



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Luteolina, Naringina y Quercetina como flavonoides inductores de apoptosis sobre la línea celular de carcinoma hipofaríngeo *FaDu*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

RICARDO GONZÁLEZ SALGUERO



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 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: GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS
VOCAL: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
SECRETARIO: JOSÉ DE JESÚS GARCÍA VALDÉS
1er. SUPLENTE: CLAUDIA TERESA TOVAR PALACIO
2do. SUPLENTE: BERENICE OVALLE MAGALLANES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Gloria Gutiérrez Venegas _____

SUSTENTANTE:

Ricardo González Salguero _____

Este proyecto fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto IN201816.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP.
AKT	Proteína cinasa B.
Apaf-1	Factor activador de peptidasa apoptótica 1.
ARN	Ácido ribonucleico.
Atg1	Proteína cinasa relacionada a autofagia 1.
Atg13	Proteína cinasa relacionada a autofagia 13.
Atg17	Proteína cinasa relacionada a autofagia 17.
ATP	Adenosín trifosfato.
Bad	Promotor de muerte asociado a Bcl-2.
Bak	Antagonista homólogo a Bcl-2.
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2.
Bcl2	Linfoma de células B 2.
Bcl-2	Familia de proteínas reguladoras de apoptosis Bcl2.
Bcl-B	Proteína tipo Bcl-2 B.
Bcl-W	Proteína tipo Bcl-2 W.
Bcl-XL	Linfoma de células B extra grandes.
BH1	Dominio 1 de homología Bcl-2.
BH2	Dominio 2 de homología Bcl-2.
BH3	Dominio 3 de homología Bcl-2.
BH4	Dominio 4 de homología Bcl-2.
Bid	Agonista de muerte de dominios de interacción BH3.
Bik	Proteína asesina de interacción Bcl-2.
Bim	Proteína 11 tipo Bcl-2.
Bmf	Factor modificador Bcl-2.
Bok	Proteína ovárica asesina relacionada a Bcl-2.
CD47	Cúmulo de diferenciación 47.
CDK1	Cinasa dependiente de ciclinas 1.
CDK2	Cinasa dependiente de ciclinas 2.
CDK4	Cinasa dependiente de ciclinas 4.
CDK6	Cinasa dependiente de ciclinas 6.
clAP-1	Inhibidor 1 de IAP.
clAP-2	Inhibidor 2 de IAP.
CL ₅₀	Concentración letal 50%.
c-Myc	Oncogén viral homólogo de Mielocitomatosis aviar V-myc.
COX-2	Ciclooxigenasa 2.
CYLD	Oncogén de ciclindromatosis.
dATP	Desoxiadenosin trifosfato.
DC4	Receptor decoy 4.
DC5	Receptor decoy 5.
DcR1	Receptor decoy 1.
DcR2	Receptor decoy 2.
DIABLO	Proteína de unión directa a IAP con bajo pl.
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte.
DMEM	Medio Eagle Modificado por Dulbecco.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
DPP-IV	Dipeptidil peptidasa IV.
E2F	Factor de transcripción E2.

E6	Oncoproteína E6 del VPH.
E7	Oncoproteína E7 del VPH.
Egl-1	Activador de MCP Egl-1.
ERK	Cinasa activada por señales extracelulares.
FADD	Proteína asociada a Fas con dominio de muerte.
FasR	Receptor de Fas.
FasL/CD95L	Fas ligando.
FLIP	Proteína inhibidora de FLICE.
G0	Fase de quiescencia del ciclo celular.
G1	Fase de crecimiento 1 del ciclo celular.
G2	Fase de crecimiento 2 del ciclo celular.
GDP	Guanosín difosfato.
GIP	Polipéptido inhibitorio gástrico.
GLP-1	Péptido 1 tipo glucagón.
GTP	Guanosín trifosfato.
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.
HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1.
HMGA	Proteína del grupo de alta movilidad.
HNC	Cáncer de cabeza y cuello.
HRK	Activador de apoptosis harakiri.
IAP	Proteína inhibidora de apoptosis.
IARC	Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer.
IKK	Cinasa de I κ B.
IL-3	Interleucina 3.
IL-6	Interleucina 6.
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible.
I κ B	Inhibidor de NF- κ B.
JAK	Janus cinasa.
JNK	Cinasa c-Jun N-terminal.
let7	miRNA let 7.
Lut	Luteolina.
M	Fase de mitosis del ciclo celular.
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno.
Mcl-1	Leucemia de células mieloides 1.
MCP	Muerte celular programada.
MEK/MAPKK	Cinasa de la MAPK.
miR-15	miRNA 15.
miR-16	miRNA 16.
miR-21	miRNA 21.
miRNA	MicroRNA.
MMP-2	Metaloproteinasa de matriz 2.
MMP-9	Metaloproteinasa de matriz 9.
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero.
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio.
Nar	Naringina.
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
NIH	Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América.
NO	Óxido nítrico.
Noxa	Proteína inducida por Forbol-12-Miristato-13-Acetato 1.

Omi	Serin proteasa mitocondrial HtrA2.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
p21	Inhibidor 1 de cinasa dependiente de ciclina.
p34	Proteína Serin treonin cinasa CDC2.
p38	Proteína cinasa 38.
p53	Proteína tumoral p53.
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno.
PARP	Poli ADP ribosa polimerasa.
PBS	Buffer de fosfatos salinos.
PI3K	Fosfatidil inositol 3 fosfato.
proTNF	Protoforma de TNF.
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa.
PVDF	Difluoruro de polivinilideno.
Puma	Modulador de apoptosis modulado por p53.
Quer	Quercetina.
Raf/MAPKKK	Cinasa de la cinasa de MARK.
Ras	Proteína G monomérica activadora de Raf.
Rb	Proteína del retinoblastoma.
RIP1	Proteína de interacción con el receptor 1.
RIP3	Proteína de interacción con el receptor 3.
RIPK	Proteína Serin treonin cinasa 2 de interacción con receptor.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
S	Fase de síntesis del ciclo celular.
SBF	Suero bovino fetal.
Smac	Segundo activador de caspasas derivado de mitocondria.
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3.
tBid	Agonista trunco de muerte de dominios de interacción BH3.
TNFR-1	Receptor de TNF 1.
TNFR-2	Receptor de TNF 2.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α .
TRADD	Proteína de dominio de muerte asociada al receptor tipo 1 de TNF.
TRAF-1	Factor asociado al receptor de TNF 1.
TRAF-2	Factor asociado al receptor de TNF 2.
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF.
UTR	Región no traducida del gen.
UV	Radiación ultravioleta.
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular.
VPH	Virus del Papiloma Humano.

ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
3.	ANTECEDENTES	3
3.1.	CÁNCER	3
3.1.1.	TIPOS DE CÁNCER.....	5
3.1.2.	EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER	7
3.2.	CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO	8
3.2.1.	EPIDEMIOLOGÍA	10
3.2.2.	FACTORES DE RIESGO.....	11
3.2.3.	MANIFESTACIONES CLÍNICAS	12
3.2.4.	DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	12
3.2.5.	CÁNCER HIPOFARÍNGEO.....	13
3.3.	CICLO CELULAR.....	14
3.4.	MUERTE CELULAR.....	16
3.4.1.	APOPTOSIS	17
3.4.1.1.	VÍA INTRÍNSECA O MITOCONDRIAL	18
3.4.1.2.	VÍA EXTRÍNSECA O DE LOS RECEPTORES DE MUERTE.....	20
3.4.2.	AUTOFAGIA	22
3.4.3.	NECROSIS PROGRAMADA.....	23
3.5.	CÁNCER Y APOPTOSIS	24
3.6.	FLAVONOIDES	26
3.6.1.	ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN	27
3.6.2.	SÍNTESIS.....	30
3.6.3.	PROPIEDADES BIOLÓGICAS	30
3.6.4.	BIOINGENIERÍA DE FLAVONOIDES.....	31
3.6.5.	LUTEOLINA	32
3.6.6.	NARINGINA.....	33
3.6.7.	QUERCETINA	35
3.7.	CÁNCER Y FLAVONOIDES	36
4.	OBJETIVOS	39
4.1.	OBJETIVO GENERAL	39
4.2.	OBJETIVOS PARTICULARES	39
5.	HIPÓTESIS	40

6.	MATERIALES Y MÉTODOS	41
6.1.	REACTIVOS	41
6.2.	POBLACIÓN DE ESTUDIO	41
6.3.	TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	41
6.4.	MATERIAL Y EQUIPO	41
6.5.	METODOLOGÍA	42
6.5.1.	CULTIVO CELULAR	42
6.5.2.	VIABILIDAD CELULAR.....	42
6.5.3.	TRATAMIENTO CELULAR	43
6.5.4.	WESTERN BLOT	43
6.5.5.	EVALUACIÓN DE ADN DEGRADADO	44
6.5.6.	MIGRACIÓN CELULAR.....	44
6.5.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
7.	RESULTADOS	45
7.1.	EFFECTO DE LUTEOLINA, NARINGINA Y QUERCETINA EN LA VIABILIDAD DE CÉLULAS <i>FaDu</i>	45
7.2.	EFFECTO DE LUTEOLINA EN LA ACTIVACIÓN DE APOPTOSIS INTRÍNSECA EN CÉLULAS <i>FaDu</i>	46
7.3.	EFFECTO DE NARINGINA EN LA ACTIVACIÓN DE APOPTOSIS INTRÍNSECA EN CÉLULAS <i>FaDu</i>	47
7.4.	EFFECTO DE QUERCETINA EN LA ACTIVACIÓN DE APOPTOSIS INTRÍNSECA EN CÉLULAS <i>FaDu</i>	48
7.5.	EFFECTO DE LUTEOLINA, NARINGINA Y QUERCETINA EN LA DEGRADACIÓN DE ADN EN CÉLULAS <i>FaDu</i>	49
7.6.	EFFECTO DE NARINGINA Y QUERCETINA EN LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS <i>FaDu</i>	50
8.	DISCUSIÓN	51
9.	CONCLUSIONES	56
10.	BIBLIOGRAFÍA	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de la carcinogénesis.	4
Figura 2. Regiones anatómicas involucradas en el cáncer de cabeza y cuello.	10
Figura 3. Etapas del ciclo celular.....	16
Figura 4. Vía intrínseca de la apoptosis.....	20
Figura 5. Vía extrínseca de la apoptosis.	22
Figura 6. Aglicona: estructura base de los flavonoides.....	28
Figura 7. Estructura química del flavonoide luteolina.....	32
Figura 8. Estructura química del flavonoide naringina.	33
Figura 9. Estructura química del flavonoide quercetina.	35
Figura 10. Efecto de luteolina, naringina y quercetina en la viabilidad de la línea celular <i>FaDu</i>	45
Figura 11. Efecto de luteolina en la inducción de apoptosis intrínseca en la línea celular <i>FaDu</i>	46
Figura 12. Efecto de naringina en la inducción de apoptosis intrínseca en la línea celular <i>FaDu</i> . ..	47
Figura 13. Efecto de quercetina en la inducción de apoptosis intrínseca en la línea celular <i>FaDu</i> . 48	
Figura 14. Efecto de luteolina, naringina y quercetina en la degradación de ADN en la línea celular <i>FaDu</i> ...	49
Figura 15. Efecto de naringina y quercetina en el proceso de migración de células <i>FaDu</i>	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructura de los principales grupos de flavonoides.....	29
---	----

1. RESUMEN

El cáncer es una de las principales enfermedades que han afectado a la población mundial en los últimos años; se calcula que alrededor de 8 millones de decesos anuales son provocados por esta patología, convirtiéndola en la principal causa de muerte. El cáncer de cabeza y cuello (HNC) es considerado el sexto tipo de neoplasia maligna más común alrededor del mundo y, en determinados casos, uno de los más letales. Además, es conocida su alta predisposición a desarrollar metástasis, pues las zonas anatómicas implicadas cuentan con una amplia red de vasos sanguíneos y linfáticos. Dado que la etiología es diversa y el desarrollo del mal depende en buena medida de la carga genética de los individuos, no existen terapias adecuadas ni especializadas para cada tipo de cáncer, haciendo que la manera de tratar la enfermedad sea generalizada y conlleve un gran daño al estilo de vida de los pacientes. En las últimas décadas ha surgido evidencia de que los flavonoides presentan propiedades biológicas importantes, ejerciendo diferentes efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antibacterianos y anticancerígenos, siendo estos últimos los que permiten regular la división descontrolada y el desarrollo de las células tumorales. La luteolina (Lut), la naringina (Nar) y la quercetina (Quer) son ejemplos de este tipo de compuestos; se presentan abundantemente en vegetales y frutos como el apio, la cebolla, la toronja y el cacao, y recientemente, ha cobrado gran relevancia su empleo en diversos padecimientos, incluido el cáncer. En el presente trabajo, mediante ensayos de viabilidad celular con el método del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT) y Western blot se determinó que los tres flavonoides mencionados inducen la muerte celular por apoptosis vía intrínseca en células de carcinoma hipofaríngeo *FaDu*, al inhibir proteínas como el linfoma de células B 2 (Bcl2) y activar otras como la proteína X asociada a Bcl2 (Bax) y las caspasas -9 y -3. Además, mediante electroforesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) se encontró que los tres compuestos, aunque en mayor medida Quer, logran inducir la degradación del material genético. Finalmente, con el objetivo de evaluar si Nar y Quer actuaban a nivel de migración celular, se realizaron ensayos de cierre de herida (Wound Healing) en los que se encontró que, más que inhibir la migración, ejercieron efectos citotóxicos. En conclusión, los flavonoides, al activar el proceso de muerte celular por apoptosis, pueden conducir al desarrollo de nuevas terapias anticancerígenas y/o suplementos con mayor eficacia, mayor seguridad y menor daño a la calidad de vida de los pacientes.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial, el cáncer es considerado una de las más importantes causas de morbilidad así como la principal causa de muerte. De acuerdo a cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2012 el número de decesos por este padecimiento ascendió a 8.2 millones, mientras que los nuevos casos alcanzaron los 14 millones. Tristemente, las estadísticas sugieren que estos números aumentarán hasta en un 70% durante los próximos 20 años. El cáncer de cabeza y cuello (HNC) representa uno de los tipos de cáncer más comunes al englobar cerca del 6% de los tumores sólidos a nivel global. Esta variedad congrega un amplio grupo de neoplasias que tienen en común el originarse en las células escamosas que recubren las zonas húmedas y mucosas del interior de la cabeza y el cuello y, en algunos casos, como el cáncer de vías aerodigestivas superiores, la letalidad resulta ser muy alta, alcanzando hasta el 78% de mortalidad. Los principales factores de riesgo que conducen al desarrollo de los HNC son el consumo de alcohol y tabaco, así como la infección por el virus del papiloma humano (VPH), mismos que están relacionados a otras variedades de cáncer de mayor frecuencia como los de pulmón, hígado y cérvico-uterino. No obstante, a pesar de que no ocupa los primeros lugares de prevalencia como los mencionados anteriormente, es de resaltar que en las últimas dos décadas, los HNC pasaron del décimo tercer lugar al sexto, lo que indica una nueva tendencia en el desarrollo del cáncer por los hábitos nocivos ya referidos.

Por otra parte, se conoce que las terapias convencionales para el cáncer como la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía no han logrado el cometido de abatir el desarrollo de neoplasias, en gran medida, debido al alto número de mutaciones que posee la célula transformada y que le confieren una gran diversidad de mecanismos de resistencia. Además, los tratamientos mismos no resultan específicos para las células malignas, por lo que afectan también a las sanas. Debido a esto, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas cobra gran relevancia, destacando entre ellas el empleo de flavonoides, moléculas polifenólicas derivadas del metabolismo secundario vegetal, los cuales presentan un potencial antineoplásico importante.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio es determinar el efecto anti-cancerígeno que presentan tres flavonoides, la luteolina, la naringina y la quercetina, en la inducción de muerte celular por apoptosis sobre la línea celular de carcinoma hipofaríngeo *FaDu*.

3. ANTECEDENTES

3.1. CÁNCER

La palabra “cáncer” es el término que hace referencia a un conjunto de enfermedades relacionadas y que se caracterizan por una división descontrolada de algunas células del cuerpo que pueden o no llegar a formar masas denominadas tumores, y que se diseminan a los tejidos adyacentes¹. Se trata de un complejo desorden genético resultado de mutaciones en los genes que controlan los mecanismos de crecimiento y muerte de las células, y que pueden ser clasificados como protooncogenes y genes supresores de tumores².

Los protooncogenes codifican para proteínas que confieren a las células un potencial transformante, es decir, que su hiperactivación permite la proliferación descontrolada; una vez mutados reciben la denominación de oncogenes y actúan de manera dominante. Se ha demostrado que la mayoría de este tipo de genes suprimen la apoptosis, lo cual conduce a la iniciación del tumor, su progresión y a su diseminación o metástasis¹⁻⁴. Por otra parte, los genes supresores de tumores codifican para proteínas cuya función es inhibir la transformación celular restringiendo el crecimiento, potenciando la apoptosis o participando en los procesos de reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN) dañado^{3,4}.

Para que ocurra la formación del cáncer o carcinogénesis, debe existir una interacción de daños genéticos y epigenéticos con el medio ambiente. Durante este proceso, las células adquieren una ventaja de crecimiento selectivo y sufren una expansión clonal como resultado de la activación o inactivación de genes⁵. Existen cinco etapas en las cuales puede dividirse la carcinogénesis (**Figura 1**):

- *Iniciación*: durante esta fase una célula normal sufre una mutación en un gen que aumenta su tendencia a proliferar⁵.
- *Promoción*: se produce la expansión clonal; ocurre una hiperplasia o incremento en el número de células sin cambios morfológicos apreciables⁵.

- **Progresión:** inicia la displasia, proceso en el que las células experimentan cambios en su tamaño, forma o programas de diferenciación. Debido a esto, la arquitectura del tejido u órgano es modificada y generalmente representa un estado pre-maligno. Suele denominarse también *carcinoma in situ* debido a la presencia de matriz extracelular intacta. Finalmente, en esta etapa ocurre una selección clonal de las células con transformación maligna⁵.
- **Invasión:** ocurre la degradación de la matriz extracelular, permitiendo la movilidad de las células malignas a los tejidos circundantes⁵.
- **Metástasis:** las células malignas logran el desprendimiento del tumor primario, experimentan intravasación y extravasación vía linfática o sanguínea y forman un nuevo tumor en el nuevo tejido u órgano colonizado⁵.

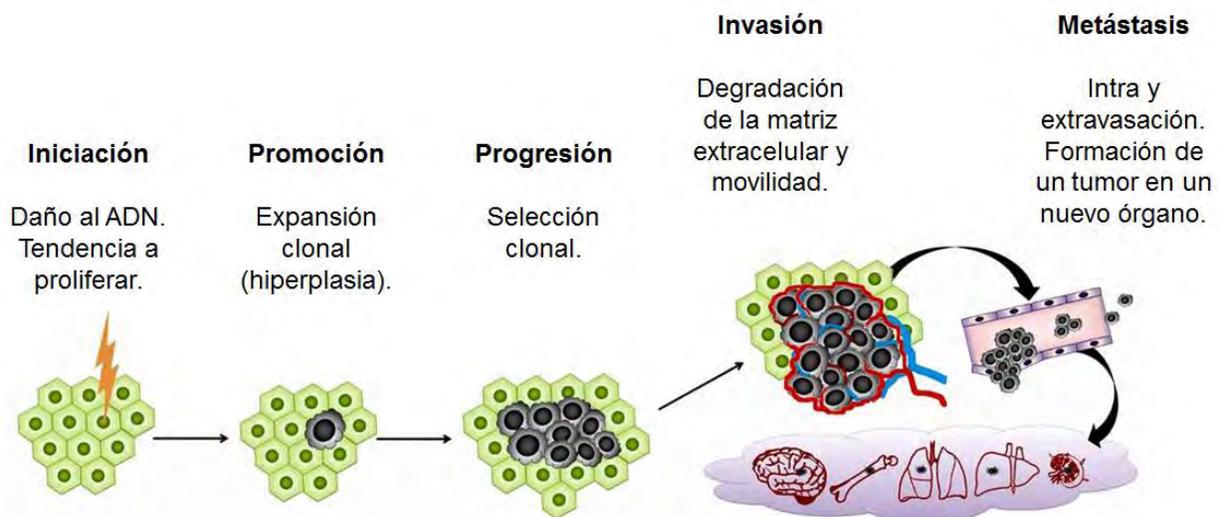


Figura 1. Etapas de la carcinogénesis.

Se observan las cinco etapas que conforman el proceso de la carcinogénesis. La iniciación tiene lugar cuando hay alguna mutación y/o daño en el ADN que le confiere a la célula la capacidad de proliferar indefinidamente. Posteriormente durante la promoción y la progresión hay una expansión y selección clonal, respectivamente, que permite la multiplicación de la célula afectada y da origen al tumor. En la invasión, la célula transformada puede degradar la matriz extracelular y así adquirir movilidad para que, en la etapa de metástasis, pueda colonizar nuevos tejidos. *Adaptada de Referencia 5.*

Durante la etapa de promoción, en el interior del tumor formado existe un límite de difusión de oxígeno que ocasiona que las células se vuelvan hipóxicas. De esta manera,

son forzadas a adoptar un fenotipo glicolítico que genera la acidificación de la lesión. Como consecuencia, ocurre la estabilización del factor de transcripción inducible por hipoxia 1 (HIF-1) que induce la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), necesario para la formación de nuevos vasos sanguíneos que posibiliten la metástasis⁵⁻⁷.

Una vez completada la carcinogénesis, las células desarrollan características particulares que posibilitan el crecimiento del tumor. En 2011, D. Hanahan y R.A. Weinberg enlistaron diez de ellas que, además, se consideran blancos terapéuticos esenciales en los tratamientos oncológicos⁶:

1. Resistencia a la muerte celular.
2. Desregulación energética celular.
3. Señales proliferativas sostenidas.
4. Evasión hacia los supresores de crecimiento.
5. Evasión frente a la respuesta inmune.
6. Inmortalidad replicativa.
7. Promoción tumoral de la inflamación.
8. Invasión activada y metástasis.
9. Inducción de angiogénesis.
10. Inestabilidad genómica y generación de mutaciones.

El cáncer es una combinación única de cambios genéticos y, conforme la célula crece, el número de éstos se incrementa. Aún dentro de cada tumor, las células que lo forman pueden tener mutaciones diferentes. Además, algunos de estos cambios pueden no estar relacionados con el cáncer; quizá sean el resultado de éste y no su causa^{1,6}.

3.1.1. TIPOS DE CÁNCER

Los más de 100 tipos de cáncer conocidos actualmente difieren en función del tipo celular del que se originen, así como del órgano o tejido donde se formen⁸. De acuerdo al tipo celular, los cánceres pueden clasificarse en:

- *Carcinoma*: cuando se forma en las células epiteliales que recubren las superficies internas y externas del cuerpo. Dado que existen muchos tipos de células epiteliales, existe una subclasificación integrada por:
 - Adenocarcinoma*: cuando las células epiteliales producen fluidos o mucosas; la mayoría de los cánceres de mama, de colon y de próstata entran en este grupo.
 - Carcinoma de células basales*: que forman la parte más interna de la epidermis.
 - Carcinoma de células escamosas o epidermoides*: células epiteliales que se ubican debajo de la superficie exterior de la piel. Las células escamosas también recubren muchos otros órganos como el estómago, los intestinos, los pulmones, la vejiga y los riñones.
 - Carcinoma de células de transición*: que forman el tejido epitelial denominado epitelio de transición o urotelio; algunos cánceres de vejiga, de los uréteres y de riñones forman parte de este grupo.
- *Sarcoma*: el cáncer se forma en el hueso y en los tejidos blandos, así como en músculos, tejido adiposo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y en tejido fibroso como tendones y ligamentos;
- *Leucemia*: cuando el cáncer empieza en los tejidos que forman la sangre en la médula ósea;
- *Linfoma*: cáncer de linfocitos T y B;
- *Mieloma*: cáncer de células plasmáticas;
- *Melanoma*: cáncer de melanocitos y sus progenitores;
- *Glioma*: cáncer de las células gliales del Sistema Nervioso Central.

De la clasificación anterior, el 90% de los tumores conocidos puede clasificarse como carcinoma. Las células epiteliales son las que mantienen durante más tiempo la capacidad de dividirse, además de que, debido a su localización, están más expuestas a la acción de carcinógenos que pueden alterar su comportamiento⁸.

3.1.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), a nivel mundial 63% de las muertes anuales son causadas por enfermedades no transmisibles que generalmente son crónicas. Entre estas, el cáncer ocupa un lugar predominante ya que provoca cerca de 8 millones de decesos al año, lo que la convierte en la principal causa de muerte a nivel global. Además, es considerada la enfermedad crónico-degenerativa de mayor incidencia entre los adultos, en comparación con niños y jóvenes. Aunque es un padecimiento que afecta por igual a ambos sexos, se observa una diferencia en los tipos de cáncer que afecta a hombres y mujeres. Al respecto, en 2015 la OMS identificó a los tumores malignos de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado como los más comunes entre los varones, mientras que en las mujeres son los de mama, colorrectal, pulmón, cuello del útero y estómago⁹.

Si bien no hay una causa directa que origine la aparición del cáncer, dicho organismo internacional clasifica los agentes carcinógenos en tres grandes grupos¹⁰:

- *Carcinógenos físicos*, como las radiaciones ionizantes y ultravioleta.
- *Carcinógenos químicos*, como el tabaco, el alcohol, los asbestos, el arsénico y las aflatoxinas.
- *Carcinógenos biológicos*, que hacen referencia a infecciones por determinados virus, bacterias y parásitos.

Según el informe de la OMS de 2015, se calcula que el consumo de tabaco se relacionó con el 20% de las muertes por cáncer en ese año, mientras que la quinta parte de los nuevos casos de cáncer se vincularon con infecciones crónicas como el virus del papiloma humano (VPH), relacionado al cáncer de cuello uterino, y el virus de la hepatitis B, asociado al cáncer hepático. Además, si se añaden factores ambientales y genéticos, así como estilos de vida poco saludables como el sedentarismo y una alimentación rica en grasas y carbohidratos, el riesgo de desarrollar una neoplasia maligna se incrementa^{9,10}.

De acuerdo a estadísticas del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (NIH, por sus siglas en inglés, *National Institute of Health*), para el año 2016 se preveía el diagnóstico de 1 685 210 casos nuevos de cáncer tan solo en ese país, mientras que 595 690 personas morirían por la enfermedad. Con base en datos de 2012, se calcula que cerca del 39.6% de mujeres y hombres recibirán un diagnóstico de cáncer en algún momento de sus vidas¹¹. Finalmente, se estima que los gastos nacionales dedicados a la atención del cáncer en Estados Unidos alcanzaron una cifra cercana a los 125 mil millones de dólares en 2010 y podrían alcanzar los 156 mil millones para 2020^{10,11}.

En México, según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) del año 2013, los cánceres de órganos digestivos y de mama son la primera causa de morbilidad hospitalaria por neoplasia en hombres y mujeres, respectivamente, de 20 años o más, en tanto que el cáncer de órganos hematopoyéticos es la principal causa de morbilidad hospitalaria por tumores malignos en población de 0 a 19 años, siendo ligeramente superior en mujeres que en hombres (62% contra 58.7%). Del total de tumores malignos en la población de 20 años y más, los de órganos digestivos son la primera causa de mortalidad, con 32.52 casos por cada 100 mil habitantes, seguido de las neoplasias de órganos genitales, con 15.08 casos por cada 100 mil habitantes; de órganos respiratorios e intratorácicos, con 10.72 por cada 100 mil; y de mama, con 8.13 decesos por cada 100 mil¹².

3.2. CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

El cáncer de cabeza y cuello (HNC, por sus siglas en inglés, *Head and Neck Cancer*) engloba una gran variedad de neoplasias malignas que tienen en común el originarse en las células escamosas que revisten las superficies húmedas y mucosas del interior de la cabeza y cuello¹³ (**Figura 2**).

De acuerdo a la zona en la que inician, los HNC se categorizan en:

- *Cavidad oral:* comprende los labios, dos terceras partes del frente de la lengua, las encías, el revestimiento dentro de las mejillas y labios, la base de la boca debajo de la lengua, el paladar duro y la zona pequeña de la encía detrás de las muelas del juicio.
- *Faringe o garganta:* es un tubo hueco de casi 5 pulgadas de largo que comienza detrás de la nariz y se extiende hasta el esófago. Consta de tres partes: la nasofaringe (la parte superior de la faringe, detrás de la nariz), la orofaringe (la parte central de la faringe, incluido el paladar blando, la base de la lengua y las amígdalas) y la hipofaringe (la parte inferior de la faringe).
- *Laringe:* es un conducto corto formado por cartílago situado justo abajo de la faringe en el cuello. La laringe contiene las cuerdas vocales. Tiene también un tejido pequeño, llamado epiglotis, que se mueve para cubrir la laringe e impedir que los alimentos entren en las vías respiratorias.
- *Senos paranasales y cavidad nasal:* los senos paranasales son pequeños espacios huecos en los huesos de la cabeza localizados alrededor de la nariz. La cavidad nasal es el espacio hueco dentro de la nariz.
- *Glándulas salivales:* la mayoría de ellas se encuentran en el piso de la boca y cerca de la mandíbula. Las glándulas salivales producen saliva^{13,14}.

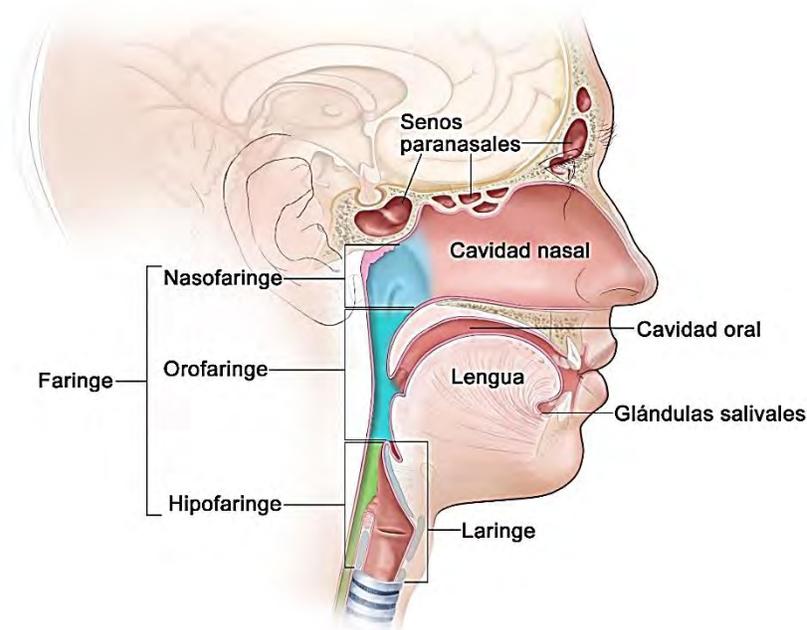


Figura 2. Regiones anatómicas involucradas en el cáncer de cabeza y cuello.

Se observa en el esquema las zonas anatómicas cuyos carcinomas forman parte de los HNC, es decir, la cavidad oral, lengua, glándulas salivales, cavidad nasal, senos paranasales, faringe y laringe. *Obtenida de Referencia 13.*

3.2.1. EPIDEMIOLOGÍA

Los HNC se encuentran entre los cánceres más comunes y representan un serio problema de salud, pues engloban alrededor del 6% de los tumores sólidos a nivel mundial¹⁴. En el año 2012, de acuerdo a cifras del proyecto GLOBOCAN de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés, *International Agency for Research on Cancer*) se contabilizaron 540 mil nuevos casos, mientras que se estimó una ocurrencia anual de 271 mil muertes ligadas a los HNC. En otras palabras, este tipo de cáncer presenta una letalidad cercana al 50%. En casos específicos como en el cáncer de vías aerodigestivas superiores, la letalidad alcanza hasta el 78%^{15,16}. En los Estados Unidos representa el 3% de todos los cánceres, sin embargo resulta mucho más prevalente en algunas zonas de América Latina, incluido México, que ocupa la quinta posición de prevalencia de la región¹⁷. De acuerdo a la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, el riesgo relativo en

nuestro país es de 7.5 por cada 100 mil habitantes y representan entre el 1.29% y el 1.44% de todos los casos registrados de cáncer¹⁶.

3.2.2.FACTORES DE RIESGO

Las neoplasias de este tipo tienen dos causas etiológicas principales: el consumo de alcohol y tabaco y la infección con el VPH^{13,14}. Aunque no ocupa los primeros lugares de prevalencia mundial, los HNC han presentado un incremento importante en las últimas dos décadas, pasando del decimotercer lugar al sexto, según informes de la OMS¹⁶. El tabaquismo se considera su causa más importante debido a los más de 30 carcinógenos presentes en el humo inspirado, y es seguido inmediatamente por el consumo de alcohol. Ambos hábitos presenta un efecto sinérgico: al disminuir la acción protectora de la saliva y provocar una deficiencia en las células T, el alcohol potencia la solvencia de los carcinógenos del tabaco y promueve su penetración en la mucosa¹⁶.

La infección por VPH también ha sido íntimamente ligada al HNC, pues entre el 75% y el 90% de los pacientes presentan esta infección^{16,18}. El VPH es un virus de ADN que tiene especial afinidad por las células epiteliales; hasta el momento se ha identificado 202 diferentes tipos de este virus, siendo los 16 y 18 los que han sido asociados al desarrollo de neoplasias malignas. En una infección persistente, estos virus expresan dos proteínas, E6 y E7, las cuales inactivan a dos importantes supresores de tumores, pRb y p53, alterando así la regulación del ciclo celular y los procesos de apoptosis de las células huéspedes¹⁸.

Recientemente se han asociado otros factores de riesgo al desarrollo de HNC como el consumo de betel, una mala higiene bucal o los riegos ocupacionales como el contacto con polvo de cemento, pintura, barnices, asbesto y níquel. En Europa se han asociado las dietas pobres en frutas y verduras, debido a que entre el 10 y 15% de los casos de HNC presentan deficiencias nutrimentales. Finalmente, es fundamental considerar las contribuciones genéticas para la susceptibilidad a HNC debido a una historia familiar con cáncer^{14,16}.

3.2.3.MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los síntomas de HNC van a depender del tipo de cáncer, así como del grado de avance. Sin embargo, en términos generales, estos son los principales síntomas¹⁶:

- Dificultad para tragar.
- Dolor de garganta que no desaparece.
- Cambios de voz.
- Formación de abultamientos con o sin dolor.
- Úlceras y sangrados.
- Dificultad para respirar.
- Epistaxis.
- Disfagia.
- Dolor en los oídos.
- Dolor en los dientes.
- Congestión de senos paranasales.
- Dolor de cabeza.
- Inflamación en el mentón o alrededor de la mandíbula.
- Parálisis de los músculos de la cara.

3.2.4.DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

En México, dos de cada tres pacientes con HNC son diagnosticados en una etapa avanzada, mientras que aproximadamente el 50% de los casos no supera los cinco años de supervivencia, por lo que es de gran importancia lograr un diagnóstico temprano y promover la prevención¹⁹.

Los exámenes y pruebas varían de acuerdo a los síntomas, no obstante, el especialista deberá estadificar la enfermedad, es decir, determinar si ha ocurrido la diseminación a otras partes del cuerpo. En general, el diagnóstico consiste en exámenes completos de cabeza y cuello, biopsias, citología exfoliativa, pruebas de VPH, tomografías y resonancia magnética²⁰.

Respecto al tratamiento para los HNC, este igualmente va a depender de la sintomatología y el estadio de la neoplasia. Por lo general, la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia son las técnicas más empleadas en este tipo de cánceres, no obstante, presentan la desventaja de actuar no sólo sobre las células de tejidos enfermos sino también sobre las células sanas. Es por ésto que, durante y después de los tratamientos, suelen ocurrir efectos secundarios que pueden aparecer bajo la forma de lesiones orales y complicaciones sistémicas^{19,20}.

3.2.5. CÁNCER HIPOFARÍNGEO

El cáncer de hipofarínge es uno de los HNC menos comunes en el continente americano, sin embargo, en Europa y Asia se nota una alta incidencia. Como la mayoría de los HNC, está estrechamente relacionado al consumo de tabaco y alcohol, no obstante, algunas variantes se asocian a deficiencias nutricionales²¹.

Anatómicamente, la hipofaringe se extiende desde el plano del hueso hioides por encima del plano del borde inferior del cartilago cricoideo más abajo. La hipofaringe se compone de las siguientes tres partes²¹:

- El seno piriforme.
- El área poscricoidea.
- La pared faríngea posterior.

De acuerdo al NIH, entre 65 y 85% de los carcinomas hipofaríngeos implica los senos piriformes, entre 10 y 20% implica la pared posterior de la faringe y entre 5 y 15% implica el área poscricoide. Por otra parte, debido a la abundante red linfática existente en la región, esta variante de HNC presenta una amplia tendencia a diseminarse y hacer metástasis²¹.

El tratamiento del cáncer de hipofaringe resulta polémico, en parte debido a su baja incidencia y a la dificultad de realizar estudios clínicos adecuadamente impulsados y aleatorizados. Por tanto, es difícil de definir el tratamiento ideal para un estadio o sitio específico de este tipo de cáncer. En general, tanto la cirugía como la radioterapia

constituyen el pilar de la mayor parte de los esfuerzos curativos; además, en años recientes, se añadió la quimioterapia a la estrategia de tratamiento, sin embargo, sólo es aplicable para casos específicos avanzados²¹.

3.3. CICLO CELULAR

El cáncer es una enfermedad de los procesos fisiológicos que controlan el crecimiento y la muerte de las células. Existen muchas formas en las que se presenta pero su fisiopatología básica comprende alteraciones en cualquier punto de la maquinaria molecular que controla el ciclo celular, y que por tanto, causan desregulaciones en éste²².

El ciclo celular es un proceso altamente sincronizado que comprende el periodo entre dos divisiones sucesivas de una célula. Durante este lapso de tiempo suceden dos eventos consecutivos: la replicación del ADN y la segregación de los cromosomas hacia dos células distintas²². En los organismos pluricelulares, el ciclo y la división celular resultan fundamentales para el crecimiento y desarrollo de los mismos, así como para regenerar y reemplazar las células envejecidas o dañadas²³. El ciclo celular incluye cuatro etapas o fases sucesivas a partir de la división celular (**Figura 3**):

- *G1* (del inglés *Growth phase 1*), que abarca desde el final de la mitosis hasta el inicio de la síntesis de ADN²³. La célula aumenta de tamaño e inicia una intensa actividad metabólica con el fin de sintetizar la mayoría de las proteínas implicadas en la siguiente fase^{24,25}.
- *S* (del inglés *Synthesis phase*), que engloba el proceso de síntesis de ADN²³. Durante esta etapa también se sintetizan la ADN polimerasa y las histonas asociadas al ADN eucarionte. La fase S finaliza cuando el cromosoma de la célula es duplicado, resultando cada copia con dos cromátidas idénticas^{24,25}.
- *G2* (del inglés *Growth phase 2*), donde la célula se prepara para iniciar el proceso de mitosis²³. Durante esta fase continúa la síntesis de proteínas y ácido ribonucleico (ARN) y termina cuando los cromosomas se condensan al inicio de la mitosis^{24,25}.

- *M* (del inglés *Mitotic phase*), que comprende los proceso de mitosis y citocinesis²³. En esta etapa se distribuyen los cromosomas duplicados a cada una de las células hijas, finalizando cuando se han separado por completo estas últimas^{24,25}.

Se ha establecido una etapa adicional, la llamada G0 ó etapa de quiescencia o quietud. Durante esta fase no hay división alguna, aunque la célula puede realizar sus funciones principales por tiempo indefinido. No obstante, no se considera parte del ciclo celular²⁴.

La fidelidad en la progresión del ciclo celular depende de varios mecanismos de supervivencia como la regulación por cinasas dependientes de ciclinas (CDK's), que son complejos proteicos que aparecen y desaparecen periódicamente a lo largo del ciclo y son reguladores clave en la transición entre etapas²⁴⁻²⁷. Existe un sistema de puntos de restricción o control (checkpoints) que permite la progresión ordenada del ciclo. Los dos más importantes se ubican al término de la etapa G1, en el que participan los complejos ciclina D/cinasa dependiente de ciclinas (CDK) 4 o 6, o ciclina E/CDK2 y la proteína del retinoblastoma (Rb). Los eventos que suceden en este punto de restricción inician con la hiperfosforilación de Rb por parte de las ciclinas D/CDK4 y ciclina D/CDK6, lo que impide su unión al factor de transcripción E2 (E2F) que controla la transcripción de genes necesarios en la fase S. Toda vez que el ADN se encuentra dañado, entonces es activado este checkpoint²⁴. El segundo punto de control se ubica en la fase G2 y en él participan el complejo ciclina B/CDK1 y su inhibidor, la proteína serin treonin cinasa CDC2 (p34) en su estado hiperfosforilado, que monitorean la replicación total del ADN antes de entrar a la etapa de mitosis^{22,24}. Adicionalmente, la proteína tumoral p53 es un importante regulador de ambos puntos de restricción; activando al inhibidor 1 de CDK (p21) puede detener el ciclo si se presentan daños al ADN, sin embargo, cuando la célula no es capaz de enmendar las alteraciones, son activados los denominados mecanismos de muerte celular programada (MCP)²⁸.

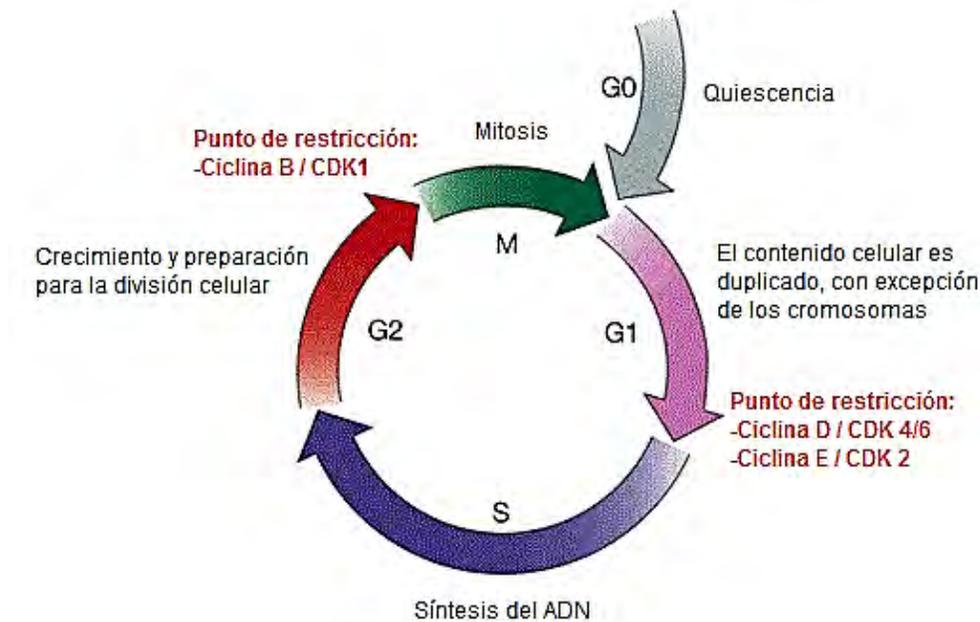


Figura 3. Etapas del ciclo celular.

Se muestran las cuatro etapas que conforman el ciclo celular y los procesos involucrados en cada una, además de los respectivos puntos de restricción en las fases G1/S y G2/M. *Adaptada de Referencia 29.*

3.4. MUERTE CELULAR

La muerte celular programada (MCP) es definida como la muerte de una célula que, sin estar bajo condiciones patológicas, ocurre por acción de diversos mecanismos intracelulares²⁸. La importancia de este proceso radica en que permite la regulación del desarrollo del organismo, la homeostasis de los tejidos y las señales de estrés, al tiempo en que se propicia un balance con la proliferación y supervivencia celular. En cáncer, este balance se rompe, pues la célula escapa a los controles de división y muerte y comienza a proliferar descontroladamente³⁰.

La ejecución de los mecanismos de MCP requiere de la activación de tres procesos generales que controlan el destino de la célula: apoptosis, autofagia y necrosis programada, que se distinguen entre sí por características morfológicas y bioquímicas particulares. La apoptosis o MCP tipo I es el más importante de los tres procesos antes mencionados; fue descrita desde la década de los setentas y se caracteriza por inducir la contracción de la célula, la condensación nuclear y la fragmentación del material

genético, la disrupción membranal y la pérdida de adhesión celular²⁸. Por su parte, la autofagia o MCP tipo II es un proceso catalítico que involucra la formación de autofagosomas, estructuras de doble membrana cuya finalidad es degradar organelos y biomoléculas, del modo en que favorece el reciclaje cuando la célula se encuentre en periodos de estrés²⁸. En años recientes diversas investigaciones han sugerido que este proceso genera una respuesta temprana en favor de la supervivencia de la célula, sin embargo, cuando sucede una hiperactivación, conduce a la muerte celular^{28,30}. Finalmente, la necrosis programada o MCP tipo III involucra el crecimiento celular, la disfunción de los organelos y la lisis celular, no obstante, a diferencia de la apoptosis, no ocurre la condensación ni la fragmentación nuclear^{28,30}.

3.4.1. APOPTOSIS

Es el principal tipo de MCP que ocurre cuando el daño al ADN resulta irreparable²⁸. Se caracteriza por ser un engranaje jerárquico de eventos moleculares que puede desencadenarse mediante dos rutas, la extrínseca o vía de los receptores superficiales de muerte, y la intrínseca o vía mitocondrial, bajo condiciones que causan estrés celular²⁹. Ambas rutas convergen en la activación de una familia de proteasas, denominadas caspasas, que pueden ser expresadas después de los 10 minutos de estimulación hacia los receptores de muerte, en tanto que por la vía mitocondrial se requiere de un mayor tiempo. Una vez activadas las caspasas, éstas dirigen una cascada de eventos bioquímicos que provocan el desmantelamiento de los componentes celulares, culminando así en la muerte de la célula^{30,31}.

El proceso completo de la apoptosis finaliza con la remoción de las células apoptóticas por parte de células fagocíticas, una etapa donde las primeras expresan en sus superficies algunas moléculas que propician su reconocimiento por los fagocitos; algunas de ellas son la fosfatidilserina y la calreticulina³⁰. Finalmente, las células viables también expresan moléculas que evitan su reconocimiento y las protegen de ser fagocitadas; una de ellas es la proteína transmembranal de diferenciación 47 (CD47), sin embargo, el mecanismo por el que otorga tal protección aún no ha sido elucidado por completo^{30,31}.

3.4.1.1. VÍA INTRÍNSECA O MITOCONDRIAL

Esta ruta apoptótica es activada por señales de muerte intracelulares como la expresión de la proteína p53, en respuesta al daño en el ADN, la falta de factores de crecimiento o la presencia de estrés oxidativo³¹ (**Figura 4**). Dicha vía es regulada por la familia de proteínas denominadas en conjunto Bcl-2, que median la liberación de proteínas de la mitocondria como el citocromo c dentro de un proceso conocido como permeabilización de la membrana externa mitocondrial^{30,31}. Actualmente, se han identificado alrededor de 20 miembros de proteínas Bcl-2 que pueden clasificarse de acuerdo a su función y estructura en antiapoptóticas y proapoptóticas. Las primeras, entre las que destacan la proteína del linfoma de células B 2 (Bcl2), la proteína del linfoma de células B extra grandes (Bcl-XL), las proteínas tipo Bcl-2 B y W (Bcl-B y Bcl-W) y la proteína de la leucemia de células mieloides 1 (Mcl-1), se encuentran localizadas en la membrana nuclear, el retículo endoplásmico, la mitocondria y el citosol, y participan en la prevención de la apoptosis limitando la permeabilización mitocondrial antes mencionada, manteniendo así su integridad³⁰. Poseen cuatro dominios de homología Bcl-2 (BH 1-4), siendo los dominios 1, 2 y 3 los responsables de formar una región hidrofóbica de interacción con los dominios BH3 de las proapoptóticas, conduciendo a su inhibición. Respecto a estas últimas, entre las que destacan la proteína X asociada a Bcl-2 (Bax), la antagonista homóloga a Bcl-2 (Bak) y la proteína ovárica asesina relacionada a Bcl-2 (Bok), inducen directamente la permeabilización mediante su homo o heterodimerización³². Existe un tercer grupo denominado proteínas de dominios BH3 que incluye al promotor de muerte asociado a Bcl-2 (Bad), el antagonista de muerte de dominios de interacción BH3 (Bid), la proteína asesina de interacción Bcl-2 (Bik), la proteína 11 tipo Bcl-2 (Bim), el factor modificador Bcl-2 (Bmf), la proteína inducida por Forbol-12-Miristato-13-Acetato 1 (Noxa), el modulador de apoptosis regulado por p53 (Puma), el activador de apoptosis harakiri (HRK) y el activador de MCP (Egl-1), que actúan como iniciadores de la vía³⁰⁻³².

La inducción de la apoptosis inicia con la relocalización de los miembros Bcl-2. Las proteínas de la subfamilia de dominios BH3, Bid y Bim, se translocan a la mitocondria

para inducir la multimerización y activación de Bax y Bak, lo que conduce a la permeabilización de la membrana³². En el caso de Bid, esta es distribuida tanto a la mitocondria como al citosol, donde es digerida por la caspasa-8 para dar origen a la forma truncada denominada tBid, que entra a la mitocondria e induce la apoptosis. Bim, que en condiciones normales forma un complejo con la proteína motora dineína, es disociada por señales apoptóticas para unirse a Bcl2 con el objetivo de intensificar las señales de muerte celular³⁰⁻³².

La permeabilización de la membrana externa mitocondrial es producto de la activación de las proteínas proapoptóticas Bax y Bak; la primera es trasladada a la mitocondria mientras que Bak, originalmente en la mitocondria unida a Mcl-1 y Bcl-XL en condiciones normales, es liberada y con ello se permite la degradación de dichas proteínas antiapoptóticas. Tanto Bax como Bak, una vez libres dentro de la mitocondria, se anclan a la membrana externa e interactúan con los canales aniónicos dependientes de voltaje, lo que conduce a una pérdida del potencial de membrana y a la liberación del citocromo c^{32,33}. Éste, en presencia del desoxiadenosin trifosfato (dATP), se une al factor activador de peptidasa apoptótica 1 (Apaf-1) para formar el complejo proapoptótico denominado apoptosoma, que de manera específica activa a caspasa -9, encargada de iniciar una serie de eventos proteolíticos que dará como resultado la activación de caspasas -3, -6 y -7³⁰⁻³². De esta manera, el apoptosoma puede ser blanco de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), para bloquear la activación y actividad de las caspasas^{33,34}.

Durante la salida del citocromo c de la mitocondria, otras proteínas como el segundo activador de caspasas derivado de mitocondria (Smac), la proteína de unión directa a IAP con bajo pI (DIABLO) y la serin proteasa mitocondrial HtrA2 (Omi) también son liberadas; éstas moléculas actúan como inhibidoras de las IAPs, por lo que se consideran como proteínas potenciadoras de la apoptosis^{30,32}.

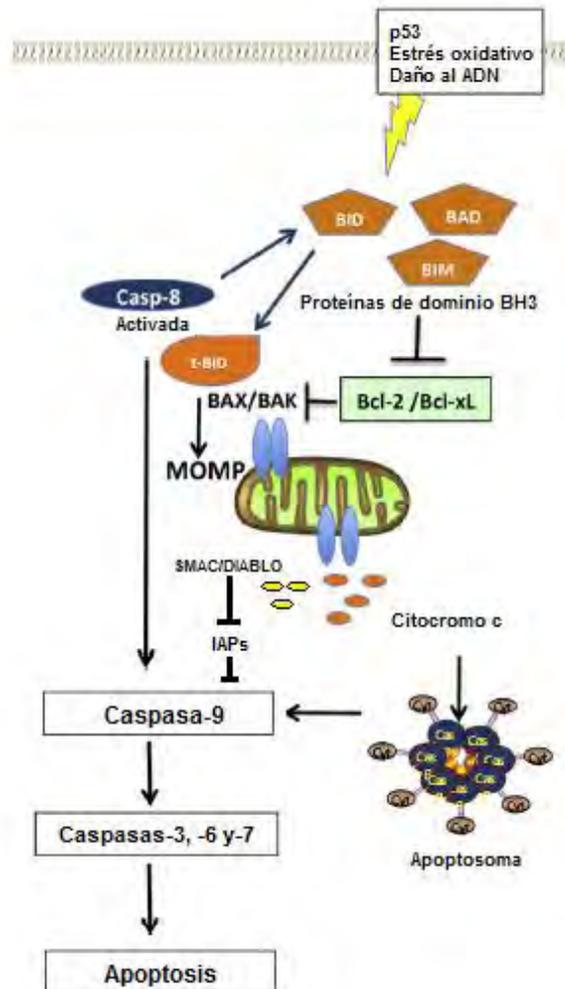


Figura 4. Vía intrínseca de la apoptosis.

Se muestran las moléculas involucradas en la vía intrínseca de la apoptosis, la cual es inducida por la proteína p53, estrés oxidativo y daños en el ADN. Con la activación de las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, la consecuente liberación del citocromo c de la mitocondria y la formación del apoptosoma, da inicio la activación de las caspasas 9, 3, 6 y 7 que conducen a la muerte celular. *Adaptada de Referencia 31.*

3.4.1.2. VÍA EXTRÍNSECA O DE LOS RECEPTORES DE MUERTE

La vía extrínseca de la apoptosis es desencadenada por la activación ligando-inducida de los receptores de muerte que pertenecen a la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR), como Fas, los receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) y TNFR 1/2³⁰⁻³² (**Figura 5**). El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) es una citocina pleiotrópica proinflamatoria secretada principalmente por monocitos/macrófagos que afecta la supervivencia y proliferación celular, así como la resistencia a la insulina, el metabolismo lipídico, la coagulación y la función endotelial³⁰.

Es sintetizado como un precursor inactivo denominado proTNF que se escinde por metaloproteinasas de matriz (MMP) en algunos sitios de homología con colágeno, resultando en la forma reducida y soluble TNF; su unión a los receptores TNFR1/2 conduce a una fusión de balsas lipídicas en la membrana plasmática y al reclutamiento de los receptores de dominios de muerte intracelulares TRADD, los factores asociados al receptor de TNF 1 y 2 (TRAF-1/2), la proteína serin treonin cinasa 2 de interacción con receptor (RIPK) y la proteína asociada a Fas con dominios de muerte (FADD), para formar el denominado Complejo I. Posteriormente, este complejo se disocia del receptor TNFR y en el citoplasma se une a la proteína inhibidora de FLICE (FLIP) y a algunas moléculas de procaspasa-8, con la finalidad de conformar el Complejo II; para dirigir la muerte celular es necesario que se active la procaspasa-8 a caspasa-8, evento que sucede mediante el mecanismo de activación inducida por proximidad, donde las moléculas inactivas se cortan mutuamente y se activan unas a otras³⁰⁻³².

Fas es otro receptor de muerte que comparte algunas características con los receptores TNFR. Su ligando, FasL o CD95L, es una proteína de membrana tipo II expresada principalmente en linfocitos activados. Una vez reconocida por su receptor Fas, da inicio el reclutamiento de FADD y procaspasa-8, formando el complejo DISC, que conduce a la activación proteolítica de caspasa-8³⁰. Finalmente, los receptores de TRAIL o receptores *decoy* DC4 y DC5 inducen la formación de DISC y la posterior muerte celular tras unirse a su ligando, la citocina TRAIL; existen otros dos receptores *decoy*, DcR1 y DcR2, que compiten por la unión a TRAIL, pero no inician la apoptosis³⁰⁻³².

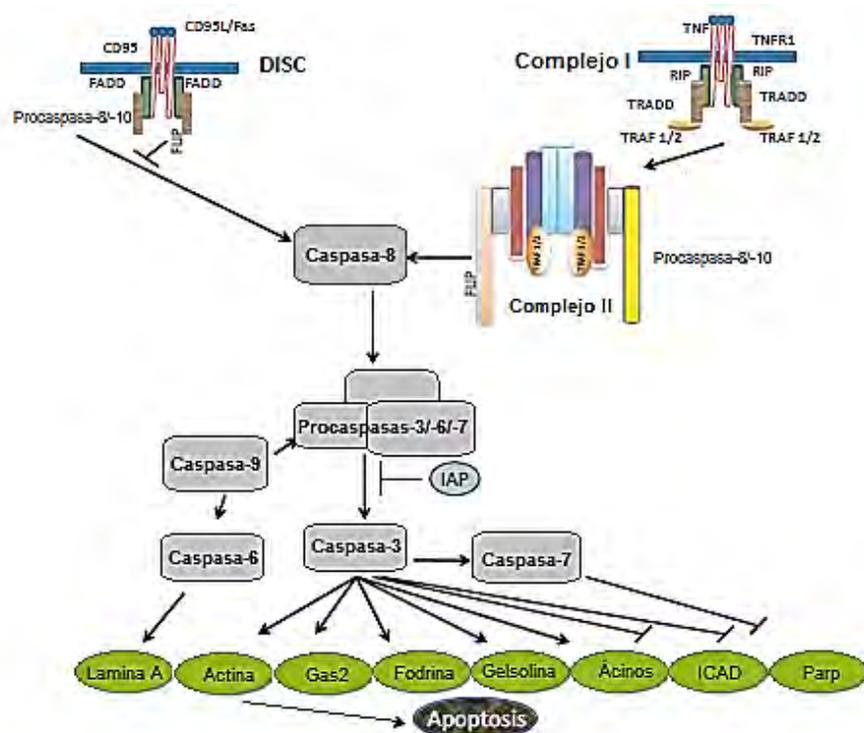


Figura 5. Vía extrínseca de la apoptosis.

Se muestran las moléculas involucradas en la vía extrínseca de la apoptosis, la cual inicia con la activación ligando-inducida de los receptores membranales de muerte. Tras el reclutamiento de los receptores de dominios de muerte intracelulares y la formación de los Complejos I y II, caspasa-8 es activada y, con ello, las caspasas-3, 6 y 7, finalizando en la muerte celular. *Adaptada de Referencia 30.*

3.4.2. AUTOFAGIA

Con el propósito de reciclar nutrientes, la célula ha desarrollado una estrategia para degradar proteínas citosólicas y diferentes organelos dañados o disfuncionales, denominada autofagia. Se trata de un mecanismo adaptativo en respuesta a los estados de hipoxia, inanición y estrés oxidativo, y que es considerado como una vía de sobrevivencia celular. No obstante, cuando los estados de estrés sobrepasan determinados límites, ocurre una acumulación de vacuolas autofágicas que conducen inevitablemente a la muerte celular³¹. Estas vacuolas autofágicas, también llamadas autofagosomas, son vesículas multimembranales que secuestran componentes del citoplasma y los transportan hasta los lisosomas para ser degradados. Su formación ocurre en diversas etapas, iniciando con el aislamiento de una membrana que recibe el nombre de fagóforo; posteriormente, éste es expandido y engloba el material que será

degradado. Después, con la participación de las proteínas motoras dineínas, los autofagosomas son transportados hasta los lisosomas, con los que se fusionan y dan origen a los autolisosomas, cuyo contenido luminal incluye una mezcla de hidrolasas. Finalmente, los metabolitos generados son liberados al citoplasma y reingresados a las rutas metabólicas^{30,31}.

Para regular el proceso de autofagia, un sensor metabólico, la cinasa diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), puede participar inhibiendo el ensamblaje del autofagosoma. mTOR fosforila a la proteína cinasa relacionada a autofagia (Atg) 13, previniendo su interacción con el complejo formado por Atg1 y Atg17. Durante los estados de inanición, mTOR es inhibido y la forma no fosforilada de Atg13 se acopla al complejo, desencadenando el aislamiento de la membrana que formará el fagóforo y, posteriormente, el autofagosoma^{30,31}. Dependiendo de diversos factores, la autofagia conduce a la muerte o a la supervivencia celular. Puede prevenir la inducción de la apoptosis manteniendo un suministro de nutrientes aun a costa de la falta de los mismos o a su bloqueo por la ausencia de factores de crecimiento, no obstante, también puede inducirla como un resultado fallido durante la adaptación a los diferentes estados de estrés³¹. Por tal motivo, su papel como un mecanismo de muerte celular continua siendo debatido^{30,31}.

3.4.3. NECROSIS PROGRAMADA

También llamada necroptosis, este mecanismo de muerte celular comparte algunas características con el proceso de apoptosis. Involucra la pérdida de la integridad membranal así el crecimiento de organelos y de la propia célula que finaliza en su lisis; es desencadenada por complejos protéicos como en la apoptosis, sin embargo, a diferencia de ésta, la necroptosis es independiente de las caspasas, además de que no desencadena la condensación ni la fragmentación del ADN³⁰. Se ha asociado este mecanismo a los receptores de muerte TNFR1, los que permiten la formación del llamado Complejo I junto a TRADD, TRAF2, los inhibidores de apoptosis cIAP1/2 y la proteína de interacción con el receptor (RIP) 1. cIAP1/2 tienen la capacidad de inducir la poliubiquitinización de RIP1, lo que conduce a la activación de la vía del factor nuclear

potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B). Sin embargo, cuando ocurre su desubiquitinación por parte de la enzima de cilindromatosis (CYLD), RIP1 forma el Complejo II con RIP3, TRADD, FADD y caspasa-8, y se desencadena la maquinaria de apoptosis. En caso de que el inhibidor cFLIP se una a caspasa-8, se bloquea la apoptosis y RIP1 y RIP3 pueden ser fosforiladas por RIPK1/3, lo que dirige el mecanismo de muerte hacia necrosis, involucrando especies reactivas de oxígeno (ROS), permeabilización de la membrana lisosomal y el agotamiento del adenosin trifosfato (ATP) por las polimerasas de la familia PARP. Por lo tanto, la composición del Complejo II es determinante para definir la ruta que inducirá la muerte celular^{30,31}.

3.5. CÁNCER Y APOPTOSIS

El cáncer puede ser interpretado como una enfermedad de la comunicación entre y dentro de las células². Como resultado de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumor, el cáncer conduce invariablemente a la alteración de vías de señalización, siendo las de apoptosis las que presentan una gran variedad de cambios que limitan o evitan el proceso de muerte celular.

La proteína p53, siendo un importante factor proapoptótico e inhibidor de tumores, es considerada como el blanco de mutaciones más común en cánceres humanos³⁵. Su pérdida de función conlleva inestabilidad genómica, apoptosis alterada y un arresto al ciclo celular disminuido^{2,35}. Adicionalmente, las proteínas de la familia Bcl-2 también presentan patrones de expresión perturbados en las células tumorales; el balance entre los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos resulta de gran significancia para decidir el destino de las células individuales^{2,36}.

Otra de las rutas de señalización íntimamente ligadas al cáncer y a la resistencia a la muerte celular es la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK). Hasta ahora, se han identificado tres miembros de la familia MAPK, la cinasa activada por señales extracelulares (ERK), la cinasa c-Jun N-terminal (JNK) y la cinasa p38, que tienen papeles importantes en el desarrollo del cáncer². ERK actúa de manera complicada ya

que puede promover el crecimiento celular así como inhibir la proliferación dependiendo del estímulo que reciba; en el caso de que sea activado por la interleucina 3 (IL-3) sobreexpresada dentro del microambiente tumoral, resultará en señales de proliferación y supervivencia³⁶. Por el contrario, cuando ocurre un daño oxidativo, ERK puede conducir a la promoción de la muerte celular³⁷. No obstante, se ha observado que en diferentes tipos de cáncer, la principal alteración de la vía de señalización de ERK se produce en las primeras etapas. ERK es activada después de ser fosforilada por la cinasa MEK (también denominada MAPKK), que a su vez se activa cuando es fosforilado por la serin treonin cinasa Raf (también conocida como MAPKKK). Para que ésta pueda ser funcional, el complejo formado entre la GTPasa Ras y el guanosin trifosfato (GTP) debe fijarse en el dominio regulador de Raf; una vez realizada la hidrólisis de GTP dando lugar a guanosin difosfato (GDP), Raf se libera de forma activa para cumplir su labor. En algunos cánceres, principalmente de páncreas, las mutaciones en Ras y Raf conducen a la sobreactivación de la vía de ERK, lo que mantiene encendidas las señales de proliferación y supervivencia malignas³⁸.

Respecto a p38 y JNK, sus funciones parecen estar ligadas al contrarresto de la transformación maligna ocasionada por las mutaciones de Ras y Raf, es decir, actúan como genes supresores de tumor, sin embargo, aún no es totalmente claro el papel que desempeñan ambas proteínas cinasas. Lo que resulta evidente es que al presentarse mutaciones en p38 se bloquea la fosforilación de p53, y por ende, no pueden activarse las rutas apoptóticas, mientras que mutaciones en JNK han sido relacionadas con la represión transcripcional de p53³⁸.

El NF- κ B, otro importante regulador de apoptosis, es un factor de transcripción que controla la expresión de una gran cantidad de genes involucrados en la regulación de apoptosis, la replicación viral, tumorigénesis, inflamación y algunas enfermedades autoinmunes. Puede ser activado por una gran variedad de estímulos como factores de crecimiento, citocinas, radiación y agentes farmacológicos. En las células de mamíferos, el NF- κ B existe acoplado a su inhibidor I κ B; una vez que factores proapoptóticos como citocinas proinflamatorias, antígenos bacterianos o los miembros de la familia TNF permiten la activación del complejo IKK, éste fosforila a I κ B para la disociación y final

activación del NF- κ B. De manera general, existe un consenso que atribuye a este factor de transcripción un papel oncogénico de relevancia, mediante la regulación transcripcional de genes vinculados al ciclo celular o a los estados de inflamación crónica característicos de algunos cánceres, lo que potencia la transformación maligna y con ello, la resistencia a la muerte de las células^{2,38}.

Finalmente, la desregulación de la apoptosis en cáncer también es producto de algunos microRNAs. Éstos son una clase de ARN cortos, conservados y de cadena simple que no codifican para ninguna proteína endógena; su función predominante es regular la traducción de proteínas mediante su unión a las secuencias complementarias de las regiones 3'-UTR de los ARN mensajeros diana^{28,39}. De acuerdo a su mecanismo de acción, pueden clasificarse como miRNAs supresores de tumor o miRNAs oncogénicos. Entre los primeros destacan miR-15/16, cuyo ARN mensajero blanco es el que codifica para Bcl2; una vez unido a éste, la expresión de la proteína antiapoptótica decrece, permitiendo el proceso de muerte celular³⁹. Los miRNAs de la familia let7 también se consideran supresores de tumores, pues entre sus dianas se encuentran los oncogenes c-Myc, ras, HMGA, JAK y STAT3, críticos en la tumorigénesis, proliferación e invasión⁴⁰. Respecto a los miRNAs oncogénicos, miR-21 ocupa un lugar primordial; entre sus ARN mensajeros blanco destaca PTEN, que es el regulador negativo de la vía PI3K/AKT y que limita la proliferación de las células⁴¹. En diferentes tipos de cáncer, miR-21 es considerado el microRNA con mayor sobreexpresión, mientras que let7 es el microRNA cuya expresión se encuentra, en una gran cantidad de casos, totalmente inhibida³⁹⁻⁴¹. Finalmente, en los últimos años ha surgido evidencia que otros tipos de ARN no codificante pueden proporcionar pistas de los mecanismos del cáncer; algunos de ellos son los ARNs largos no codificantes, los ARN pequeños nucleolares y los ARN circulares, no obstante, aún se requiere una mayor comprensión acerca de su papel en la evasión de la muerte celular³⁹.

3.6. FLAVONOIDES

Entre las actuales terapias oncológicas, la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia son las más recurridas en una amplia variedad de cánceres. Sin embargo, poseen la

desventaja de ocasionar efectos tardíos como la citotoxicidad generalizada o la resistencia farmacológica. Aunado a esto, los altos precios de la mayoría de los fármacos anticancerígenos hacen que su acceso sea difícil e inequitativo para la gran mayoría de la población. Debido a lo anterior, en los últimos años la búsqueda de terapias alternativas ha cobrado gran relevancia, encontrándose a los flavonoides como moléculas con efectos anticancerígenos prometedores, y de esta forma, como una posible opción natural, económica y con la misma eficacia que las convencionales^{42,43}.

Los flavonoides son metabolitos secundarios de plantas que otorgan a los tejidos de éstas sus característicos colores rojo, azul y morado. Presentan diferentes funciones como la resistencia de las plantas a la fotooxidación de la luz ultravioleta del sol; intervienen en el transporte de la fitohormona reguladora del crecimiento auxina y participan como defensa ante el herbivorismo y diferentes infecciones microbianas. Otra función importante en muchas plantas es la atracción de los animales polinizadores, a través del color o el olor que dan a la planta o a sus flores. Además de sus papeles fisiológicos en el reino vegetal, los flavonoides son componentes importantes de la dieta humana, sin embargo, no son considerados como nutrientes⁴².

3.6.1. ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN

Los flavonoides forman parte de un amplio grupo de compuestos polifenólicos con un esqueleto base de 15 carbonos, C₆-C₃-C₆, que consiste en dos anillos bencénicos (A y B) unidos mediante un anillo heterocíclico derivado del pirano (C); esta estructura primaria recibe el nombre de aglicona⁴³ (**Figura 6**).

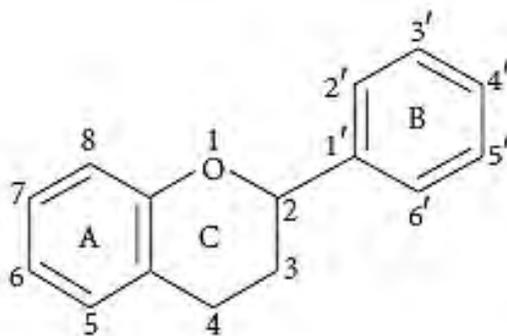
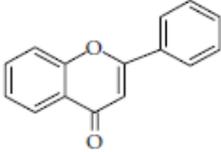
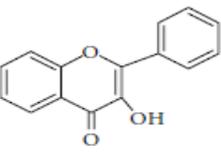
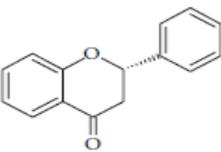
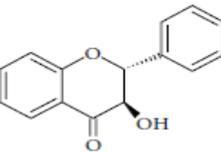
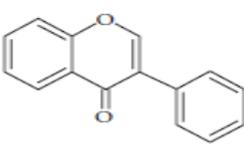
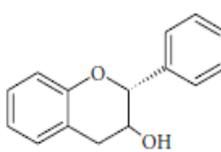


Figura 6. Aglicona: estructura base de los flavonoides.

Se muestra el esqueleto de 15 carbonos que forman dos anillos bencénicos (A y B) y un anillo heterocíclico derivado del pirano (C). *Obtenida de Referencia 43.*

La posición de unión del anillo B con el anillo C usualmente es utilizada para dividir tres categorías: flavonoides, cuando la unión se da en la posición 2; isoflavonoides, cuando la unión está en la posición 3; y neoflavonoides, cuando la unión sucede en la posición 4⁴³. Por otra parte, existe una segunda clasificación de este grupo de compuestos con base en el grado de oxidación y el nivel de saturación del anillo C. De acuerdo a esto, los flavonoides se dividen en seis subclases: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, isoflavonas y flavan-3-oles, y dentro de cada una de ellas, los compuestos difieren en el patrón de sustitución de los anillos A y B^{43,44} (**Tabla 1**).

Tabla 1.
Estructura de los principales grupos de flavonoides.

Grupo	Estructura base	Ejemplos
Flavonas		Luteolina Apigenina Crisina
Flavonoles		Quercetina Kaempferol Galangina
Flavanonas		Hesperetina Naringenina
Flavanonoles		Taxifolin
Isoflavonas		Genisteína Daidzeína
Flavan-3-oles		Catequina Epicatequina

Adaptada de Referencia 43.

3.6.2.SÍNTESIS

Los flavonoides son biosintetizados en la cara citosólica de las membranas del retículo endoplásmico de células vegetales por la acción de diversos complejos enzimáticos. En general, esta clase de compuestos surgen a través de la vía del fenilpropanoide, utilizando tres moléculas de malonil-CoA y una de fenilpropanoil-CoA. Con la excepción de algunos flavonoides, la gran mayoría de estas moléculas se sintetizan utilizando un núcleo común, la chalcona, a la que diferentes clases de enzimas (isomerasas, hidroxilasas, oxido-reductasas y enzimas de modificaciones posteriores como glicosiltransferasas, metiltransferasas y aciltransferasas) diversifican en los más de 8000 flavonoides conocidos hasta la fecha⁴⁴.

3.6.3.PROPIEDADES BIOLÓGICAS

La importancia del estudio de los flavonoides radica en las diversas aplicaciones que se han identificado en los campos de la nutrición y la medicina. Algunas de las propiedades biológicas que presentan son:

- *Actividad antioxidante*: esta capacidad radica en el arreglo de grupos funcionales sobre la estructura nuclear. La configuración, sustitución y el número total de grupos hidroxilo influyen ampliamente en la captación de radicales (actividad “scavenger”) y como moléculas quelantes de iones metálicos^{42,43}.
- *Actividad antibacterial*: diversos estudios han demostrado que ciertos flavonoides inactivan adhesinas microbianas, enzimas y proteínas de transporte de la envoltura nuclear. Así mismo, los flavonoides lipofílicos tienen la capacidad de romper las membranas biológicas⁴³.
- *Actividad antiinflamatoria*: algunos flavonoides pueden inhibir la actividad enzimática del metabolismo del ácido araquidónico para la síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos; por otra parte, también disminuyen la expresión de citocinas proinflamatorias y quimiocinas debido a que inhiben la fosforilación de las MAPK o a que bloquean la ruta del NF-κB⁴³.

- *Actividad anticancerígena*: diversos mecanismos han sido propuestos para explicar esta capacidad de los flavonoides; los más importantes son la desregulación de p53 mutada y la inducción de apoptosis, el arresto al ciclo celular, la inhibición de tirosin cinasas, la inhibición de proteínas de choque térmico, la capacidad de unirse a receptores de estrógeno y la inhibición en la expresión de proteínas Ras⁴³.
- *Actividad antiviral*: se ha observado que algunos flavonoides pueden inhibir la transcriptasa reversa de ciertos retrovirus y determinadas polimerasas virales, así como unirse al ácido nucleico y cápsides para inducir un efecto antiviral⁴³.

3.6.4. BIOINGENIERÍA DE FLAVONOIDES

Debido a la amplia variedad de propiedades biológicas identificadas en los flavonoides, su demanda ha incrementado considerablemente en los últimos años. Sin embargo, esto acarrea una serie de problemas como los procesos de extracción costosos, ineficientes y perjudiciales para el medio ambiente; además, la época del año influye en la disponibilidad que tengan los vegetales a utilizar. Por tal motivo, recientemente se han diseñado estrategias alternativas para lograr la producción de flavonoides. Entre las más utilizadas se encuentra el uso de ingeniería genética para implementar rutas de síntesis de flavonoides en huéspedes microbianos; de esta forma, empleando herramientas de biología molecular ha sido posible producir flavonoides e incluso algunos derivados de éstos que no existen de forma natural, en bacterias modificadas genéticamente como *Escherichia coli*, *Streptomyces sp* y *Saccharomyces cerevisiae*^{43,44}.

Desgraciadamente, los rendimientos de producción continúan siendo una limitante para la ampliación industrial y la producción comercial de flavonoides usando células microbianas recombinantes, por lo que se hace necesario optimizar las rutas biosintéticas, así como identificar los cuellos de botella que ralentizan la producción. No obstante, el empleo de ingeniería genética aún promete ser una alternativa a futuro para lograr una producción eficiente de flavonoides⁴⁴.

3.6.5. LUTEOLINA

La luteolina (Lut), cuyo nombre químico es 3',4',5,7-tetrahidroxiflavona, es un flavonoide que forma parte del grupo de las flavonas (**Figura 7**). Se encuentra presente abundantemente en una gran variedad de vegetales tales como el apio, perejil, brócoli, hojas de cebolla, zanahorias, pimientos, coles, cáscaras de manzana y flores de crisantemo⁴⁵.

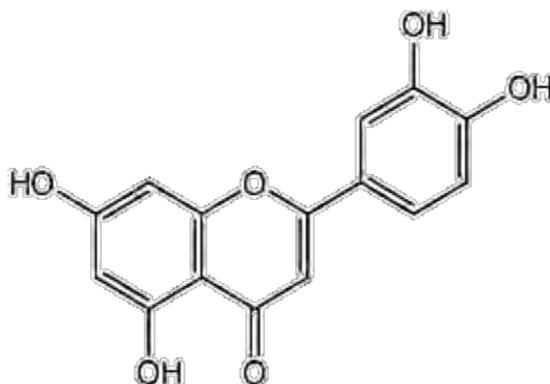


Figura 7. Estructura química del flavonoide luteolina.

Se observa el anillo C oxidado característico de la familia de las flavonas, además de cuatro hidroxilaciones en las posiciones 5, 7, 3' y 4'. *Obtenida de Referencia 46.*

Las propiedades farmacológicas de la luteolina son muy diversas y han sido empleadas desde la antigüedad en la medicina tradicional china. Como muchos otros flavonoides, presenta actividad antioxidante ya que funciona como un captador de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a que posee dos grupos hidroxilo en las posiciones 3' y 4', así como a la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, y un grupo carbonilo en el carbono 4. Además, también inhibe oxidasas generadoras de ROS y protege antioxidantes naturales como las enzimas glutatión transferasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa y catalasa^{43,45}.

Otra propiedad ampliamente estudiada de este flavonoide es su capacidad anticancerígena, asociada a diversos mecanismos como la inducción de apoptosis y la inhibición del ciclo celular, metástasis y angiogénesis. Diversos estudios han asociado su efecto supresor en vías de señalización como las del fosfatidilinositol-3-cinasa

(PI3K)/AKT o NF- κ B con su capacidad de sensibilizar a las células a la citotoxicidad terapéutica inducida. Además, de acuerdo a estudios *in vivo*, se ha establecido que su empleo como agente terapéutico anticancerígeno es seguro, pues induce una citotoxicidad relativamente nula en las células sanas⁴⁵. Finalmente, otras propiedades asociadas son las antiinflamatorias y antialérgicas⁴⁵.

3.6.6. NARINGINA

La naringina (Nar) es uno de los flavonoides glicosilados más abundantes en la naturaleza. Su nombre químico es 4',5,7-trihidroxi-flavanona-7-ramnoglucósido, y como se indica, forma parte del grupo de las flavanonas. Su esqueleto central está formado por una molécula de naringenina (4',5,7-trihidroxi-flavanona) que tiene unido en el grupo hidroxilo del carbono 7 un disacárido denominado neohesperidosa, que consta de glucosa y ramosa (**Figura 8**). Durante la digestión, este disacárido es separado mediante hidrólisis por las enzimas del intestino α -ramnosidasas y β -glucosidasas. Adicionalmente, la naringina posee un carácter altamente lipofílico, y por lo tanto, puede distribuirse a la gran mayoría de los órganos del cuerpo⁴⁷.

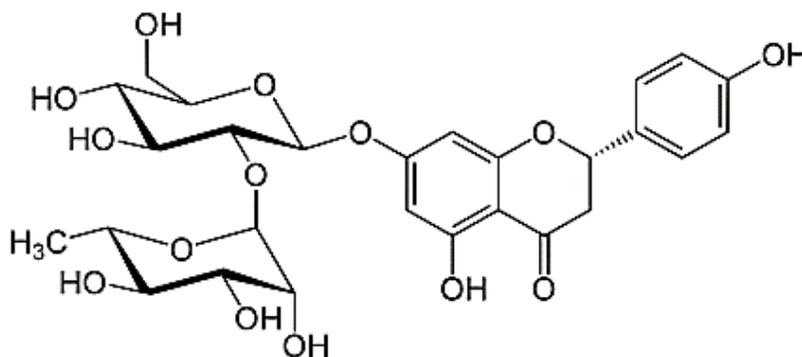


Figura 8. Estructura química del flavonoide naringina.

Se muestra la estructura fundamental de las flavanonas con el anillo C reducido. En la posición 7 se encuentra unido, mediante un enlace glucosídico, el disacárido neohesperidosa. Además en las posiciones 5 y 4' se encuentran dos grupos hidroxilo. *Obtenida de Referencia 47.*

Este glucósido flavónico se encuentra presente principalmente en el tomate, cerezas, cacao, orégano y toronja, estando en el jugo de ésta última en concentraciones de hasta

800 mg/L⁴⁷. La naringina presenta una amplia gama de efectos biológicos que se han determinado tanto de manera *in vitro* como *in vivo*:

- *Efecto antioxidante*: en diversos estudios *in vitro* se ha reportado que este flavonoide presenta actividad “scavenger”, al igual que posee la capacidad de inactivar enzimas generadoras de ROS⁴⁷.
- *Efecto antiinflamatorio*: en modelos *in vitro* se ha observado que la naringina suprime la síntesis de óxido nítrico (NO), óxido nítrico sintasa-inducible (iNOS), ciclooxigenasa-2 (COX-2), TNF- α , IL-6 y la activación del NF- κ B, moléculas esenciales para el desarrollo del estado inflamatorio. Por otra parte, algunos estudios *in vivo* demuestran que la naringina reduce el infiltrado celular del sistema inmune en algunos desordenes patológicos como la inflamación pulmonar neutrofílica crónica, bronquitis crónica y la colitis ulcerativa⁴⁷.
- *Efectos terapéuticos en enfermedades cardiovasculares*: se han asociado algunos efectos cardioprotectores de este flavonoide debido a que incrementa significativamente la actividad de las ATPasas Na⁺/K⁺, mientras que reduce la de las ATPasas Ca⁺²/Mg⁺². También pueden explicarse la cardioprotección ya que la naringina reduce la actividad de proteínas de choque térmico, así como regula las vías de señalización de AKT y MAPK⁴⁷.
- *Efectos sobre la diabetes*: se ha observado que la naringina tiene la capacidad de inhibir a la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), encargada de degradar las incretinas péptido 1 tipo glucagon (GLP-1) y polipéptido inhibitorio gástrico (GIP), responsables de impulsar la secreción de insulina⁴⁷.
- *Efectos anticancerígenos*: los mecanismos para explicar esta actividad anticancerígena de la naringina dependen el tipo de cáncer que se estudie. En algunos cánceres de mama, este flavonoide puede unirse y bloquear los receptores de estrógeno, así como inhibir la síntesis del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En cánceres de colon, la naringina puede modular la actividad de las metaloproteinasas de matriz 2 y 9 (MMP-2 y -9), así como inducir mecanismos de apoptosis. Finalmente, en cánceres de piel, se ha propuesto que el flavonoide previene la formación de dímeros de timina en el ADN por acción de la radiación UV⁴⁷.

- *Efectos antibacterianos*: en estudios recientes se ha asociado a este flavonoide con una protección significativa contra infecciones de *Salmonella typhimurium*⁴⁷.

3.6.7. QUERCETINA

La quercetina (Quer) es un flavonoide que forma parte del grupo de los flavonoles y cuyo nombre químico es 3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona. No obstante, en la naturaleza este flavonoide se encuentra unido a mono y oligosacáridos vía enlaces glucosídicos en el grupo hidroxilo del carbono 3, lo que incrementa la solubilidad acuosa del flavonoide (**Figura 9**). Algunos de los vegetales con altas concentraciones de quercetina son las manzanas, el apio, el cacao, la cebolla y las alcaparras, en las cuales se han descrito contenidos de 180.77 mg/g⁴⁸.

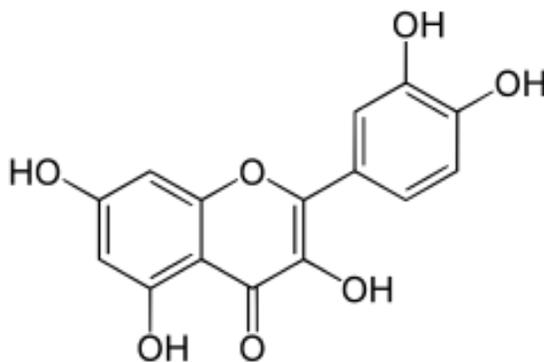


Figura 9. Estructura química del flavonoide quercetina.

Se observa la estructura fundamental de los flavonoles con el grupo hidroxilo en la posición 3. Además, se observan las cuatro hidroxilaciones adicionales en las posiciones 5, 7, 3' y 4'. *Obtenida de Referencia 48.*

Como todos los flavonoides, la quercetina presenta una gran variedad de efectos biológicos, destacando:

- *Efecto antioxidante*: su actividad “scavenger” ha sido descrita a dosis muy bajas (1 μM), sin embargo, por el efecto citotóxico que presenta a dosis mayores, no es usual que se emplee con fines protectores contra ROS⁴⁸.
- *Efecto anticancerígeno*: es una de las propiedades más estudiadas de la quercetina alrededor del mundo. Se ha establecido que a dosis altas (100 μM) este

flavonoide actúa como un oxidante, dañando el ADN y conduciendo a la activación de la proteína p53; con ello, se activa la vía apoptótica mitocondrial. Por otra parte, también se han observado otros mecanismos anticancerígenos como la unión y el posterior bloqueo a receptores de estrógenos, o bien, inhibiendo a la telomerasa⁴⁸.

- *Efecto antiinflamatorio*: se ha asociado a quercetina con el bloqueo de la vía del NF-κB en diferentes puntos, por ejemplo, inhibiendo al IKK o bien, impidiendo la traslocación del factor de transcripción al núcleo celular⁴⁸.

La lista de efectos biológicos es muy amplia y engloba, entre otros, propiedades antiobesidad y contra patologías como artritis, asma o diabetes; efectos gastroprotectores, inmunitarios y contra infecciones; antialérgicos e incluso, se ha asociado este flavonoide con el estado anímico^{48,49}. Debido a lo anterior, hoy por hoy, quercetina es uno de los flavonoides más estudiados, sin embargo, el enfoque clínico apenas inicia⁴⁹.

3.7. CÁNCER Y FLAVONOIDES

En las últimas dos décadas, en numerosas investigaciones alrededor del mundo se han demostrado los efectos anticancerígenos de diversas moléculas polifenólicas naturales como los flavonoides. Dichos efectos se han atribuido a sus capacidades antioxidantes y antiinflamatorias, así como a su habilidad de modular vías de señalización implicadas en sobrevivencia celular, proliferación, diferenciación, migración, angiogénesis y respuesta inmune. En adición a lo anterior, es importante destacar que algunos de estos polifenoles presentan actividad análoga a las hormonas, así como potencial inductor de enzimas detoxificantes⁵⁰.

La familia de los flavan-3-oles, o simplemente flavanoles, presenta una gran variedad de estructuras que engloba monómeros (conocidos como catequinas), oligómeros y polímeros (ambos también llamados proantocianidinas o taninos condensados). Recientes investigaciones han revelado que algunos de sus miembros poseen efectos anticancerígenos de relevancia⁵⁰; tratamientos con epigallocatequina-3-galato (EGCG) sobre células de cáncer de pulmón A549 y CL1-5 han revelado importantes efectos

antiangiogénicos, así como una marcada inhibición de los procesos de invasión y migración debido a que suprime la expresión de MMP-2⁵¹. Por otra parte, en líneas celulares de cáncer gástrico se encontró que EGCG induce mecanismos de apoptosis al inhibir a la proteína survivina⁵².

Las flavanonas son otra familia con efectos anticancerígenos de relevancia, siendo la naringenina y la hesperetina sus miembros más importantes⁵⁰. La primera ha sido empleada como agente inductor de apoptosis en diversos tipos celulares: en células de cáncer pulmonar *A549* se ha observado que activa la vía extrínseca⁵³, en tanto que en células de cáncer de colon induce la muerte mediada por la vía dependiente de p38⁵⁴. Finalmente, en células de carcinoma hepático *HepG2* activa la vía mitocondrial y el arresto al ciclo celular mediante la sobrerregulación de p53⁵⁵. Respecto a la segunda molécula, la hesperetina inhibe la proliferación celular e induce apoptosis vía mitocondrial en células de cánceres gástrico y mamario mediante la acumulación de ROS y la activación de la vía ASK1/JNK^{56,57}. Adicionalmente, la explicación a los efectos antiproliferativos de este compuesto ha tomado un nuevo rumbo con el descubrimiento de que en células de cáncer mamario, la hesperetina suprime la captación de glucosa⁵⁸.

El grupo de las flavonas también resulta ser importante en cuanto al estudio del efecto anticancerígeno de los flavonoides. Generalmente, se consideran a la apigenina y a la luteolina como sus integrantes clásicos, debido a que son los flavonoides mayoritariamente presentes en los alimentos de origen vegetal⁵⁰. En algunos estudios se ha demostrado que tratamientos con apigenina sobre células de cáncer de mama con el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) positivo suprimen significativamente el crecimiento celular e inducen apoptosis, posiblemente por efecto de la inhibición de la vía del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3)⁵⁹. Por su parte, la luteolina ha sido estudiada en un amplio grupo de líneas celulares como *A549* de cáncer de pulmón, *MDA-MB-231-ER negativo* de cáncer de mama y *LNCaP* de cáncer de próstata. Interesantemente, se ha visto un efecto inductor de apoptosis en prácticamente todas, además del arresto en el ciclo celular en la fase G2⁵⁰.

Los flavonoles, aunque presentes en una gran cantidad de vegetales, generalmente se encuentran en muy bajas concentraciones⁵⁰. La quercetina, su miembro más importante,

es considerada como uno de los flavonoides con mayor actividad anticancerígena, pues induce apoptosis mediante la inhibición de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), así como mediante la sobrerregulación de Bad, Bax, Bcl2 y survivina⁵⁰. Por otra parte, también se han estudiado sus efectos antiangiogénicos mediante la supresión de la vía de señalización VEGFR2 en líneas celulares de cáncer de mama⁶⁰.

El quinto grupo de flavonoides, las isoflavonas, también llamadas fitoestrógenos por su estructura similar al estrógeno, tienen en la daidzeína y la genisteína a sus principales representantes⁵⁰. Se ha estudiado el efecto inductor de apoptosis de la primera sobre células de cáncer hepático, a través de la desregulación de distintos miembros de la familia proteica Bcl-2; además, en células de cáncer de mama se ha observado su capacidad antiinvasiva al desregular la expresión de MMP-2⁶¹. Por su parte, la genisteína presenta actividad antiproliferativa y proapoptótica en células de cáncer de colon; se ha observado que puede inhibir el oncogen miR-95, Akt y SGK⁶²; incluso, se han realizado experimentos *in vivo* en ratones con cáncer gástrico donde se aprecia que la administración oral de genisteína inhibe la angiogénesis y suprime la metástasis hacia distintos órganos⁶³.

Finalmente, el último grupo de flavonoides, los flavononoles o 3-hidroxi flavononas, es una familia poco estudiada, siendo el taxifolin, también llamado dihidroquercetina, el compuesto más importante del grupo. Se ha demostrado que, en sinergismo con el diterpenoide andrografólido, el taxifolin inhibe la proliferación de células de cáncer de próstata *DU145*, mediante el arresto mitótico y la inducción de apoptosis por vía intrínseca⁶⁴.

Como puede observarse, los efectos anticancerígenos de los flavonoides resultan muy atractivos para la investigación oncológica, no obstante, es importante señalar que aún se requieren más estudios clínicos para asegurar su completa eficacia y seguridad. Adicionalmente, la biodisponibilidad de los polifenoles es otro reto importante que necesita ser evaluado y mejorado. Por lo anterior, el uso de flavonoides en tratamientos oncológicos aún necesita realizarse con cautela y responsabilidad⁵⁰.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los flavonoides luteolina, naringina y quercetina en la inducción de muerte celular por apoptosis y en el proceso de migración sobre la línea celular *FaDu*, para determinar si poseen propiedades anticancerígenas sobre el tipo oncológico de cabeza y cuello.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de los flavonoides luteolina, naringina y quercetina en la viabilidad de la línea celular *FaDu*, para determinar sus actividades citotóxicas.
- Evaluar el efecto de los flavonoides luteolina, naringina y quercetina en la expresión de proteínas anti y proapoptóticas de la vía intrínseca en la línea celular *FaDu*, para determinar su regulación en el proceso de muerte celular.
- Evaluar el efecto de los flavonoides luteolina, naringina y quercetina sobre la degradación del material genético en la línea celular *FaDu*, para confirmar la inducción y culminación del proceso de apoptosis.
- Evaluar el efecto de los flavonoides naringina y quercetina sobre el proceso de migración celular en la línea *FaDu*, para determinar si poseen capacidad antiinvasiva.

5. HIPÓTESIS

Si los flavonoides luteolina, naringina y quercetina poseen actividad anticancerígena mediante la inducción de apoptosis vía intrínseca y la desregulación del proceso de migración celular, entonces regularán la expresión de proteínas de la vía mitocondrial y sus efectos sobre el material genético, así como la capacidad migratoria de la línea celular de carcinoma hipofaríngeo *FaDu*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. REACTIVOS

Luteolina, naringina y quercetina (>95% de pureza), Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) con rojo de fenol (GIBCO), suero bovino fetal (SBF), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio (MTT), acrilamida, N,N-metilenbisacrilamida, dodecil sulfato de sodio (SDS) y kit de quimioluminiscencia fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Anticuerpos anti-Bcl2, anti-Bax, anti-caspasa9 y anti-caspasa3, y secundarios fueron obtenidos de Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA). Antibiótico antimicótico, kit DNAzol y agarosa ultrapura, fueron obtenidos de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

6.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Línea celular de carcinoma hipofaríngeo de células escamosas *FaDu* (ATCC® HTB-43™).

6.3. TAMAÑO DE LA MUESTRA

1,000,000 células (1x10⁶ células)

6.4. MATERIAL Y EQUIPO

- Agitador magnético (Thermolyne).
- Balanza (Sartorius).
- Baño (Riossa).
- Baño seco (Bio-dynamics).
- Cajas de cultivo Falcon, de 6 y 96 pozos (Corning).
- Cámara de electroforesis horizontal (Life Technologies).
- Cámara de electroforesis vertical (Hoeffer).
- Cámara de transferencia (Bio-Rad).
- Campana de flujo laminar (The Baker Company).
- Centrífuga (Cole-Palmer).
- Centrífuga MICROCL 17R (Thermo Scientific).
- Espectrofotómetro (Optizen).
- Fuente de poder para la cámara de electroforesis (OWL).
- Fuente de poder para la cámara de transferencia (Bio-Rad).
- Gendarme.
- Incubadora (NUAIRE).
- Incubadora (SANYO).
- Lector de placas (BioTek).
- Máquina de hielo (Cornelius).

- Microscopio de objetivos invertidos (Olympus CK2).
- Micropipetas de 10, 100 y 1000 μL (Eppendorf).
- Orbit Shaker (LAB-LINE).
- Pipetas de 5 y 10 mL.
- Potenciómetro.
- Probetas graduadas.
- Propipeta.
- Sonicador (Ultrasonic Processor).
- Transiluminador (UVITEC).
- Tubos clínicos (Corning).
- Tubos Eppendorf.

6.5. METODOLOGÍA

6.5.1. CULTIVO CELULAR

La línea celular de carcinoma hipofaríngeo *FaDu* se creció en cajas Falcon con medio de cultivo DMEM con rojo de fenol suplementado con SBF al 10% -inactivado por calor- y 2 mM de L-glutamina, penicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y fungizona (1 mg/mL). Los cultivos se mantuvieron hasta la confluencia a 37°C y 5% CO_2 .

6.5.2. VIABILIDAD CELULAR

Las células *FaDu* se sembraron en cajas de 96 pozos durante 24 horas. Posteriormente, se realizó el tratamiento con los flavonoides luteolina, naringina y quercetina a concentraciones de 1 μM , 10 μM , 50 μM y 100 μM durante 24, 48 y 72 horas. Finalizados los tratamientos, se determinó la viabilidad celular mediante el método de reducción del MTT. Se aspiró el medio y se añadió a cada pozo una solución de MTT de 0.5 mg/mL; se incubó por cuatro horas a 37°C y al término de éstas, se retiró el sobrenadante. La formación de formazán se solubilizó con 100 μL de dimetil sulfóxido (DMSO) y, finalmente, las placas fueron leídas en el lector de placas a 570 nm. Se consideró el 100% de viabilidad en el grupo tratado con el vehículo DMSO/agua (1:10). El ensayo se realizó por sextuplicado para cada concentración de los tres flavonoides.

6.5.3. TRATAMIENTO CELULAR

Las células *FaDu* se sembraron en cajas de 6 pozos y se incubaron en DMEM con 2% de SBF. Los flavonoides luteolina, naringina y quercetina se añadieron en las concentraciones y tiempos indicados en los pies de figura correspondientes.

6.5.4. WESTERN BLOT

Después del tratamiento, el medio se aspiró y las células se desprendieron de la caja de cultivo con ayuda de un gendarme en una solución de ortovanadato de sodio 1 mM en solución amortiguadora de fosfatos salinos (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaHPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 2 mM) pH 7.2. Las células se recuperaron y el homogeneizado se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente las células se lisaron con amortiguador de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, 1% Nonidet P-40, leupeptina 10 µg/mL, aprotinina 50 µg/mL, Na₃VO₄ 0.4 mM, NaF 10 mM y Na₃P₂O₇ 10 mM) sobre hielo y se sonicaron a 15 Hz por 30 segundos. La proteína total se cuantificó empleando el método de Bradford a 595 nm.

Para el ensayo de Western blot, se mezclaron 30 µg de proteína 1:1 con solución amortiguadora de muestra (0.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% glicerol, 1% azul de bromofenol y 4% β-mercaptoetanol), se calentaron en baño seco a 70°C durante cinco minutos y se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% a 90 V por una hora. Una vez terminada la separación, las proteínas celulares se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) en una cámara semi-húmeda a 15 V por 45 minutos. Posteriormente, la membrana fue bloqueada en una solución 5% de leche libre de grasa durante una hora y lavada tres veces con amortiguador de lavado (NaCl 20 mM, TRIS 137 mM y 2 mL de Tween 20). Enseguida, la membrana se incubó toda la noche con la solución de anticuerpo primario 1:1,000 y/o 3:10,000 a 4°C; se lavó tres veces con amortiguador de lavado y se incubó a temperatura ambiente con solución 1:10,000 de anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa por una hora. Se realizaron tres lavados más y, para la detección de bandas, se empleó un kit de quimioluminiscencia. La radiografía se obtuvo después de exponer la película durante 15 minutos.

6.5.5. EVALUACIÓN DE ADN DEGRADADO

Después del tratamiento con luteolina, naringina y quercetina (0.1 mM) por 2, 4, 6, 20 y 24 horas, las células *FaDu* se lisaron para aislar el ADN genómico mediante un kit comercial de acuerdo al protocolo. Para observar la degradación del material genético, se realizó la electroforesis horizontal de las muestras en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio, a 100 mA por 40 minutos; finalmente, los geles se observaron en un transiluminador de rayos UV.

6.5.6. MIGRACIÓN CELULAR

Se realizó la siembra de células *FaDu* en cajas de 6 pozos y se incubaron hasta obtener la confluencia de una monocapa; alcanzado ésto, con ayuda de una punta de micropipeta de 100 μ L se trazó una estría recta en el fondo de los pozos y se lavaron con PBS para eliminar las células despegadas. Posteriormente, se realizó el tratamiento con naringina y quercetina (0.1 mM) por 6, 9, 12 y 24 horas, tiempos en los que las células se observaron al microscopio y se capturaron tres imágenes para cada uno.

6.5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las bandas obtenidas en los ensayos de Western blot se analizaron por densitometría a través del software Digi Doc-It. Respecto a las imágenes obtenidas en el ensayo de migración, éstas se analizaron mediante el software ImageJ, determinando el área libre de células. Posteriormente, los datos se sometieron a un análisis estadístico mediante las pruebas ANOVA y t de Student con el programa GraphPad Prism 4. El intervalo de confianza empleado fue de 95% por lo que los datos con un $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS

7.1. EFECTO DE LUTEOLINA, NARINGINA Y QUERCETINA EN LA VIABILIDAD DE CÉLULAS *FaDu*

Con el propósito de evaluar si los flavonoides de estudio alteraban la viabilidad de la línea celular *FaDu* se realizaron ensayos de MTT. Se encontró que los tres flavonoides ejercen su efecto citotóxico de manera dosis dependiente, siendo 100 μM la concentración a la que observa un mayor efecto letal (**Figura 10**).

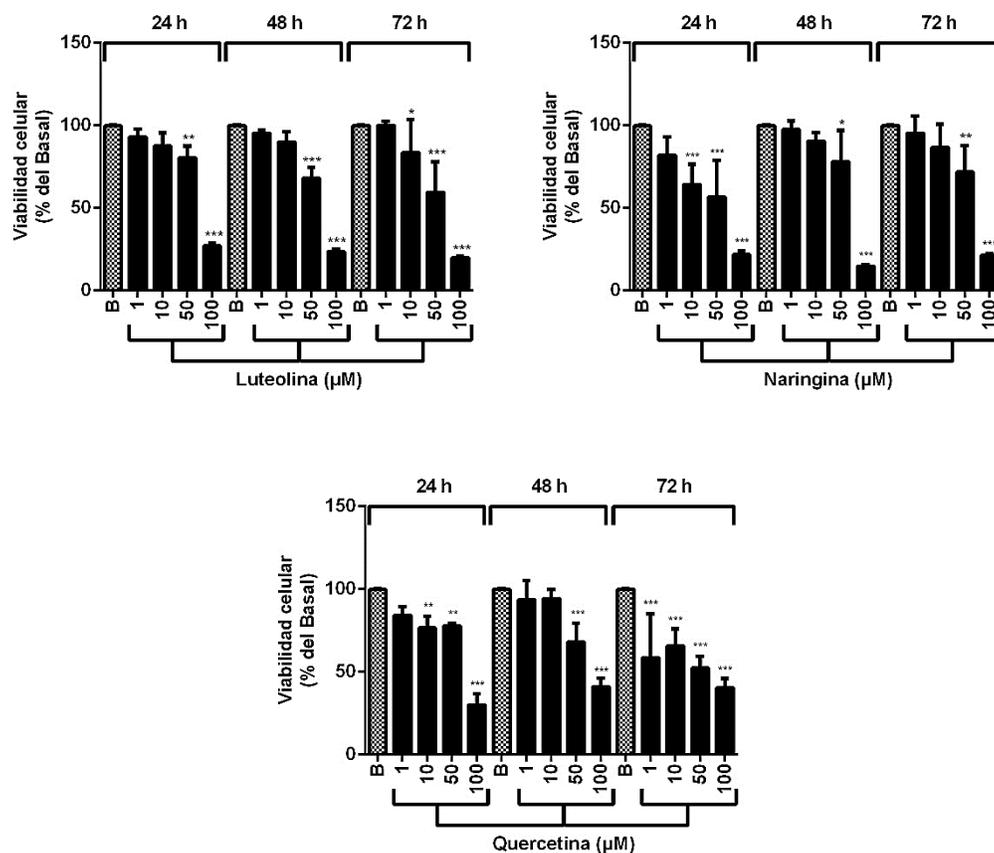


Figura 10. Efecto de luteolina, naringina y quercetina en la viabilidad de la línea celular *FaDu*.

Las células fueron sembradas en cajas de 96 pozos e incubadas durante 24 horas. Posteriormente se trataron con los distintos flavonoides a concentraciones de 1, 10, 50 y 100 μM por 24, 48 y 72 horas. Los resultados representan la media \pm DE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

7.2. EFECTO DE LUTEOLINA EN LA ACTIVACIÓN DE APOPTOSIS INTRÍNSECA EN CÉLULAS *FaDu*

Con el objetivo de determinar si la citotoxicidad de Lut es producto de la inducción de apoptosis vía intrínseca en células *FaDu*, se realizaron ensayos de Western blot, evaluando la proteína antiapoptótica Bcl2, así como las caspasas-9 y -3. Se encontró que Bcl2 es inhibida respecto al tiempo por el flavonoide, mientras que la activación de las caspasas -9 y -3 es incrementada. Se observa que caspasa-3 presenta un máximo de activación a los 30 minutos de haber sido puesta en contacto con el flavonoide (**Figura 11**).

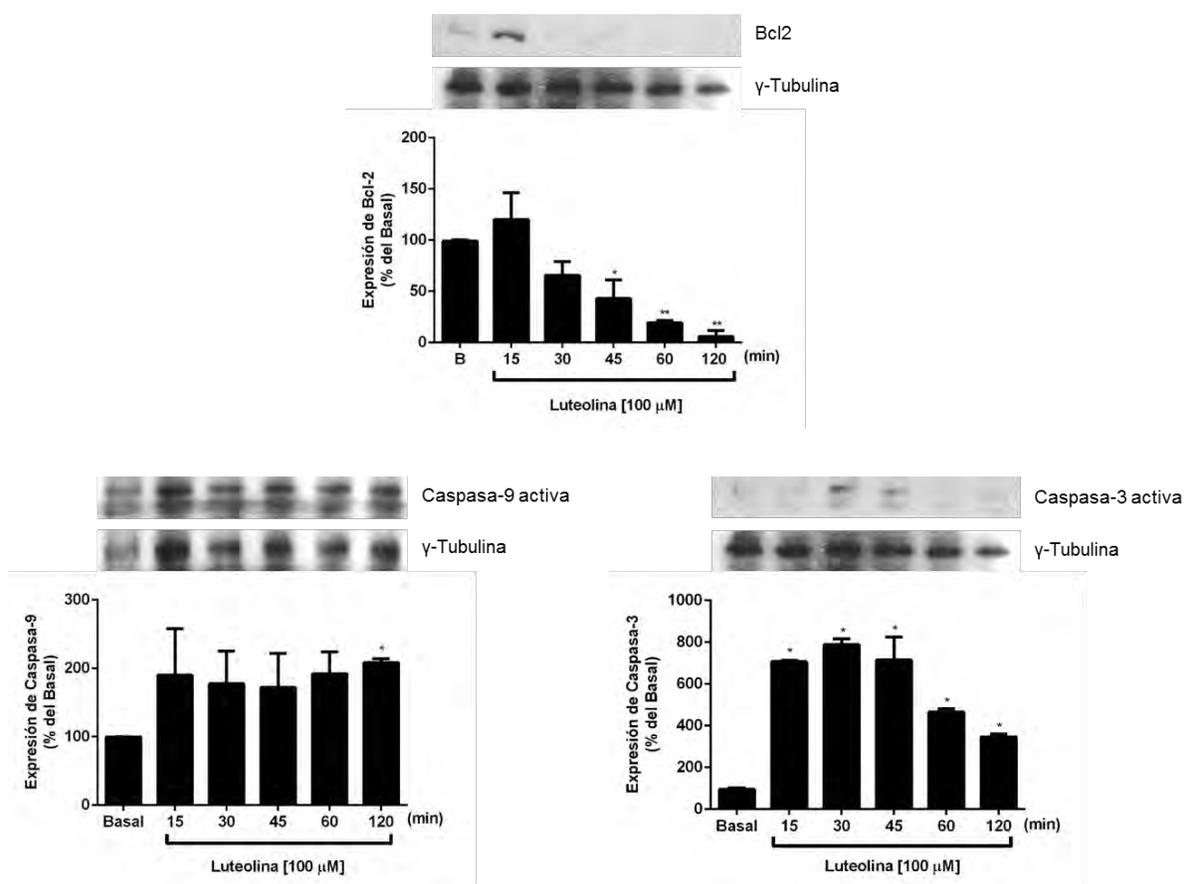
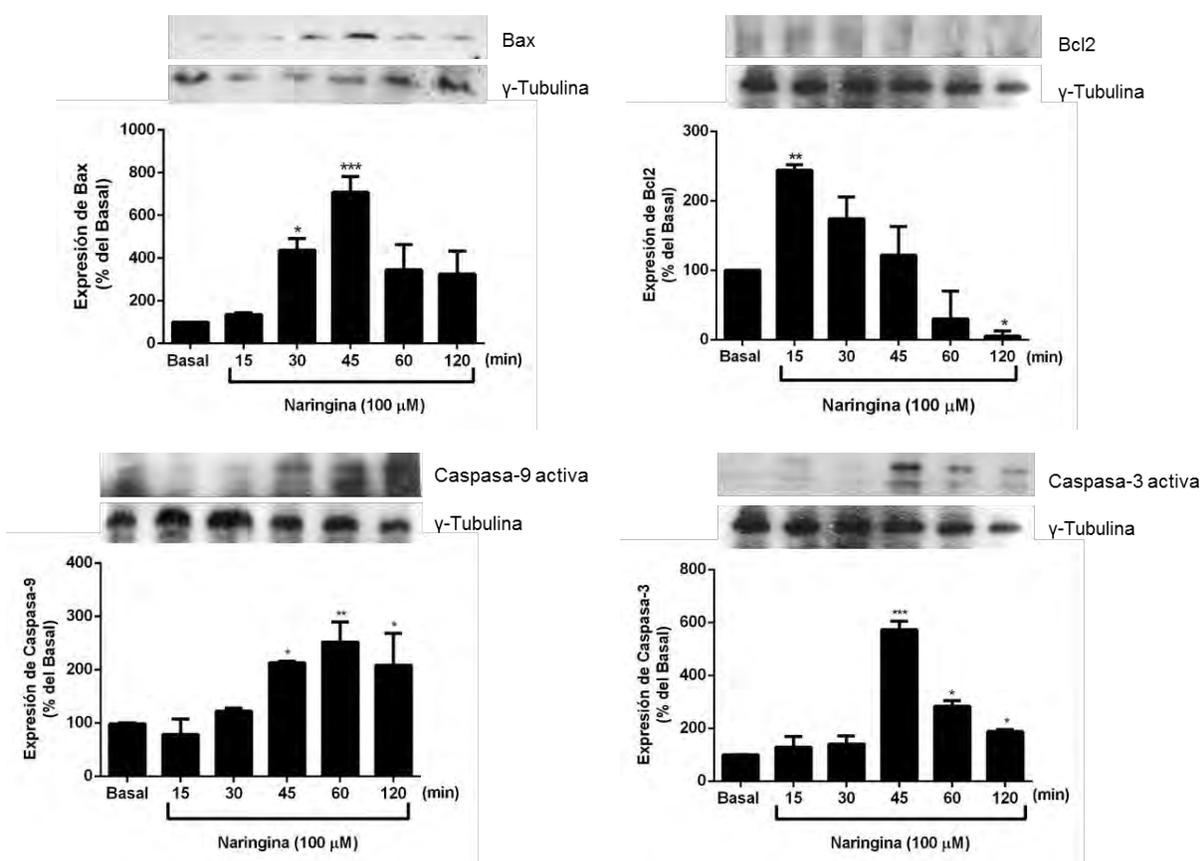


Figura 11. Efecto de luteolina en la inducción de apoptosis intrínseca en la línea celular *FaDu*.

Las células fueron sembradas en cajas de 6 pozos e incubadas por 24 horas; posteriormente fueron tratadas con Luteolina (100 μ M) por 15, 30, 45, 60 y 120 minutos. Las muestras fueron procesadas para el ensayo de Western blot como se describe en 6. **MATERIALES Y MÉTODOS**. Los resultados representan la media \pm DE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

7.3. EFECTO DE NARINGINA EN LA ACTIVACIÓN DE APOPTOSIS INTRÍNSECA EN CÉLULAS *FaDu*

Para evaluar si Nar ejerce su citotoxicidad mediante la inducción de apoptosis de vía intrínseca, se realizaron ensayos de Western blot para evaluar la proteína apoptótica Bax, la proteína antiapoptótica Bcl-2 y las caspasas -9 y -3. Se determinó que Nar induce la expresión de Bax respecto al tiempo, teniendo a 45 minutos el mayor efecto respecto al Basal; por el contrario, Bcl2 es inhibida por efecto del flavonoide. Por otra parte, las caspasas -9 y -3 son incrementadas respecto al tiempo, teniendo su expresión máxima a los 60 y 45 minutos, respectivamente (**Figura 12**).



7.4. EFECTO DE QUERCETINA EN LA ACTIVACIÓN DE APOPTOSIS INTRÍNSECA EN CÉLULAS *FaDu*

Respecto a la evaluación de la inducción de apoptosis por parte de Quer, se realizaron ensayos de Western blot para la proteína antiapoptótica Bcl2, así como para las caspasas -9 y -3. Se encontró que Bcl2 es inhibida desde los 15 minutos de exposición al flavonoide, mientras que las caspasas presentaron un incremento respecto al tiempo de exposición, logrando su expresión máxima a los 120 minutos (**Figura 13**).

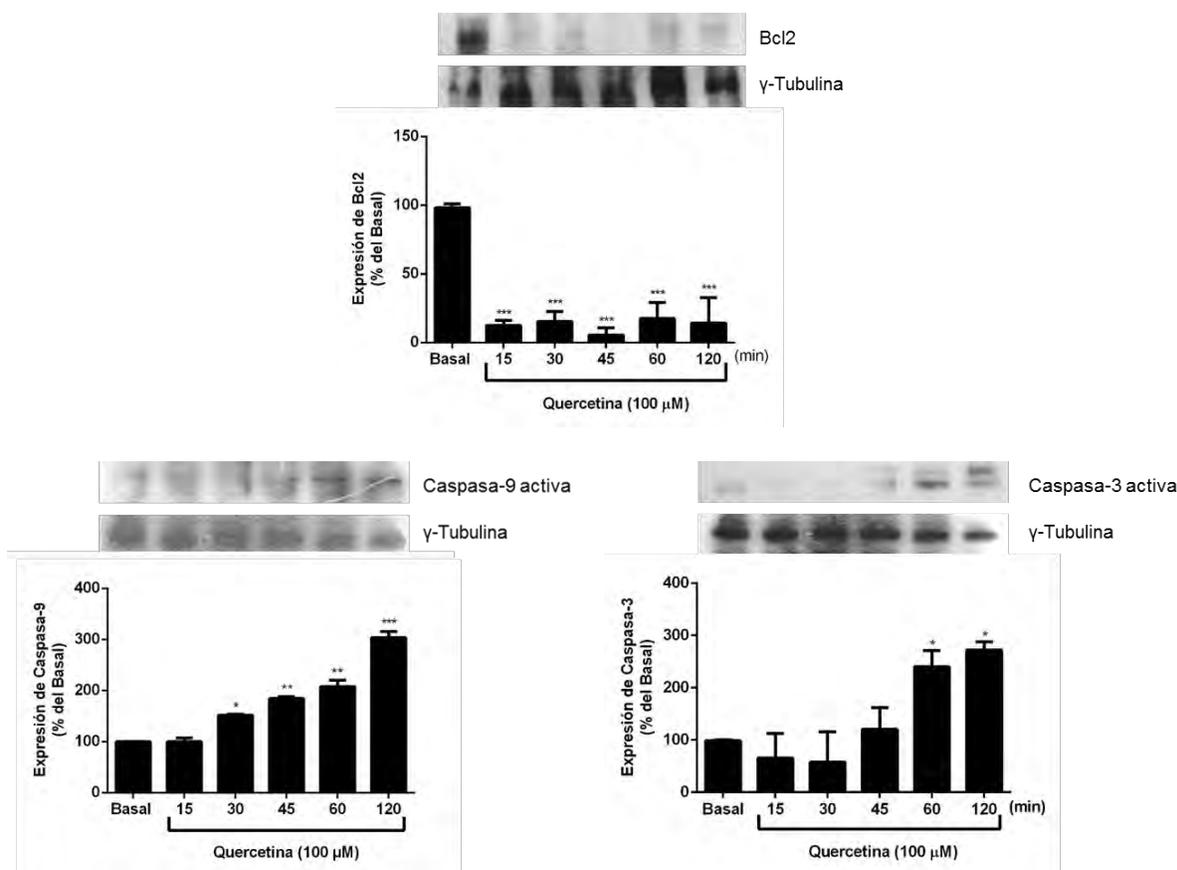


Figura 13. Efecto de quercetina en la inducción de apoptosis intrínseca en la línea celular *FaDu*.

Las células fueron sembradas en cajas de 6 pozos e incubadas por 24 horas. Posteriormente fueron tratadas con quercetina (100 μ M) por 15, 30, 45, 60 y 120 minutos. Las muestras fueron procesadas para el ensayo de Western blot como se describe en 6. **MATERIALES Y MÉTODOS**. Los resultados representan la media \pm DE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

7.5. EFECTO DE LUTEOLINA, NARINGINA Y QUERCETINA EN LA DEGRADACIÓN DE ADN EN CÉLULAS *FaDu*

A fin de evaluar si el proceso de apoptosis inducida por los flavonoides de estudio desencadenaba la degradación del material genético en células *FaDu*, se realizó el aislamiento del ADN genómico y su posterior electroforesis en geles de agarosa al 1%. Se encontró que Lut induce la degradación del ADN desde las 2 horas de exposición, mientras que Quer y Nar lo hacen a tiempos más largos, 6 horas para ambos, aumentando tal efecto respecto al tiempo (**Figura 14**).

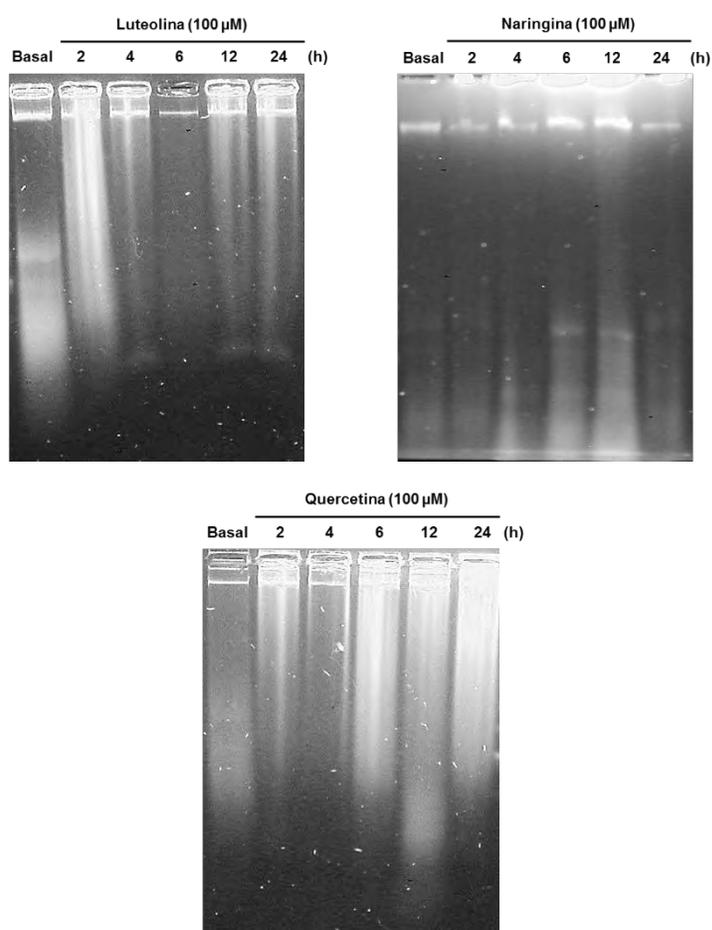


Figura 14. Efecto de luteolina, naringina y quercetina en la degradación de ADN en la línea celular *FaDu*. Las células fueron sembradas en cajas de 6 pozos e incubadas por 24 horas. Posteriormente fueron tratadas por 2, 4, 6, 20 y 24 horas con los flavonoides de estudio (100 μM). El ADN genómico fue aislado como se describe en 6. *MATERIALES Y MÉTODOS* y posteriormente visualizado en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

7.6. EFECTO DE NARINGINA Y QUERCETINA EN LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS *FaDu*

Con el objetivo de determinar si los flavonoides Nar y Quer podían regular procesos implicados en el desarrollo del cáncer, se realizaron ensayos de cierre de herida para evaluar sus efectos sobre el proceso de migración celular a una concentración de 50 μM . De acuerdo a los resultados, no se observa regulación alguna con Nar, pues la concentración utilizada resultó letal para las células. Respecto a Quer, se observa que la concentración empleada no interfiere en la migración, pues se observa un patrón similar al Basal en los primeros tres tiempos de exposición; finalmente, a partir de las 12 horas de exposición se presenta un efecto citotóxico al aumentar el área ausente de células (Figura 15).

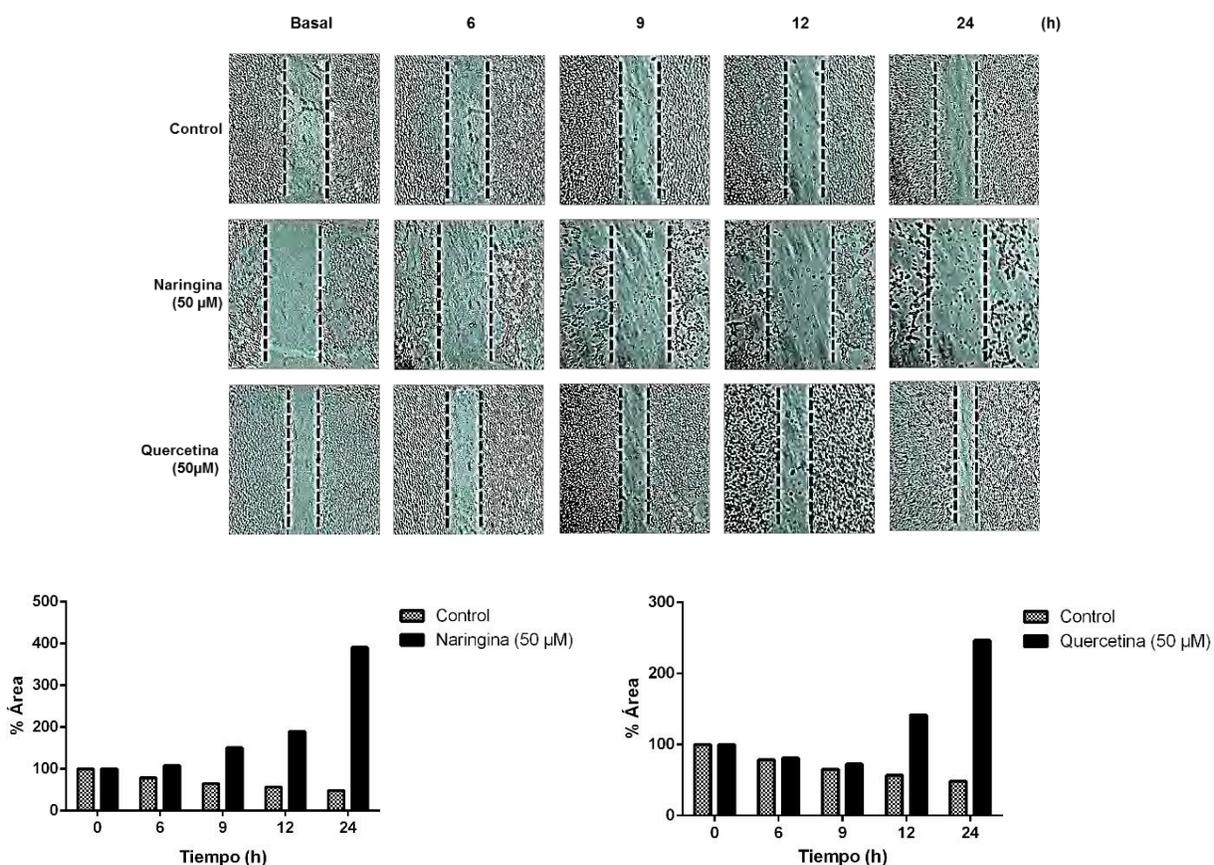


Figura 15. Efecto de naringina y quercetina en el proceso de migración de células *FaDu*.

Las células fueron sembradas en cajas de 6 pozos e incubadas por 24 horas. Posteriormente fueron tratadas para realizar el ensayo de migración celular como se describe en 6. *MATERIALES Y MÉTODOS*. Los resultados que se muestran son los más representativos de tres observaciones independientes.

8. DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, el objetivo fundamental de este trabajo consistió en determinar el efecto de los flavonoides luteolina, naringina y quercetina en la línea celular de carcinoma hipofaríngeo *FaDu*. Los resultados obtenidos revelaron que estos compuestos inducen la muerte celular por apoptosis mediante la vía mitocondrial o intrínseca que es activada por señales de estrés celular. Así también, con la finalidad de evaluar la implicación de este tipo de moléculas en otros procesos celulares relacionados a la evolución del cáncer, se encontró que la naringina y la quercetina carecen de actividad sobre la migración de las células, al menos en la concentración aquí empleada.

El cáncer de cabeza y cuello representa una de las variantes de la patología más extendidas alrededor del mundo¹⁴. Sin tanta repercusión dentro de la investigación básica y clínica como los de mama o de vías respiratorias, resulta atractivo su estudio puesto que la etiología se basa en prácticas nocivas ampliamente extendidas en la sociedad como el tabaquismo y el alcoholismo^{13,14}, y que en muchos casos, llega a alcanzar una mortalidad de hasta el 78%^{15,16}. Así pues, es el aumento en su prevalencia durante las últimas dos décadas lo que hace fundamental buscar alternativas para su tratamiento¹⁶. Por su parte, el cáncer de hipofaringe se presenta como una variante compleja de los cánceres de cabeza y cuello en la medida de que es la faringe una de las zonas anatómicas con mayor red linfática y, consecuentemente, hace de esta neoplasia una de las más propensas a desarrollar metástasis²¹. Aunado a esto, el hecho de la multirresistencia farmacológica que se presenta en la mayoría de los casos, termina por abatir la calidad de vida de los pacientes, incluso más rápido que la misma enfermedad²¹.

Por otra parte, desde hace algunos años, la comunidad científica mundial ha obtenido evidencia de que los flavonoides presentan actividad importante frente a un sin número de patologías, entre las que se incluye el cáncer. Al ser moléculas de origen natural, su atractivo como terapia y/o auxiliar en los tratamientos oncológicos radica en que no muestran un único mecanismo de acción y esto hace que su comportamiento sea diferente frente a una célula cancerosa y una célula sana. Por otra parte, resulta relativamente fácil el acceso a ellos, puesto que se pueden encontrar en ciertos vegetales y derivados que forman parte de la dieta cotidiana de la población^{42,43}. De esta manera,

resulta inevitable pensar en el rol que estas moléculas pueden tener dentro de la medicina tradicional mexicana, una de las más ricas e importantes a escala mundial.

Por estas razones, en el presente trabajo se investigaron los efectos que la luteolina, la naringina y la quercetina ejercían sobre la línea celular de carcinoma hipofaríngeo *FaDu*. Previamente, el equipo de investigación del Laboratorio de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM, se había enfocado en determinar el papel de estos compuestos en procesos relacionados con la inflamación producida por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs) mediante receptores tipo Toll, en fibroblastos gingivales humanos y en cardiomiocitos de ratón *H9c2*. Se encontró que los tres flavonoides antes mencionados pueden inhibir la activación de la vía de las MAPK^{65,66,67}, así como la expresión de interleucina 1 β ^{65,66}, ciclooxigenasa-2⁶⁶ y prostaglandina E2⁶⁶. Igualmente, se determinó que la luteolina disminuye la fosforilación de Akt^{65,67} y la translocación del NF- κ B al núcleo⁶⁷, así como la síntesis de óxido nítrico⁶⁷. De manera similar, se describió la disminución de la expresión de proteasas como las MMP -2 y -9 en fibroblastos gingivales por efecto de la naringina, moléculas que en el ámbito del cáncer, suelen estar involucradas en los procesos de metástasis. Con tal información, se dispuso a caracterizar si estos compuestos tendrían efecto en una línea celular neoplásica.

Primeramente, se realizaron ensayos de viabilidad celular por el método del MTT para evaluar la citotoxicidad de los flavonoides. Se encontró que los tres compuestos presentan una inhibición significativa de la viabilidad de células *FaDu* de manera dosis dependiente, siendo 100 μ M la concentración a la que se presentó el mayor efecto letal. En el caso de la luteolina, el resultado concuerda con lo descrito sobre otras líneas celulares cancerígenas como la mamaria *MDA-MB-435*⁶⁸. Resulta interesante observar que las concentraciones más bajas del flavonoide, que en principio no presentaron efectos citotóxicos significativos a las 24 horas, acentuaron su letalidad conforme incrementó el tiempo de exposición a 48 y 72 horas, logrando que las concentraciones de 10 y 50 μ M disminuyeran la viabilidad significativamente.

Por otra parte, el efecto letal observado por la naringina resulta por demás interesante. Nuestros resultados revelaron que a 100 μ M, el flavonoide ejerce una citotoxicidad

significativa sobre más del 50% de las células *FaDu*, no obstante en algunos estudios se ha encontrado que en líneas celulares de carcinoma hepático *HepG2*⁶⁹ y cáncer cervical *HeLa*⁷⁰, las concentraciones letales 50 (CL₅₀) oscilan por arriba de 172 µM en el primero y 1500 µM en el segundo. Resulta llamativo el hecho de que la concentración de la naringina con efectos citotóxicos significativos en células de carcinoma hipofaríngeo *FaDu* es considerablemente menor a lo evaluado en otros tipos de cáncer. A falta de mayores estudios, los resultados sugieren una selectividad de la naringina por células *FaDu* y, por ende, una tentativa terapéutica sobre los cánceres de cabeza y cuello.

En lo que respecta a la quercetina, se observó que la citotoxicidad de ésta, al igual que la de la luteolina, aumentó respecto al tiempo, por lo que las concentraciones de 10 y 50 µM resultaron letales a las 72 horas. En 2015, Ranganathan y cols.⁷¹ informaron que en dos líneas celulares de cáncer mamario el flavonoide ejerció efectos letales diferentes en un intervalo de 10 a 100 µM. Se encontró que en células *MDA-MB-231* la quercetina no ejerció efecto citotóxico alguno, contrario a lo que sucedió en la línea *MCF-7*. De esta manera, los datos obtenidos en el presente trabajo con células de carcinoma hipofaríngeo parecen coincidir con lo reportado en la segunda línea mamaria estudiada y sugieren que este flavonoide puede presentar selectividad por ciertos tipos celulares.

Una vez observado el efecto citotóxico de los flavonoides, se determinó que para ambos, la concentración a la que había un mayor efecto letal era 100 µM, algo que coincide con la literatura referente al tema. Posteriormente, con el objetivo de conocer qué ruta de muerte estaba siendo activada, se decidió analizar mediante Western blot las proteínas implicadas en apoptosis Bcl2 y caspasa-3; se observó que los flavonoides lograron inhibir a la proteína antiapoptótica Bcl2, mientras que, aunque a diferentes tiempos, promovieron la activación de caspasa-3. Adicionalmente, se evaluó la activación de caspasa-9 para determinar si la muerte celular se debía a una inducción de apoptosis por vía intrínseca, lo que se confirmó al observar la señal de ésta. Se encontró que los tres flavonoides lograron una activación de la caspasa específica de la vía mitocondrial, la cual se mantiene a lo largo de las dos horas de exposición al flavonoide. Diversos estudios en otros tipos de cáncer como el hepático⁶⁹, el de mama^{71,73} y el pulmonar⁷², confirman el efecto inductor de apoptosis intrínseca de los flavonoides con concentraciones similares

a la utilizada en este trabajo. Más aún, en algunos reportes se habla de un sinergismo entre este tipo de moléculas polifenólicas⁷⁴ o entre ellas y fármacos convencionales antineoplásicos como el 5-fluorouracilo⁷⁵, y responde a la necesidad de desarrollar terapias más efectivas frente a la resistencia farmacológica. Mención aparte merece el hecho de que el empleo de flavonoides en dosis bajas no letales en conjunto con los tratamientos quimioterapéuticos puede servir como contrapeso a la agresividad de las terapias, valiéndose de sus propiedades antioxidantes.

Finalmente, para evaluar si el mecanismo de muerte celular inducido por los flavonoides culminaba en la fragmentación del material genético al activar endonucleasas e inhibir polimerasas como la poli ADP ribosa polimerasa (PARP), se realizó la extracción de ADN y su posterior electroforesis. Con base en los resultados obtenidos, la quercetina logró un mayor efecto sobre la degradación de ADN en comparación con la luteolina y la naringina; se observó que la fragmentación se produce desde las dos horas de exposición y esta continúa hasta las 24 horas. De acuerdo a un estudio en 2015, se encontró que la quercetina induce la fragmentación al material genético desde concentraciones de 50 μM en células de cáncer mamario *MCF-7*, sin embargo, la degradación se incrementa cuando se exponen las células a derivados alquilados del flavonoide⁷⁶. Esto cobra relevancia puesto que sugiere un mecanismo de acción alternativo del flavonoide, que implica su metabolismo y un eventual cambio estructural para mejorar su actividad citotóxica.

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron, resulta evidente la inducción de apoptosis vía mitocondrial por parte de los flavonoides. No obstante, ante los numerosos mecanismos de acción descritos por otros grupos de investigación, es fundamental incrementar la investigación sobre estas moléculas para darles un uso terapéutico seguro y eficaz en el futuro.

Para concluir este trabajo y ampliándolo a perspectivas, con el objetivo de determinar si los flavonoides estudiados podían ejercer algún efecto sobre otros procesos celulares que propician la carcinogénesis como la migración celular, se realizaron ensayos de Wound healing. Nuestros resultados revelaron que ninguno de los dos flavonoides empleados, la naringina y la quercetina, presentaron actividad en la migración, aunque sí tuvieron efecto citotóxico. Diversos grupos de investigación han encontrado que la

naringina sí regula la migración celular en diferentes tipos de líneas cancerígenas como glioblastoma *U87* y *U3730*⁷⁷ o condrosarcoma *JJ012*⁷⁸, no obstante, las concentraciones utilizadas son menores a las aquí empleadas, pues oscilan de 5 a 20 μM y de 3 a 30 μM , respectivamente. Es de resaltar que los trabajos de Sonia Aroui y cols⁷⁷. explican esta regulación en los procesos migratorios celulares mediante la supresión de la expresión de MMP-2 y -9 por efecto del flavonoide al inhibir la vía de las MAPK, lo que concuerda con lo encontrado anteriormente en fibroblastos gingivales humanos.

Respecto a la quercetina, el equipo de investigación de Anna Klimaszewska-Wiśniewska describió un efecto del flavonoide sobre el ensamblaje de los microfilamentos y microtúbulos del citoesqueleto de células cancerígenas pulmonares *A549*, así como la inhibición en la expresión de vimentina y N-cadherina⁷⁹, lo que permite explicar la inhibición observada en la migración. Por último, dentro de los pocos estudios de flavonoides sobre células de cáncer de cabeza y cuello, Chien-Yi Chan y cols. encontraron que la quercetina logró suprimir la expresión y la activación proteolítica de MMP-2 y -9 sobre células *HSC-3* y *FaDu*⁸⁰, a concentraciones de 10 μM , lo que, como ya se mencionó, altera e inhibe la movilidad y migración de la célula. Con este antecedente, se sugiere emplear concentraciones menores a la que se describe en este trabajo.

9. CONCLUSIONES

En la presente investigación se logró establecer que los flavonoides luteolina, naringina y quercetina presentan propiedades anticancerígenas sobre la línea celular de carcinoma hipofaríngeo *FaDu*, al activar de manera dosis dependiente la maquinaria molecular de apoptosis vía intrínseca. Del mismo modo, se encontró que este conjunto de proteínas anti y proapoptóticas puede ser detectado desde los 15 minutos de exposición a los flavonoides y sus efectos sobre el material genético se observan durante 24 horas. En el caso de la naringina, se logró demostrar que sus efectos citotóxicos sobre células *FaDu* se presentan a concentraciones más bajas que las establecidas en otros modelos cancerígenos. Por otra parte, se determinó que la naringina y la quercetina no actúan sobre los procesos de movilidad y migración, lo que permite concluir que sus efectos se reducen a la inducción de muerte celular.

Lo anterior resulta interesante ya que, eventualmente, podría conducir al desarrollo de nuevas terapias basadas en moléculas de origen natural, más accesibles y menos agresivas para los pacientes.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. ¿Qué es el cáncer?. (2016). National Cancer Institute. Consultado: 15 de Agosto de 2016, de: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
2. Liu, J., Lin, M., Yu, J., Liu, B., & Bao, J. (2011). *Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics*. *Cancer Letters*, 300(2), 105-114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2010.10.001>
3. Chial, H. (2008). *Proto-oncogenes to oncogenes to cancer*. *Nature Education* 1(1):33
4. Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M., & Greenwood, M. (2011). *Anti-apoptosis and cell survival: A review*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(1), 238-259. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.010>
5. Liu, Y., Yin, T., Feng, Y., Cona, M. M., Huang, G., Liu, J., Song, S., Jiang, Y., Xia, Q., Swinnen, J. V., Bormans, G., Himmelreich, U., Oyen, R. & Ni, Y. (2015). *Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research*. *Quantitative imaging in medicine and surgery*, 5(5), 708. <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2015.06.01>.
6. Hanahan, D. & Weinberg, R. (2011). *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. *Cell*, 144(5), 646-674. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
7. Hahn, W. & Weinberg, R. (2002). *Modelling the molecular circuitry of cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2(5), 331-341. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc795>
8. ¿Qué es el cáncer?. (2016). National Cancer Institute. Consultado: 14 de agosto de 2016, de: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es#tipos>
9. OMS | Cáncer. (2016). Who.int. Consultado: 14 de agosto de 2016, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
10. OMS | Prevención del cáncer. (2016). Who.int. Consultado: 14 de agosto de 2016, de: <http://www.who.int/cancer/prevention/es/>
11. *Informe Anual a la Nación, 1975 – 2012*. (2016). National Cancer Institute. Consultado: 15 de agosto de 2016, de: <http://www.cancer.gov/espanol/investigacion/progreso/informe-anual-nacion>
12. *Estadísticas a propósito del... Día Mundial contra el Cáncer (4 de Febrero)*. (2016). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Consultado: 16 de agosto de 2016, de: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf
13. *Cánceres de cabeza y cuello*. (2016). National Cancer Institute. Consultado: 18 de agosto de 2016, de: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/cabeza-cuello/hoja-informativa-cabeza-cuello>
14. Cadoni, G., Boccia, S., Petrelli, L., Di Giannantonio, P., Arzani, D., Giorgio, A., De Feo, E., Pandolfini, M., Gallí, P., Paludetti, G. & Ricciardi, G. (2012). *A review of genetic epidemiology of head and neck cancer related to polymorphisms in metabolic genes, cell cycle control and alcohol metabolism*. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, 32(1), 1–11.
15. *Fact Sheets by Population*. (2016). Globocan.iarc.fr. Consultado: 20 de agosto de 2016, de: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
16. Gallegos-Hernández, J. F. (2015). *Cáncer de cabeza y cuello*. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 14(1), 1-2.

17. Szymanska, K., Levi, J., Menezes, A., Wunsch-Filho, V., Eluf-Neto, J., & Koifman, S. et al. (2009). *TP53 and EGFR mutations in combination with lifestyle risk factors in tumours of the upper aerodigestive tract from South America*. *Carcinogenesis*, 31(6), 1054-1059. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgp212>
18. Hübbers, C. & Akgül, B. (2015). *HPV and cancer of the oral cavity*. *Virulence*, 6(3), 244-248. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2014.999570>
19. Gallegos-Hernández, J. F. (2008). *Lesiones preneoplásicas de la cavidad bucal: detección y diagnóstico oportuno*. *Cir Ciruj*, 76(3), 197-8.
20. Brener, I. V., Mancera, N. G. I., Eljure, E. E., & Bravo, F. A. (2014). *Retraso en el diagnóstico de cáncer en cavidad bucal y anexos como factor clave para el pronóstico*. *Revista ADM*, 71(4), 188-191.
21. *Cáncer de hipofaringe*. (2016). National Cancer Institute. Consultado: 21 de agosto de 2016, de: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/cabeza-cuello/pro/tratamiento-hipofaringe-pdq>
22. Tang, Z. I. (2010). *The domino and clock models of cell cycle regulation*. *Nat Educ*, 3(9), 56. Consultado en: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/the-domino-and-clock-models-of-cell-14233440>
23. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D., & Berneman, Z. (2003). *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. *Cell Proliferation*, 36(3), 131-149. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x>
24. Fragoso, L. R., Baltasar, E. H., & Esparza, J. A. R. (2004). *El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer*. *Biotecnología aplicada*, 21(2), 60-69.
25. Gabrielli, B., Brooks, K., & Pavey, S. (2012). *Defective Cell Cycle Checkpoints as Targets for Anti-Cancer Therapies*. *Frontiers In Pharmacology*, 3. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2012.00009>
26. Clarke, P. & Allan, L. (2009). *Cell-cycle control in the face of damage – a matter of life or death*. *Trends In Cell Biology*, 19(3), 89-98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2008.12.003>
27. Medema, R. & Macúrek, L. (2011). *Checkpoint control and cancer*. *Oncogene*, 31(21), 2601-2613. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.451>
28. Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F., Zhou, T., Liu, B., & Bao, J. (2012). *Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis*. *Cell Proliferation*, 45(6), 487-498. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x>
29. Coleman, M.L., Marshall, C.J. & Olson, M.F. (2004). *RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5(5), 355-366. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1365>
30. Jain, M., Paczulla, A., Klonisch, T., Dimgba, F., Rao, S., & Roberg, K. et al. (2013). *Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development*. *J. Cell. Mol. Med.*, 17(1), 12-29. <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12001>
31. Radogna, F., Dicato, M., & Diederich, M. (2015). *Cancer-type-specific crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as a pharmacological target*. *Biochemical Pharmacology*, 94(1), 1-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2014.12.018>

32. Hardwick, J. & Soane, L. (2013). *Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins*. Cold Spring Harbor Perspectives In Biology, 5(2), 8722-8722. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a008722>
33. Fulda, S. & Vucic, D. (2012). *Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer*. Nature Reviews Drug Discovery, 11(4), 331-331. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3698>
34. Silke, J., & Vucic, D. (2013). *IAP family of cell death and signaling regulators*. Methods in enzymology, 545, 35-65. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801430-1.00002-0>.
35. Smith, N., Rubenstein, J., Eggen, S., & Kozlowski, J. (2003). *The p53 Tumor Suppressor Gene and Nuclear Protein: Basic Science Review and Relevance in the Management of Bladder Cancer*. The Journal Of Urology, 169(4), 1219-1228. <http://dx.doi.org/10.1097/01.ju.0000056085.58221.80>
36. Luna-Vargas, M. & Chipuk, J. (2016). *Physiological and Pharmacological Control of BAK, BAX, and Beyond*. Trends In Cell Biology. 26(12), 906-917. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2016.07.002>
37. Dentelli, P., Rosso, A., Olgasi, C., Camussi, G., & Brizzi, M. (2011). *IL-3 is a novel target to interfere with tumor vasculature*. Oncogene, 30(50), 4930-4940. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.204>
38. Dhillon, A., Hagan, S., Rath, O., & Kolch, W. (2007). *MAP kinase signalling pathways in cancer*. Oncogene, 26(22), 3279-3290. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210421>
39. Hayes, J., Peruzzi, P., & Lawler, S. (2014). *MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy*. Trends In Molecular Medicine, 20(8), 460-469. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2014.06.005>
40. You, Y. (2012). *Regulation of let-7 and its target oncogenes (Review)*. Oncology Letters, 3(5), 955-960. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2012.609>
41. Pan, X., Wang, Z., & Wang, R. (2010). *MicroRNA-21: A novel therapeutic target in human cancer*. Cancer Biology & Therapy, 10(12), 1224-1232. <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.10.12.14252>
42. Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). *Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids*. Fitoterapia, 82(4), 513-523. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>
43. Kumar, S. & Pandey, A. (2013). *Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview*. The Scientific World Journal, 2013, 1-16. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>
44. Pandey, R., Parajuli, P., Koffas, M., & Sohng, J. (2016). *Microbial production of natural and non-natural flavonoids: Pathway engineering, directed evolution and systems/synthetic biology*. Biotechnology Advances, 34(5), 634-662. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.02.012>
45. Lin, Y., Shi, R., Wang, X., & Shen, H. (2008). *Luteolin, a Flavonoid with Potential for Cancer Prevention and Therapy*. Current Cancer Drug Targets, 8(7), 634-646. <http://dx.doi.org/10.2174/156800908786241050>
46. Tjioe, K., Tostes Oliveira, D., & Gavard, J. (2016). *Luteolin Impacts on the DNA Damage Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma*. Nutrition And Cancer, 68(5), 838-847. <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2016.1180411>

47. Bharti, S., Rani, N., Krishnamurthy, B., & Arya, D. (2014). *Preclinical Evidence for the Pharmacological Actions of Naringin: A Review*. *Planta Med*, 80(6), 437-451. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1368351>
48. Miles, S., McFarland, M., & Niles, R. (2014). *Molecular and physiological actions of quercetin: need for clinical trials to assess its benefits in human disease*. *Nutr Rev*, 72(11), 720-734. <http://dx.doi.org/10.1111/nure.12152>
49. D'Andrea, G. (2015). *Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?*. *Fitoterapia*, 106, 256-271. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2015.09.018>
50. Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D., Li, S., Chen, Y., & Li, H. (2016). *Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer*. *Nutrients*, 8(8), 515. <http://dx.doi.org/10.3390/nu8080515>
51. Deng, Y. & Lin, J. (2011). *EGCG Inhibits the Invasion of Highly Invasive CL1-5 Lung Cancer Cells through Suppressing MMP-2 Expression via JNK Signaling and Induces G2/M Arrest*. *J. Agric. Food Chem.*, 59(24), 13318-13327. <http://dx.doi.org/10.1021/jf204149c>
52. Onoda, C., Kuribayashi, K., Nirasawa, S., Tsuji, N., Tanaka, M., Kobayashi, D., Watanabe, N. (2011). *(-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in gastric cancer cell lines by down-regulating survivin expression*. *International Journal Of Oncology*, 38(5), 1403-1408. <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2011.951>
53. Jin, C., Park, C., Hwang, H., Kim, G., Choi, B., Kim, W., & Choi, Y. (2011). *Naringenin up-regulates the expression of death receptor 5 and enhances TRAIL-induced apoptosis in human lung cancer A549 cells*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(2), 300-309. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201000024>
54. Song, H., Park, G., Eo, H., & Jeong, J. (2016). *Naringenin-Mediated ATF3 Expression Contributes to Apoptosis in Human Colon Cancer*. *Biomolecules & Therapeutics*, 24(2), 140-146. <http://dx.doi.org/10.4062/biomolther.2015.109>
55. Yen, H., Liu, C., & Yeh, C. (2015). *Naringenin suppresses TPA-induced tumor invasion by suppressing multiple signal transduction pathways in human hepatocellular carcinoma cells*. *Chemico-Biological Interactions*, 235, 1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.04.003>
56. Zhang, J., Wu, D., Vikash, Song, J., Wang, J., Yi, J., & Dong, W. (2015). *Hesperetin Induces the Apoptosis of Gastric Cancer Cells via Activating Mitochondrial Pathway by Increasing Reactive Oxygen Species*. *Dig Dis Sci*, 60(10), 2985-2995. <http://dx.doi.org/10.1007/s10620-015-3696-7>
57. Palit, S., Kar, S., Sharma, G., & Das, P. (2015). *Hesperetin Induces Apoptosis in Breast Carcinoma by Triggering Accumulation of ROS and Activation of ASK1/JNK Pathway*. *J. Cell. Physiol.*, 230(8), 1729-1739. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.24818>
58. Yang, Y., Wolfram, J., Boom, K., Fang, X., Shen, H., & Ferrari, M. (2012). *Hesperetin impairs glucose uptake and inhibits proliferation of breast cancer cells*. *Cell Biochem Funct*, 31(5), 374-379. <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.2905>
59. Seo, H., Jo, J., Ku, J., Choi, H., Choi, Y., & Woo, J. et al. (2015). *Induction of caspase-dependent extrinsic apoptosis by apigenin through inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signalling in HER2-overexpressing BT-474 breast cancer cells*. *Bioscience Reports*, 35(6), e00276. <http://dx.doi.org/10.1042/bsr20150165>

60. Zhao, X., Wang, Q., Yang, S., Chen, C., Li, X., & Liu, J. et al. (2016). *Quercetin inhibits angiogenesis by targeting calcineurin in the xenograft model of human breast cancer*. *European Journal Of Pharmacology*, 781, 60-68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.03.063>
61. Magee, P., Allsopp, P., Samaletdin, A., & Rowland, I. (2013). *Daidzein, R-(+)equol and S-(-)equol inhibit the invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells potentially via the down-regulation of matrix metalloproteinase-2*. *European Journal Of Nutrition*, 53(1), 345-350. <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-013-0520-z>
62. Qin, J., Teng, J., Zhu, Z., Chen, J., & Huang, W. (2015). *Genistein induces activation of the mitochondrial apoptosis pathway by inhibiting phosphorylation of Akt in colorectal cancer cells*. *Pharmaceutical Biology*, 54(1), 74-79. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2015.1014921>
63. Xiao, X., Liu, Z., Wang, R., Wang, J., Zhang, S., Cai, X. & Fan, D. (2015). *Genistein suppresses FLT4 and inhibits human colorectal cancer metastasis*. *Oncotarget*, 6(5), 3225-3239. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.3064>
64. Zhang, Z., Al Zaharna, M., Wong, M., Chiu, S., & Cheung, H. (2013). *Taxifolin Enhances Andrographolide-Induced Mitotic Arrest and Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells via Spindle Assembly Checkpoint Activation*. *Plos ONE*, 8(1), e54577. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0054577>
65. Gutiérrez-Venegas, G. & Bando-Campos, C. (2010). *The flavonoids luteolin and quercetagenin inhibit lipoteichoic acid actions on H9c2 cardiomyocytes*. *International Immunopharmacology*, 10(9), 1003-1009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2010.05.012>
66. Gutiérrez-Venegas, G., Jiménez-Estrada, M., & Maldonado, S. (2007). *The effect of flavonoids on transduction mechanisms in lipopolysaccharide-treated human gingival fibroblasts*. *International Immunopharmacology*, 7(9), 1199-1210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2007.05.004>
67. Gutiérrez-Venegas, G., Kawasaki-Cárdenas, P., Rita Arroyo-Cruz, S., & Maldonado-Frías, S. (2006). *Luteolin inhibits lipopolysaccharide actions on human gingival fibroblasts*. *European Journal Of Pharmacology*, 541(1-2), 95-105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.03.069>
68. Cook, M., Liang, Y., Besch-Williford, C., & Hyder, S. (2016). *Luteolin inhibits lung metastasis, cell migration, and viability of triple-negative breast cancer cells*. *Breast Cancer: Targets And Therapy*, 9, 9-19. <http://dx.doi.org/10.2147/bctt.s124860>
69. Banjerdpongchai, R., Wudtiwai, B. & Khaw-on, P. (2016). *Induction of Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cell Apoptosis by Naringin*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17 (7), 3289-3294.
70. Zeng, L., Zhen, Y., Chen, Y., Zou, L., Zhang, Y., & Hu, F. et al. (2014). *Naringin inhibits growth and induces apoptosis by a mechanism dependent on reduced activation of NF- κ B/COX-2-caspase-1 pathway in HeLa cervical cancer cells*. *International Journal Of Oncology*. 45(5), 1929-1936. <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2014.2617>
71. Ranganathan, S., Halagowder, D., & Sivasithambaram, N. (2015). *Quercetin Suppresses Twist to Induce Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells*. *PLOS ONE*, 10(10), e0141370. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0141370>

72. Meng, G., Chai, K., Li, X., Zhu, Y., & Huang, W. (2016). *Luteolin exerts pro-apoptotic effect and anti-migration effects on A549 lung adenocarcinoma cells through the activation of MEK/ERK signaling pathway*. *Chemico-Biological Interactions*, 257, 26-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.07.028>
73. Kim, M., Woo, J., Kwon, C., Kim, J., Kim, Y., & Kim, K. (2012). *Luteolin induces apoptotic cell death through AIF nuclear translocation mediated by activation of ERK and p38 in human breast cancer cell lines*. *Cell Biology International*, 36(4), 339-344. <http://dx.doi.org/10.1042/cbi20110394>
74. Amin, A., Wang, D., Zhang, H., Peng, S., Shin, H., & Brandes, J. et al. (2010). *Enhanced Anti-tumor Activity by the Combination of the Natural Compounds (-)-Epigallocatechin-3-gallate and Luteolin: POTENTIAL ROLE OF p53*. *Journal Of Biological Chemistry*, 285(45), 34557-34565. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m110.141135>
75. Xavier, C., Lima, C., Rohde, M., & Pereira-Wilson, C. (2011). *Quercetin enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in MSI colorectal cancer cells through p53 modulation*. *Cancer Chemotherapy And Pharmacology*, 68(6), 1449-1457. <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-011-1641-9>
76. Liao, H., Bao, X., Zhu, J., Qu, J., Sun, Y., & Ma, X. et al. (2015). *O-Alkylated derivatives of quercetin induce apoptosis of MCF-7 cells via a caspase-independent mitochondrial pathway*. *Chemico-Biological Interactions*, 242, 91-98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.09.022>
77. Aroui, S., Aouey, B., Chtourou, Y., Meunier, A., Fetoui, H., & Kenani, A. (2016). *Naringin suppresses cell metastasis and the expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) via the inhibition of ERK-P38-JNK signaling pathway in human glioblastoma*. *Chemico-Biological Interactions*, 244, 195-203. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.12.011>
78. Tan, T., Chou, Y., Yang, W., Hsu, C., Fong, Y., & Tang, C. (2014). *Naringin suppress chondrosarcoma migration through inhibition vascular adhesion molecule-1 expression by modulating miR-126*. *International Immunopharmacology*, 22(1), 107-114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2014.06.029>
79. Klimaszewska-Wiśniewska, A., Hałas-Wiśniewska, M., Izdebska, M., Gagat, M., Grzanka, A., & Grzanka, D. (2016). *Antiproliferative and antimetastatic action of quercetin on A549 non-small cell lung cancer cells through its effect on the cytoskeleton*. *Acta Histochemica*. 119(2), 99-112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2016.11.003>
80. Chan, C., Lien, C., Lee, M., & Huang, C. (2016). *Quercetin suppresses cellular migration and invasion in human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)*. *Biomedicine*, 6(3), 10-15. <http://dx.doi.org/10.7603/s40681-016-0015-3>