlan el ciclo celular; los que están encargados del mecanismo de reparación de DNA; los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores [6]. Los factores ambientales pueden generar mutaciones en estos genes favoreciendo la aparición de neoplasias malignas. Por ejemplo, la mutación de un proto-oncogen genera la activación de oncogenes que estimulan la división celular. Tal es el caso de mdm2, que codifica para una proteína antagonista del supresor de tumores p53, del cual se hablará más adelante. Asimismo, mutaciones en genes supresores de tumores puede ayudar a la célula maligna a evadir el mecanismo de muerte celular y favorecer su proliferación [6,7].

2.1.6 Fenotipo de células malignas

En seguida se mencionan diferentes aspectos en el comportamiento celular que diferencian a los tumores malignos de células normales [3,4]:

- I. Proliferación incontrolable. Hay una pérdida en la inhibición del crecimiento, lo cual se observa mejor en modelos *in vitro*, donde las células no malignas presentan una inhibición dependiente de densidad, entrando a un estado de quiescencia en la fase G0 del ciclo celular.
- II. Autonomía en la proliferación. Células cancerígenas disminuyen sus requerimientos de factores de crecimiento. Estas células producen sus propios factores que estimulan su proliferación.
- III. Disminución de la capacidad de adhesión celular. En células tumorales, existe una baja en la expresión de ciertas moléculas de adhesión, lo que permite que estas células cancerígenas interactúen con células de otros tejidos favoreciendo su metástasis.
- IV. Secreción de proteasas. Las células malignas son capaces de secretar proteasas para digerir componentes de la matriz extracelular e invadir tejidos adyacentes.

-
-
- V. Inducción de angiogénesis. Debido a la producción de factores de crecimiento, hay generación de vasos sanguíneos. Esto favorece el crecimiento del tumor y la inducción de metástasis, ya que aporta oxígeno y nutrientes.
 - VI. Anaplasia. Una característica de las neoplasias es la anormalidad en la diferenciación celular. Es el proceso donde una célula diferenciada cambia a una célula que presenta una naturaleza embrionaria o no diferenciada. Es decir, células cancerígenas son bloqueadas en fases tempranas de diferenciación.
 - VII. Evasión de la muerte celular. Por mecanismos moleculares, estas células muestran resistencia a la apoptosis.

2.2 Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.

Como se mencionó anteriormente, dentro de estas neoplasias malignas encontramos a los carcinomas que son un tipo de cáncer que empieza en la piel o en los tejidos que revisten o cubren los órganos internos [1].

El carcinoma de cabeza y cuello (CACYC) es un conjunto de diferentes tipos de cáncer que se origina en células escamosas que recubren las mucosas de vías aerodigestivas superiores como boca, nariz y garganta [8].

La clasificación del carcinoma de cabeza y cuello depende de su localización. Puede darse en la cavidad oral, cavidad nasal y paranasal, laringe, glándulas salivales o faringe. Esta última, a su vez se divide en orofaringe, nasofaringe e hipofaringe (figura 3).

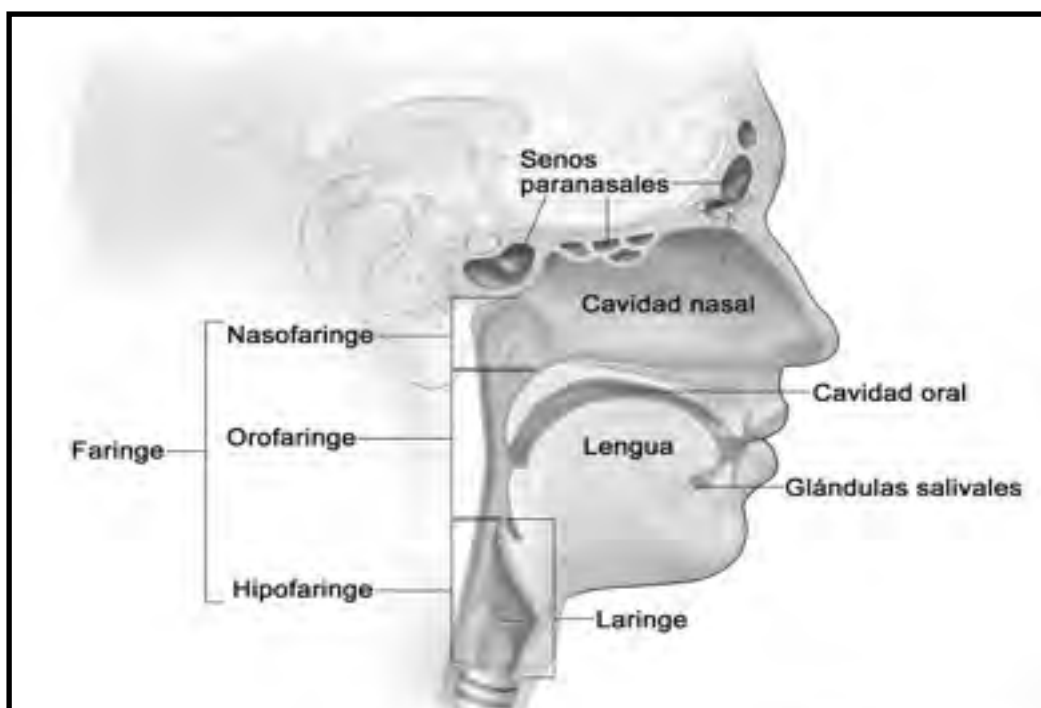


Figura 3. Regiones de generación del cáncer de cabeza y cuello.
(Obtenido de National Cancer Institute, 2016) [95].

Hasta el momento, se han descrito como principales causas que originan a este carcinoma el consumo excesivo de tabaco y de bebidas alcohólicas así como infecciones por el Virus del Papiloma Humano (VPH). También se ha reportado que existen otros factores de riesgo como: la higiene bucal, el Virus de Epstein-Barr (VEB), reflujo gastroesofágico, nutrición, entre otros [9].

En el 2007 se reportó a nivel mundial un 17.6 % de malignidades en la cabeza y cuello de la totalidad de neoplasias malignas. De estos, un 12 % correspondía a carcinomas de células escamosas de las vías aerodigestivas superiores, ocupando el tercer lugar el cáncer de faringe [10]. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia de CACYC ha mostrado un incremento en los últimos años ocupando el sexto lugar a nivel mundial [8,9]. En los últimos 30 años, los tumores malignos se han encontrado dentro de las tres primeras causas de muerte en México [1]. México se encuentra entre los primeros 5 lugares de América Latina en CACYC teniendo un riesgo relativo de 7.5/ 100,000 habitantes [8,9]. Los tratamientos de este tipo de cáncer pueden ser cirugías, radioterapias y quimioterapias. Sin embargo, sólo la mitad de las personas afectadas sobreviven más de cinco años después del diagnóstico [8].

El impacto a nivel mundial que este cáncer tiene, hace que diferentes grupos de investigadores centren su atención en su estudio y en la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento. Es por esta razón que el uso de modelos *in vitro* ha adquirido una gran relevancia, ya que nos permite evaluar, dilucidar y comprender el mecanismo de acción de diferentes compuestos con un posible uso farmacológico.

Las células *FaDu* son una línea celular obtenida a partir de tejido epitelial de hipofaringe. Esta línea celular se obtuvo de un paciente caucásico de 56 años de edad diagnosticado con carcinoma de células escamosas [11]. Éste es un modelo *in vitro* que permite el estudio de diferentes alternativas terapéuticas naturales, como los flavonoides.

2.3 Ciclo celular

El ciclo celular es el conjunto de diferentes eventos que se llevan a cabo con la finalidad de promover el crecimiento y la división celular [12]. Esta duplicación es necesaria para mantener el equilibrio que debe haber entre células sanas y células perdidas por una muerte programada (apoptosis), asegurando que el proceso se realice de forma debida y regulada [12].

2.3.1 Fases del ciclo celular

Este ciclo consta de 2 fases: interfase y mitosis. Ambas a su vez tienen subdivisiones (figura 4). Durante la interfase los componentes celulares y el material genético se duplica, habiendo puntos de control (*check points*) que permiten la regulación del ciclo celular asegurándose de que la célula esté lista para entrar a la segunda fase

denominada Mitosis (M). En esta segunda etapa, también existe un punto de control donde la célula se prepara y se divide, generando dos células hijas iguales a la célula madre; es decir, con el mismo número de cromosomas y la misma información genética [12].

2.3.1.1 Interfase

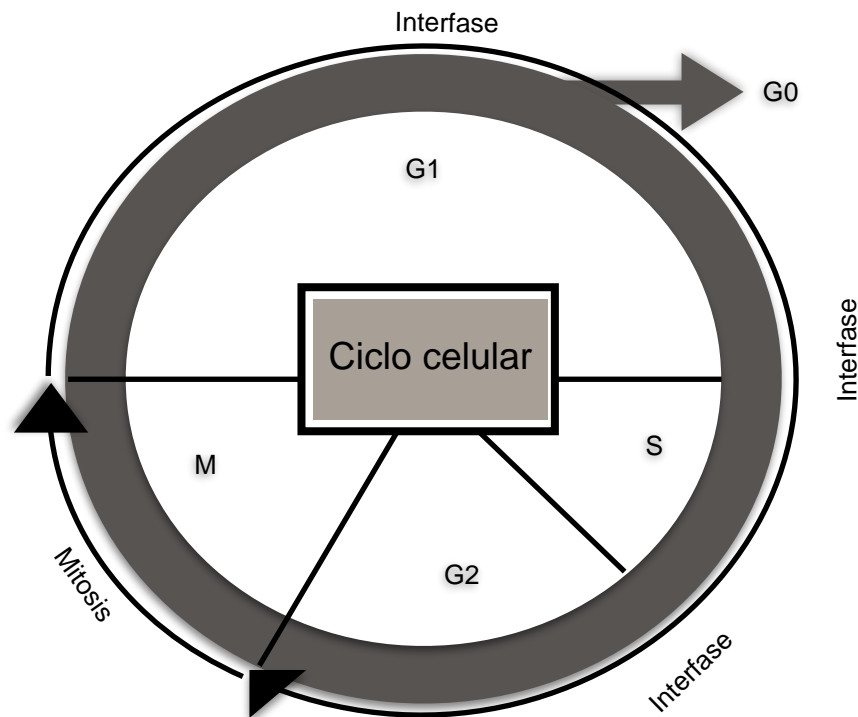


Figura 4. Fases del ciclo celular. Aquí se muestra como el ciclo celular está constituido de dos fases principales: Interfase y Mitosis.

La interfase se subdivide a su vez en 3 fases diferentes (figura 5), siendo la primera la fase G1. En esta fase la célula inicia la preparación para la división celular, por lo tanto es un periodo de actividad bioquímica intensa, ya que la célula aumenta el material enzimático e inicia la replicación de organelos y estructuras citoplasmáticas, aumentando así el tamaño de la célula [12]. Las diferencias en las tasas de división celular se deben a los diferentes tiempos en los que una célula tarda en salir de la fase G1. Esta variación en el tiempo es causada por una fase de reposo donde las células pueden detener su progresión [13]. A este estado de reposo se le conoce como G0 y una célula puede permanecer en él durante días e incluso años antes de continuar con el ciclo, dependiendo del tipo celular y de las condiciones ambientales. Esta fase de reposo puede deberse a que la célula no necesita replicarse, es incapaz de hacerlo o no hay nutrientes necesarios [12].

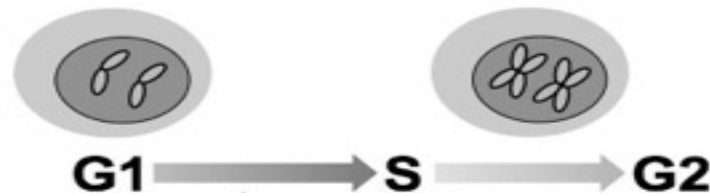


Figura 5. Progresión de la Interfase en el ciclo celular. La interfase está constituida por 3 sub fases. El crecimiento celular y la duplicación del material genético, como se muestra en esta imagen, son características de esta fase. (Adaptado de Lim and Kaldis, 2013) [97].

Si la célula no entra a G0 y continúa con la división celular, pasa a la fase S en la cual la célula adquiere el tamaño adecuado y las proteínas necesarias para su división. Aquí es donde inicia la replicación del material genético [12,13].

Finalmente, llega a la fase G2 donde adquiere todos los organelos y las proteínas necesarias para la preparación de la división celular. Es cuando la cromatina comienza a condensarse [12,13].

Una vez que la célula está lista, entra a la fase M, denominada así por Mitosis, donde se da la división celular.

2.3.1.2 Mitosis

La mitosis es el proceso de división nuclear que culmina con la división citoplasmática denominada citocinesis [3]. Esta división celular produce dos células hijas con la misma información genética. Es decir, este proceso tiene la finalidad de obtener dos células completamente iguales a la célula madre [3,12]; debido a que los cromosomas que se replican durante la fase S se dividen de modo que cada célula tenga una copia [3].

En células animales, la mitosis comienza con un evento nuclear (la condensación de cromosomas) y un evento citoplasmático (la separación de centrosomas). Esto es seguido de la ruptura de la membrana nuclear y la migración de los cromosomas condensados al centro para que las cromátidas hermanas se separen a los polos opuestos. La segregación de los cromosomas generalmente es seguida de la división celular, donde las membranas nucleares de las células hijas vuelven a formarse, la cromatina se descondensa y las nuevas células entran en interfase [12,14]. La mitosis a su vez se divide en cuatro fases (figura 6): profase, metafase, anafase y telofase [3, 12].

- I. Profase. El inicio de esta etapa se da por la aparición de los cromosomas condensados durante la interfase, cada uno con dos cromátidas hermanas (duplicadas durante la fase S). Estas cromátidas están unidas por los centrómeros que forman el cinetocoro, por donde pasan los microtúbulos. Es en esta fase donde

se da la formación del huso mitótico y los centrosomas empiezan a moverse a polos opuestos del núcleo. Finalmente se da la ruptura de la membrana nuclear.

- A. Posteriormente, las células entran a prometafase que es un periodo de transición entre la profase y la metafase. Aquí los microtúbulos se unen al cinetocoro mientras que los centrosomas ya se encuentran en lados opuestos.
- II. Metafase. Es en este punto donde se encuentra el tercer *check point* del ciclo celular, denominado punto de control de la mitosis o también punto de control del ensamblaje del huso (SAC). Aquí la célula se asegura de la correcta alineación de los cromosomas en el ecuador.
- III. Anafase. Las cromátidas hermanas son separadas y se mueven a polos opuestos. En la etapa de anafase tardía, empieza el proceso de citocinesis que consiste en la división celular.
- IV. Telofase. Las membranas nucleares vuelven a formarse y los cromosomas se descondensan. Aquí se complementa el proceso de citocinesis, dando lugar a las dos células hijas.

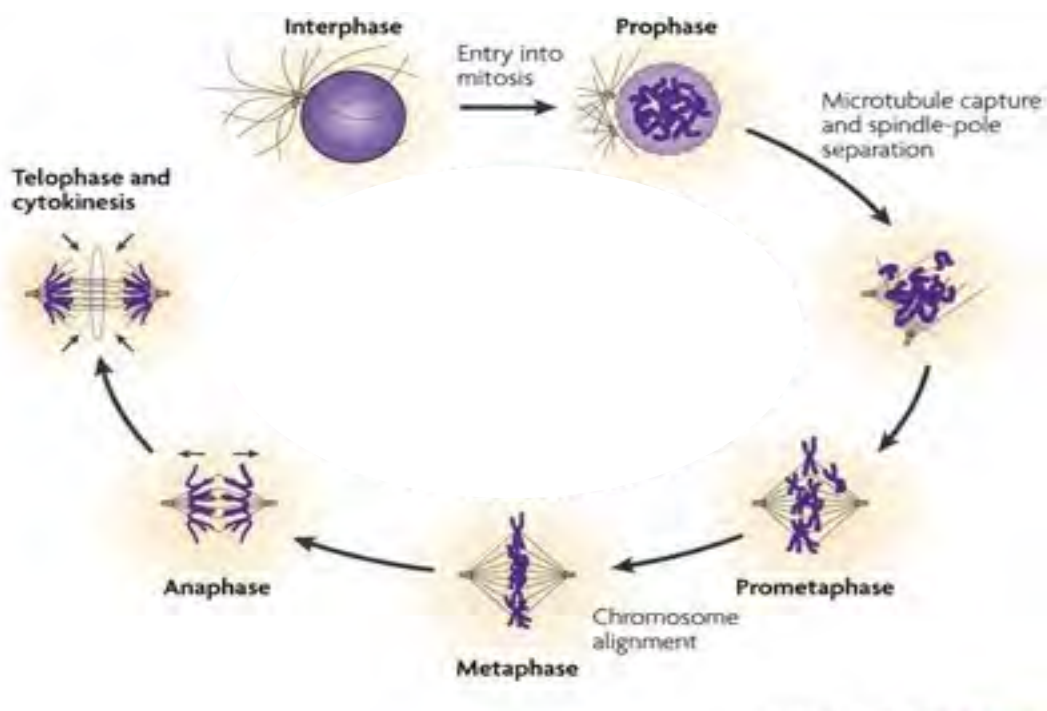


Figura 6. Progresión de la Mitosis en el ciclo celular. La mitosis consta de cuatro sub fases principales, en cada una de estas diferentes procesos celulares se llevan a cabo con el fin de llegar a la división celular. (Adaptado de Jackson et al., 2007) [98].

2.3.2 Regulación del ciclo celular

Como ya se dijo, el ciclo celular y la apoptosis son importantes, ya que las células madre son capaces de dividirse para la producción de más células sólo cuando ocurre una disminución en el número celular. Sin la existencia de estos dos mecanismos, los órganos no mantendrían el tamaño proporcional adecuado [13].

Es por esto que existen mecanismos moleculares para la regulación del ciclo celular donde señales extracelulares e intracelulares participan para mantener el control del número celular, como se muestra en la figura 7.

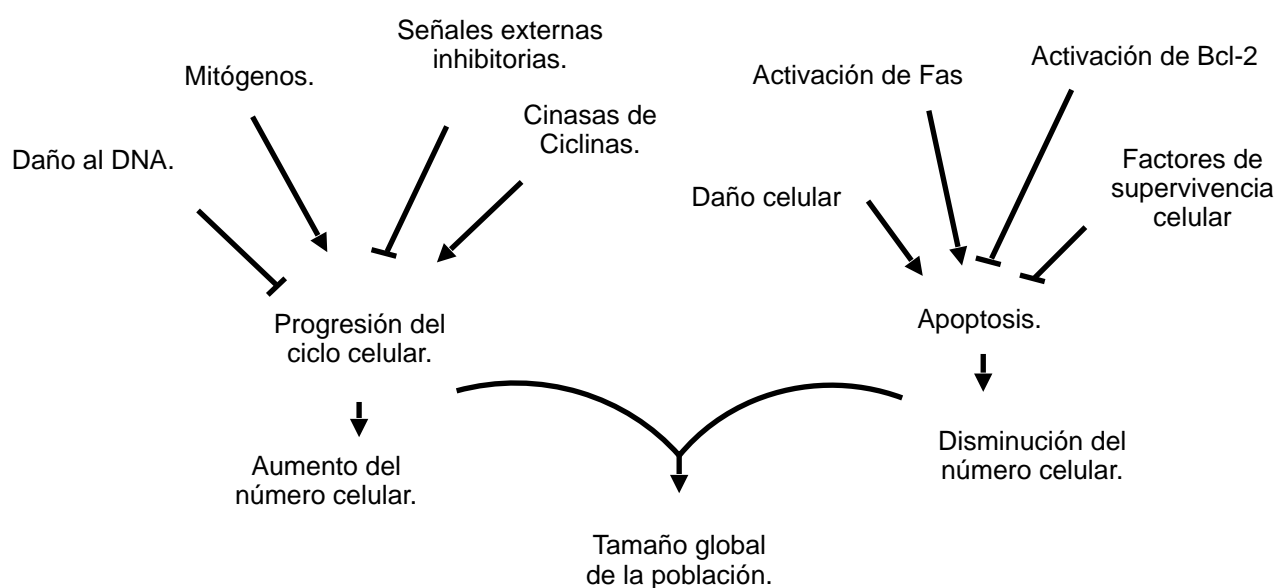


Figura 7. Señales que intervienen en el control del número celular.
(Adaptado de Griffiths and Murillo Araujo, 2000) [13].

2.3.2.1 Señales extracelulares

Son señales que controlan el número celular mediante la inducción de diferentes cascadas de señalización que son capaces de activar o inactivar los complejos CDK-ciclina y favorecer o inhibir la proliferación celular, de lo cual se hablará más adelante [13].

2.3.2.2 Señales intracelulares

El ciclo celular es un proceso que se realiza de forma regulada y en él existen 3 puntos de control (*check points*) entre sus fases para asegurar que la célula es apta para continuar con la división celular. Estos puntos de regulación se encuentran: a) al final de la fase G1 y antes de la fase S ; b) al final de la fase G2 y al inicio de la mitosis y c) en la metafase (figura 8) [12]. Esto con el fin de evaluar en cada uno de los puntos el estado nutricional, la masa, el proceso de crecimiento y el estado del material genético de la célula.

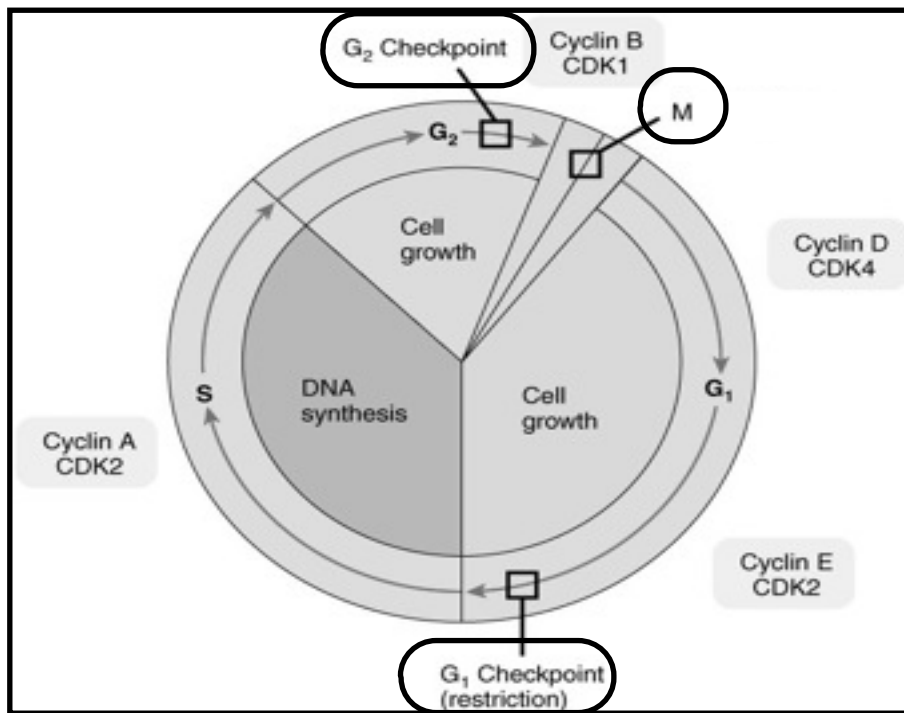


Figura 8. Puntos de control en el ciclo celular. El ciclo celular está regulado por tres puntos de control diferentes. El primer punto de control se encuentra al final de la fase G₁, donde se evalúa si la célula está lista para la replicación del material genético. El segundo punto de control es al finalizar la fase G₂. Es aquí donde se verifica que no haya errores en el DNA replicado. Y finalmente, en la fase M se encuentra el tercer punto de control para asegurar que la información genética se distribuye de manera equitativa entre las células hijas. (Adaptado de Oerpub.github.io, 2016) [99].

Este sistema de regulación está basado principalmente en una serie de complejos proteicos constituidos por dos familias de proteínas que son las que impulsan la progresión del ciclo celular: 1) las ciclinas y 2) las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK) [13].

Las ciclinas deben su nombre a que son proteínas que se sintetizan y se degradan a lo largo del ciclo celular (figura 9) controlando la actividad de las CDKs [12]. La aparición de una ciclina está regulada a nivel transcripcional, gracias a factores de transcripción o a los complejos ciclina-Cdk ya activos. Asimismo, la desaparición de una ciclina se regula por la inactivación de su transcripción o una baja en la traducción de la misma ciclina [13].

No obstante, existen varios inhibidores importantes de los complejos ciclina-CDK que aparecen como respuesta de un daño celular. El papel que hay entre las ciclinas y sus inhibidores en los diferentes puntos de control es determinar si la célula puede pasar a la siguiente fase del ciclo [15].

Ejemplos de estos inhibidores son p16 que actúa en el primer *check point* inhibiendo la formación del complejo ciclina-cdk y la proteína p53 que es la clave para la evaluación de errores durante la replicación u otros daños que pueda haber en el DNA. Si el DNA está dañado, p53 detiene el ciclo celular en la fase G₁ [12]. Esta es una proteína reguladora de

apoptosis y de otras funciones relacionadas con estrés celular, además actúa como un factor de transcripción e induce la expresión de p21 (también conocido como CDKN1A) que inhibe diferentes complejos de ciclina-CDK y detiene el ciclo celular [15].

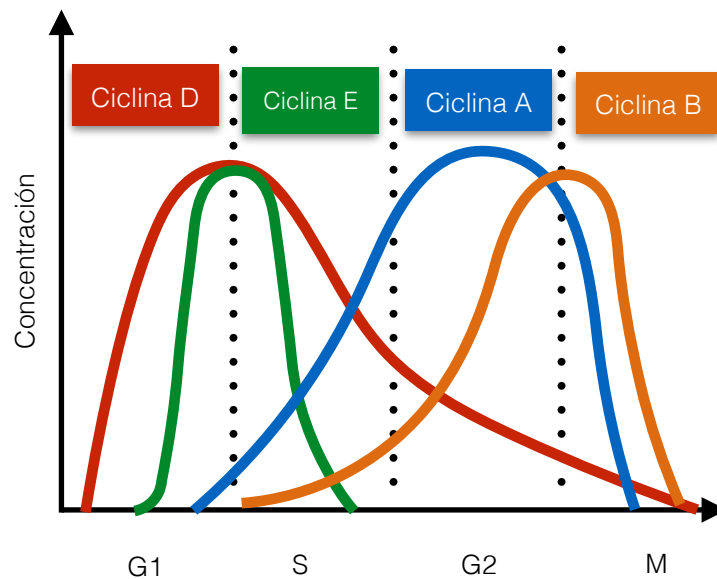


Figura 9. Expresión de ciclinas durante el ciclo celular. Las ciclinas deben su nombre a su aparición y desaparición durante el ciclo celular. El progreso de este ciclo está mediado por la expresión o inhibición de estas proteínas. (Adaptada de Boundless.com, 2016) [100].

2.3.2.3 Complejos Ciclina-CDK

En los humanos hay aproximadamente 30 genes que codifican para ciclinas y 21 para CDKs. Si bien es cierto, aún no se conoce completamente el papel de cada una de estas proteínas durante el ciclo celular; sin embargo, actualmente se han caracterizado cerca de 15 ciclinas con sus respectivas isoformas (A-; B-; C-; D-; E-; F-; G-; H-; I-; J-; K-; L-; O-; T-; Y). Asimismo, el número de CDKs ha aumentado debido a la evolución, en humanos existen 8 subfamilias donde se pueden agrupar estas proteínas, cada una representada por las CDKs: 1, 4, 5, 7, 8, 9, 11 y 20 [14,16].

Existen dos clases de ciclinas por su función temporal: las G1 y las mitóticas. Las G1 aparecen en esta fase y se unen a las CDK para inducir el paso de G1 a S, por lo tanto G1 es el punto de control principal donde se evalúa a la célula: que su tamaño sea el adecuado y esté preparada para la replicación del material genético [11]. Este punto de control está regulado principalmente por la proteína Retinoblastoma (RB) que está unida e inhibe a E2F, de los cuales se hablará más adelante [15].

Por otro lado, las ciclinas mitóticas se unen a sus CDKs durante la fase G2 formando un complejo denominado Factor Promotor de Mitosis (FPM) para inducir la división celular [11]. Este es el segundo punto de control en el ciclo celular. En este punto el material genético ya ha sido replicado [15].

Una vez que se forma el complejo ciclina-Cdk su activación depende de la fosforilación de la Cdk en el residuo de treonina adyacente al sitio activo de la cinasa. Esta fosforilación está catalizada por las cinasas activadoras de Cdk (CAKs) [15]. CAK está constituida en células animales por el complejo ciclina H- cdk7 y el factor MAT1 [18] .

Al estar activadas, las CDKs son cinasas; es decir, son enzimas encargadas de añadir grupos fosfatos a proteínas diana. Las CDKs catalizan la fosforilación en residuos de serina y treonina de diferentes proteínas, lo cual está regulado por la ciclina a la que se asocia [13]. Como ya se dijo, las ciclinas varían a lo largo del ciclo celular, por lo que cada fase del ciclo se caracteriza por la fosforilación de un conjunto específico de proteínas [13].

En la figura 10 se observa la fosforilación de una proteína diana por el complejo ciclina-CDK. Esta fosforilación inicia una cadena de sucesos que termina con la activación de diferentes factores de transcripción encargados de favorecer la expresión de proteínas necesarias para avanzar a la siguiente fase del ciclo celular [13].

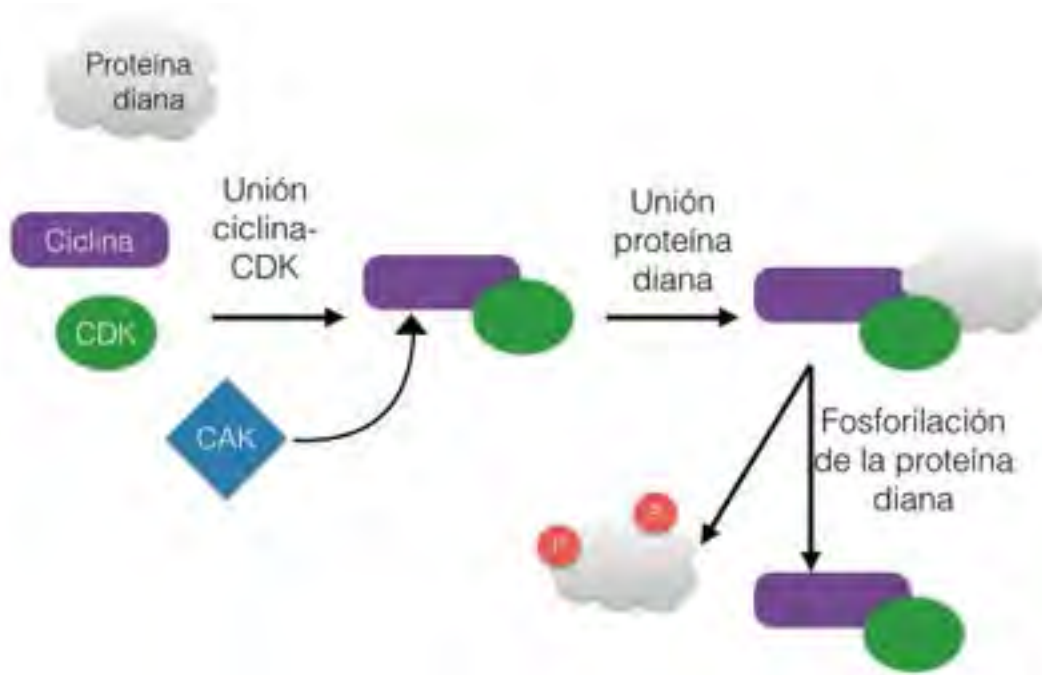


Figura 10. Fosforilación de una proteína diana por el complejo ciclina-CDK. Para que la actividad de las CDKs sobre una proteína diana de lleve a cabo, es necesaria la unión de esta con su ciclina correspondiente y su activación por CAK. (Adaptado de Griffiths and Murillo Araujo, 2000) [13].

2.3.2.3.1 Ciclina H.

Como ya se mencionó, el complejo de cinasas CAK está constituido por tres subunidades: 1) ciclina H, que es la parte reguladora; 2) Cdk 7, la parte catalítica y 3) Mat1, que es el factor proteico que permite el ensamblaje del complejo [19].

Este complejo está encargado de la fosforilación y activación de los demás complejos ciclina-CDKs. Y, a diferencia de otras ciclinas, la concentración de ésta a lo largo del ciclo celular no varía [19].

2.3.2.3.2 Ciclina D y ciclina E

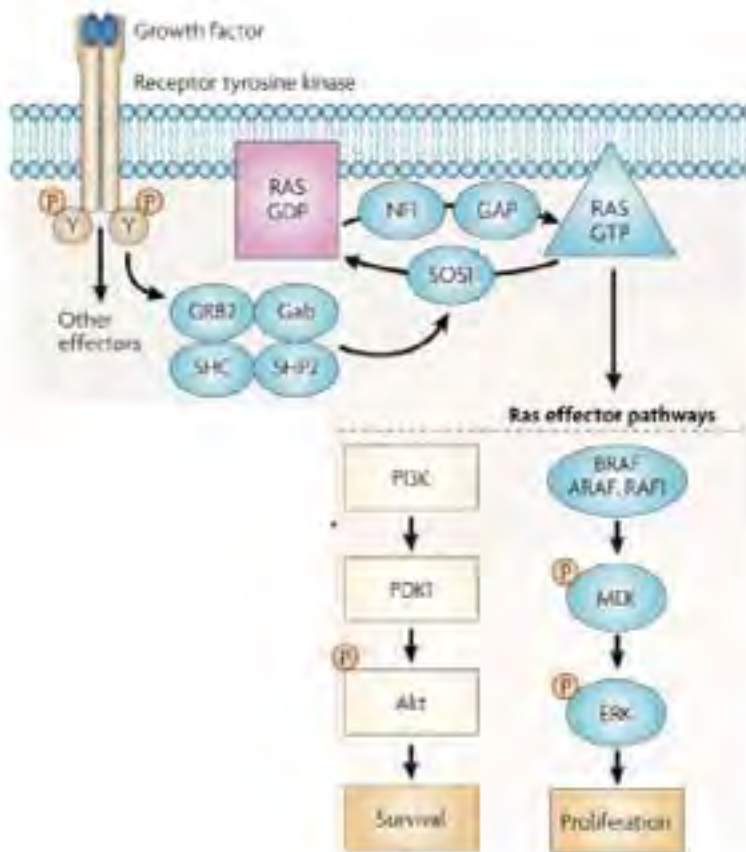


Figura 11. Señales exógenas y vías de señalización. Existen vías de señalización, como las que se muestran en este esquema, que regulan la división celular gracias a señales exógenas. (Adaptado de Schubert, Shannon and Bollag, 2007) [101].

Las señales extracelulares, como factores de crecimiento, pueden inducir la progresión del ciclo celular. Esto se debe a la activación de vías de señalización. Un ejemplo de esto, son las vías activadas a partir de las proteínas Ras (GTPasas localizadas en la cara interna de la membrana plasmática). Como se observa en la figura 11, la señalización de estas vías involucra a su vez la promoción de la transcripción de las ciclinas D [20].

Existen tres clases diferentes de esta ciclina, siendo la ciclina D1 la más estudiada, ya que se encuentra expresada en un gran número de tejidos; además de que tiene un papel importante en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer como el carcinoma de células escamosas [21,22].

La ciclina D1 es una proteína que se puede asociar a las CDKs 4 y 6 [22] y la activación de este complejo es importante para el progreso de la fase G1 y la transición a la fase S. Otra ciclina que está involucrada en este paso del ciclo celular es la ciclina E, la cual se asocia a la Cdk 2 [23].

Para que el progreso en el ciclo celular se lleve a cabo, estos complejos de ciclinas- CDKs activan la cascada de regulación que ya se mencionó anteriormente: Rb-E2F [22].

Rb es una proteína diana de los complejos ciclina D-cdk 4/6 y ciclina E-cdk 2, mientras que E2F es un factor de transcripción que induce la transcripción de genes involucrados en la fase S [15].

Desde la fase M tardía hasta la mitad de la fase G1, RB y E2F se encuentran formando un complejo inactivo. Para su activación, en la fase G1 tardía, gracias al complejo ciclina-cdk, Rb se fosforila generando un cambio conformacional y liberando a E2F [12]. La forma libre de este factor de transcripción es su forma activa y esto permite la transcripción de diferentes genes importantes para la replicación del DNA en la fase S (figura 12) [13].

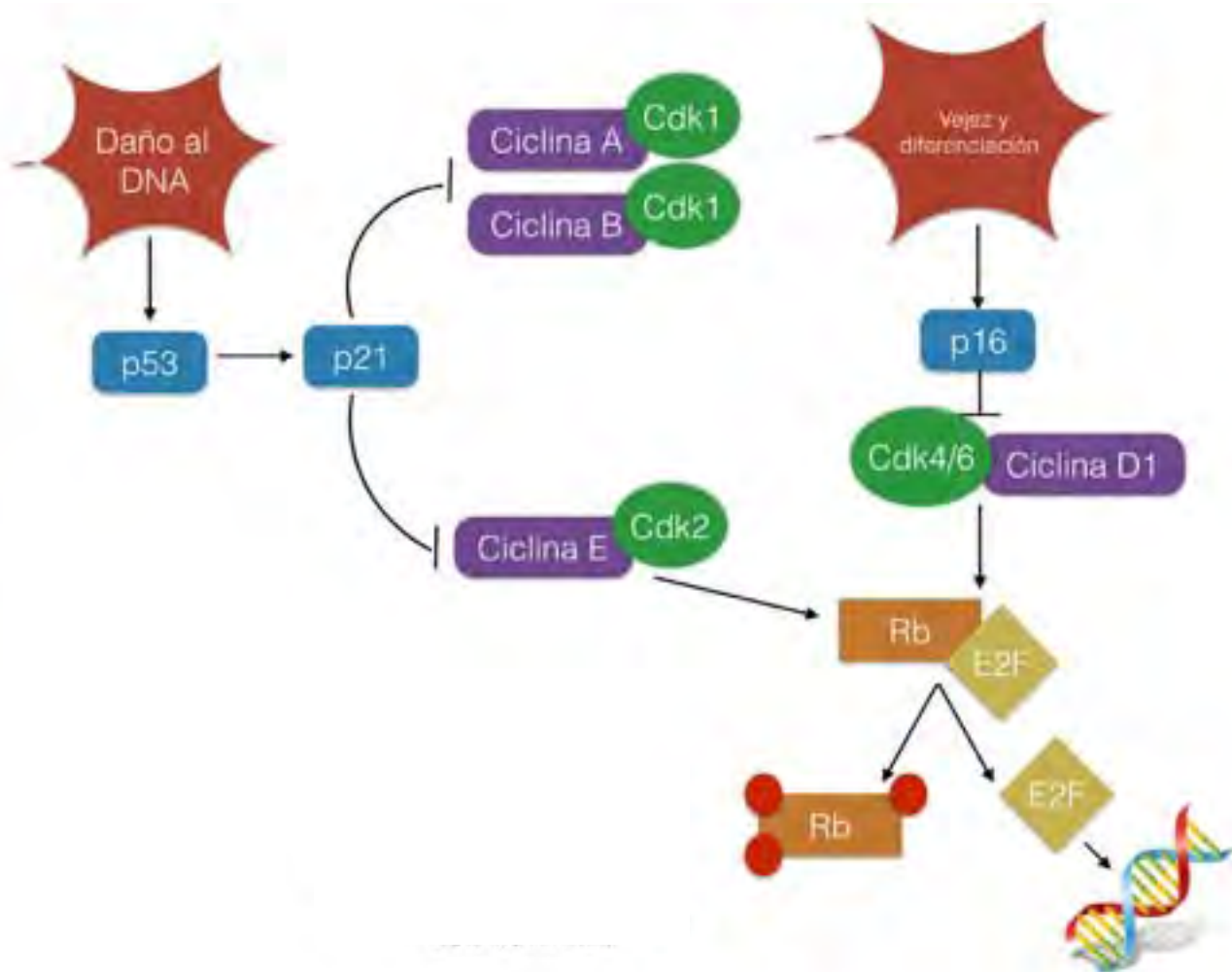


Figura 12. Regulación negativa del ciclo celular. Los complejos formados con las ciclinas D y E hiperfosforilan a Rb (círculos rojos), favoreciendo la actividad de E2F sobre la expresión de genes. En presencia de daños al material genético, se inhiben los complejos de ciclina-cdk así como la transcripción de genes necesarios para la replicación. (Adaptado de Leemans, 2011) [15].

Por lo tanto, Rb es una proteína que regula el punto de restricción entre G1 y S cuando hay un daño en el DNA. Rb secuestra diferentes factores de transcripción importantes para la progresión del ciclo celular, entre los cuales está E2F. El complejo ciclina D1-cdk 4/6 es capaz de agregar un grupo fosfato en uno de los 16 sitios diferentes de fosforilación que posee Rb. El resultado de esta mono-fosforilación es la liberación del factor de transcripción correspondiente. E2F es capaz de inducir la expresión de la ciclina E. El complejo ciclina E-cdk 2 a su vez hiper-fosforila a Rb, favoreciendo la actividad de E2F sobre la expresión de genes relacionados a la replicación del material genético [23,24,25].

Por otro lado, no todas las acciones del complejo ciclina D-cdk 4/6 dependen de la fosforilación de un sustrato (figura 13). Por ejemplo, la ciclina D puede estar asociada a factores de transcripción, lo cual promueve la expresión de ciertas proteínas, como las que están involucradas en la migración e invasión celular [22]. También puede estar relacionada con la regulación de la acetilación y metilación de las histonas, así como con el secuestro de p21 y p27 de lo cual se hablará más adelante en el apartado de Inhibidores de CDK [22].

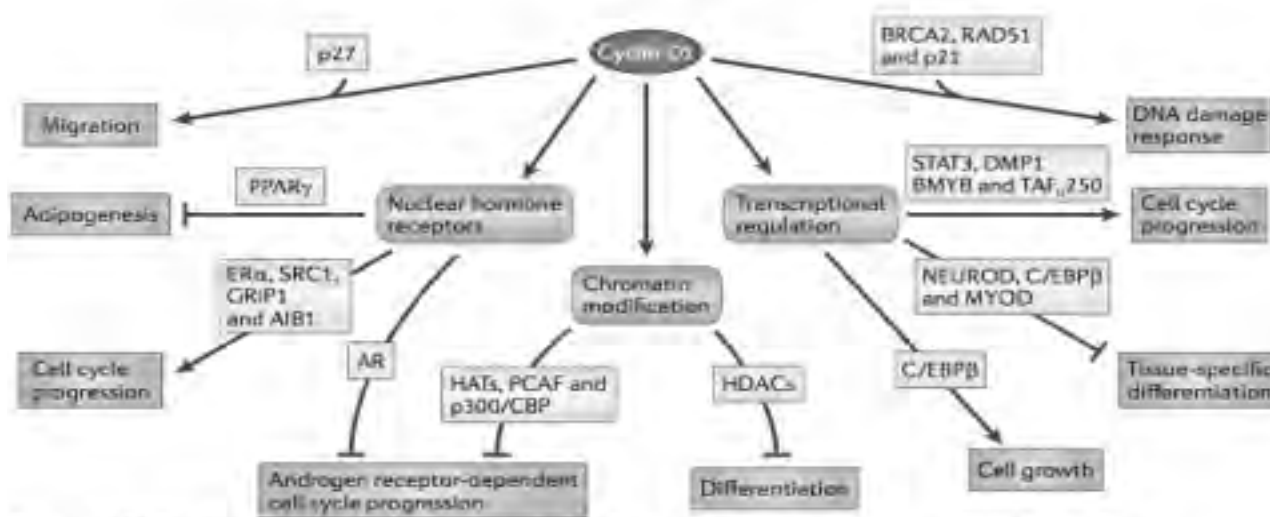


Figura 13. Funciones de la ciclina D1 independientes de CDK.
(Obtenido de Musgrove et al., 2011) [22].

En el caso de la ciclina E, además de participar en la liberación de E2F, también es capaz de inducir la degradación de los inhibidores p21 y p27 a través de la fosforilación en sus residuos Ser 130 y Thr 187 [23].

Al ser ciclinas, estas proteínas deben degradarse una vez que su función ha sido cumplida. La ciclina E puede tener dos mecanismos diferentes de degradación. Uno de estos mecanismos requiere la fosforilación de la ciclina en el residuo Thr 380 por su misma cdk2 o bien por la glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK-3) [18, 24]. Por otro lado, la glucógeno sintasa cinasa-3 β (GSK-3β) es una proteína encargada de fosforilar en el residuo Thr 286 a la ciclina D1, lo que promueve su exportación del núcleo al citoplasma durante la fase S para su posterior degradación a través de la ubiquitinación [20, 26].

Asimismo, la transcripción de la ciclina D está regulada por la presencia de factores de crecimiento y la activación de receptores como Ras y sus cascadas de señalización que involucran cinasas como: ERK y Akt [20].

Como se puede observar en la figura 11, la activación de Ras promueve la transcripción de la ciclina D1 a través de la activación de la cascada de señalización de ERK que está asociada, entre otras cosas, a la proliferación celular. En cambio, la activación de la vía de

Akt también favorece la supervivencia celular, ya que ésta fosforila e inactiva a GSK-3 β , inhibiendo así la degradación de la ciclina D1 y favoreciendo la progresión del ciclo celular [20, 27].

2.3.2.3.3 Ciclina A

La ciclina A es una proteína nuclear que tiene función durante las fases S y M del ciclo celular. Existen dos isoformas de esta proteína: la forma embrionaria (A1) y la somática (A2) [28]. Esta última es la más estudiada debido a que es la involucrada en la proliferación de células somáticas. Estas ciclinas tiene la capacidad de asociarse con cdk1 (cdc2) y cdk2 [18].

Para su activación es necesaria la formación del complejo ciclina A- cdk1 o ciclina A- cdk2 y la fosforilación dada por la CAK de estas cinasas en sus residuos de Thr 161 y 160, respectivamente [18].

Como ya se mencionó, la ciclina A tiene funciones tanto en la fase de síntesis de DNA como en la fase de Mitosis; sin embargo, la actividad y el mecanismo exacto de esta ciclina en estas fases no ha sido completamente elucidado [28].

Se ha propuesto que la ciclina A es sintetizada al final de la fase G1 y al inicio de la fase S y que se localiza principalmente en el sitio de la replicación del material genético [18]. Es en esta fase donde la ciclina se asocia a su cdk y forma el complejo ciclina A- cdk2 [28]. Muchos de los sustratos de este complejo son componentes de la maquinaria de replicación del DNA [18]. Por ejemplo, la ciclina A promueve la replicación ya que fosforila a la proteína de replicación A (RPA), que es un complejo proteico de unión al DNA para favorecer la síntesis del material genético [18]. Muchos otros sustratos de la ciclina A también son componentes de la maquinaria de replicación del DNA, como CDC6 y MCM [18].

Aunque se sabe que las ciclinas A y B son las principales ciclinas involucradas en la mitosis [14], la actividad de la ciclina A durante esta fase aún no se conoce del todo bien. En este punto la ciclina A forma un complejo con cdk1 y regula la progresión de la fase G2 [28,29] . Se tienen hipótesis donde se sugiere que la ciclina A, al sintetizarse antes que la ciclina B, controla la vida media de dicha ciclina. Una vez que la ciclina B ya está activada en la fase de la Mitosis, la ciclina A ya no es necesaria, y la misma ciclina B es la responsable de dirigir la degradación de la A, así como la salida de la Mitosis [18].

Recordando que las ciclinas D y E son las encargadas de liberar a E2F, debemos mencionar que este factor de transcripción induce la expresión de genes involucrados en la fase S [15]. Por ejemplo, se une a la región promotora de la ciclina A en la entrada de esta fase promoviendo su expresión [18].

Por el contrario, la ciclina A puede regular de manera negativa su propia transcripción a través de una realimentación (*feedback loop*), ya que el complejo ciclina A- cdk2 puede fosforilar al factor E2F e inactivar la transcripción de la misma ciclina. También la proteína p53 se ha visto que regula de manera negativa esta transcripción causando un arresto del ciclo celular [18].

Asimismo, la ciclina A empieza su degradación en la prometafase y se completa en la metafase [18]. La degradación de las ciclinas mitóticas necesita una secuencia cercana al N-terminal llamada la caja de destrucción (*D-Box*), que actúa como señal para iniciar la proteólisis dependiente de ubiquitinización. La ubiquitina ligasa principal de la mitosis es APC/C (*Anaphase Promoting Complex o Cyclosome*) [18]. Existen evidencias de que las ciclinas A y B poseen el mismo mecanismo de degradación; no obstante, también existen trabajos que muestran diferencias en su degradación. Por ejemplo, la ciclina A desaparece mucho antes que la B, también la ciclina A requiere de más elementos en su secuencia además de la *D-box* para su destrucción eficiente [18].

2.3.2.3.4 Ciclina B

El paso de G2 a Mitosis está regulado por la activación del factor FPM, el cual está constituido por el complejo ciclina B-cdk1. La formación de este complejo es mediada por la transcripción y degradación de la ciclina B. Niveles elevados de esta proteína se pueden encontrar durante la fase G2 y la Mitosis temprana [30]. En la figura 14 se observa la regulación de los niveles de dicha ciclina.

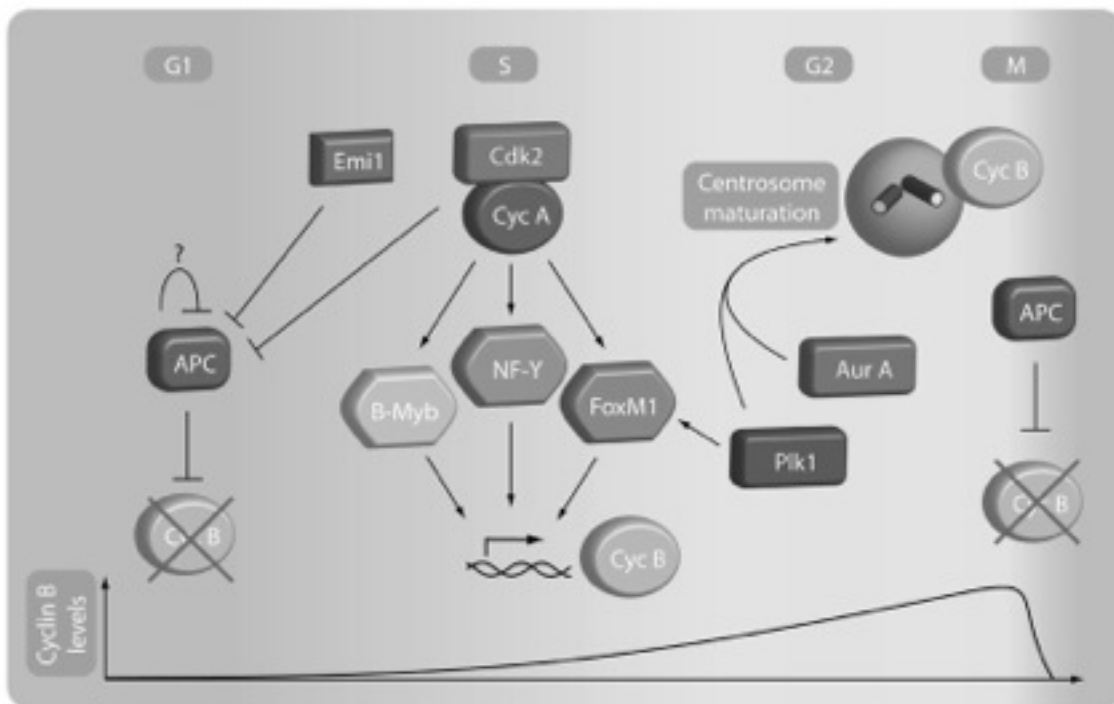


Figura 14. Regulación de los niveles de ciclina B en el ciclo celular. La ciclina B es activada en la transición de la fase S a la G2 y se observan niveles altos de esta durante las fases G2 y M. (Obtenido de Lindqvist, Rodríguez-Bravo and Medema, 2009) [30].

En la fase S, diferentes factores de transcripción como NF-Y, FoxM1 y B-Myb son activados, favoreciendo la transcripción de la ciclina B. Esta transcripción a su vez está regulada por la actividad del complejo ciclina A-cdk2 [30].

Por otro lado, la degradación de la ciclina B se da después de que la célula ha pasado el *check point* en la Mitosis. En este tercer punto de control se regula el correcto alineamiento de los cromosomas durante la Metafase [3]. Es aquí, entre la metafase y la anafase, cuando se da la proteólisis de ciertas proteínas reguladoras, promovido por APC/C, una ligasa encargada de ubiquitar proteínas como la ciclina B. La activación de este complejo a su vez es inducida por FPM al inicio de la mitosis y continúa promoviendo esta degradación hasta la fase S temprana, en donde es inhibida por Emi 1 y la ciclina A. Por lo tanto, FPM propicia su propia destrucción [30]. La degradación de la ciclina es importante para salir de la fase M y entrar nuevamente a la interfase [3].

Como ya se dijo, para la activación del complejo ciclina B-cdk1 y la entrada a la Mitosis, es necesaria la fosforilación de la cdk en Thr 161 por la cinasa activadora de cdk (CAK). Sin embargo, durante la interfase, cdk1 permanece inactiva por la fosforilación en sus residuos de Thr 14 y en Tyr 15, por lo tanto, para su activación también es necesaria una desfosforilación en dichos sitios [30].

La fosforilación y desfosforilación de los residuos Thr 161, Thr 14 y Tyr 15 está regulada por la actividad de las cinasas Wee1 y Myt1 así como por las fosfatasas Cdc25 (figura 15) [30].

Una vez que se forma el complejo FPM, las fosfatasas Cdc25 son activadas y se encargan de desfosforilar a la cdk1 activándola. Existen tres isoformas de esta proteína, siendo la Cdc25a nuclear y la Cdc25c citoplasmática [30].

Por otro lado, tanto Wee1 como Myt1 son proteínas encargadas de inactivar a la cdk1 a través de la fosforilación en Thr 14 y Tyr 15. Myt1 es una proteína presente principalmente

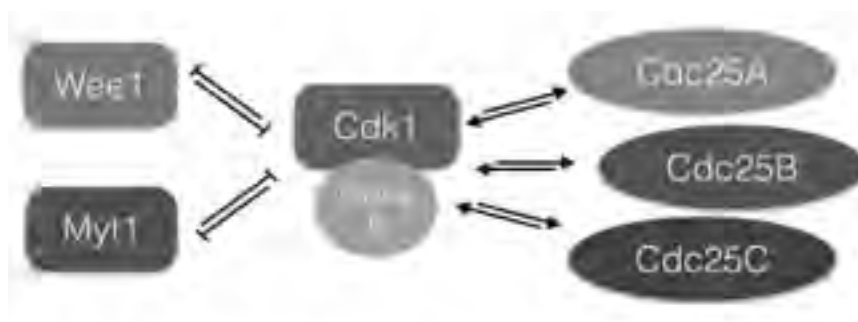


Figura 15. Regulación de la activación e inhibición del complejo ciclina B-Cdk1 en el ciclo celular. (Modificado de Lindqvist, Rodríguez-Bravo and Medema, 2009) [30].

en citoplasma mientras que Wee1 es nuclear, aunque también se encuentra asociada al centrosoma. Una vez que el complejo ciclina B-cdk1 está activado, ambas cinasas son fosforiladas con la finalidad de inactivarse [30].

Otra forma de inactivar y degradar a Wee1 es a través de *Polo-like kinase1* (Plk1). Plk es una serina/treonina cinasa que se expresa en la fase G2 y se degrada al final de la mitosis; sin embargo, su actividad se observa en la transición G2/M [31]. Existe una fosforilación dual entre Plk1 y la Cdk1 que favorece la degradación de la proteína Wee1. Plk1 a su vez fosforila a Myt1 para inhibirla y a Cdc25c para aumentar su actividad en el núcleo. Además Plk1 tiene como función la activación del factor de transcripción FoxM1, que favorece la transcripción de genes asociados a la mitosis [30].

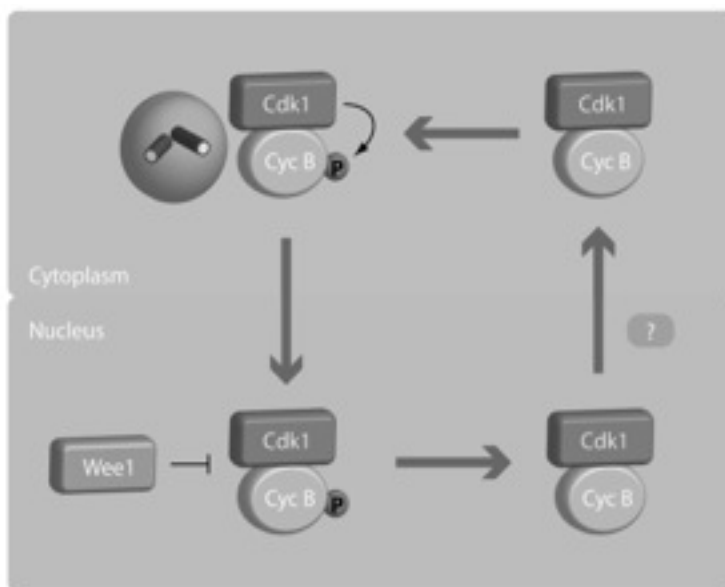


Figura 16. Translocación de ciclina B mediada por fosforilación en el ciclo celular.

(Obtenido de Lindqvist, Rodríguez-Bravo and Medema, 2009) [30].

Por lo tanto, el paso a la mitosis está determinado por la activación del complejo ciclina B-cdk1 y también por su localización [32]. La ciclina B es traslocada entre el citoplasma y el núcleo. Durante la interfase, se concentra en citoplasma, principalmente en los centrosomas antes de la Mitosis [14]. Se ha observado que la ciclina B es translocada del citoplasma al núcleo durante la fase M, aproximadamente 5 minutos antes de la ruptura de la membrana nuclear (figura 16) [14,33]. Así como las fosforilaciones y desfosforilaciones regulan la activación de cdk, la fosforilación y desfosforilación de la ciclina B por Plk1 regula

su localización en la célula [33]. Para facilitar este movimiento entre citoplasma y núcleo, la ciclina B posee dos dominios que controlan dicha transición: 1) señal de localización nuclear (NLS), que dirige el complejo al núcleo y 2) señal de retención citoplasmática (CRS), que media la exportación nuclear antes de la mitosis [31].

Esta ciclina posee 5 Serinas fosforilables: 116, 126, 128, 133 y 147; siendo los residuos 133 y 147 los principales para la translocación de la proteína al núcleo. En el núcleo los niveles de Wee1 son elevados, y esto favorece la degradación de dicha proteína después del tercer *check point* [30].

Durante la interfase, el complejo se acumula en el citoplasma, ya que la exportación desde el núcleo es constante. Es en la profase tardía cuando la ciclina es importada al núcleo debido a su fosforilación por Plk1 en el residuo Ser 147, localizado en el dominio

NLS de la ciclina, lo cual es importante para la entrada a la mitosis, ya que ésta se caracteriza por una rápida acumulación del complejo en el núcleo [31,32] (figura 16). La activación de este complejo se puede resumir en la figura 17.

A)



B)

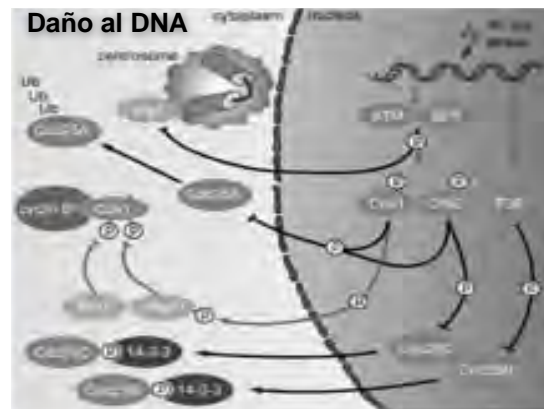


Figura 17. Activación e inhibición de la ciclina B1. A) En la fase G2 se previene una entrada a la mitosis prematura por medio de la fosforilación de Cdk1 y la exportación nuclear del complejo. Plk1 está implicada en varios procesos relacionados con la activación de dicho complejo ya que fosforila manera directa a Wee1 y Myt1, lo que genera su inhibición y degradación; y también a la ciclina B y Cdc25C, lo que promueve su activación en el centrosoma. B) En respuesta al daño del DNA, el check point de la fase G2 se activa, previendo la entrada a la mitosis a través de la activación de cinasas como ATM, ATR, Chk1, Chk2 and p38. Estas cinasas median la exclusión nuclear de Cdc25A, activando Wee1 e inhibiendo a Plk1 [33]. (Modificado de van Vugt and Medema, 2005[29])

La aparición del FPM no sólo actúa como un regulador de la transición a la fase M, sino también en la fosforilación de algunas proteínas estructurales (figura 18) [3]. Por ejemplo:

- ❖ La condensación de la cromatina durante la interfase es dada por las condensinas. Para su activación deben ser fosforiladas por FPM.
- ❖ FPM participa en la ruptura de la membrana nuclear fosforilando las láminas y disociando los filamentos en dímeros libres. Esto es seguido de la fragmentación de la membrana en vesículas pequeñas que, durante la telofase, se fusionan para formar los núcleos nuevos de las células hijas.
- ❖ El retículo endoplásmico y el aparato de Golgi también son fragmentados en pequeñas vesículas debido a la fosforilación e inactivación de GM130 (proteína del aparato de Golgi).
- ❖ La reorganización del citoesqueleto que culmina con la formación del huso mitótico resulta de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos ocasionado por FPM.

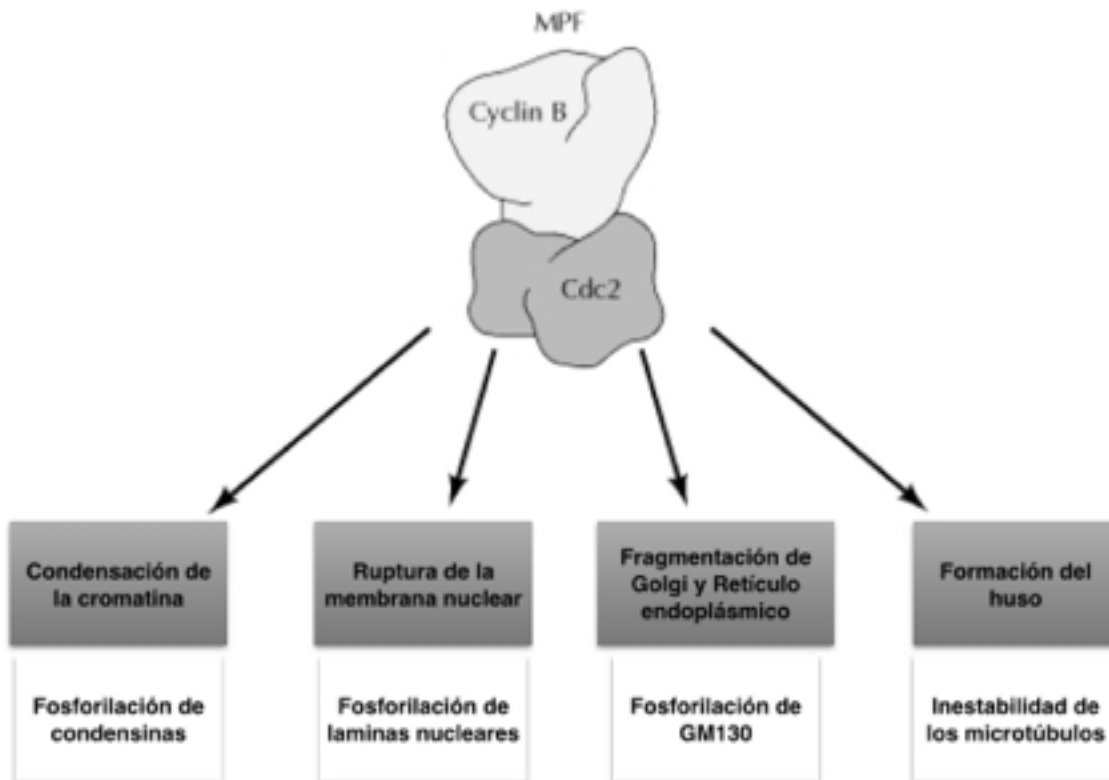


Figura 18. FPM induce cambios nucleares y citoplasmáticos en proteínas estructurales. (Modificado de Cooper and Hausman, 2000) [3].

2.3.2.4 Inhibidores de CDK.

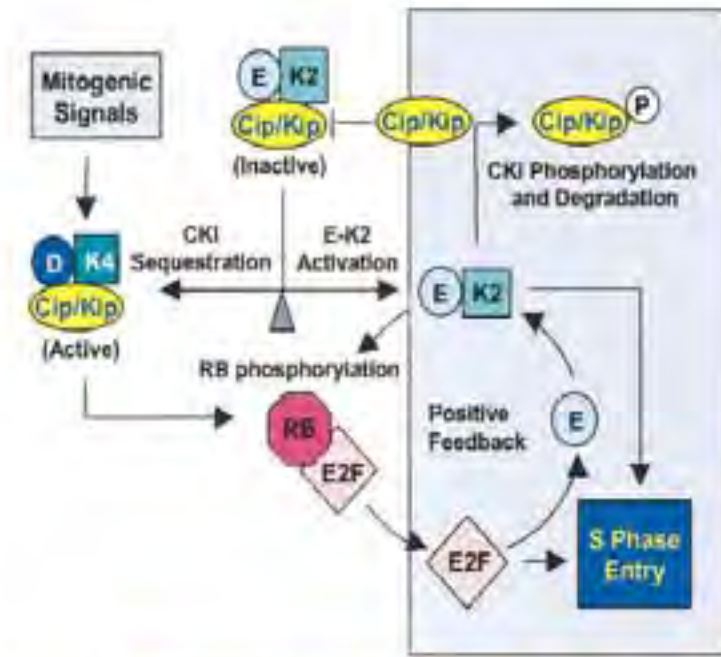
Existen dos familias de inhibidores de CDK (CKIs): la familia INK4 y la Cip/Kip. La primera está constituida por las proteínas p16, p15, p18 y p19, éstas se unen a CDK 4 y 6 inhibiendo su actividad de cinasas en el complejo formado con ciclina D [34,35].

Por otro lado, la familia Cip/Kip está formada por p21, p27 y p57. Estas proteínas se unen a diferentes CDKs y ciclinas modulando la actividad de estos complejos [34].

Los CKIs se unen al dominio de interacción entre el sustrato y la ciclina y se inserta sobre la hendidura catalítica de la CDK evitando la unión del ATP [33]. A pesar de que inicialmente las Cip/Kip eran considerados supresores de tumores por su habilidad de bloquear la proliferación celular, actualmente existen estudios que demuestran que pueden estar relacionadas con el progreso del ciclo celular [34]. Esta familia de proteínas participan en la activación del complejo ciclina D-cdk 4/6 [34], por lo tanto, su capacidad inhibitoria puede variar y esto se regula por fosforilaciones de las CKIs o por interacciones con otras proteínas [34].

Cuando hay señales antiproliferativas, la expresión de Cip/Kip aumenta. Por ejemplo, la expresión de p21 es inducida cuando hay daño al DNA por el supresor de tumores p53 generando el arresto tanto en la fase G1 como en la fase G2 [34]. Por otro lado, en el caso de p27, en ausencia de agentes mitógenos o cuando se trata de células quiescen-

tes, las concentraciones de esta proteína se encuentran elevadas y van disminuyendo conforme la célula va avanzando en el ciclo celular [34].



Los CKIs pueden ser reguladores tanto positivos como negativos de la progresión de la fase G1 [35]. Como se mencionó en el apartado de ciclinas D y E, la ciclina D, dentro de sus funciones, es un secuestrador de CKIs como p27 y p21 [24, 35]. En presencia de mitógenos o factores de crecimiento, el complejo ciclina D-cdk 4/6 no sólo resiste la inhibición de Cip/Kip, sino también la activación del complejo es facilitada por su interacción con las CKIs; es decir, p27 y p21 estimulan la interacción entre ciclina D y las cdk 4 y 6 [35] (figura 19).

Figura 19. Regulación de la transición de G1 a S por Cip/Kip. (Obtenido de Sherr and Roberts, 1999) [35].

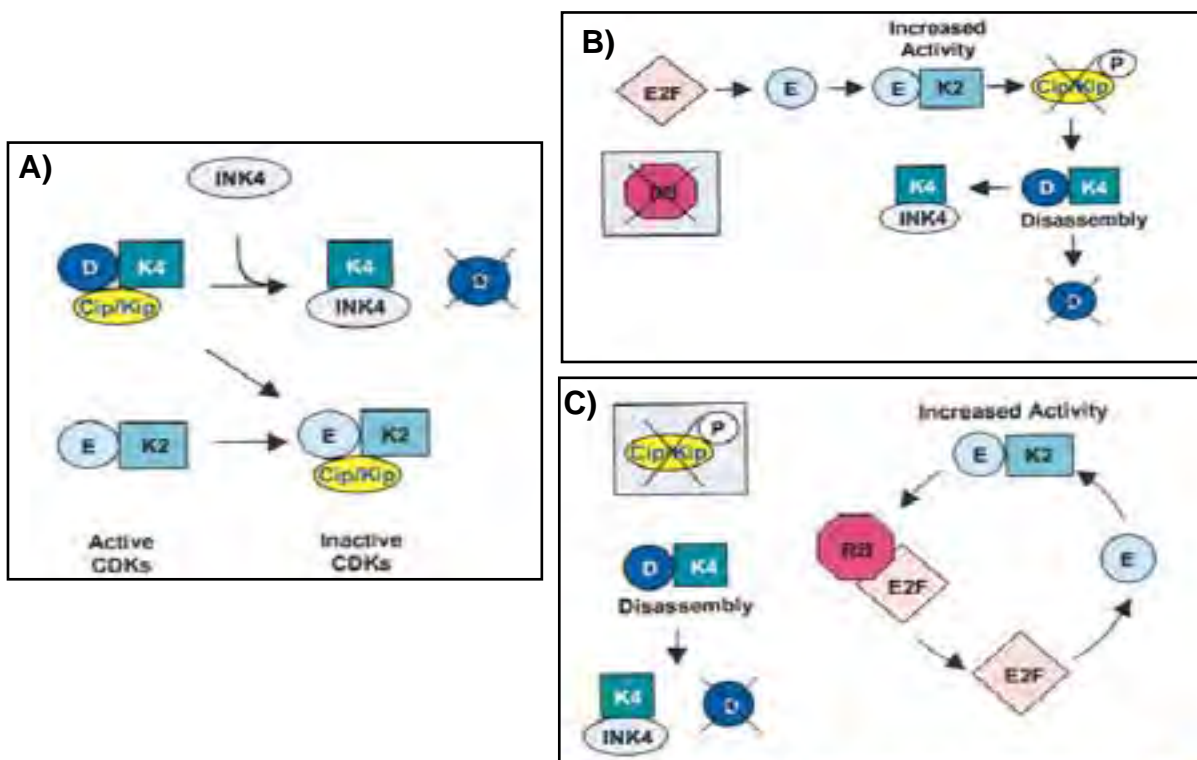


Figura 20. Papel de las proteínas INK4 y la pérdida de Rb y Cip/kip en el ciclo celular. A) Si las concentraciones de INK4 se elevan, se unen a las CDKs 4 y 6 para liberar a Cip/Kip que es capaz de inhibir a la ciclina E. B) Pero si para este punto la actividad de la ciclina E ya es elevada, puede inactiva a Cip/Kip en ausencia de ciclina D. C) Una vez que la ciclina E está activada, el ciclo celular puede continuar. (Obtenido de Sherr and Roberts, 1999) [35].

Una vez que el complejo ciclina E-cdk 2 está activo, es capaz de fosforilar a las Cip/Kip para inducir su degradación. Esto reduce la dependencia a factores de crecimiento para que la célula complete el ciclo celular independientemente de factores ambientales [35].

En el caso de la familia INK4, estas proteínas aumentan sus niveles para generar un arresto en la fase G1. Si las concentraciones de estas proteínas se elevan, son capaces de unirse a las Cdk 4 y 6 para liberar a las Cip/Kip. Esto inhibe al complejo ciclina D-cdk 4/6 favoreciendo el arresto en fase G1 [35]. Por ejemplo, en el caso de la cascada de regulación Rb-E2F, la inhibición de estos complejos de ciclinas puede darse por la acción de p16 que se liga a cdk 4 y cdk 6, por lo tanto evita la unión de la ciclina a su cdk [12,17]. Sin embargo, si para este punto la actividad de la ciclina E ya es elevada, entonces puede inactivar a las Cip/Kip y favorecer su degradación. Y, ya que la presencia de la ciclina D no es necesaria, el ciclo celular puede continuar (figura 20) [35].

2.3.2.4.1 p53.

Es una proteína supresora de tumores que, en estado basal, se encuentra en concentraciones bajas pero ante estímulos de estrés como daño al DNA, depleción de nucleótidos, activación de oncogenes o hipoxia, aumenta sus niveles [36, 37]. p53 inhibe la proliferación celular principalmente por dos mecanismos diferentes: 1) Bloqueando la división celular ; y 2) Induciendo apoptosis [38].

La activación de p53 se presenta en tres diferentes pasos. Primero, se da la estabilización de p53; en respuesta al daño celular, p53 se estabiliza inhibiendo la interacción con MDM2 (denominada así por sus siglas en inglés: *murine double minute 2*) [39]. La proteína MDM2 tiene la habilidad de unirse a p53 interactuando en la región amino terminal . Para que la inhibición de la interacción entre ambas proteínas se lleve a cabo, p53 debe de ser fosforilada por proteínas como: DNA-PK, ATM y ATR en sus residuos Ser37 y Ser15 [39].

Estos sitios de fosforilación (Ser15 y Ser37) están localizados cerca de la región de unión con MDM2 [38]. Por lo tanto, su fosforilación previene la interacción de p53 con dicha molécula, la cual es una proteína intracelular que funciona como regulador negativo y que media la exportación de p53 del núcleo, favoreciendo su proteólisis en el citoplasma [37, 40]. La expresión de MDM2 mediada por p53 aumenta aproximadamente una hora después de la inducción del supresor de tumor, lo que nos sugiere que existe una retroalimentación entre p53 y MDM2, ya que esta última suprime la actividad de p53, mientras que p53 a su vez favorece la transcripción de MDM2 [40].

Después de su estabilización y acumulación en el núcleo, p53 se une a una secuencia específica de DNA y finalmente se da la activación de la transcripción de diferentes genes [36,37].

Miembros de la superfamilia PI3-K (*phosphoinositide-3 kinase*) regulan diferentes procesos incluidos la progresión del ciclo celular y la reparación del DNA. Esta familia se puede dividir en tres subfamilias: TOR, ATM (por sus siglas en inglés *ataxia telangiectasia mutated*) y DNA-PK (*double-stranded DNA-dependent protein kinase*).

Como ya se dijo, tanto ATM/ATR como DNA-PK están involucradas en la reparación del DNA. ATM y ATR participan en la activación del *check point* del ciclo celular como respuesta a daños en el material genético. Mientras que DNA-PK actúa principalmente en la reparación del DNA [41].

DNA-PK es una serina/treonina proteína cinasa nuclear; y para su activación requiere una ruptura en la doble cadena de DNA u otras discontinuidades en el material genético [38]. Dentro de los mecanismos de acción importantes de p53 se tiene el bloqueo de la proliferación celular. Cuando se detecta un daño en el material genético debido a radiaciones UV o IR, las vías ATM/ATR se activan, lo que induce la activación de p53 [38].

Este supresor de tumor favorece el arresto en el ciclo celular para evitar de esta manera la propagación de posibles mutaciones en el DNA. Para llevar a cabo el arresto en la fase G1, p53 induce la transcripción de p21 (proteína inhibidora de las CDKs) que a su vez evita la fosforilación de Rb inactivando a E2F [37,38]. Por otro lado, para el arresto del ciclo celular en G2, la proteína 14-3-3 sigma aumenta la estabilidad de p53 y su transcripción [42], lo que promueve la perturbación de las funciones del complejo ciclina B-cdk1 por la represión de Cdc25c [37].

Este arresto favorece la supervivencia de la célula hasta que el daño es reparado; sin embargo, esto puede ser un riesgo si se arregla el daño y la célula continúa el ciclo. Es en estos casos cuando p53 induce la actividad de senescencia, que es un arresto irreversible del ciclo celular, este estado es la respuesta celular para prevenir transformaciones neoplásicas [38].

Por otro lado, p53 puede inducir la muerte celular programada gracias a la activación de proteínas proapoptóticas, como la proteína PUMA que induce muerte celular por la vía mitocondrial; y a la inducción de la permeabilidad de membrana externa mitocondrial (MOMP) [37].

Entonces, podemos decir que p53 puede favorecer la supervivencia celular a través del bloqueo de la proliferación, permitiendo que la célula repare los daños en el DNA o favoreciendo la inducción de un estado de senescencia, o bien, puede inducir muerte celular a través de mecanismos apoptóticos [38].

La decisión entre supervivencia o muerte depende de los niveles de estrés a los que la célula se someta. Si este estrés no es elevado, se desarrolla una respuesta de

supervivencia. Por el contrario, si la célula se encuentra en condiciones poco favorables, se induce apoptosis [38].

Existen diferentes mecanismos por los cuales una célula decide irse a muerte celular o al arresto del ciclo celular. Estos mecanismos son complejos e involucran modificaciones post-traduccionales sobre p53 o la interacción de este supresor de tumores con otras proteínas (figura 21) [38].

Se ha demostrado que p53 sufre de modificaciones post-traduccionales por fosforilación, acetilación, glicosilación y ubiquitinación. Como ya se mencionó, estas fosforilaciones dependen de diferentes proteínas cinasas como DNA-PK, ATM, ATR, casein cinasa I, entre otras que fosforilan en la región amino terminal. Mientras que los complejos de ciclinas de las fases S y G2 con sus CDKs correspondientes, la protein cinasa C y la casein cinasa II, fosforilan en la región del carboxilo terminal [43].

El daño en el material genético induce la fosforilación de los residuos de Serina 6, 9, 15, 20, 33, 37, and 392 así como la desfosforilación de Ser 376 [39]. Por ejemplo, la radiación UV o IR induce la fosforilación de Ser 392 y la desfosforilación de Ser 376, facilitando la interacción entre p53 y la proteína 14-3-3 sigma [40,45] que aumenta la estabilidad de p53 y su transcripción [42].

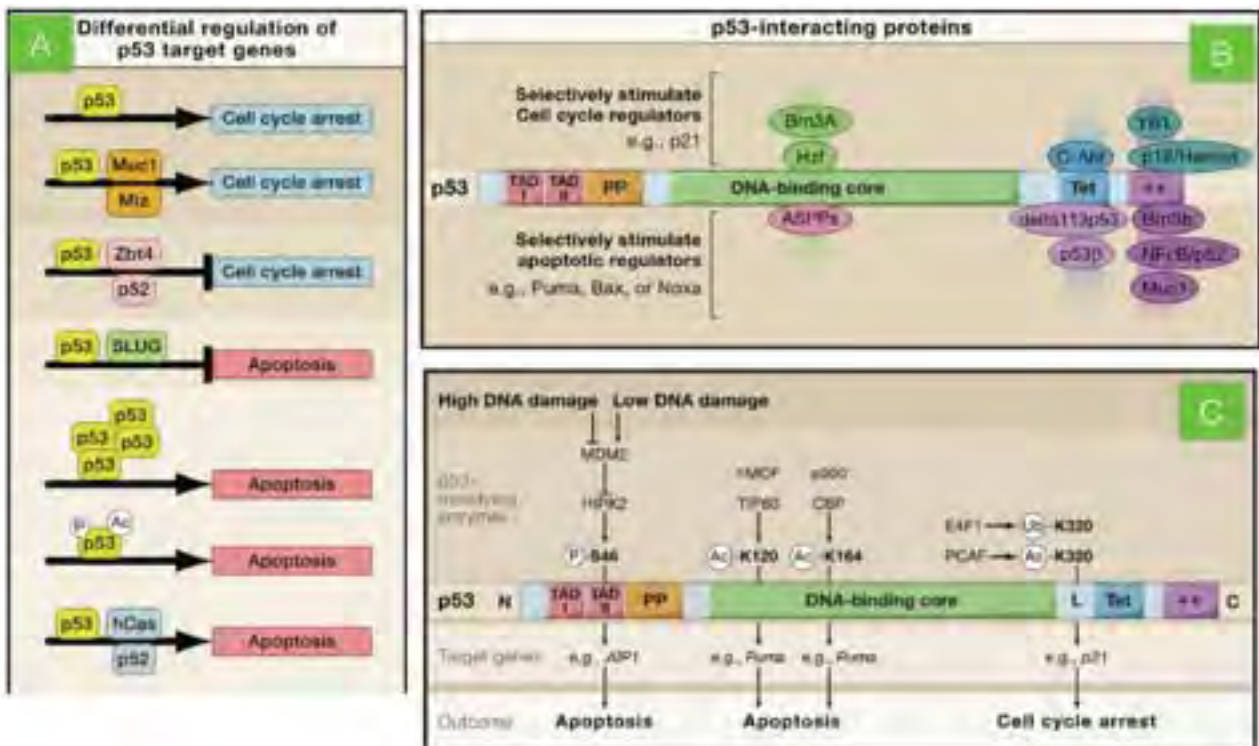


Figura 21. Blancos sobre los que actúa p53 y su regulación post traduccional de p53. A) p53 interactúa con otras proteínas o es fosforilada para generar arresto en el ciclo celular o apoptosis. B) Interacción de diferentes proteínas con p53 favorecen algunas de las funciones de este supresor de tumores. C) Fosforilaciones o acetilaciones inducen apoptosis o arresto en el ciclo. (Obtenido de Vousden and Prives, 2009) [38].

Daños en el DNA también inducen la acetilación de los residuos de lisina 320, 373 y 382 [39]. La proteína de unión a CREB (CBP) y p300 están relacionadas con las histonas acetiltransferasas (HATs) que interactúan con p53 a través de su amino terminal. Esto indica que la actividad de p53 puede estar mediada por la acetilación de CBP / p300 [36,45].

Algunos ejemplos de modificaciones sobre los dominios de p53 y la respuesta que éstas inducen, se pueden observar en la figura 21 [38]. Por ejemplo, la fosforilación de p53 en el residuo de Ser 46 del amino terminal induce la expresión de genes apoptóticos [38].

Por otro lado, modificadores no covalentes pueden decidir el porvenir de la célula por medio de su interacción con p53 [38]. En la figura 21 se observa que diferentes proteínas se pueden unir a p53 en sus diferentes dominios e inducir arresto celular o apoptosis. Brn3A, Hzf, c-Abl, YB1 y p18/Hamlet inducen la expresión de genes relacionados con la regulación del ciclo celular como p21. Por otro lado, ASPPs; la variante de p53: delta113p53; la isoforma de p53: p53β; Brn3b; NFκB/p52 y Muc1 activan la expresión de reguladores apoptóticos como PUMA, Bax y Noxa [38].

2.3.3 Ciclo celular y cáncer

Muchos de los genes cuya mutación induce al desarrollo de tumores están implicados de manera directa o indirecta en el control del crecimiento y de la diferenciación celular [13]. Diferentes mutaciones pueden ocurrir en dos tipos de genes: los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores. Mutaciones en los proto-oncogenes u oncogenes puede promover el crecimiento celular, mientras que la inactivación de los supresores de tumores resulta en una disfunción de las proteínas que inhiben el ciclo celular.

Alteraciones en diferentes proteínas pertenecientes al ciclo celular pueden estar asociadas a la presencia de cáncer. Se han observado mutaciones en genes que codifican para las CDKs, en sus sustratos o en enzimas que las activan; así como en las ciclinas, CKIs y proteínas involucradas en los puntos de control [44].

Aunque existe un bajo número de reportes sobre alteraciones de las CDKs, se sabe que una sobreexpresión de Cdk4 ocurre como resultado de la amplificación de su gen y se ha identificado en melanoma, sarcoma y glioma. Asimismo, se ha reportado una sobreexpresión en las Cdk 1 y 2 en cáncer de colon [44].

Expresiones aberrantes de la ciclina D han sido reportadas en diferentes tipos de cáncer [42]. Hay evidencias donde la ciclina D1 se encuentra sobreexpresada, o bien su gen *CCND1* se encuentra amplificado en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello con una frecuencia de 20-68 % y 26-39 % respectivamente así como en cáncer de mama y pulmón [22,46]. También se sabe que las mutaciones en el gen que codifica para dicha ciclina están asociadas a alteraciones en los linfocitos B [44].

La ciclina E, aunque son pocos los casos, se ha encontrado sobreexpresada en diferentes tipos de cáncer como carcinomas, linfomas, leucemias y sarcomas. Mutaciones en diferentes vías de señalización pueden aumentar la actividad del factor E2F y así la expresión de la ciclina. Otro ejemplo puede ser inhibiendo la degradación de la ciclina, por ejemplo, por mutaciones en PTEN que activan la vía de Akt lo cual regula de manera negativa a GSK-3 inhibiendo la degradación de la ciclina E [25].

Por otro lado, un aumento de la expresión de la ciclina A ha sido detectado en diferentes tipos de cáncer como el carcinoma hepatocelular y el cáncer oral [18]. Existen experimentos donde ratones transgénicos que tienen una sobreexpresión de dicha ciclina, muestran hiperplasia y anormalidades que sugieren alteraciones preneoplásicas [18]. También se sugiere que el complejo ciclina A-cdk puede contribuir a la generación de tumores por la fosforilación de otras proteínas como supresores de tumores, por ejemplo, la fosforilación de p53 en el residuo de Ser 315 [18].

En el caso de enzimas que regulan la activación de las CDKs, se ha observado una desregulación o una sobreexpresión de Cdc25 lo que puede estar asociado a la formación de tumores. Tanto Cdc25A como Cdc25B son oncogenes potenciales, y esta última está sobreexpresado en 32 % de los cánceres de mama [44].

Por el contrario, no se han observado muchas alteraciones en las proteínas Cip/Kip [35]. Existen estudios en ratones donde p27 está disminuido y se ha observado una mayor susceptibilidad a tumorigenesis. La disminución de la proteína p27 se ha visto en carcinomas de mama, colon, próstata, ovarios, pulmón, cerebro y estómago [34,35].

El gen que codifica para p16 se ha encontrado alterado por deleciones y mutaciones puntuales en un porcentaje alto. Por ejemplo, aproximadamente un 50 % de los gliomas y 40–60 % de cáncer nasofarínge y pancreático muestran deleciones de p16 [44]. También se tienen estudios donde una disminución de esta proteína junto con un aumento de la ciclina D, conlleva a la presencia de cáncer [35].

En el caso de p18 y p21 se han encontrado pocas alteraciones. Por otro lado p21 está involucrado en la tumorigénesis a través de la regulación de p53. El gen que codifica para este supresor de tumor es el más reportado como causa de cáncer [44]. Mutaciones en p53 se encuentran de un 50 a un 55% en los diferentes tipos de cáncer alterando el funcionamiento de la proteína lo que evita la inducción del arresto del ciclo celular o apoptosis. En algunos tumores se ha encontrado que p53 es inactivado debido a la amplificación del gen que codifica para MDM2 o bien por la retención de p53 en el citoplasma [45].

Mutaciones en Rb han sido reportadas en cáncer de pulmón y leucemias, aproximadamente un 90 % de los cánceres tienen anormalidades en la vía de señalización de Rb [44].

2.3.4 Ciclo celular como blanco terapéutico contra el cáncer.

Se han desarrollado diversas terapias contra diferentes tipos de cáncer y muchas de éstas tienen como mecanismo de acción la inhibición o la interrupción del ciclo celular.

Los fármacos de primera generación consisten en la inhibición de las CDKs 1, 2 y 4. Posteriormente, llegó una segunda generación donde los inhibidores poseían una mayor potencia y eran más selectivos [22]. Un ejemplo de estos es el inhibidor PD0332991 que es ampliamente usado para cáncer de mama, ovario, pulmón, colon y próstata. Este, al ser un inhibidor selectivo de cdk4/ cdk6, causa un arresto en la fase G1 [22].

Tabla 2. Inhibidores selectivos de CDKs de segunda generación.

Componente (compañía)	Blancos primarios (IC50)	Tipo de Cáncer	Fase clínica
BAY1000394 (Bayer)	CDK1–cyclin B (7 nM) CDK2–cyclin E (9 nM) CDK9–cyclin T1 (<10 nM) CDK4–cyclin D1 (11 nM)	Tumores sólidos (ciclina E amplificada) Cáncer de pulmón	II
P1446–05 (Piramal Healthcare)	CDK1–cyclin B (n/a) CDK4–cyclin D1 (n/a) CDK9–cyclin T (n/a)	Tumores sólidos Leucemia Melanoma	I
PD0332991 (Pfizer)	CDK4–cyclin D3 (9 nM) CDK4–cyclin D1 (11 nM) CDK6–cyclin D2 (15 nM) CDK2–cyclin E2 (>10 µM) CDK2–cyclin A (>10 µM) CDK1–cyclin B (>10 µM) CDK5–p25 (>10 µM)	Cáncer de mama tardío Leucemia mieloide Cáncer de pulmón Cáncer de ovario Glioblastoma Cáncer pancreático Liposarcoma Leucemia linfoblástica	I II
R547 (Hoffman–Roche)	CDK4–cyclin D (n/a) CDK2–cyclin A (0.1 nM) CDK5–p35 (0.1 nM) CDK1–cyclin B (0.2 nM) CDK2–cyclin E (0.4 nM) CDK6–cyclin D3 (4 nM) CDK7–cyclin H (171 nM) GSK3α (46 nM) GSK3β (260 nM)	Tumores sólidos	III I

Adaptado de Musgrove et al., 2011 [22]. Información obtenida del sitio web ClinicalTrials.gov.

En el caso de cáncer de testículo, el tratamiento más empleado es el cisplatino, cuya acción repercute de manera indirecta en la actividad de p53. Este fármaco y otros agentes quimioterapéuticos han sido desarrollados para el tratamiento de leucemias, melanoma, cáncer de pulmón, de colon y de próstata [45]. En la tabla 2 se mencionan algunos de los inhibidores conocidos para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

2.4 Alternativas terapéuticas para el CACYC.

Actualmente, las alternativas terapéuticas para este tipo de neoplasia son radio y quimioterapias. Dentro de los fármacos prescritos para este carcinoma, se puede mencionar a Cetuximab, agente dirigido contra el Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFR) [47,48]. A pesar de que existe evidencia que muestra la efectividad de este agente terapéutico, también se ha reportado que posee efectos secundarios como lo son erupciones en la piel, dermatitis con picazón, hipomagnesemia, entre otras [48,49].

Por esta razón, la búsqueda de nuevas alternativas naturales es el objetivo principal de muchos grupos de investigadores. Existe evidencia pre-clínica donde los flavonoides poseen un efecto citotóxico contra algunas líneas tumorales, por lo cual se están desarrollando fármacos basados en estos compuestos para el tratamiento de diferentes neoplasias. Tal es el caso de Oncamex, un derivado de miricetina, sintético de segunda generación empleado para el posible tratamiento contra el cáncer de mama [50].

2.5 Flavonoides.

Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en frutos, plantas, flores y semillas, ya que son sintetizados como metabolitos secundarios [51,52]. Estos compuestos son los encargados de proteger contra organismos fitopatógenos y la radiación UV, actuando contra el estrés oxidativo, y a su vez regulan el crecimiento de plantas y su coloración [51,53]. Los flavonoides son ampliamente estudiados debido a las diversas actividades biológicas que presentan, lo que sugiere que podrían ser candidatos a compuestos con un posible uso terapéutico.

2.5.1 Estructura química, síntesis y clasificación de los flavonoides.

Estos metabolitos secundarios son compuestos del tipo C6-C3-C6, constituidos por dos anillos fenólicos (A y B) ligados a un anillo pirano (C) (Figura 22) [52]. Estos compuestos se pueden encontrar en su forma libre (aglicona), como glicósidos (Figura 23), como sulfatos y algunas veces pueden estar formando dímeros o polímeros [52].

Su síntesis tiene lugar en las plantas a partir de unidades de acetato y de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y la tirosina, dando lugar al ácido cinámico y al ácido parahidroxicinámico que al condensarse con malonil-CoA generan la estructura base de los flavonoides [52,54]. Posteriormente, un grupo de enzimas como isomerasas,

reductasas e hidroxilasas, modifican el esqueleto base, obteniendo los diferentes grupos de flavonoides [53].

Por lo tanto, la clasificación de los flavonoides se basa en las variaciones que puede haber en el anillo pirano. En la tabla 3, se mencionan los principales grupos de flavonoides, así como ejemplos de estos y sus estructuras químicas [51,52,54].

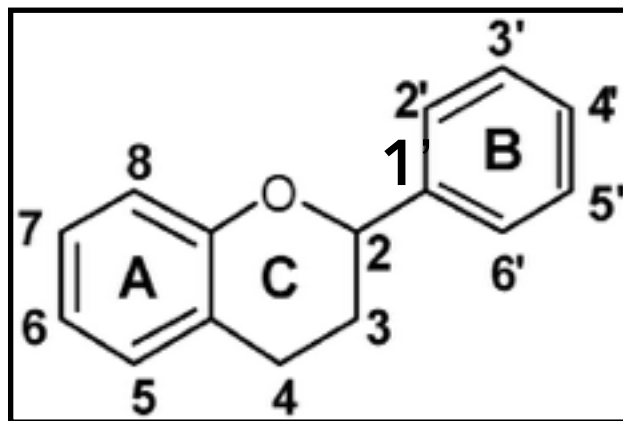


Figura 22. Estructura química básica de los flavonoides . (Adaptado de Racchi, 2013) [96].

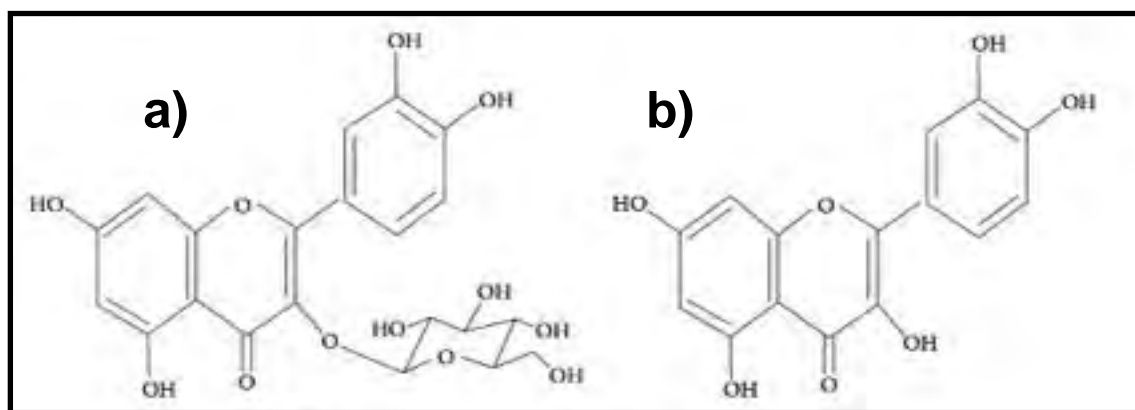
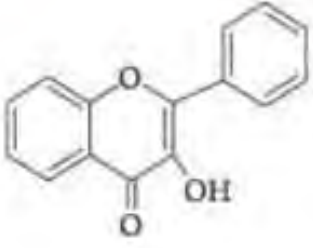
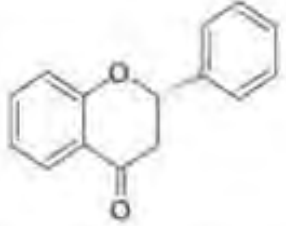
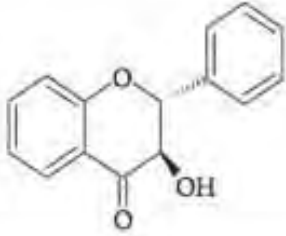
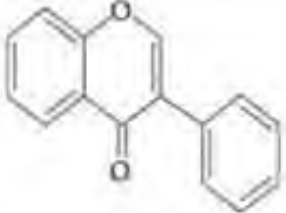
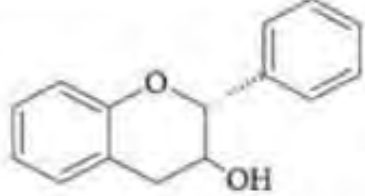
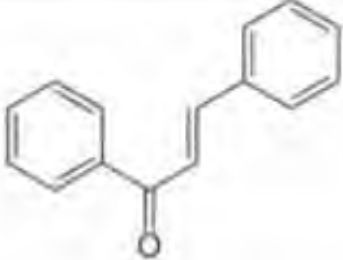


Figura 23. Estructura química de los flavonoides. a) Glicósido b) Aglicona. (Adaptado de Kumar and Pandey, 2013) [51].

Tabla 3. Estructura química de diferentes grupos de flavonoides y ejemplos.

Estructura química	Grupo	Ejemplos
	Antocianinas	Cianidina Delfinina Peonidina
	Flavonas	Luteolina Apigenina Crisina Diosmetina Nobiletin

Estructura química	Grupo	Ejemplos
	Flavonoles	Morina Quercetina Kaempferol Galangina
	Flavanonas	Hesperetina Naringenina
	Flavanonoles	Txifolin
	Isoflavonas	Genisteína Daidzeína
	Flavan-3-oles	Catquina Epicatequina
	Chalconas	Buteina

Estructuras obtenidas de Kumar and Pandey, 2013 [51].

2.5.2 Actividades biológicas de los flavonoides.

Diferentes grupos de estudio han reportado las actividades biológicas de estos compuestos. Principalmente, se ha descrito su actividad antioxidante, la cual depende de los grupos hidroxilos y de su posición [52]. Sin embargo, también hay reportes de su actividad antibacteriana, antiinflamatoria, de protección hepatocelular y anticancerígena [54].

La mayoría de los cambios fisiológicos presentes en el cáncer están asociados a alteraciones en diferentes vías de señalización, las cuales son blancos para el tratamiento de dicha enfermedad [55]. Asimismo, mutaciones en p53 son las anomalías más comunes en diferentes tipos de cáncer. Se tienen reportes de flavonoides que disminuyen la expresión de estas mutaciones favoreciendo a su vez la inhibición del ciclo celular [51].

2.5.3 Absorción y metabolismo de los flavonoides.

La absorción de los flavonoides en su forma glicosilada es baja debido a su estructura no lipofílica. Para absorberse con una mayor facilidad es necesario que estos se hidrolicen generando el azúcar y la aglicona. La hidrólisis puede darse por el pH del ácido estomacal o por la acción de ciertas enzimas bacterianas [54]. La absorción de la aglicona puede tardar hasta tres horas por lo que la concentración pico de los flavonoides es a las 1.75 horas. Su distribución es homogénea en todos los tejidos y tienen un metabolismo de primer paso. Dicho metabolismo se da en dos sitios: 1) hígado; aquí se da lugar a las reacciones de fase I donde se adicionan o se exponen los grupos polares y 2) colon; las reacciones que se llevan a cabo aquí son de fase II, donde la microbiota degrada a los flavonoides y a su vez se conjugan con glicina, ácido glucurónico y sulfatos [52].

2.6 Morina.

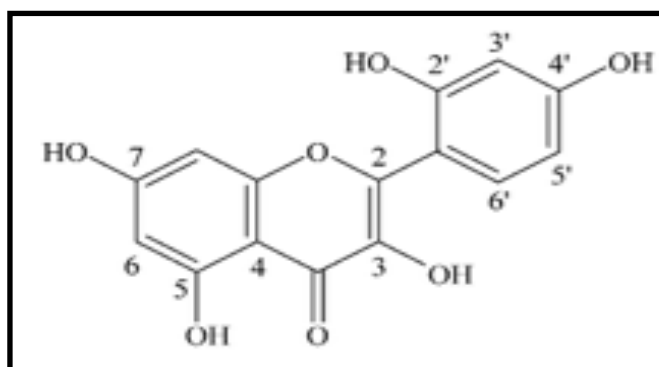


Figura 24. Estructura química de la morina.
(Obtenido de Hsiang, Wu and Ho, 2005) [63].

2.6.1 Características y localización.

Morina (3,5,7,2',4'- pentahidroxi flavona) es un pigmento amarillo perteneciente al grupo de flavonoles [56]. Consiste en dos anillos aromáticos que están unidos a un anillo heterocíclico oxigenado (figura 24) [57]. Este flavonoide se puede encontrar principalmente en hojas, frutos, tallos y ramas de diferentes especies de plantas de la familia *Moraceae* [59]. Por ejemplo, se pueden extraer altas concentraciones de este flavonoide de las ramas de *Morus alba* (mora blanca). Otras plantas pertenecientes a esta familia son *Maclura tricuspidata*, naranjo de los osages (*Maclura pomifera*), árbol de jaca (*Artocarpus heterophyllus*), y *Maclura tinctoria* [59,60]. También se puede encontrar en el vino tinto; almendra (*Prunus dulcis*, familia *Rosaceae*); castaña (*Castanea sativa*, familia *Fagaceae*); entre otros [60].

2.6.2 Actividades biológicas de morina.

Diferentes grupos de investigadores han descrito las actividades biológicas de este flavonoide dentro de las cuales se puede mencionar su capacidad antioxidante, antiinflamatoria, antialérgica, antimutagénica, anticarcinogénica y antiproliferativa [58,61,62,63,64]. La morina suprime la proliferación en diferentes células tumorales, existen reportes que describen su efecto sobre el carcinoma oral de células escamosas, cáncer de colon y células de leucemia, además de suprimir la transformación hepatocelular [62,65,66].

3. Antecedentes

3.1 Flavonoides y cáncer de faringe.

Diferentes equipos de investigación se han adentrado en la búsqueda de alternativas naturales, como lo son los flavonoides, para la prevención y tratamiento de diferentes tipos de cáncer, por ejemplo el cáncer de faringe.

El equipo de Mi-Ra Park, en Corea, ha investigado el efecto de Licochalcona A en células *FaDu* y observaron que había una condensación de la cromatina en las células tratadas por 24h. Asimismo el número de células apoptóticas se incrementó de una manera dependiente del tiempo y las caspasas y PARP polimerasa, que son factores apoptóticos, fueron activados. Por el contrario, los factores antiapoptóticos disminuyeron. Con base en sus resultados, ellos concluyen que el efecto citotóxico de este flavonoide es debido a una activación de la vía MAPK, por lo que sugieren que puede ser un agente quimioterapéutico debido a su efecto sobre las células *FaDu* [46].

Otro grupo de investigadores en Estados Unidos, evaluó el impacto de flavonoides como apigenina y kaempferol en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Emplearon células *FaDu* como modelo *in vitro*, además realizaron explantes de esta línea celular en ratones para evaluar el crecimiento del tumor con y sin tratamiento. Sin embargo, encontraron que a pesar de que en el modelo *in vitro* estas moléculas sí reducen la viabilidad celular, no se observa la disminución en el tamaño de tumores *in vivo* [67].

En el caso de las proantocianidinas, el grupo de Santosh K. Katiyar ha evaluado cómo éstas inhiben el proceso de invasividad del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Por medio de un ensayo de MTT, este grupo estableció que el tratamiento con estos flavonoides inhibe el efecto invasivo de una manera dependiente de la dosis, así como la expresión del factor de transcripción NF-kB; lo cual es importante porque este factor se encuentra sobreexpresado en diferentes neoplasias favoreciendo la metástasis [68]. Este mismo grupo de investigadores en la universidad de Alabama observó que la viabilidad celular disminuía de manera dosis y tiempo dependiente con el tratamiento de proantocianidinas. Este efecto citotóxico fue asociado con el arresto del ciclo celular en la fase G1 [69].

Existen estudios que demuestran el efecto que tienen los componentes del té verde sobre este carcinoma de cabeza y cuello. Un equipo de investigadores en Estados Unidos y en Corea, evaluó los efectos del flavonoide epicatequin galato (ECG). Ellos encontraron que en el carcinoma de cabeza y cuello la ciclina D1 se encuentra sobreexpresada y el flavonoide tiene un efecto inhibitorio sobre la expresión de ésta [70].

Existen estudios donde se han empleado diferentes compuestos ricos en flavonoides. Tal es el caso del grupo de Taiwán que evaluó el efecto de los componentes de Silimarina entre los cuales se encuentra una amplia variedad de flavonoides. Observaron que este compuesto aumenta la expresión de PTEN inhibiendo la fosforilación de Akt y la expresión de la familia Bcl-2 [71].

Thomas Walle y sus colaboradores examinaron el efecto de diferentes flavonas metiladas en células de cáncer oral y compararon su efecto con inhibidores de la proliferación celular. Encontraron, por medio de citometría de flujo, que las flavonas causan un arresto en la proliferación celular en la fase G1, a diferencia de los inhibidores que generan el arresto en la transición de G2/M [72].

3.2 Flavonoides, cáncer y arresto del ciclo celular.

Se ha evaluado el efecto de diversos flavonoides en el ciclo celular de diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, como ya se mencionó en el apartado anterior, Katiyar y su grupo de investigadores evaluaron el efecto de las proantocianidinas en células escamosas de carcinoma de cabeza y cuello observando un arresto del ciclo celular en la fase G1. Esta inhibición se debe a la baja en la expresión de la ciclina D y la Cdk, además se observó una sobreexpresión de los inhibidores de Cdk y una baja expresión de E2F [69].

Existen reportes donde se evaluó la inhibición del crecimiento celular y la apoptosis por epicatequin galato suprimiendo a la ciclina D1 de manera dosis y tiempo dependiente en células de carcinoma de cabeza y cuello. Se sugiere que la supresión de la vía de señalización de β -catenina es el mecanismo por el cual ECG induce el arresto del ciclo celular [70]. En otros estudios donde emplearon epigallocatequin galato reportaron que éste inhibe el crecimiento celular del cáncer de pulmón y en combinación con curcumina a bajas concentraciones, favorece el arresto del ciclo celular en las fases G1 y S/G2, esto por la inhibición de las ciclinas D1 y B1 [73]. Asimismo, en otro estudio, reportaron que este flavonoide por sí solo, genera un arresto del ciclo celular en la fase G0/G1. Mencionan que el arresto celular puede deberse a la supresión de la vía de señalización EGFR, ya que observaron una disminución en la activación de AKT y ERK1/2. Esto llevó, a su vez, a la inhibición de la expresión y localización nuclear de la ciclina D1 [74].

Epigallocatequin galato, epigallocatequin, epicatequin galato y epicatequin son compuestos que se encuentran en el té verde. Salucci y su equipo evaluaron los componentes de este té así como de quercetina-3-glucosido en células de adenocarcinoma de colon. Estos flavonoides poseen un efecto antioxidante significativo; sin embargo, esto no está relacionado con el arresto del ciclo celular ya que sólo epigallocatequin galato es capaz de interferir con el ciclo en esta línea celular [75].

También se ha evaluado Quercetina en cáncer de hígado. Se encontró un aumento en el proceso apoptótico reduciendo la proliferación celular. Además, se observó una reducción en las células pertenecientes a las fases G1 y S y una acumulación de éstas en la fase G2 con una reducción de la expresión de ciclinas D1, A y B y de la Cdk1 [76]. Kaempferol es otro flavonoide que ha sido estudiado en el arresto del ciclo celular en cáncer de colon. Este compuesto induce dicho arresto en la fase G1 en tiempos cortos (6h), y en tiempos largos (12h) un arresto en la transición de G2/M. Además, este flavonoide inhibe la actividad de Cdk2 y Cdk4, así como la expresión de proteínas como la ciclina D1, ciclina E y ciclina A. También suprime la fosforilación de la proteína retinoblastoma, y los niveles de Cdc25c, Cdc2 y ciclina B1 disminuyen [77].

Formononetina es una isoflavona O-metilada que fue empleada por el grupo de Tianyu Li en China, para tratar células de cáncer de próstata. Esta isoflavona inhibe de manera dosis- dependiente la proliferación celular del ciclo celular, causando un arresto en la fase G0/G1. Esto coincide con la inhibición de la fosforilación de Akt, disminuyendo la expresión de proteínas como la ciclina D1 y la Cdk4 [78].

Otro flavonoide que ha sido evaluado para ver su efecto en el arresto del ciclo celular de cáncer oral es Baicaleina. Esto se llevó a cabo en la fase G1; se observó que hay una disminución en la expresión de Cdk4, ciclina D1, y en la fosforilación de Rb [79].

Silimarina es conocida porque regula de manera negativa la progresión del ciclo celular a través de una baja en la expresión de la ciclina D1. Un equipo de investigadores en Corea evaluó este flavonoide en células de cáncer de colon y observó que la expresión de ciclina D1 disminuye con el tratamiento. Asimismo, se vio que este compuesto incrementa la fosforilación de la ciclina en el residuo Thr-286 [80], lo que promueve su exportación al citoplasma para su posterior degradación [20,26]. Este flavonoide también ha sido evaluado por otro grupo en Alabama en células de melanoma. Se encontró que reduce la viabilidad celular a través la inducción de apoptosis y del arresto en la fase G0/G1 y G2/M. Este arresto es debido a la baja de expresión de proteínas como PCNA, ciclina D1 y D2, y cdk 4 [81].

3.3 Morina, cáncer y arresto del ciclo celular

El flavonoide morina ha sido evaluado por sus diferentes actividades biológicas, de las cuales se puede mencionar su actividad anti cancerígena. Por ejemplo, en un trabajo de investigación se indujo la transformación celular de hepatocitos empleando 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) y se observó que morina inhibe esta transformación celular por medio de la inhibición de la cinasa p38 y el arresto del ciclo celular en la fase S [63].

Otro equipo de investigadores evaluó el efecto de este flavonoide sobre la viabilidad de células de hepatoma. A diferencia del estudio anterior, aquí reportaron un arresto del ciclo celular en la fase G2/M, esto por una alteración en la expresión de proteínas tales como: ciclina B y Cdc2 [82]. El efecto citotóxico del flavonoide también fue evaluado en células de leucemia HL-60 donde encontraron que induce apoptosis y un arresto del ciclo celular en la fase G2/M por una promoción de las proteínas p21 y Wee1 y una baja en la expresión de Cdc25c, ciclina A y ciclina B [56]. Un estudio similar presentó en células de leucemia linfoblástica evidencia del efecto citotóxico de morina, aquí se observó un cambio morfológico y un efecto apoptótico [83].

Grupos de investigadores han centrado su atención en la búsqueda de tratamientos para el carcinoma oral de células escamosas, Brown y su equipo en Reino Unido, son un ejemplo de estos grupos. Ellos evaluaron la función estructural de los grupos hidroxilo localizados en la estructura del flavonoide morina. Ellos concluyeron que ambos grupos son necesarios para la selectividad tumoral del compuesto; además este compuesto, al igual que en los casos anteriores, propicia un arresto en el ciclo celular en la fase G2/M asociado a la fosforilación e inhibición de cdk 1 [84].

Tabla 4. Morina, cáncer y arresto del ciclo celular.

Tipo de cáncer	Eventos estudiados	Línea celular	Concentración	Referencia
Leucemia	Inducción de apoptosis y arresto del ciclo celular en G2/M	HL-60	100-500µM	56
Carcinoma hepatocelular	Inhibición en la transformación hepatocelular y arresto del ciclo celular en S	Human Chang liver cell line	100µM	63
Hepatoma	Arresto del ciclo celular en fase G2/M	Hepa1c1c7	165µM	82
Leucemia linfoblástica	Inducción de apoptosis y cambios morfológicos	HUT-78	165-331µM	83
Carcinoma oral de células escamosas	Arresto en el ciclo celular en G2/M	Cultivo primario de carcinoma oral de células escamosas	115µM	84

4. Justificación

El impacto que tiene el carcinoma de células escamosas corresponde a un 12% de las malignidades en la cabeza y cuello [6]. El incremento de este carcinoma ha aumentado de tal modo que hoy en día ocupa el sexto lugar a nivel mundial [8,9]. México se encuentra entre los primeros 5 lugares de América Latina en CACYC [8,9]. A pesar de que existen alternativas terapéuticas para el tratamiento de este tipo de neoplasias, sólo la mitad de las personas afectadas sobreviven más de cinco años después del diagnóstico [8].

Por esta razón, la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de este carcinoma se ha convertido en un punto de relevancia. Y, actualmente, esta búsqueda se da en productos de origen natural como los flavonoides. Se tienen reportes sobre el efecto citotóxico de algunos de estos compuestos en diferentes tipos de neoplasias. Su mecanismo de acción se basa en un efecto sobre proteínas reguladoras del ciclo celular, causando un arresto en éste para inhibir la proliferación. Por lo tanto, el ciclo celular es uno de los blancos terapéuticos más importantes para el tratamiento de cáncer.

Un ejemplo de estos flavonoides es morina, compuesto natural encontrado en diferentes plantas de origen chino, del cual se tienen reportes de su actividad anti proliferativa en diferentes tipos de cáncer. Dentro de sus mecanismos de acción se puede mencionar un efecto inhibitorio sobre proteínas relacionados con el progreso del ciclo celular. Si bien es cierto que existen reportes de la actividad de este flavonoide sobre carcinoma oral de células escamosas, estos son escasos y su investigación sobre el cáncer de faringe es nula.

Por lo anterior, se ha propuesto en este proyecto el uso del flavonoide morina para evaluar el efecto que éste tiene sobre el ciclo celular del carcinoma de faringe de células escamosas.

5. Hipótesis

Si el flavonoide morina tiene un efecto sobre la migración celular y un efecto citotóxico en células de cáncer de faringe *FaDu*, entonces estos mecanismos pueden estar relacionados con los niveles de proteínas que regulan positivamente el progreso del ciclo celular.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general.

Evaluar en un modelo *in vitro* de células de cáncer de faringe (*FaDu*) el efecto del flavonoide morina sobre la viabilidad y migración celular, así como los niveles de proteínas relacionadas con la progresión del ciclo celular.

6.2 Objetivos particulares.

- I. Evaluar el efecto citotóxico del flavonoide morina por medio de un ensayo de MTT a diferentes tiempos y concentraciones.
- II. Evaluar el efecto que la morina tiene sobre la migración celular a través de un ensayo de cicatrización en diferentes tiempos.
- III. Realizar un tratamiento curso-temporal y evaluar, por medio de Western Blot, la expresión de proteínas relacionadas con la regulación del ciclo celular empleando dos distintas concentraciones del flavonoide.

7. Materiales y métodos

7.1 Material y equipo.

Agitador magnético.	Espectrofotómetro (Pharmacia Biothec).
Balanza (Sartorius).	Fuente de poder para cámara de transferencia (Bio-Rad).
Baño (Riossa).	Fuente de poder para cámara de electroforesis (OWL).
Baño seco (Bio-dynamics).	Incubadora (SANYO).
Cajas de cultivo celular de 6 pozos (Corning).	Lector de placas (BioTek).
Cajas Falcon (Corning).	Microscopio de objetivos invertidos (Olympus CK2).
Cámara.	Micropipetas.
Cámara de electroforesis vertical (Amersham Biosciences).	Sonicador (Ultrasonic Processor).
Cámara de transferencia (Bio-Rad).	Tubos clínicos.
Campana de flujo laminar (The Baker Company).	Tubos Eppendorf.
Centrífuga (Thermo Scientific).	

7.2 Softwares.

DIGI-DOC	LabWorks
GEN 5	ImageJ
GraphPad Prism	

7.3 Metodología.

7.3.1 Cultivo celular de cáncer de faringe.

Para la realización de este proyecto se empleó la línea celular de cáncer de faringe *FaDu* (ATCC® HTB-43). Estas células se crecieron en un medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (SIGMA D-7777) con rojo de fenol y suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor (GIBCO BRL [cat.no. 10099-141](#)) y 1 % de antibiótico-antimicótico (GIBCO BRL [cat.no. 15240-096](#)). Los cultivos celulares se incubaron en cajas falcon a 37°C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Cada tercer día se cambió el medio hasta que las células alcanzaron una confluencia del 70-80 %.

7.3.2 Viabilidad Celular.

Las células fueron tripsinizadas con solución de tripsina (GIBCO BRL no. cat. 25200-072). Posteriormente se transfirieron 20µL del medio a cajas de 96 pozos y, al observar confluencia, se trataron con diferentes concentraciones del flavonoide morina (SIGMA M4008 [100 %]) a partir de un stock 1mM, empleando Metanol [1 %] como vehículo. Las concentraciones del flavonoide utilizadas fueron de : 0, 50, 100, 150 y 200µM; en tres

diferentes tiempos: 24, 48 y 72h, por sextuplicado. Una vez concluido el tiempo de incubación, se retiró el medio de los pozos con ayuda de un sistema de vacío y se adicionaron 50µL de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; azul de tiazolilo) 1mM. Se incubó durante 4 horas a 37°C y finalmente se retiró el medio y se añadió 50µL de DMSO para la solubilización de los cristales formados. Al ser una metodología colorimétrica, la placa se leyó en el lector de placas a una longitud de onda de 550nm, empleando el programa GEN 5. Se consideró como 100 % de viabilidad celular a los grupos controles.

7.3.3 Migración Celular.

Las células fueron tripsinizadas y transferidas a una placa de 6 pozos (80 µL por pozo) y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Una vez que se observó confluencia de 70 al 80 %, se ayunaron las células por 12h con Medio DMEM 2 % SBF. Posteriormente se realizó una cicatriz en cada uno de los pozos con una punta de 200µl y se hicieron 2 lavados con PBS (Buffer de fosfato salino) para retirar las células desprendidas. Las células se trataron con 1µl de AraC 10µM (inhibidor de proliferación) y con 100µM de morina en cinco diferentes tiempos: 0, 6, 9, 12 y 24h; teniendo un pozo control para cada tiempo. Al final de cada uno, se tomaron imágenes en tres diferentes campos de todos los grupos empleando el objetivo 10X. Gracias al programa ImageJ se midieron las áreas libres de células y se hicieron los cálculos correspondientes para poder obtener el porcentaje de migración.

7.3.4 Tratamiento celular para curso temporal.

Las células fueron tripsinizadas y transferidas a una placa de 6 pozos (80µL por pozo). Se dejaron incubando a 37°C en una atmósfera de 5 % de CO₂ hasta que se observó confluencia. Posteriormente, se retiró el medio de las cajas y se ayunaron las células por 1h a 37°C, empleando Medio DMEM 2 % SBF. Una vez transcurrido el tiempo, se trataron las células con dos concentraciones diferentes de morina: 100µM y 200µM, a partir de un stock 1mM del flavonoide, en diferentes tiempos: 0, 15, 30, 60, 90 y 120min.

7.3.5 Western Blot.

Después del tratamiento, la reacción se paró adicionando 700µL de Ortovanadato de sodio 1mM a cada pozo. Los pozos fueron raspados para desprender las células y posteriormente el medio se colocó en tubos eppendorf que se centrifugaron (14 000rpm; 10min; 4°C). El sobrenadante se retiró con el sistema de vacío y, para la extracción de proteínas totales, las células fueron lisadas con un Buffer de Lisis (Tris-HCL 50mM, NaCl 150mM, 1 % Nonidet P-40, leupeptina 10µg/ml, aprotinina 50g/ml, Na₃VO₄ 0.4mM, NAF

10mM y Na₃P₂O₇ 10mM) y sonicadas. Después se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, empleando una curva patrón de Albúmina Sérica Bovina (BSA) y se realizaron los cálculos correspondientes para el procesamiento de proteínas por Western Blot. Se prepararon las muestras de proteína extraída diluyendo en 6μL de buffer de carga (Azul de Coomasie 5 %, β-mercaptoetanol) y se incubó durante 10min en una placa a 60°C. Se cargaron 32μg de proteína en geles de poliacrilamida al 10 % en un equipo de electroforesis (Amersham Biosciences) a 96V durante 1 hora. Las proteínas fueron transferidas (10V, 1h) a una membrana de PVDF (GE Healthcare) y se bloquearon con una solución TBS 1X (Tris-HCl 5M pH 7.5 y NaCl 1.5M), con leche libre de grasa (5 %) y Tween-20 (0.1 %) durante una hora. Se incubó por 12h con el anticuerpo primario específico para cada una de las siguientes proteínas con su respectiva dilución (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA):

Tabla 5. Diluciones de anticuerpos.

Anticuerpo	Dilución
Ciclina B	1:2000
Ciclina A	3:10000
Ciclina D1	1:2000
p-Ciclina D1	1:2000
p53	3:10000

Posteriormente a la incubación con el anticuerpo primario se realizaron lavados de las membranas en una solución de TBS 1X con 500μL de Tween-20 (TBST), con recambio del buffer cada 10min durante media hora. A continuación, las membranas se incubaron con su anticuerpo secundario correspondiente (1:10000) durante 1h y media a temperatura ambiente y con agitación suave. Se realizaron lavados con una solución de TBST durante media hora con recambios de la solución cada 10min y al finalizar los lavados se reveló en placas fotográficas (GE Healthcare) con ayuda de la solución de quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotechnology). El análisis densitométrico se llevó a cabo sobre las bandas reveladas con ayuda de los programas DIGI-DOC y LabWorks. Cada uno de los resultados se comparó con su basal correspondiente, considerando a éste como el 100 %. En los resultados se muestran las figuras de los experimentos representativos.

7.3.6 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico del ensayo de viabilidad (MTT), se realizó una ANOVA de una vía ($P < 0.05$), ya que sólo se comparó la viabilidad celular de los cinco grupos (de diferentes concentraciones). Esto se hizo para cada uno de los tres tiempos con una

comparación múltiple Dunnett, utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.0. En el caso de Western Blot, también se hizo una ANOVA de una vía ($P < 0.05$) para el análisis estadístico de los duplicados de cada una de las proteínas obtenidas.

Por el contrario, para el ensayo de migración celular se realizó una ANOVA de dos vías, ya que se buscaba comparar las diferencias entre ambos grupos en diferentes tiempos. Esto se hizo para el triplicado del ensayo empleando una prueba post-hoc Bonferroni gracias al programa GraphPad Prism.

8. Resultados

8.1 Efecto de la morina sobre la viabilidad en la línea celular FaDu.

Para poder evaluar si el flavonoide morina posee un efecto citotóxico en la línea celular *FaDu*, se realizó un ensayo de MTT empleando cinco concentraciones diferentes del flavonoide, en tres tiempos. Como se observa en la figura 25, la viabilidad celular disminuye de manera dependiente de la concentración y del tiempo a las 48 y 72h, siendo el efecto más claro a las 72h, con una diferencia significativa desde la concentración de 50 μM . Por otro lado, en tiempos cortos (24h) se observa una diferencia significativa sólo con 200 μM del flavonoide morina, lo que nos sugiere que esta es la concentración necesaria para observar un efecto sobre la viabilidad celular.

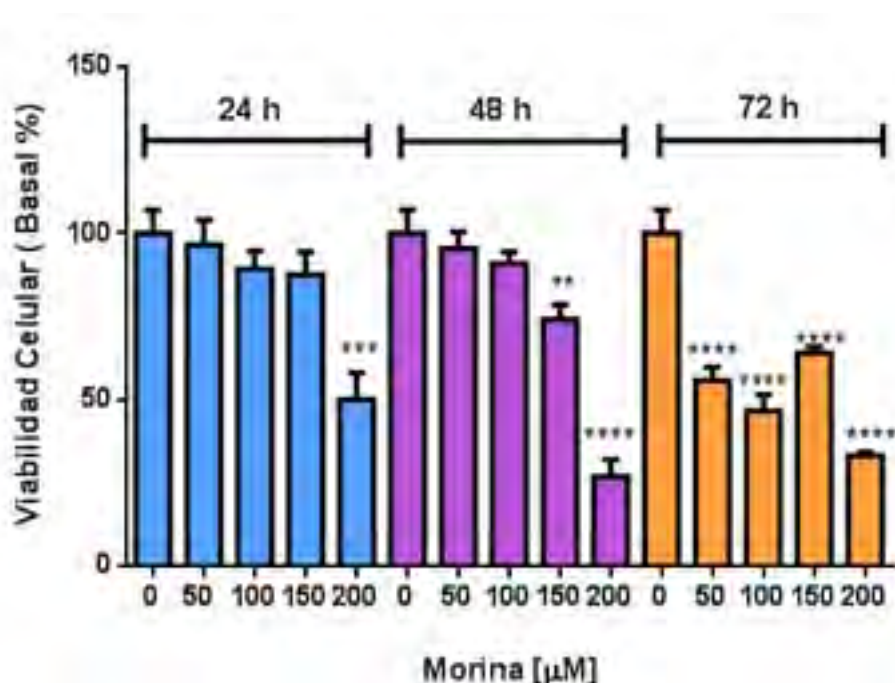


Figura 25. Efecto de la morina sobre la viabilidad en la línea celular FaDu. Las células fueron incubadas en cajas de 96 pozos durante toda la noche y posteriormente fueron tratadas con morina (1mM) a diferentes concentraciones y tiempos. Asimismo, se evaluó si el vehículo tenía un efecto sobre la viabilidad celular, empleando la concentración mayor de metanol [0.2%] en el tiempo más largo (dato no mostrado).

8.2 Efecto de la morina sobre la migración celular de FaDu.

La migración e invasividad celular son características que favorecen la generación de metástasis, por esta razón es importante la estandarización y realización de ensayos que nos permitan evaluar el efecto sobre la motilidad celular de posibles agentes terapéuticos. Para poder llevar a cabo el ensayo de migración celular (“wound healing”) se realizó una cicatriz en cada pozo. Con base en los resultados obtenidos en el ensayo de MTT, se seleccionó una concentración del flavonoide menor que la citotóxica ($< 200\mu\text{M}$), esto con el fin de evitar el desprendimiento celular y poder descartar que el efecto observado en el ensayo de migración no fuera debido al efecto sobre la viabilidad. Las células se trataron con 100 y 150 μM de morina y el proceso de migración celular se fue observando en diferentes tiempos tomando imágenes en tres campos (figura 26). Como se puede observar, conforme aumenta el tiempo, las células comienzan a moverse disminuyendo el grosor de la cicatriz. Sin embargo, las células tratadas con 150 μM se desprendieron a partir de las 6h (Anexo A).

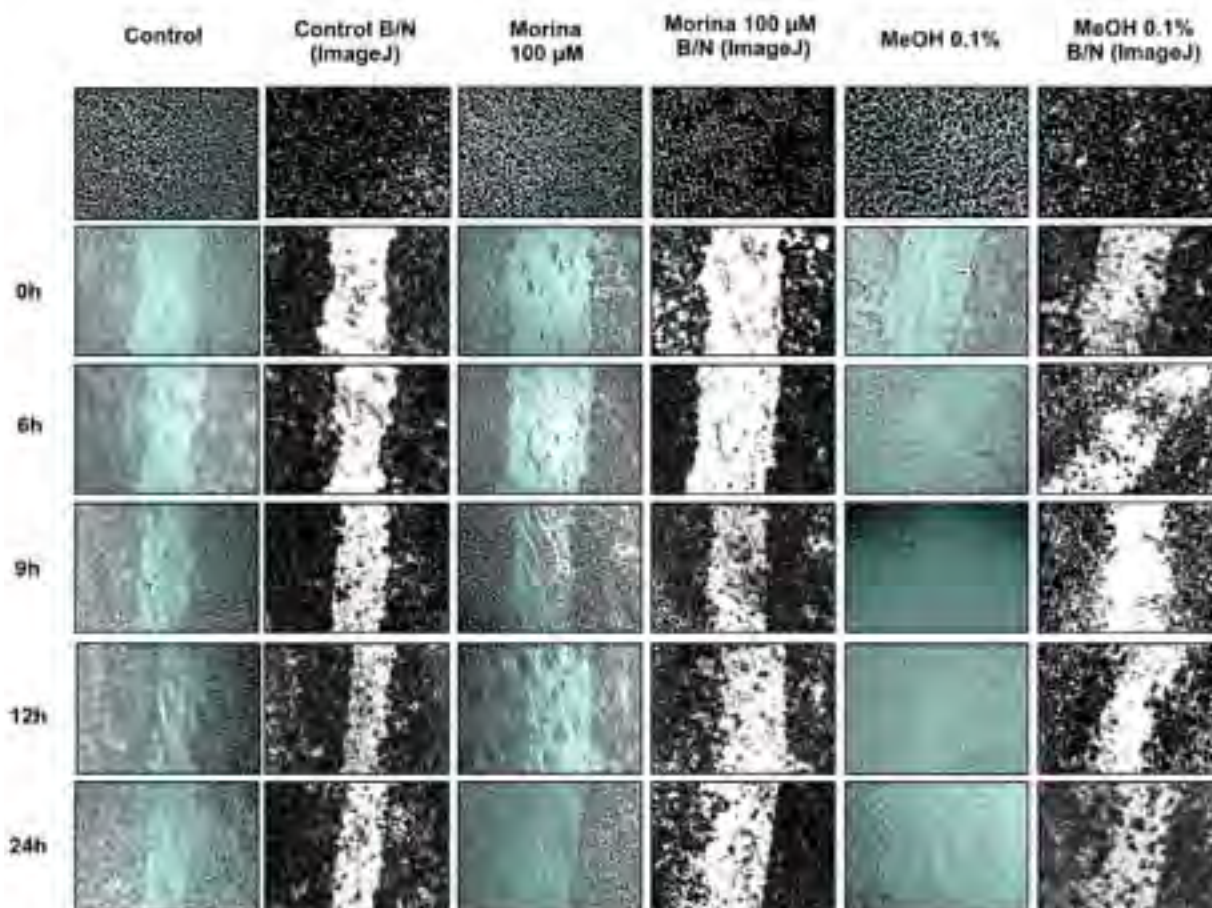


Figura 26. Efecto de la morina 100 μM sobre la migración celular de FaDu.

Las células fueron incubadas en cajas de 6 pozos hasta observar confluencia del 70-80%. Se realizó una cicatriz en la superficie de los pozos. Se evaluaron en diferentes tiempos tres grupos: 1) control; 2) con tratamiento de morina (100 μM); y 3) con vehículo (0.1%). En la imagen se observan las fotos tomadas al final de cada tiempo empleando el objetivo 10X.

Los porcentajes de migración celular se encuentran en la tabla 5 y en el gráfico de la figura 27. Nuestros resultados muestran que en presencia de morina no hay un efecto sobre la migración celular ya que se observa un porcentaje de migración similar que el grupo control. Se observa un movimiento celular más lento a partir de las 12h siendo más claro en las 24h; sin embargo, esta diferencia no es significativa.

Tabla 6. Porcentajes de migración celular.

TIEMPO (h)	CONTROL (%)	MORINA 100 μ M (%)	MeOH 0.1%
0	0	0	0
6	26.99	12.04	13.17
9	42.31	36.64	25.05
12	46.89	41.82	34.24
24	63.10	45.76	73.81

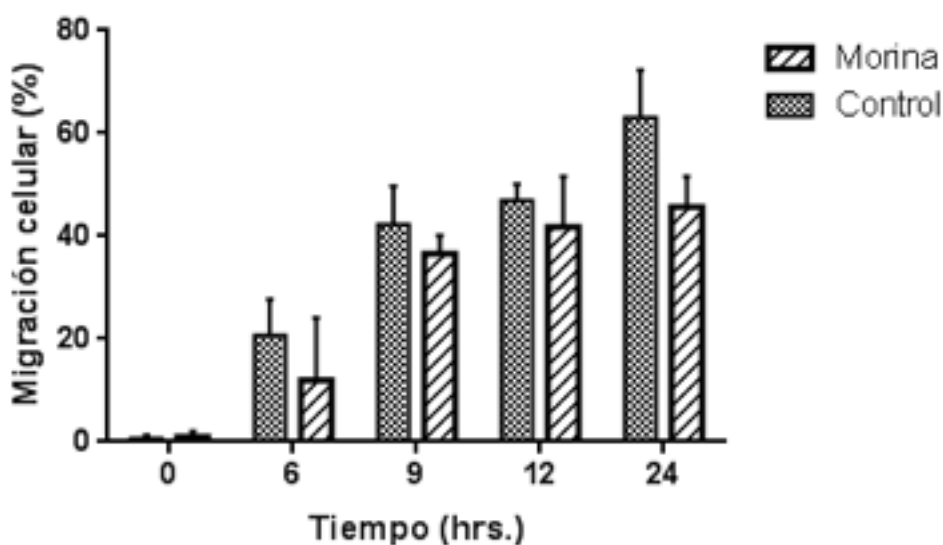


Figura 27. Gráfico del porcentaje de migración celular en grupo control y con tratamiento.

Grupo Control: las células FaDu se sometieron a 12 horas de ayuno con medio DMEM 2 % SBF. Se realizó la cicatriz y posteriormente se trataron con 1 μ l de AraC. Grupo con tratamiento de morina: las células FaDu se sometieron a 12 horas de ayuno con medio DMEM 2 % SBF. Se realizó la cicatriz y posteriormente se trataron con 1 μ l de AraC y 100 μ M de morina.

8.3 Efecto de la morina sobre los niveles de la ciclina D1 y su forma fosforilada Thr 286 en la línea celular FaDu.

Se sabe que en el carcinoma de células escamosas de orofaringe hay una sobreexpresión de la ciclina D1[19] ya que su gen, *CCND1*, se encuentra amplificado en casi el 80 % de los casos de cáncer de cabeza y cuello [15,22]. Además, se han evaluado los niveles de esta ciclina en células FaDu en diferentes tiempos y se ha visto que estos no varían [85].

Debido a lo anterior, se evaluó el efecto que este flavonoide tiene, por medio de Western Blot, en dos diferentes concentraciones sobre la expresión de la ciclina D1 y su forma fosforilada en el residuo Thr 286. De manera dependiente del tiempo, se observa que hay una reducción en los niveles de esta ciclina en ambas concentraciones; sin embargo, este efecto inhibitorio es más notorio en la concentración de 200 μ M. Debido a esto, se decidió evaluar con la dosis máxima (200 μ M) la fosforilación de esta ciclina, observando una disminución significativa entre el grupo control y los grupos tratados en diferentes tiempos con morina.

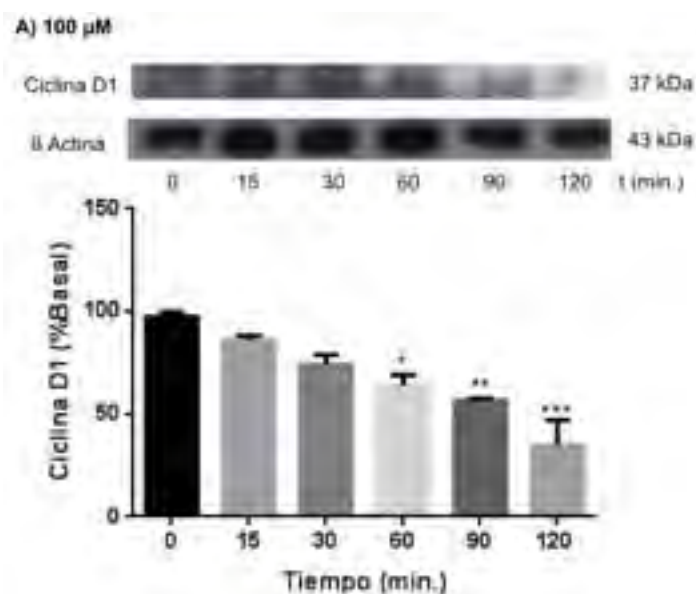
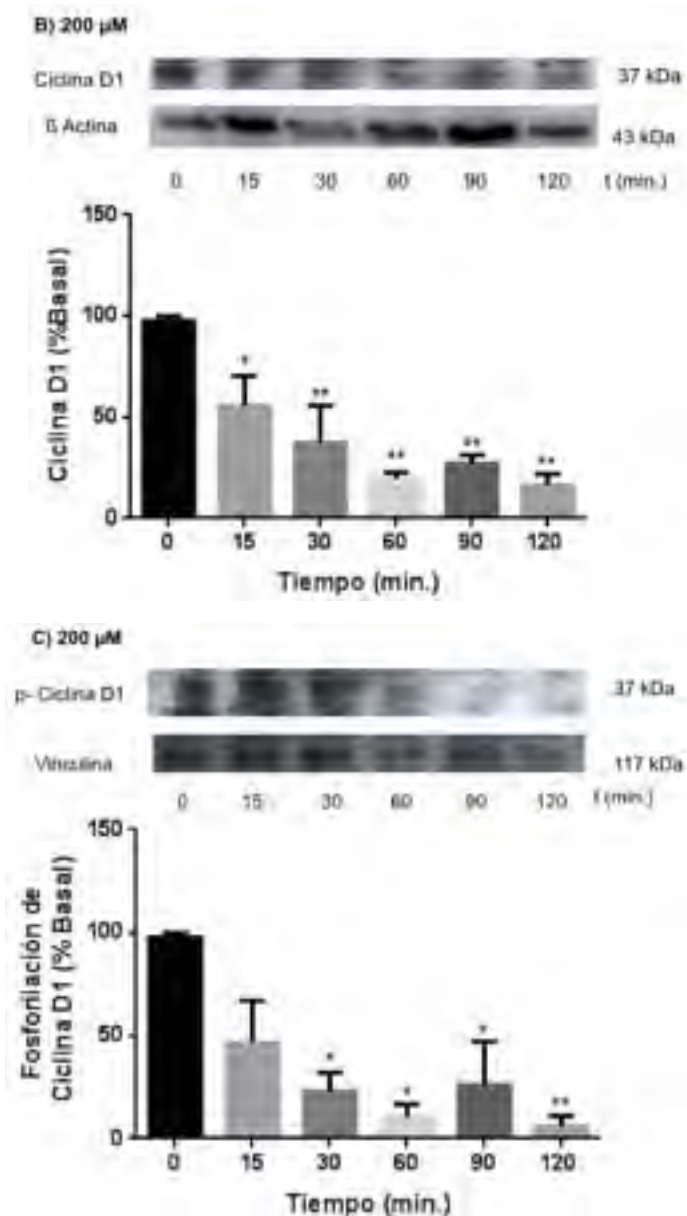


Figura 28. Efecto de la morina sobre los niveles de la ciclina D1 y su forma fosforilada en la línea celular FaDu. A) Expresión de la ciclina D1 en células FaDu sembradas en cajas de 6 pozos y tratadas con 100 μ M de morina en seis diferentes tiempos, empleando β -actina como control de carga. B) Expresión de la ciclina D1 en células FaDu sembradas en cajas de 6 pozos y tratadas con 200 μ M de morina en seis diferentes tiempos, empleando vinculina como control de carga. C) Fosforilación en el residuo Thr 286 de la ciclina D1 en células FaDu sembradas en cajas de 6 pozos y tratadas con 200 μ M de morina en seis diferentes tiempos, empleando vinculina como control de carga.



Cont. Figura 28. Efecto de la morina sobre los niveles de la ciclina D1 y su forma fosforilada en la línea celular FaDu. A) Expresión de la ciclina D1 en células FaDu sembradas en cajas de 6 pozos y tratadas con 100 μ M de morina en seis diferentes tiempos, empleando β -actina como control de carga. B) Expresión de la ciclina D1 en células FaDu sembradas en cajas de 6 pozos y tratadas con 200 μ M de morina en seis diferentes tiempos, empleando vinculina como control de carga. C) Fosforilación en el residuo Thr 286 de la ciclina D1 en células FaDu sembradas en cajas de 6 pozos y tratadas con 200 μ M de morina en seis diferentes tiempos, empleando vinculina como control de carga.

8.4 Efecto de la morina sobre los niveles de la ciclina A en la línea celular FaDu.

Un aumento en la expresión de la ciclina A ha sido detectado en algunas neoplasias como el carcinoma oral [18, 86]. Estudios han demostrado que esta ciclina se encuentra sobre-expresada en el núcleo de este tipo de células tumorales [86]. Por esta razón, se trataron nuevamente las células FaDu con dos diferentes concentraciones para evaluar a través de un Western blot la expresión de la proteína ciclina A. Como se observa en la figura 29, con 100 μ M de morina, parece disminuir, pero no de manera significativa. Caso contrario al ser tratadas con 200 μ M, donde la disminución en los niveles de esta proteína es notoria desde los primeros 15min de exposición al flavonoide.

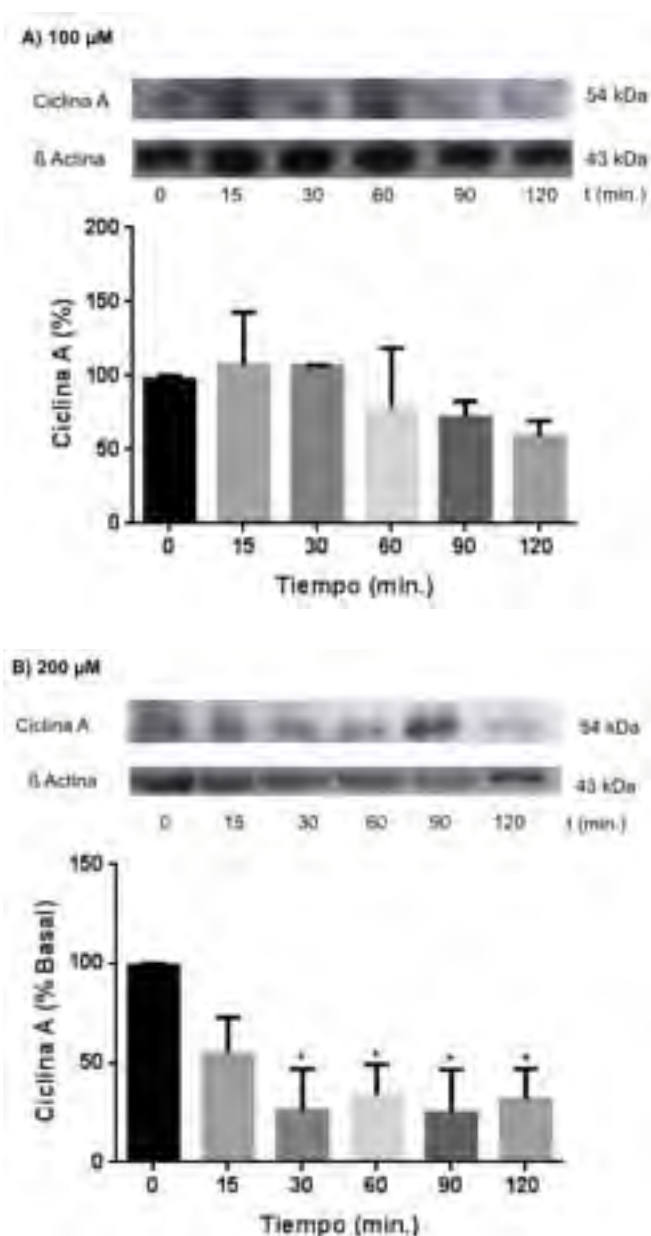


Figura 29. Efecto de la morina sobre los niveles de la ciclina A en la línea celular FaDu. A) Expresión de la ciclina A en células FaDu sembradas en cajas de 6 pozos y tratadas con 100 μ M de morina en seis diferentes tiempos, empleando β -actina como control de carga. B) Expresión de la ciclina A en células FaDu sembradas en cajas de 6 pozos y tratadas con 200 μ M de morina en seis diferentes tiempos, empleando β -actina como control de carga.

8.5 Efecto de la morina sobre los niveles de la ciclina B1 en la línea celular FaDu.

Una sobreexpresión de la ciclina B ha sido reportada en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; y se ha asociado a tumores en etapas avanzadas y a un pronóstico pobre sobre todo en células escamosas de orofaringe [91,92,93]. En este proyecto se evaluó el efecto de la morina sobre los niveles de la ciclina B gracias a la técnica de Western blot. Para este caso, las células también fueron tratadas a dos concentraciones diferentes y, como se puede observar en los gráficos, en ambos casos se observa el mismo patrón de inhibición a la expresión de esta ciclina, siendo en el minuto 60 donde se observa un efecto más evidente (Figura 30).

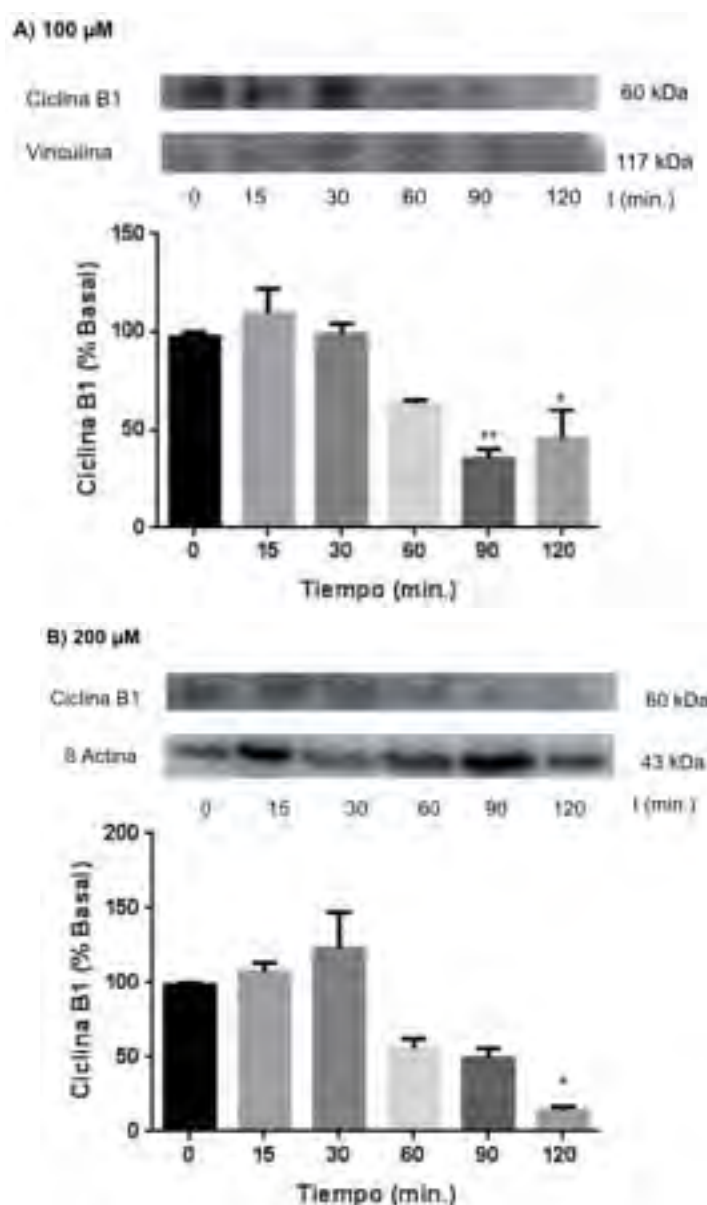


Figura 30. Efecto de la morina sobre los niveles de la ciclina B1 en la línea celular FaDu. A) Expresión de la ciclina B1 en células FaDu sembradas en cajas de 6 pozos y tratadas con 100 μ M de morina en seis diferentes tiempos, empleando vinculina como control de carga. B) Expresión de la ciclina B1 en células FaDu sembradas en cajas de 6 pozos y tratadas con 200 μ M de morina en seis diferentes tiempos, empleando β -actina como control de carga.

8.6 Efecto de la morina sobre los niveles de p53 en la línea celular FaDu.

Como ya se mencionó en el apartado de introducción, p53 es una proteína supresora de tumores que inhibe la proliferación celular. En la línea celular FaDu, el gen que codifica para p53 posee una mutación puntual en el codón 248 (de CGG a CTG) [94]. Para este proyecto, las células fueron tratadas con dos concentraciones de morina: 100 μ M y 200 μ M, en tiempos diferentes; la expresión de este supresor de tumor se evaluó a través de un ensayo de Western Blot. Como se observa en la figura 31, en ambas concentraciones no se observa una diferencia significativa, ni al alta ni a la baja. Estos resultados sugieren que la expresión de p53 es constante y no varía.

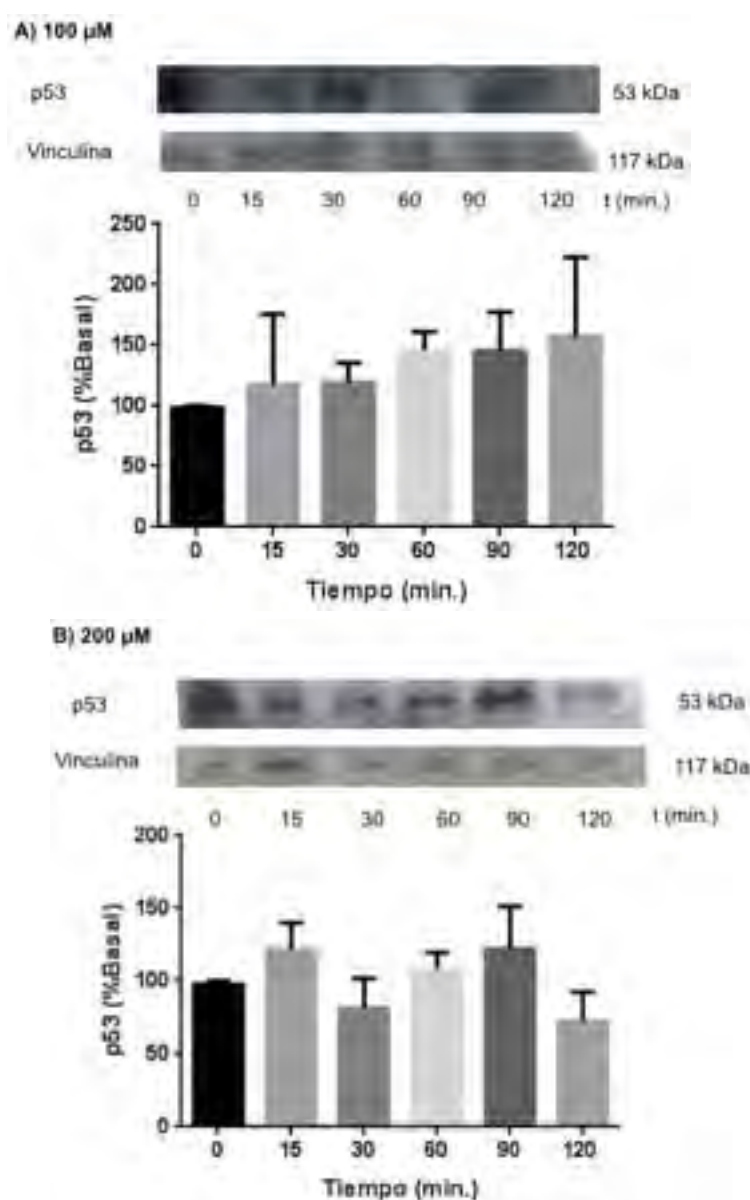


Figura 31. Efecto de la morina sobre los niveles de p53 en la línea celular FaDu. A) Expresión de p53 en células FaDu sembradas en cajas de 6 pozos y tratadas con 100 μ M de morina en seis diferentes tiempos empleando vinculina como control de carga. B) Expresión de p53 en células FaDu sembradas en cajas de 6 pozos y tratadas con 200 μ M de morina en seis diferentes tiempos, empleando vinculina como control de carga.

9. Discusión

El ciclo celular consta de diferentes eventos por medio de los cuales se da un crecimiento y una división. El equilibrio que existe entre el ciclo celular y la apoptosis es de gran importancia ya que de esto depende la estabilidad de las células sanas [12]. La ruptura de este equilibrio puede deberse a patologías como neoplasias malignas, ejemplo de esto es el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [1]. Mutaciones en genes o alteraciones en las proteínas que regulan el ciclo celular se han reportado como las causantes de este desequilibrio en diferentes tipos de cáncer. Es por esto que el ciclo celular representa un blanco terapéutico para combatir estas enfermedades.

Diferentes grupos de investigadores han centrado su atención en la búsqueda de alternativas terapéuticas naturales. Los flavonoides, al ser metabolitos secundarios de las plantas con diversas funciones biológicas, representan una opción para su estudio en diversas neoplasias. En el presente trabajo se evaluó el efecto del flavonoide morina sobre la línea celular *FaDu*, la cual corresponde a un carcinoma de células escamosas de hipofaringe.

Existen reportes donde se ha evaluado el efecto de los flavonoides como licochalcona A, apigenina y kaempferol en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, y se ha reportado un efecto citotóxico en células *FaDu* [46,67]. Además, se sabe que las proantocianidinas inhiben el proceso de invasividad en este carcinoma de manera dependiente de la dosis [68] y que preparaciones como la silimarina, que posee una amplia variedad de flavonoides, han mostrado un aumento en la expresión de PTEN inhibiendo la fosforilación de Akt y la expresión de la familia Bcl-2 [71].

Sin embargo, a pesar de que existen estudios sobre el efecto de diferentes flavonoides en el cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, la información que hay sobre el efecto de morina en estas neoplasias es escasa. Por esta razón, en este proyecto se evaluó el efecto que tiene este flavonoide en la migración celular de la línea *FaDu*, en su viabilidad y en la regulación del ciclo celular.

La migración e invasión celular están implicadas en el cáncer, lo que favorece la generación de metástasis. Uno de los mecanismos por los cuales se promueve el movimiento celular es la contracción de actina-miosina [87]. El citoesqueleto es una red dinámica constituida por microfilamentos de polímeros de actina y gran variedad de proteínas asociadas. Sus principales funciones fisiológicas están relacionadas con la motilidad y los cambios de forma de la célula durante el ciclo celular. Estas funciones son moduladas por vías de señalización que responden a estímulos que inciden sobre la membrana plasmática [88]. El ensamblaje y la tensión de este esqueleto están controlados por enzimas reguladoras de la superfamilia Ras, en las cuales se incluye la familia de proteínas Rho como: Rho y Rac [87,88]. Dentro de estas GTPasas Rho podemos encontrar a RhoA [88], que es el mayor regulador de la formación de fibras de estrés (microfilamentos) [89]. Si ésta está activada por señales extracelulares, dirige la

organización de la actina del citoesqueleto para inducir cambios morfológicos característicos [88]. Una de sus proteínas diana puede ser Rho-associated kinase (ROCK) [87] que también está relacionada con la regulación de la formación de dichas fibras, así como del ensamblaje de la adhesión focal y la contractilidad de actina-miosina [34]. ROCK a su vez puede fosforilar y activar a LIM kinase-1 (LIMK1) encargada de inactivar por medio de fosforilaciones a miembros de la familia de ADF/cofilina, que es una familia de proteínas de unión a actina que despolimerizan los microfilamentos [34,87], y de esta manera promueven la formación de fibras de estrés [34]. Por otro lado, Rac induce rearrreglos de actina que controlan la formación del lamelipodio (prolongaciones anchas de la membrana celular) y de nuevos contactos focales en los bordes celulares. Este lamelipodio se adhiere al sustrato para generar el movimiento de translación producido por la contracción del cuerpo celular y la retracción de la cola (figura 32) [89]. Por lo tanto, la migración celular requiere de este balance entre Rho y Rac, así como de su activación e inhibición dinámica coordinada [34].

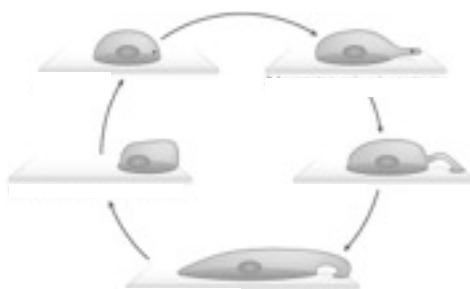


Figura 32. Mecanismo de motilidad celular. Se forma un lamelipodio que sobresale en la parte frontal de la célula y se adhiere al sustrato, proporcionando la tracción requerida para generar el movimiento de translación producido por la contracción del cuerpo celular y la retracción de la cola. (Obtenido de Bravo-Cordero et al., 2013) [102].

Por otro lado, se sabe que la ciclina D1 se encuentra sobreexpresada en diferentes neoplasias y se relaciona con la generación de metástasis [90]. Como ya se mencionó en el apartado de introducción, esta ciclina puede estar asociada a factores de transcripción, lo cual promueve la expresión de ciertas proteínas involucradas con la migración e invasión celular, como ROCK [22, 90].

En los resultados se observa una disminución en la expresión de la ciclina D1, con lo cual se esperaría una inhibición en la migración celular. Sin embargo, este efecto en la motilidad no se observa con el tratamiento de morina. La concentración de 100 μM fue seleccionada con base en los resultados obtenidos en el ensayo de MTT. Con 200 μM se tiene un efecto citotóxico significativo; sin embargo, la dosis requerida para el ensayo de migración debe ser menor para así garantizar que el efecto que se observa es sobre la motilidad celular y no sobre la viabilidad. Como se observa en los resultados de Western blot, a 100 μM sí hay una disminución en la expresión de la ciclina D, pero esta concentración no es suficiente para inhibir de manera significativa la migración celular.

Asimismo, la morina muestra un efecto citotóxico de manera dependiente de la dosis y del tiempo, lo cual es lo esperado porque buscamos reducir la viabilidad celular de esta neoplasia. Existen reportes donde se sugiere que en el carcinoma oral de células escamosas los grupos hidroxilo localizados en la estructura de este flavonoide son necesarios para la selectividad tumoral del compuesto [83]. Con base en esto se podría sugerir cierta especificidad del flavonoide en células *FaDu*; sin embargo, es necesaria la realización de estudios posteriores para evaluar esta especificidad. Por otro lado, el mecanismo de acción por el cual este flavonoide ejerce su efecto citotóxico en células *FaDu* aún no ha sido explicado. Con base en estos resultados se prosiguió a evaluar si este mecanismo está relacionado o tiene un efecto sobre el ciclo celular.

A pesar de que existen tres isoformas de la ciclina D, la ciclina D1 es la más estudiada debido a que ésta se encuentra expresada en un gran número de tejidos y también por el papel que representa en diferentes neoplasias [21,22]. La sobreexpresión de la ciclina D1 también ha sido reportada en el carcinoma de células escamosas y en el carcinoma de orofaringe [21]. El gen *CCND1* es el que codifica para dicha ciclina, y en casi el 80% de los casos de cáncer de cabeza y cuello se encuentra amplificado así como en el cáncer de mama, cáncer de pulmón y melanoma [15,22]. Además, como se mencionó en la introducción, la transcripción de la ciclina D está regulada por la presencia de factores de crecimiento y la activación de receptores como Ras y sus cascadas de señalización. Alteraciones o mutaciones que se presenten sobre las vías de señalización de ERK y Akt repercuten en la expresión y activación de la ciclina D1 [20], así como la fosforilación e inactivación de GSK-3 β inhiben la degradación de la ciclina, favoreciendo la progresión del ciclo celular [20, 26].

En este trabajo se evaluó la expresión de dicha ciclina y se observó que el flavonoide tiene un efecto de manera dependiente del tiempo en la expresión de la ciclina. Es decir, conforme aumenta el tiempo de exposición al flavonoide, la expresión de la ciclina D1 disminuye. Estos resultados coinciden con el efecto de otros flavonoides que han sido evaluados. Formononetina, que es una isoflavona O-metilada, genera de manera dosis-dependiente un arresto en la fase G0/G1 debido a la inhibición de la fosforilación de la proteína Akt, disminuyendo la expresión de proteínas como la ciclina D1 y la Cdk4 [78]. Otro ejemplo es la baicaleina que ha sido probada en cáncer oral y en melanoma. Se tienen reportes donde se dice que este flavonoide ocasiona el arresto en la fase G1 por una disminución en la expresión de Cdk4, ciclina D1, y en la fosforilación de Rb [79,81]. Se sabe que la epigallocatequina galato induce un arresto celular en la fase G0/G1 y se sugiere que puede deberse a la disminución en la activación de Akt y ERK1/2, lo que favorece la inhibición de la expresión y localización nuclear de la ciclina D1 [74]. La acción de este flavonoide también se ha observado en el carcinoma de cabeza y cuello donde se inhibe la expresión de la ciclina [70].

Con base en los resultados y los antecedentes que se tienen se puede sugerir que la morina disminuye la concentración de la ciclina D1 causando a su vez un arresto del ciclo

celular en la fase G1/S. Este efecto citotóxico es más notorio empleando la concentración de 200 μ M, donde existe una diferencia significativa entre el control y los grupos tratados. Por ello se decidió emplear esta concentración para evaluar la fosforilación de la ciclina en su residuo Thr 286, con el fin corroborar si la disminución en la concentración es debida a un aumento en la degradación de la ciclina y no por una inhibición en la traducción de la proteína.

Se sabe que GSK-3 β es una proteína encargada de fosforilar el residuo Thr 286 a la ciclina D1, promoviendo su exportación del núcleo al citoplasma durante la fase S para su posterior degradación a través de la ubiquitinación [20,26]. Se tienen estudios donde flavonoides como la Silimarina regulan de manera negativa la progresión del ciclo celular a través de una baja en la expresión de la ciclina D1. En cáncer de colon se ha observado que la expresión de la ciclina D1 disminuye con este flavonoide. Asimismo, se observó que este compuesto incrementa la fosforilación de la ciclina en el residuo Thr-286 [80]. Sin embargo, en los resultados obtenidos se observa una disminución significativa en la fosforilación de la ciclina. Esto nos sugiere que, si bien hay un arresto en la fase G1/S debido a una baja en la concentración de la ciclina D1, esto no se debe a su degradación, sino a una inhibición de la expresión de la proteína.

Por otro lado, un aumento en la expresión de la ciclina A ha sido detectado en algunas neoplasias como el cáncer oral y el carcinoma hepatocelular [18], por ejemplo, existen reportes que mencionan la existencia de ratones que presentan una sobreexpresión de esta ciclina mostrando hiperplasia y anomalías que sugieren alteraciones preneoplásicas [18]. En el presente trabajo se obtuvo una disminución en la expresión de esta ciclina en presencia del flavonoide a concentraciones altas (200 μ M).

Asimismo, una sobreexpresión de la ciclina B ha sido reportada en diferentes tipos de cáncer como de mama, cervical, gástrico, de colon y en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. De hecho, una sobreexpresión de esta ciclina se ha visto relacionada con la resistencia a radioterapia en CACYC [91] y está asociada a tumores en etapas avanzadas y a un pronóstico pobre sobre todo en células escamosas de orofaringe [92,93].

En el presente trabajo se observó una disminución en la expresión tanto de la ciclina A como de la ciclina B. Sin embargo, para poder observar niveles bajos de la ciclina A es necesario tratar con concentraciones altas del flavonoide. Por otro lado, en el caso de la ciclina B, esta disminución en sus niveles se da hasta el minuto 60 de exposición a morina, independientemente de la concentración. Una disminución de ambas ciclinas nos sugiere un arresto del ciclo celular en la transición de la fase S a la fase G2. Además, en el Laboratorio de Bioquímica, en la división de estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, se está evaluando la fosforilación de la ciclina B en el residuo Ser 147 (ver resultados en anexo A) y hasta el momento se ha encontrado que esta fosforilación en concentraciones altas disminuye de manera dependiente del tiempo,

mientras que en la dosis menor (100 μ M) esta disminución se observa hasta el minuto 60. La fosforilación de este residuo, que está dada por Plk1, es importante para la transición de G2 a mitosis, ya que la mitosis se caracteriza por una rápida acumulación del complejo ciclina B1- cdk1 en el núcleo [31,32]. Estos resultados podrían ser prometedores ya que al inhibir esta fosforilación, se inhibe la importación nuclear, lo que inhibe la entrada a mitosis debido a un arresto en la transición de G2/M.

Los resultados obtenidos concuerdan con trabajos ya publicados. Por ejemplo, se indujo la transformación celular de hepatocitos empleando 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) y se observó que morina inhibe esta transformación por medio de la inhibición de la cinasa p38 y el arresto del ciclo celular en la fase S, lo cual fue evaluado por medio de citometría de flujo [63]. Sin embargo, a diferencia de ese estudio, existe otro ejemplo en células de hepatoma donde se reportó un arresto del ciclo celular en la fase G2/M, esto por una alteración en la expresión de proteínas, tales como: ciclina B y Cdc2 [82]. Asimismo, en células de leucemia HL-60 concluyeron que morina induce un arresto del ciclo celular en la fase G2/M por una promoción de las proteínas p21 y Wee1 y una baja en la expresión de Cdc25c, ciclina A y ciclina B y la fosforilación e inhibición de cdk 1 [18,82,83].

En el caso del flavonoide quercetina se ha encontrado que, en cáncer de hígado, reduce el número de células pertenecientes a las fases G1 y S y genera una acumulación en la fase G2 con una reducción de la expresión de ciclinas D1, A y B [76]. En el caso de morina, esto concuerda con los resultados obtenidos ya que las tres ciclinas evaluadas disminuyen su expresión. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que la disminución en la expresión de las ciclinas D y A es más notoria en concentraciones altas del flavonoide, mientras que la expresión de la ciclina B disminuye en tiempos largos aún en concentraciones altas. Kaempferol es otro flavonoide que ha sido estudiado en el arresto del ciclo celular en cáncer de colon. Este compuesto induce dicho arresto en la fase G1 en tiempos cortos (6h) y en tiempos largos (12h), un arresto en la transición de G2/M. Además, este flavonoide inhibe la expresión de proteínas como las ciclinas D1, E, A y B1 [77].

Con todo esto, podemos sugerir que en concentraciones bajas y tiempos largos (60min) la morina induce un arresto en la fase G2, mientras que con concentraciones mayores (200 μ M) puede inducir un arresto en las fases G1 y S desde tiempos cortos.

Además, se evaluó el efecto de este flavonoide en la expresión del supresor de tumores p53. El HPV es una de las causas del 20 % de casos de este carcinoma y se ha establecido que el mecanismo de carcinogénesis de este virus es a través de la expresión de sus oncogenes (E6 y E7) que inactivan a p53 y al retinoblastoma, causando una perturbación en el ciclo celular. Es en estos casos donde se ha reportado un pronóstico favorable [32]. En otros casos no asociados con la infección de este virus, también se ha encontrado la inactivación de p53 [32]. Por otro lado, se sabe que de un 60 a un 80 % de

los casos de cáncer de cabeza y cuello *TP53*, que codifica para el supresor de tumores, se encuentra mutado y sobreexpresado, lo que se ha visto relacionado con un pronóstico menos favorable [32], como es el caso de la línea celular FaDu donde el gen posee una mutación puntual en el codón 248 (de CGG a CTG) [94]. Sin duda, p53 representa un blanco terapéutico para el tratamiento de este tipo de neoplasias; sin embargo, con base en nuestros resultados, se sugiere que el efecto citotóxico que presenta morina sobre las células no es a través de este supresor de tumores ya que lo esperado era una disminución en la expresión de p53, sien embargo, en los resultados no presentaron diferencias significativas.

10. Conclusiones

En este proyecto se evaluó el efecto citotóxico que el flavonoide morina presenta sobre la línea celular de cáncer de faringe FaDu. Se observó que este efecto se da de manera dependiente de la dosis y del tiempo. Además se sugiere que, en concentraciones bajas y tiempos largos (60 min), está relacionado con un arresto en el ciclo celular en la fase G2, mientras que con concentraciones mayores (200 μM) puede inducir un arresto desde tiempos cortos en fases tempranas como G1 y S. También, con base en los resultados, se concluye que el efecto citotóxico de la morina y el arresto del ciclo celular no están relacionados con p53.

Asimismo, se evaluó el efecto del flavonoide sobre la migración celular y se observó que no posee un efecto inhibitorio en este proceso a una concentración de 100 μM .

Con este trabajo sugerimos que el flavonoide morina puede tener un efecto anticancerígeno en células FaDu, como el reportado en otras líneas celulares; de esta manera, se da oportunidad a un estudio posterior de este compuesto con el fin de encontrar nuevas alternativas para el tratamiento de neoplasias como el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.

11. Referencias

1. Fernández Cantón, S. et al. (2011). Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. [pdf] México, pp.21-135. Available at: <http://www.salud.gob.mx> [Accessed Feb. 2016].
2. Gupta, S., Kim, J., Prasad, S. and Aggarwal, B. (2010). Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(3), pp.405-434.
3. Cooper, G. (2000). *The cell, a molecular approach*. 2nd ed. [ebook] Boston: Sinauer Associates. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/> [Accessed Sep. 2016].
4. Hernández Luis, F., Bravo Gómez, ME., Castañeda López, P. and Mouret Hernández, C. (2014). Unidad 4. Mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis ms. Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.
5. Anand, P., Kunnumakara, A., Sundaram, C., Harikumar, K., Tharakan, S., Lai, O., Sung, B. and Aggarwal, B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*, 25(9), pp.2097-2116.
6. National Institutes of Health (US); Biological Sciences Curriculum Study. NIH Curriculum Supplement Series [Internet]. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US); 2007. *Understanding Cancer*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [Accessed Sep. 2016].
7. National Center for Biotechnology Information (US). Genes and disease [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 1998-. *Cancers*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [Accessed Sep. 2016].
8. Gallegos-Hernández, J. (2015). Cáncer de cabeza y cuello. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 14(1), pp.1-2.
9. Gallegos-Hernández, J. (2006). El cáncer de cabeza y cuello. Factores de riesgo y prevención. *Cirugía y cirujanos*, 74(4), pp. 287-293.
10. Tirado, L. and Granados, M. (2007). Epidemiología y etiología del cáncer de la cabeza y el cuello. México: *Cancerología*, pp.9-17. Available at: Departamentos de Epidemiología y Tumores de Cabeza y Cuello del Instituto Nacional de Cancerología [Accessed Feb. 2016].
11. Atcc.org. (2016). FaDu ATCC ® HTB-43™ Homo sapiens pharynx squamous cell carci. [online] Available at: <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-43.aspx> [Accessed Feb. 2016].
12. Lomanto Díaz, LD., Ortiz Cala, OL., Bretón Pinto, CO., Gómez Lizcano, Al., and Mesa Cornejo, VM. (2002). El ciclo celular. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Bucaramanga, Bucaramanga, Colombia. 6(16) pp. 21-9.
13. Griffiths, A. and Murillo Araujo, F. (2000). *Genética moderna*. Madrid: McGraw-Hill.
14. Gong, D. and Ferrell, J. (2010). The roles of cyclin A2, B1, and B2 in early and late mitotic events. *Molecular Biology of the Cell*, 21(18), pp.3149-3161.
15. Leemans, C., Braakhuis, B. and Brakenhoff, R. (2010). The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(1), pp.9-22.

-
-
16. Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*, 15(6), p.122.
 17. Owen Morgan, D. (2007). The cell cycle: Principles of control. 1st ed. [ebook] UK: Eleanor Lawrence. Available at: https://books.google.com.mx/books?id=ScEuiD2V6GoC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false [Accessed May 2016].
 18. Yam, C., Fung, T. and Poon, R. (2002). Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 59(8), pp.1317-1326.
 19. Schneider, E., Kartarius, S., Schuster, N. and Montenarh, M. (2002). The cyclin H/cdk7/Mat1 kinase activity is regulated by CK2 phosphorylation of cyclin H. *Oncogene*, 21(33), pp.5031-5037.
 20. Alt, J. (2000). Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes & Development*, 14(24), pp. 3102-3114.
 21. Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M., Pagano, M. and Draetta, G. (1993). Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes & Development*, 7(5), pp.812-821.
 22. Musgrove, E., Caldon, C., Barraclough, J., Stone, A. and Sutherland, R. (2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(8), pp. 558-572.
 23. Siu, K., Rosner, M. and Minella, A. (2012). An integrated view of cyclin E function and regulation. *Cell Cycle*, 11(1), pp.57-64.
 24. Narasimha, A., Kaulich, M., Shapiro, G., Choi, Y., Sicinski, P. and Dowdy, S. (2014). Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. *eLife*, 3.
 25. Hwang, H. and Clurman, B. (2005). Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene*, 24(17), pp.2776-2786.
 26. Lin, D., Lessie, M., Gladden, A., Bassing, C., Wagner, K. and Diehl, J. (2007). Disruption of cyclin D1 nuclear export and proteolysis accelerates mammary carcinogenesis. *Oncogene*, 27(9), pp.1231-1242.
 27. Shao, J., Sheng, H., DuBois, R. and Beauchamp, R. (2000). Oncogenic Ras-mediated cell growth arrest and apoptosis are associated with Increased ubiquitin-dependent Cyclin D1 degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), pp. 22916-22924.
 28. Tsang, W., Wang, L., Chen, Z., Sánchez, I. and Dynlacht, B. (2007). SCAPER, a novel cyclin A-interacting protein that regulates cell cycle progression. *Journal of Cell Biology*, 178(4), pp.621-633.
 29. De Boer, L., Oakes, V., Beamish, H., Giles, N., Stevens, F., Somodevilla-Torres, M., DeSouza, C. and Gabrielli, B. (2008). Cyclin A/cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events. *Oncogene*, 27(31), pp.4261-4268.
 30. Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V. and Medema, R. (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *Journal of Cell Biology*, 185(2), pp.193-202.
 31. van Vugt, M. and Medema, R. (2005). Getting in and out of mitosis with Polo-like kinase-1. *Oncogene*, 24(17), pp.2844-2859.
-
-

-
-
32. Jackman, M., Lindon, C., Nigg, E. and Pines, J. (2003). Active cyclin B1–Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nature Cell Biology*, 5(2), pp.143-148.
 33. Li, J., Meyer, A. and Donoghue, D. (1997). Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94(2), pp.502-507.
 34. Besson, A., Dowdy, S. and Roberts, J. (2008). CDK Inhibitors: Cell cycle regulators and beyond. *Developmental Cell*, 14(2), pp.159-169.
 35. Sherr, C. and Roberts, J. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*, 13(12), pp.1501-1512.
 36. Sakaguchi, K., Herrera, J., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. and Appella, E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes & Development*, 12(18), pp.2831-2841.
 37. Zilfou, J. and Lowe, S. (2009). Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(5), pp.a001883-a001883.
 38. Vousden, K. and Prives, C. (2009). Blinded by the light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, 137(3), pp.413-431.
 39. Chehab, N., Malikzay, A., Stavridi, E. and Halazonetis, T. (1999). Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), pp.13777-13782.
 40. Shieh, S., Ikeda, M., Taya, Y. and Prives, C. (1997). DNA Damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 91(3), pp.325-334.
 41. Tibbetts, R., Brumbaugh, K., Williams, J., Sarkaria, J., Cliby, W., Shieh, S., Taya, Y., Prives, C. and Abraham, R. (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes & Development*, 13(2), pp.152-157.
 42. Yang, H., Wen, Y., Chen, C., Lozano, G. and Lee, M. (2003). 14-3-3 Positively regulates p53 and suppresses tumor growth. *Molecular and Cellular Biology*, 23(20), pp.7096-7107.
 43. Shieh, S. (1999). DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N-terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization. *The EMBO Journal*, 18(7), pp.1815-1823.
 44. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. and Berneman, Z. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*, 36(3), pp.131-149.
 45. Levine, A. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88(3), pp.323-331.
 46. Park, M., Kim, S., Cho, I., Oh, D., Kang, K., Lee, S., Moon, S., Cho, S., Yoon, G., Kim, C., Oh, J., You, J., Kim, D., Seo, Y., Im, H. and Kim, J. (2015). Licochalcone-A induces intrinsic and extrinsic apoptosis via ERK1/2 and p38 phosphorylation-mediated TRAIL expression in head and neck squamous carcinoma FaDu cells. *Food and Chemical Toxicology*, 77, pp.34-43.
 47. Price, K. and Cohen, E. (2012). Current treatment options for metastatic head and neck cancer. *Current Treatment Options in Oncology*, 13(1), pp.35-46.

-
-
48. Reeves, T., Hill, E., Armeson, K. and Gillespie, M. (2011). Cetuximab therapy for head and neck squamous cell carcinoma: A Systematic Review of the Data. *Otolaryngology -- Head and Neck Surgery*, 144(5), pp.676-684.
 49. Buzina S.D, et al. Adverse reaction to cetuximab, an epidermal growth factor receptor inhibitor. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2016 Apr;24(1), pp.70-2.
 50. Martínez-Pérez, C., Ward, C., Turnbull, A., Mullen, P., Cook, G., Meehan, J., Jarman, E., Thomson, P., Campbell, C., McPhail, D., Harrison, D. and Langdon, S. (2016). Antitumour activity of the novel flavonoid Oncamex in preclinical breast cancer models. *British Journal of Cancer*, 114(8), pp.905-916.
 51. Kumar, S. and Pandey, A. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013, pp.1-16.
 52. Escamilla Jiménez, Cl., Cuevas Martínez, EY., and Guevara Fonseca, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*, 52(2), pp. 73-5.
 53. Falcone Ferreyra, M., Rius, S. and Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3.
 54. Pérez Trueba, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed* 2003;22(1):48-57
 55. Gupta, S., Kim, J., Prasad, S. and Aggarwal, B. (2010). Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(3), pp.405-434.
 56. Hsiu-Maan Kuo, Li-Sheng Chang, et al. (2007) Morin Inhibits the growth of human leukemia HL-60 cells via cell cycle arrest and induction of apoptosis through mitochondria dependent pathway. *Anticancer research* 27: 395-406 .
 57. Naso, L., Lezama, L., Rojo, T., Etcheverry, S., Valcarcel, M., Roura, M., Salado, C., Ferrer, E. and Williams, P. (2013). Biological evaluation of morin and its new oxovanadium(IV) complex as antio-xidant and specific anti-cancer agents. *Chemico-Biological Interactions*, 206(2), pp.289-301.
 58. Sreedharan, V., Venkatachalam, K. and Namasivayam, N. (2008). Effect of morin on tissue lipid peroxidation and antioxidant status in 1, 2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *Investigational New Drugs*, 27(1), pp.21-30.
 59. Caselli, A., Cirri, P., Santi, A. and Paoli, P. (2016). Morin: a promising natural drug. *Current Medicinal Chemistry*, 23(8), pp.774-791.
 60. Venu Gopal, J. (2013). Morin hydrate: botanical origin, pharmacological activity and its applications: A mini-review. *Pharmacognosy Journal*, 5(3), pp.123-126.
 61. Kapoor, R. and Kakkar, P. (2012). Protective role of morin, a flavonoid, against high glucose induced oxidative stress mediated apoptosis in primary rat hepatocytes. *PLoS ONE*, 7(8), p.e41663.
 62. Ma, Y., Ge, A., Zhu, W., Liu, Y., Ji, N., Zha, W., Zhang, J., Zeng, X. and Huang, M. (2016). Morin attenuates ovalbumin-induced airway inflammation by modulating oxidative stress-responsive MAPK signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, pp.1-13.

-
-
63. Hsiang, C., Wu, S. and Ho, T. (2005). Morin inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced hepatocellular transformation via activator protein 1 signaling pathway and cell cycle progression. *Biochemical Pharmacology*, 69(11), pp. 1603-1611.
 64. Kawabata, K., Tanaka, T., Honjo, S., Kakumoto, M., Hara, A., Makita, H., Tatematsu, N., Ushida, J., Tsuda, H. and Mori, H. (1999). Chemopreventive effect of dietary flavonoid morin on chemically induced rat tongue carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 83(3), pp.381-386.
 65. Manna, S., Aggarwal, R., Sethi, G., Aggarwal, B. and Ramesh, G. (2007). Morin (3,5,7,2',4'-Pentahydroxyflavone) Abolishes nuclear factor- κ B activation induced by various carcinogens and inflammatory stimuli, leading to suppression of nuclear factor- κ B-regulated gene expression and up-regulation of apoptosis. *Clinical Cancer Research*, 13(7), pp.2290-2297.
 66. Gupta, S., Phromnoi, K. and Aggarwal, B. (2013). Morin inhibits STAT3 tyrosine 705 phosphorylation in tumor cells through activation of protein tyrosine phosphatase SHP1. *Biochemical Pharmacology*, 85(7), pp.898-912.
 67. Swanson, H., Choi, E., Helton, W., Gairola, C. and Valentino, J. (2014). Impact of apigenin and kaempferol on human head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 117(2), pp.214-220.
 68. Sun, Q., Prasad, R., Rosenthal, E. and Katiyar, S. (2012). Grape seed proanthocyanidins inhibit the invasiveness of human HNSCC cells by targeting EGFR and reversing the epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS ONE*, 7(1), p.e31093.
 69. Prasad, R. and Katiyar, S. (2012). Bioactive phytochemical proanthocyanidins inhibit growth of head and neck squamous cell carcinoma cells by targeting multiple signaling molecules. *PLoS ONE*, 7(9), p.e46404.
 70. Lim, Y., Lee, S., Song, M., Yamaguchi, K., Yoon, J., Choi, E. and Baek, S. (2006). Growth inhibition and apoptosis by (-)-epicatechin gallate are mediated by cyclin D1 suppression in head and neck squamous carcinoma cells. *European Journal of Cancer*, 42(18), pp.3260-3266.
 71. Su, C., Chen, L., Liao, J. and Cheng, J. (2013). Increase of phosphatase and tensin homolog by silymarin to inhibit human pharynx squamous cancer. *Journal of Medicinal Food*, 16(9), pp.778-784.
 72. Walle, T., Ta, N., Kawamori, T., Wen, X., Tsuji, P. and Walle, U. (2007). Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids—Methylated versus unmethylated flavones. *Biochemical Pharmacology*, 73(9), pp.1288-1296.
 73. Zhou, D., Wang, X., Yang, M., Shi, X., Huang, W. and Feng, Q. (2013). Combination of low concentration of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) and curcumin strongly suppresses the growth of non-small cell lung cancer in vitro and in vivo through causing cell cycle arrest. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), pp. 12023-12036.
 74. Jin, L. (2013). Epigallocatechin gallate inhibits the growth of human lung cancer by directly targeting the EGFR signaling pathway. *Oncology Reports*.

-
-
75. Salucci, M., Stivala, L., Maiani, G., Bugianesi, R. and Vannini, V. (2002). Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Caco2). *British Journal of Cancer*, 86(10), pp.1645-1651.
 76. Casella, M., Parody, J., Ceballos, M., Quiroga, A., Ronco, M., Francés, D., Monti, J., Pisani, G., Carnovale, C., Carrillo, M. and de Luján Alvarez, M. (2013). Quercetin prevents liver carcinogenesis by inducing cell cycle arrest, decreasing cell proliferation and enhancing apoptosis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(2), pp.289-300.
 77. Cho, HJ. and Park J. (2013). Kaempferol induces cell cycle arrest in HT-29 Human colon cancer cells. *Journal of cancer prevention*. 18(3), pp.257-263.
 78. Li, T., Zhao, X., Mo, Z., Huang, W., Yan, H., Ling, Z. and Ye, Y. (2014). Formononetin promotes cell cycle arrest via downregulation of Akt/Cyclin D1/CDK4 in human prostate cancer cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34(4), pp. 1351-1358.
 79. Cheng, Y., Li, L., Lin, P., Cheng, L., Hung, C., Chang, N. and Lin, C. (2012). Baicalein induces G1 arrest in oral cancer cells by enhancing the degradation of cyclin D1 and activating AhR to decrease Rb phosphorylation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 263(3), pp.360-367.
 80. Eo, H., Park, G., Song, H., Lee, J., Kim, M., Lee, M., Lee, J., Koo, J. and Jeong, J. (2015). Silymarin induces cyclin D1 proteasomal degradation via its phosphorylation of threonine-286 in human colorectal cancer cells. *International Immunopharmacology*, 24(1), pp.1-6.
 81. Vaid, M., Singh, T., Prasad, R. and Katiyar, S. (2014). Silymarin inhibits melanoma cell growth both in vitro and in vivo by targeting cell cycle regulators, angiogenic biomarkers and induction of apoptosis. *Mol. Carcinog.*, 54(11), pp.1328-1339.
 82. Kim, MN., Ahn EY., et al. (2010) Morin inhibits the growth of murine hepatoma cells via cell cycle arrest and induction of apoptosis. *Cancer prevention research*. 15(3), pp. 190-7.
 83. Karimi, R., Parivar, K., Hayati Roudbari, N., Vakili Sadeghi, S., Hashemi, M. and Hayat, P. (2013). Anti-proliferative and apoptotic effects of morin in human leukemia cell lines (HUT-78). *International Journal of Cellular and Molecular Biotechnology*, 2013, pp.1-13.
 84. Brown, J., O'Prey, J., and Harrison P.R. (2003). Enhanced sensitivity of human oral tumours to the flavonol, morin, during cancer progression: involvement of the Akt and stress kinase pathways. *Carcinogenesis*. 24(2), pp.171–177.
 85. Storch, K. and Cordes, N. (2015). The impact of CDK9 on radiosensitivity, DNA damage repair and cell cycling of HNSCC cancer cells. *International Journal of Oncology*.
 86. Chen Q, Zhou H, Guo W, Samaranayake LP, Zhou M, Li B. (2001). Correlation between the expression of cyclin A protein and p53 activity in oral squamous cell carcinomas. *Cytobios*.
 87. Bozzuto, G., Ruggieri, P. and Molinari, A. (2010). Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 46(1).
-
-

-
-
88. Guirado B.O; et al. El citoesqueleto de actina: una perspectiva desde la biología molecular del cáncer. *Rev Cubana Invest Biomed* 2002;21(2):115-22
 89. Pellegrin, S. and Mellor, H. (2007). Actin stress fibres. *Journal of Cell Science*, 120(20), pp.3491-3499.
 90. Li, Z., Wang, C., Jiao, X., Lu, Y., Fu, M., Quong, A., Dye, C., Yang, J., Dai, M., Ju, X., Zhang, X., Li, A., Burbelo, P., Stanley, E. and Pestell, R. (2006). Cyclin D1 regulates cellular migration through the inhibition of thrombospondin 1 and ROCK signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 26(11), pp.4240-4256.
 91. Androic, I., Krämer, A., Yan, R., Rödel, F., Gätje, R., Kaufmann, M., Strebhardt, K. and Yuan, J. (2008). Targeting cyclin B1 inhibits proliferation and sensitizes breast cancer cells to taxol. *BMC Cancer*, 8(1).
 92. Aaltonen, K., Amini, R., Heikkilä, P., Aittomäki, K., Tamminen, A., Nevanlinna, H. and Blomqvist, C. (2009). High cyclin B1 expression is associated with poor survival in breast cancer. *British Journal of Cancer*, 100(7), pp.1055-1060.
 93. Hassan K.A; et al. Cyclin B1 Overexpression and resistance to radiotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Research* 62, November 15, 2002. pp 6414 – 6417.
 94. Kim M.S, et al. State of p53, Rb and DCC tumor suppressor genes in human oral cancer cell lines. *Anticancer Research*. 1993 Sep-Oct;13(5A) pp.1405-13.
 95. National Cancer Institute. (2016). Comprehensive Cancer Information. [online] Available at: <https://www.cancer.gov> [Accessed 7 Jun. 2016].
 96. Racchi, M. (2013). Antioxidant defenses in plants with attention to prunus and citrus spp. *Antioxidants*, 2(4), pp.340-369.
 97. Lim, S. and Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, 140(15), pp.3079-3093.
 98. Jackson, J., Patrick, D., Dar, M. and Huang, P. (2007). Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents?. *Nature Reviews Cancer*, 7(2), pp. 107-117.
 99. Oerpub.github.io. (2016). Cell growth and division. [online] Available at: <http://oerpub.github.io/epubjs-demo-book/content/m46034.xhtml> [Accessed 7 May 2016]. Boundless.com. (2016).
 100. Boundless - Textbook Innovation. [online] Available at: <https://www.boundless.com/> [Accessed 7 Oct. 2016].
 101. Schubert, S., Shannon, K. and Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(7).
 102. Bravo-Cordero, J., Magalhaes, M., Eddy, R., Hodgson, L. and Condeelis, J. (2013). Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(7), pp.405-417.

Anexo A

❖ Efecto de la morina 150 μ M sobre la migración celular en la línea celular FaDu.

Se observó un desprendimiento celular a partir de las 6h por lo que ya no se realizó un análisis cuantitativo.

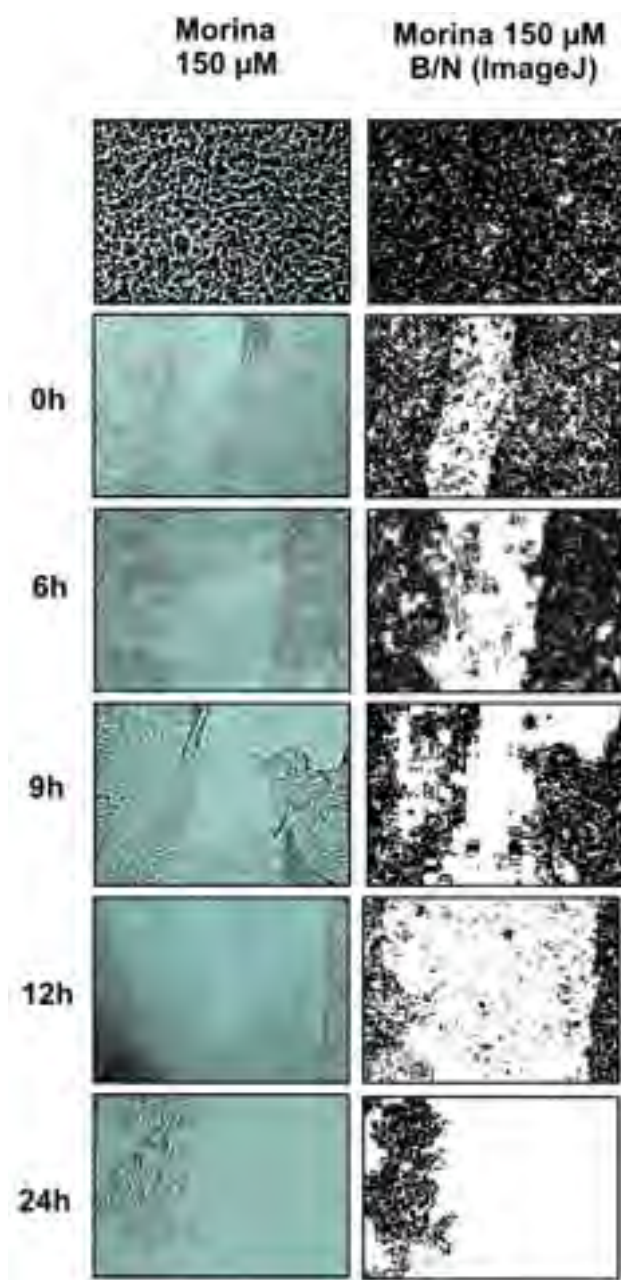


Figura 33. Efecto de la morina 150 μ M sobre la migración celular FaDu. Las células comienzan a desprenderse a las 6 horas. A las 9 horas ya no se observa una cicatriz definida y a las 24h la cicatriz desaparece.

Anexo B

- ❖ Efecto de la morina sobre la forma fosforilada Ser 147 de la ciclina B1 en la línea celular FaDu.

Actualmente en el laboratorio de Bioquímica se está evaluando la fosforilación en el residuo Ser 147 de la ciclina B, la cual es necesaria para la entrada a la fase de Mitosis. En la fosforilación de la ciclina B1 se observa el mismo patrón que en la expresión de la ciclina: a la concentración 100 μ M, en el minuto 60 esta fosforilación disminuye. Sin embargo, a 200 μ M esta disminución en la fosforilación se observa desde el minuto 15 (Figura 33).

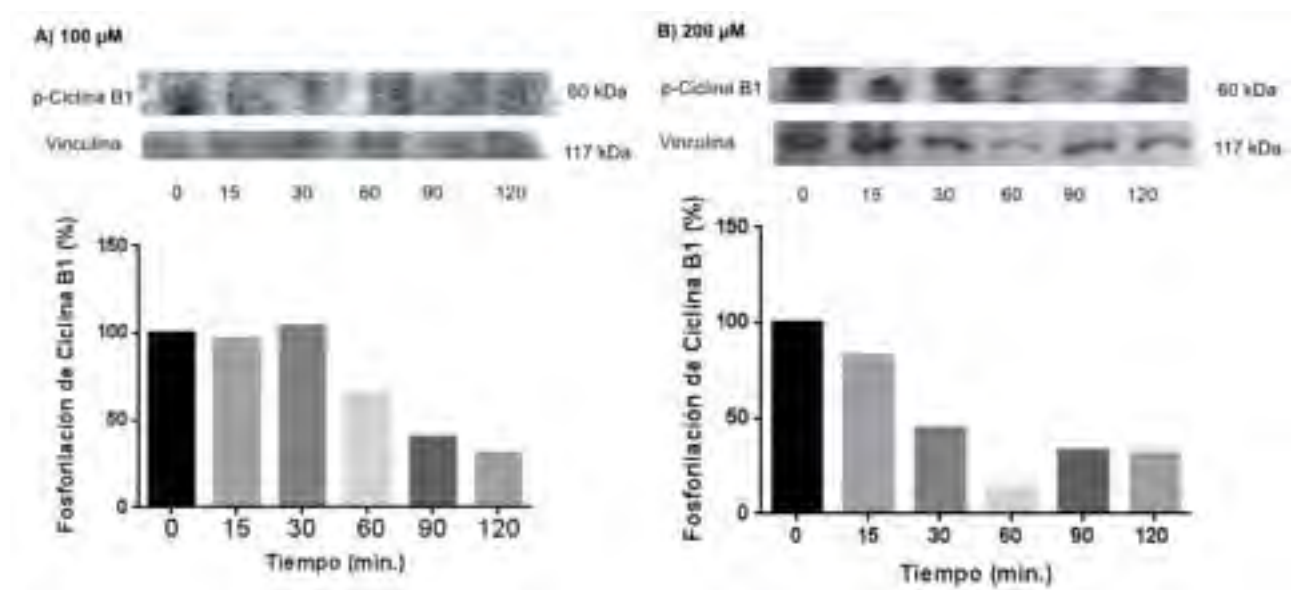


Figura 34. Efecto de la morina sobre la forma fosforilada de la ciclina B1 en la línea celular FaDu. A) Fosforilación de la ciclina B1 en células FaDu sembradas en cajas de 6 pozos y tratadas con 100 μ M de morina en seis diferentes tiempos, empleando vinculina como control de carga. B) Fosforilación de la ciclina B1 en células FaDu sembradas en cajas de 6 pozos y tratadas con 200 μ M de morina en seis diferentes tiempos, empleando vinculina como control de carga.