



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR
Y CÁNCER

LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

**Efecto Antiproliferativo, necrótico y apoptótico del
flavonol Quercetina en células tumorales.**

TESIS

Que para obtener el título de:

BIÓLOGO

Presenta

Patiño Contreras Beatriz

Director de Tesis

Dr. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

CDMX, Mayo 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **PATÍÑO CONTRERAS BEATRIZ**, con número de cuenta **311098284**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **22 de mayo de 2018** a las **13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA

Alvarez Barrera Lucila

VOCAL Dr. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ

Luis Sánchez Sánchez

SECRETARIO Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ

Hugo López Muñoz

SUPLENTE M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

José Misael Vicente Hernández Vázquez

SUPLENTE Dra. ITZEN AGUIÑIGA SÁNCHEZ

Itzen Aguiñiga Sánchez

El título de la tesis que presenta es: **Efecto antiproliferativo, necrótico y apoptótico del flavonol Quercetina en células tumorales.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 23 de marzo de 2018

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR



RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

-La primera vez que le mostré a mi hermano pequeño una célula bajo el microscopio, exclamo con asombro:

“Es la cosa más pequeña y frágil que he visto, parecen hojas que caen en otoño”

Desde ese momento la ciencia me significo más que un mundo maravilloso...

“La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a dudar y a ser ignorante”.

Ernest Rutherford

¿Quién les dio la “verdad” absoluta? Nada hay absoluto. Todo cambia, todo se mueve, todo revoluciona, todo vuela y va.

Frida Kahlo

“Creo que mientras más a fondo se estudia la ciencia, más se aleja uno de cualquier concepto que se aproxime al ateísmo”.

William Thomson

Radiante e incorruptible es la sabiduría, con facilidad la contemplan quienes la aman y ella se deja encontrar por quienes la buscan y se anticipa darse a conocer a los que la desean.

(Sab 6,12-16)

“Me enseñaron que el camino al progreso no es fácil, ni rápido”

Marie Curie.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre: Mi mayor motivación desde pequeña, me enseñaste a ser mejor día con día, a no rendirme y siempre mostrar la cara altiva. Por todo tu esfuerzo que me hizo posible culminar esta bella etapa de mi vida. Por creer firmemente en mí. Por impregnar en mí esas ganas de vivir con alegría, disfrutar de lo que me apasiona y proyectar en mí trabajo la mejor versión. Tú me enseñaste a no darme por vencida, es nuestro logro, aun nos faltan más. Te quiero

A mi padre: Mi fuerza y valentía para enfrentarme a nuevas metas, nuevos mundos, nuevas experiencias. Por el gran esfuerzo que realizabas día a día. Por mostrarme que no te imposibilita el mundo sino tú mismo, por las pláticas largas donde me explicabas lo que desconocía. Porque fuiste mi más grande maestro en cada etapa de mi vida. Por confiar en que lo lograría, aunque no fuera fácil. Te quiero

A mis padres: Por su cansancio, por su esfuerzo, por su trabajo, por sus consejos, por compartir su sabiduría, por el tiempo y los buenos momentos, que me han hecho llegar hasta este momento. Gracias a ustedes esto es posible.

A mi hermano: Mi inspiración y motor, porque en ti encuentro lo bello de la vida, porque me inspiras a ser la mejor versión de mí, por no dudar ni un momento que puedo, por acompañarme en mis malos días. Te quiero montones. Y si ya termine mi tesis

A mi abuela: Mi impulso, porque me muestras que nunca se es viejo para querer superarse, que todo se logra si se es perseverante, que la humildad en el corazón es tan importante que te hace grande. Por nunca darte por vencida y ser para mí la mejor lección de vida aprendida. Porque desde pequeña me mostraste que todos podíamos. Abita me siento orgullosa de tenerte en mi vida.

A mi hermana de vida: Por ser tan espontanea, por tu cariño, por las vivencias, por la confianza, porque siempre creíste en mí. Te quiero. Rosi

A mi innumerable familia: Por confiar en mí, por compartir conmigo bellos momentos que hacían más ameno mi camino, por sus consejos y por brindarme siempre su mano. A ustedes tía Ignacia, tío Amado, tío Malaquías, tío Perfecto, tío Santiago y tío Pablo. A todas mis tías y primos, gracias.

A ti Andrés: Por ser un gran compañero de camino, por tomar mi mano y motivarme. Por creer y confiar profundamente en mí, por las palabras de aliento en momentos difíciles, por los abrazos y por las ganas enormes que me impregnas para ser mejor, por apoyarme y convertirme en una de las personas más significativas en mi vida. Te quiero. Porque es importante pensar en grande.

A mis amigos: A ti Lucia por compartir muchísimas alegrías, porque siempre pensaste que la ciencia era lo mío. Te quiero. A ti Karina porque en verdad aprendí que esto es una montaña rusa, pero depende de la chispa que le pongas. A ti Erick por acompañarme en esta carrera y ser tan curioso que despertaste en mí las ganas de conocer más y más. A Griss, Gaby, Nayeli, Valeria, Lupita, por las risas, por las porras, por la confianza. Por mostrarme el valor de la mistad cuando se cruza por un camino complicado. Mil gracias.

A mis compañeros de laboratorio: Por su tiempo, por convertirse momentáneamente en mis maestros, por la buena vibra y las buenas charlas. Por qué el paso por el laboratorio fue más ameno a su lado. Gracias Elena, Iván, Fernando, Karen, Sergio, Brian, Amanda, Mayra, Alfonso.

Al Dr. Luis Sánchez Sánchez: Por permitirme involucrarme y acercarme a la ciencia, por dejarme pertenecer a su equipo de trabajo, por compartir sus experiencias, por la orientación, las charlas, sus aportaciones y consejos para mejor, en mi vida académica y personal. Por brindarme las herramientas y recursos necesarios para culminar con este proyecto. Fue una gran aventura, que lleno mi vida de experiencias. Gracias

Al M en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez: Por compartir sus conocimientos, por el tiempo, su amabilidad, disposición y su atenta atención, por compartir sus experiencias, por sus consejos y aporte para culminar este trabajo. Gracias

Al Dr. Hugo López Muñoz: Por ser una motivación desde aquel primer día de clases en esta linda carrera, porque en la ciencia siempre se necesitan mentes nuevas. Por las herramientas y el conocimiento brindado y por sus aportaciones a este trabajo. Gracias

A la Dr. Lucila Álvarez Barrera: Por ser una de las principales personas que me motivo a involucrarme en esta área de biología, desde su punto de vista, todo parecía sombrío. Por las aportaciones y mejoras a este trabajo. Gracias.

A la Dr. Itzen Aguiñiga Sanchez: Por sus aportaciones, observaciones y mejoras a este trabajo. Gracias.

Este trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer (Laboratorio N° 6 planta alta), edificio de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ)

Este trabajo fue realizado con el apoyo de los proyectos SEP-CONACyT 253979, CONACyT 255881 y los Proyectos PAPIIT IN216718 y PAPIIT IN220916.

ÍNDICE

Resumen.....	9
Introducción	1
La célula.....	1
El ciclo celular	1
Muerte celular	4
1. Apoptosis	4
2. Necrosis.....	7
Cáncer	9
Cáncer Cervicouterino	10
Cáncer de Mama	13
Cáncer de Pulmón	16
Cáncer de Próstata.....	18
Tratamientos.....	21
Flavonoides	24
Quercetina	25
Planteamiento del problema.....	28
Justificación	29
Hipótesis.....	30
Objetivos	31
Resultados	38
Análisis de resultados.....	49
Conclusiones	52
ANEXO.....	53
Bibliografía	54
Apéndice	59

Índice de Figuras y Tablas

Tabla 1. Concentraciones IC50 de la Quercetina.....	39
Tabla 2. Actividad de LDH de los cultivos de células tumorales.	40
Tabla 3. Porcentaje de expresión de caspasa 3 activa de las líneas celulares tumorales.....	46
Tabla 4. Porcentaje de proliferación de Linfocitos humanos.....	48
Tabla 5. IC50 y % de LDH de la Quercetina, Patuletina y Quercetagetina en células tumorales...	52
Figura 1. Fases del ciclo celular.....	3
Figura 2. Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis.	7
Figura 3. Diferencias de muerte celular necrótica y apoptótica..	8
Figura 4. Incidencia del cáncer a nivel mundial.....	10
Figura 5. Anatomía del cuello uterino.....	11
Figura 6. Anatomía del seno de una mujer.....	15
Figura 7. Anatomía de la próstata.	19
Figura 8. Estructura de los principales flavonoides.	24
Figura 9. Estructura de la Quercetina, Patuletina y Quercetagetina.....	26
Figura 10. Efecto antiproliferativo de la Quercetina.....	38
Figura 11. Actividad de LDH de células tumorales tratadas con Quercetina.	39
Figura 12. Efecto de la quercetina en la morfología de las células tumorales	41-42
Figura 13. Cuantificación de la caspasa 3 activa en las líneas celulares tumorales	44-45
Figura 14. Efecto antiproliferativo de la quercetina en células no tumorales	46
Figura 15. Evaluación de la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos humanos.	48

Resumen

Actualmente el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, en 2012, se diagnosticaron 14 millones de casos nuevos, el número de muertes por cáncer es de 171,2 por cada 100,000 hombres y mujeres por año (INC, 2017), se conocen cerca de 200 tipos de cáncer. En 2017, la OMS señala que los tipos de cáncer diagnosticados con mayor frecuencia a nivel mundial son los de mama, cervicouterino, pulmón, estomago, colon y próstata. Los tratamientos actuales para tratar el cáncer han resultado poco eficientes, tienen muchos efectos adversos, que resultan ser más nocivos que la enfermedad misma. Es por eso que, en la búsqueda de alternativas para el tratamiento del cáncer, se ha evaluado la actividad antitumoral de algunos flavonoides *in vitro*. Entre los flavonoides estudiados, la quercetina, un flavonol que ha presentado una variedad de beneficios para la salud humana, así como su importancia comercial, se le ha atribuido propiedades como protector cardiovascular, prevención de las cataratas, efectos antihipertensivos, antioxidante, antiinflamatorio, entre otros. Sin embargo, su actividad antitumoral aun no es clara, por lo que en este trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de la Quercetina en la línea celular de cáncer cervicouterino CaSki, la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, la línea celular de cáncer de pulmón SK-LU-1 y la línea celular de cáncer de próstata PC-3. Nuestros resultados, mostraron que la Quercetina afecta el potencial proliferativo de las cuatro líneas celulares de una manera dependiente de la dosis, con unas IC_{50} obtenidas de 39 $\mu\text{g/ml}$ para CaSki y SK-LU-1 41 $\mu\text{g/ml}$ para PC-3 y 55 $\mu\text{g/ml}$ para MDA-B-231, siendo la línea celular de cáncer de mama la que presentó mayor resistencia al tratamiento. No obstante estas concentraciones, el ensayo de LDH para determinar la actividad necrótica de la Quercetina en las líneas celulares, mostró que la Quercetina indujo valores menores al 10% de LDH, indicando que la quercetina ejerce una baja o nula actividad necrótica en estas líneas tumorales mostrando que el decremento en el número celular no se debe a una muerte por necrosis. Con respecto a la actividad apoptótica de la Quercetina, los resultados de tinción nuclear con DAPI, así como los resultados de determinación de la caspasa-3 activa por citometría de flujo, indicaron que la Quercetina indujo a las células tumorales a presentar una morfología típica de células apoptóticas (tinción con DAPI), así como de inducir la presencia de la caspasa -3 activa, indicando que la Quercetina induce a las células tumorales a una muerte apoptótica. Con respecto al efecto antiproliferativo y necrótico de la Quercetina en las células no tumorales (linfocíticas), los resultados mostraron que la Quercetina afectó en menor grado la proliferación de las células linfocíticas, con un efecto necrótico bajo, que indica que la Quercetina presenta una actividad antiproliferativa con cierta acción selectiva, sin inducir muerte necrótica.

Introducción

La célula

En el universo biológico hay dos tipos de células: eucariotas y procariotas. La célula es la unidad estructural y funcional básica de los seres vivos. Las células eucariotas comprenden a todos los miembros de los reinos animal, vegetal, fungí y protista (Lodish, 2005). Las células que forman comunidades derivan del crecimiento y la división de una célula inicial única. Los factores ambientales, regulan los procesos metabólicos de la célula (Murray, 2013), la división celular es un ejemplo de estos procesos metabólicos, en este proceso las células se duplican y transmiten la información contenida en su material genético (ADN), generación tras generación (Alberts *et al.*, 2006). Esta división celular es necesaria en el cuerpo para reemplazar las células perdidas por desgaste, mal funcionamiento o por muerte celular. La célula lleva una serie de procesos metabólicos durante su crecimiento, duplicación y muerte celular.

El ciclo celular

En los organismos pluricelulares, la división es un proceso importante ya que la célula “madre” o progenitora heredará una copia exacta de su información genética a sus dos células “hijas” en cada división (Díaz, 2003), para que este proceso se lleve a cabo es necesario una serie de eventos coordinados citoplasmáticos y nucleares, donde la célula incrementa su tamaño, fabrica y adquiere los componentes necesarios para su división, estos eventos en conjunto son llamados ciclo celular. El ciclo celular regula a su vez cada división celular. Para la comprensión de este proceso, algunos autores han dividido el ciclo celular en etapas discretas que han denominado: G1, S, G2 y M.

La fase G1 o también llamado gap 1 es la fase que antecede a la fase S; en esta fase la célula incrementa el material enzimático, sus organelos se replican, así como otras moléculas y estructuras citoplasmáticas también aumentan en número.

El inicio de la fase S comienza cuando la célula adquiere el tamaño suficiente, las proteínas necesarias se han sintetizado y se tiene el ATP necesario, en esta fase el ADN es replicado correctamente; de lo contrario el ciclo se detiene.

La fase G2 o también llamada gap 2 se adquiere la maquinaria necesaria para la división; se confirma que el ADN este completo y correctamente duplicado. El material genético es compactado en unas estructuradas llamadas cromosomas; se forman los conjuntos de cromosomas que serán heredados en la fase M.

En la fase M o Mitosis es donde la célula se divide, originando dos células hijas con la misma carga genética. Seguida de esta fase sigue una cariocinesis donde la célula termina de dividirse citoplasmáticamente. Cuando la célula es dividida puede prepararse para una nueva división o permanecer en un estado conocido como G0.

La fase G0 es el estado de reposo y ausencia de crecimiento, característico de algunos tipos celulares. En esta fase la célula no avanza a través de las otras fases del ciclo porque no lo requiere o porque no es necesario, algunos ejemplos celulares detenidas en G0 son: las células nerviosas y las células hepáticas; en el cual puede permanecer por días, meses y a veces años (Díaz, 2003).

El ciclo celular es un proceso que está regulado por diversas moléculas, algunos son complejos proteicos que forman una red de interacciones y que guían el ciclo celular a través de cada fase. De entre estas proteínas se destacan las cinasas dependientes de ciclinas (CDK): que son proteínas que son fosforiladas en sus aminoácidos (Thr y Ser); las ciclinas (llamadas así por aparecer y desaparecer durante el ciclo): se encargan de activar y regular a las CDK a lo largo del ciclo celular (Quezada, 2007).

Estos complejos formados entre ciclinas y CDK, conforman los denominados puntos de control o “Check-points” que actúan en lugares cruciales del ciclo celular, es decir, entre el final de una etapa y el inicio de la siguiente; Los tres puntos de control claves se encuentran en G1, justo antes de entrar en fase S, el otro en G2 antes de la mitosis, uno más durante la fase M (Fig. 1). En estos puntos de control se examina el estado nutricional, la masa celular, procesos de crecimiento, estado del ADN, estados de las partículas, la carga genética, entre otros elementos necesarios para a un ciclo celular típico normal (Díaz, 2003). Dentro de una célula se tiene un sistema bien establecido para determinar el tiempo entre una fase y la siguiente, donde algunas moléculas “marcan” (por un sistema ubiquitina proteasa) a los complejos ciclina/CDK para su degradación, permitiendo que la célula siga el paso durante la siguiente fase del ciclo. Si un punto de control desencadena la siguiente fase sin que haya terminado la anterior puede ocasionar en la célula daños fatales en sus posteriores divisiones.

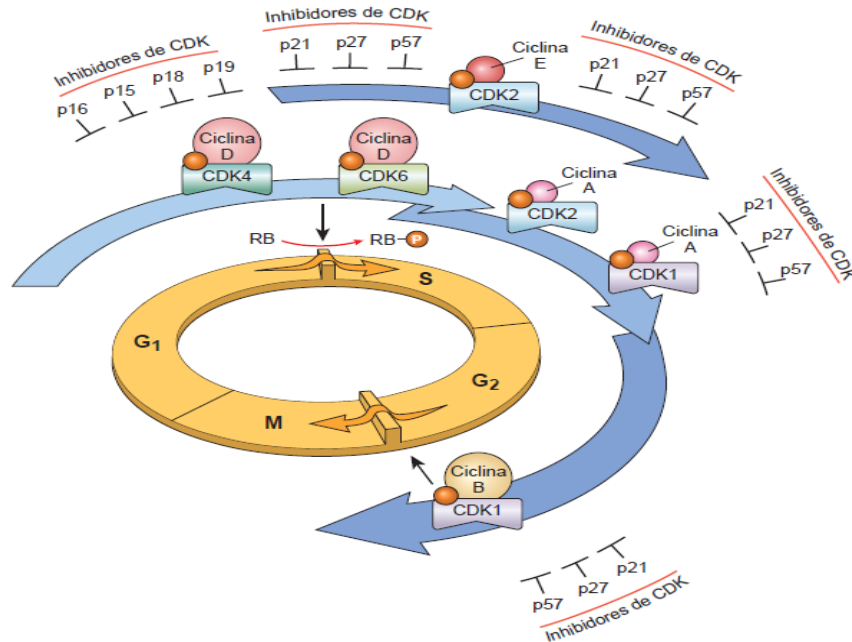


Figura 1. Fases del ciclo celular. Complejos ciclinas/CDK durante las fases del ciclo celular: G₁- S: ciclina D/Cdk 4, D/Cdk 6, ciclina E/cdk2; S: ciclina A/Cdk 2; G₂-M: ciclina A/Cdk 1, ciclina B/Cdk 1. Disponible en: <http://grupob2patologiausac.blogspot.mx/2014/08/>

Los organismos pluricelulares, se encuentran en constante renovación, exceptuando algunos tipos celulares como las neuronas y los hepatocitos, por lo que se debe establecer un equilibrio entre el control de la velocidad de división celular y el control de la muerte celular, este equilibrio es fundamental para mantener la homeostasis de los organismos, que garantiza una población adecuada de células en un tejido (Lizarbe, 2007). Ya que el número de células que conforman a un organismo adulto es constante por lo que hay una tasa de recambio celular; el cuerpo humano produce y erradica miles de millones de células al día. Por ello la muerte celular juega un papel fundamental en este equilibrio.

La muerte celular puede ocurrir de diversas formas, se abordarán dos de las principales muertes que pueden ser distinguidas claramente: la apoptosis o muerte celular programada y la necrosis.

Muerte celular

1. Apoptosis

En 1972 Kerr, Wyllie y Currie ocupan por primera vez el termino apoptosis, neologismo tomado del griego clásico (*apo*: “fuera de” o” separación” y *ptosis*: “caída”), término que hace alusión a la caída de las hojas desde los árboles en otoño o la de los pétalos de las flores (Jordán, 2003). Según Lizarbe (2007) la apoptosis es el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y que determinan su muerte de una forma regulada en respuesta a una serie de acontecimientos fisiológicos o patológicos. La apoptosis se considera como una muerte natural fisiológica, donde el resultado es la eliminación completa de la célula, esta muerte se da de manera selectiva, es decir en células no deseadas, dañadas o desconocidas; además de que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades (Jordán, 2003).

Las características principales de este tipo de muerte son:

1. Proceso altamente regulado y controlado por un grupo de proteínas proteasas, cisteinproteasas denominadas caspasas (cisteinyl proteasas específicas de aspartato); tienen un sitio activo donde se encuentra una cisteína, que escinde a sus proteínas diana sobre residuos altamente específicos de ácido aspártico. Estas proteínas se sintetizan en la célula en forma inactiva o procaspasas, éstas son activadas por otras caspasas cuando escinden en sus residuos de ácido aspártico (Alberts *et al.*, 2006). Estas proteínas se dividen en tres grupos: iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10), ejecutoras o efectoras (caspasas 3, 6 y 7) e inflamatorias (caspasas 1, 4, 5, 11,13 y 14) (Lodish, 2005). Debido a la alta biosíntesis de proteínas este proceso es energéticamente activo, es decir, requiere un gasto energético de ATP.
2. Proceso ordenado que sigue una secuencia de pasos desde que recibe el estímulo (intracelular o extracelular), la condensación nuclear (picnosis), la fragmentación del ADN en fragmentos de 180 a 200 pb o múltiplos, la condensación citoplasmática, la formación de vesículas por dilatación del retículo endoplásmico, translocación de la fosfatidilserina y la degradación de los cuerpos apoptóticos por fagocitosis (Lizarbe, 2007).
3. Proceso que mantiene la integridad de la membrana celular. Ya que se forman vesículas que provienen del retículo endoplásmico y se fusionan con la membrana; el contenido citoplasmático queda dentro de los cuerpos apoptóticos por lo que el contenido no se libera a la matriz extracelular y por lo tanto no desencadena un proceso inflamatorio.

Las vías por las que se puede desencadenar una apoptosis son:

Vía extrínseca o de receptor de muerte

La activación de la apoptosis por esta vía está mediada por receptores transmembrana. Estos implican receptores de muerte que son miembros de la súper familia de genes del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) (Cascales, 2003).

Estos receptores comparten dominios extracelulares ricos en citocinas y dominios citoplasmáticos o también llamado dominio de muerte, el cual es muy importante en el inicio de la señalización intracelular, ya que éste transmite la señal desde la superficie de la célula cuando el receptor se une a su ligando hasta la activación de moléculas citoplasmáticas que darán como resultado la apoptosis. Los receptores de muerte que pertenecen a la familia de TNF son: FasL / Fas, TNF- α / TNFR1, Apo3L / DR3, Apo2L / DR4 y Apo2L / DR5 (Elmore, 2007; Cascales, 2003).

El modelo que ha sido utilizado para describir la vía extrínseca es la que involucra a FasL/FasR. Cuando se une su ligando (FasL) a su receptor (FasR), los receptores se trimerizan (complejo de tres unidades FasR). El FasR se une con su dominio de muerte, dominio presente en la proteína adaptadora citoplasmática FADD que tiene un dominio efector de muerte. El dominio efector de muerte de FADD interactúa con el dominio efector de muerte de procaspasa 8, estos dominios se dimerizan y generan una compleja señalización inductora de muerte (DISC) y esta genera una activación autocatalítica de procaspasa 8. Caspasa 8 activa escinde a procaspasa 3, 6 o 7. Estas caspasas efectoras finalizan el proceso de muerte apoptótica (Elmore, 2007).

Paralelamente, la caspasa 8 puede activar la vía apoptótica mitocondrial al activar la proteína Bid, la cual puede promover la salida del citocromo c de la mitocondria, activar a la procaspasa 9 y la unión de ésta a APAF 1 formando el apoptosoma, activando este a su vez a las caspasas ejecutoras (Cascales, 2003) (Fig.2)

Vía intrínseca o mitocondrial

Esta vía es iniciada por eventos mitocondriales, estos eventos pueden ser inducidos por diversos factores: la ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas y citocinas, daños al ADN por radiación, luz UV, quimioterapia, hipoxia o altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS). Este daño es detectado normalmente por proteínas ATM o ATR, que fosforilan a p53 deteniendo el ciclo celular en la fase G1/S, donde el daño es reparado para continuar el ciclo celular (Elmore, 2007).

Cuando el daño al ADN es irreparable o muy grande, p53 desencadena el inicio de la apoptosis, por medio de la activación de las proteínas de la familia de Bcl-2 pro-

apoptóticas. Los miembros de esta familia tienen actividades diferentes que median la muerte celular. Éstas regulan la permeabilidad de la membrana mitocondrial y se pueden clasificar en subfamilias dependiendo de sus características estructurales y funcionales. Dependiendo de cómo actúan en el proceso de muerte se describen dos tipos de proteínas: antiapoptóticas, si lo bloquean (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-x, Bcl-XS, Bcl-w, BAG), y las proapoptóticas (Bim, Bid, Bik, Bad, Bax, Bak, PUMA y NOXA) (Lizarbe, 2007).

La proteína p53 activa genes de proteínas proapoptóticas como Bax o Bak, que se dirigen a la membrana mitocondrial y se anclan a oligómeros de estas proteínas a la membrana, en donde se polimerizan. (Cascales, 2003). El resultado de esta polimerización es un cambio en la membrana mitocondrial interna, que resulta en una apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial. Este poro provoca que se pierda el potencial transmembranal de la mitocondria y la liberación de proteínas pro-apoptóticas hacia el citosol (Citocromo C y Apaf-1) (Cascales, 2003).

Una vez que se libera el citocromo C se une y activa a Apaf-1, éste se oligomeriza y forma un complejo de 7 unidades, el mismo número de homodímeros de la procaspasa 9 y ATP, que en conjunto forman el “apoptosoma”. Cuando se forma el apoptosoma caspasa 9 queda activa y corta a su molécula diana, en este caso procaspasa 3 (Taylor, 2008; Elmore, 2007; Cascales, 2003).

Ambas vías convergen en la fase de ejecución en este caso en la activación de caspasa 3; como resultado de la activación de caspasa 3 se da la fragmentación del ADN, la degradación del citoesqueleto y proteínas nucleares, entrecruzamiento de proteínas, formación de cuerpos apoptóticos, expresión de ligandos para receptores de células fagocíticas y la absorción por las células fagocíticas, con la que culmina el proceso de apoptosis (Elmore, 2007).

Otra convergencia que puede existir entre ambas vías se da cuando caspasa 8 escinde a Bid (tBit) e interactúa en el citosol con Bax, lo que conduce a la liberación de citocromo C, a la activación del apoptosoma y la activación de procaspasa 9 (Lizarbe, 2007) (Fig. 2).

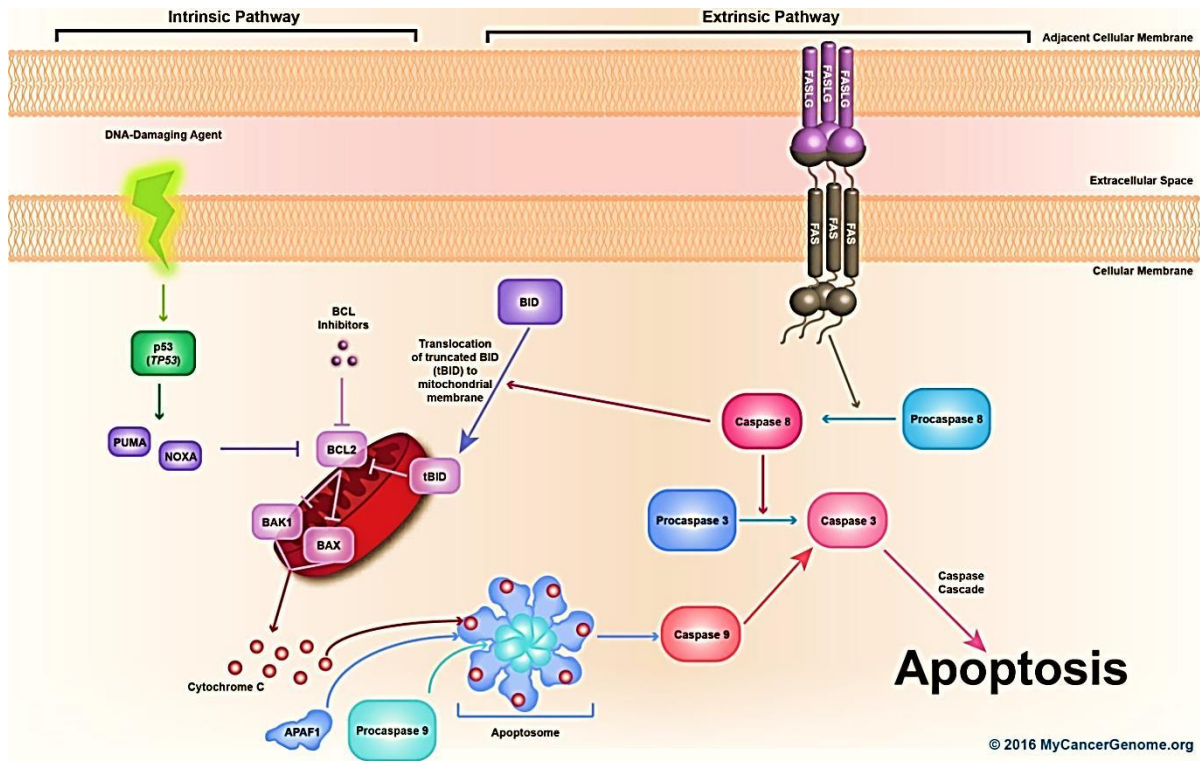


Figura 2. Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis. La vía extrínseca es activada por receptores de muerte en la membrana; la vía intrínseca es activada por p53, en respuesta a daños en el ADN. Ambas vías convergen en la activación de la caspasa 3. Tomado de <https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/pathways/apoptotic-signaling>

2. Necrosis

La necrosis del griego “*nekros*” que quiere decir muerte y este es utilizado para describir una muerte patológica de células o tejidos del organismo (Lizarbe, 2007). Este tipo de muerte es producida debido a agentes nocivos, condiciones o circunstancias determinadas, como es la isquemia, hipoxia, traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, la acción de sustancias químicas o tóxicos, o en infecciones o por el desarrollo de enfermedades autoinmunes; por lo cual este tipo de muerte es comúnmente asociada a la pérdida de células por patologías humanas (Alberts *et al.*, 2006) (Fig. 3).

Las características de este tipo de muerte son:

1. Pérdida de la integridad de la membrana con la consecuente lisis celular y liberación del contenido citoplasmático al exterior incluyendo a los orgánulos. La célula se hincha, se deterioran las estructuras celulares y se deterioran sus funciones esenciales (Lizarbe, 2007).

2. Es un proceso independiente de energía y no sigue un orden determinado, además de presentar una disfunción de la mitocondria que puede ser por condensación, hinchazón o rotura de la membrana, los organelos se encuentran alterados y la célula aumenta de tamaño (Cascales, 2003)
3. La célula pierde el control del flujo de iones, produciendo una reducción de gradientes de concentración de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , además de presentar cambios en la presión osmótica, lo que conduce a la captación de agua, la célula se hincha y por ello es considerada una muerte celular violenta (Elmore, 2007).
4. La activación del proceso inflamatorio, éste se da cuando el contenido citoplasmático es liberado al medio extracelular, el cual incide sobre las células adyacentes, generando señales quimiotácticas, lo que conduce al reclutamiento de células inflamatorias, dando lugar a la respuesta inflamatoria que es potencialmente perjudicial para los tejidos cercanos (Lizarbe, 2007).

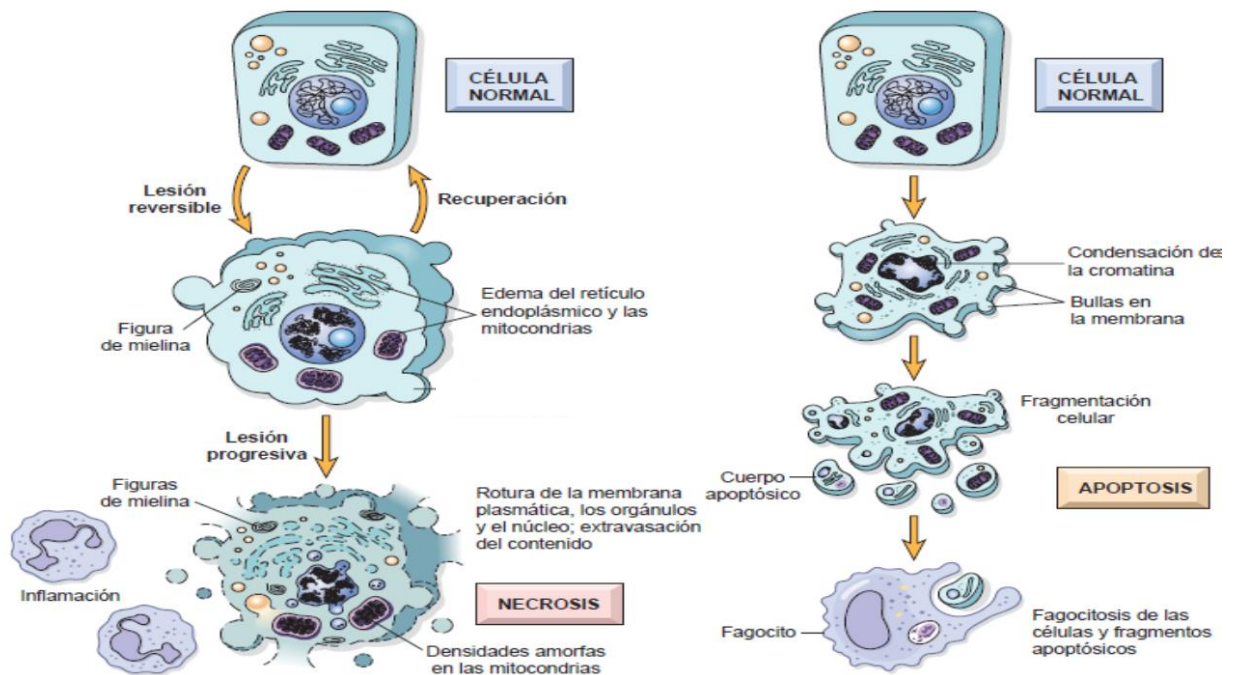


Figura 3. Diferencias de muerte celular necrótica y apoptótica. La muerte celular por necrosis es desordenada, independiente de energía y produce respuesta inflamatoria mientras que una muerte celular apoptótica es ordenada, regulada y controlada, que culmina cuando los cuerpos apoptóticos son fagocitados, sin activar el proceso inflamatorio. Disponible en: <http://patologiabcom6.blogspot.mx/2014/05/blog-post.html>

Las células de los organismos pluricelulares pertenecen a una comunidad que se encuentra bien organizada y coordinada. Esta comunidad está regulada de manera precisa, donde hay un equilibrio entra la velocidad de división celular y la muerte celular. Las células dañadas son eliminadas y reemplazadas (Alberts *et al.*, 2006).

Cáncer

Cuando una célula de la comunidad se encuentra dañada, de manera normal debería ser eliminada, sin embargo, ésta puede adquirir cambios que dañan a ciertas moléculas encargadas de controlar su ciclo celular.

Estos daños producen una multiplicación y proliferación descontrolada, aunque no sea necesario, que no es corregida y es heredada, lo que conlleva a un aumento en el número de células dañadas, produciendo una masa celular anormal, un tumor (Lodish, 2005); los tumores pueden ser benignos, cuando estos se encuentran encapsulados, facilitando su extracción, sin embargo, cuando éstos son capaces de invadir y diseminarse hasta llegar a la metástasis se convierten en malignos (Ríos, 1999). En el lugar donde aparece por primera vez la tumoración se le llama tumor primario, a pesar de que después genere metástasis,

La OMS, 2017 define al cáncer como un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo, donde el tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Los diferentes tipos de cáncer se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo celular a partir del cual se originan:

- Carcinomas: Cáncer de células epiteliales. Representa el 80% de los tipos de cáncer
- Sarcomas: Cáncer de células no epiteliales. Representa el 1% de los tipos de cáncer.
- Leucemias: Cáncer de células hematopoyéticas de cualquier linaje.
- Linfomas: Cáncer de células de la linfa o de origen linfoide que se asienta para formar tumores sólidos.

El origen del cáncer se desconoce, pero se sabe que sus causas pueden ser multifactoriales (factores físicos, químicos y biológicos), dentro de sus principales factores de riesgo se encuentran la exposición a agentes químicos del medio ambiente (contaminación), la edad, exposición a radiaciones constantes, estilo de vida etc. Actualmente se conocen cerca de 200 tipos de cáncer que son denominados según la zona de desarrollo (OMS, 2017).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, ocupa el segundo lugar en muertes al año después de las enfermedades cardiovasculares, en 2012 se diagnosticaron 14 millones de casos nuevos, el número de muertes por cáncer es de 171.2 por cada 100,000 hombres y mujeres por año, el número de casos nuevos de cáncer aumentará a 22 millones en las siguientes dos décadas (INC, 2017).

La OMS, 2017 señala que los tipos de cáncer diagnosticados con mayor frecuencia a nivel mundial son los de pulmón, hígado, estómago, colon y recto, mama y esófago. Por sexo, los cinco principales en las mujeres son el de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago, mientras que en los varones son el de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado (Fig. 4).

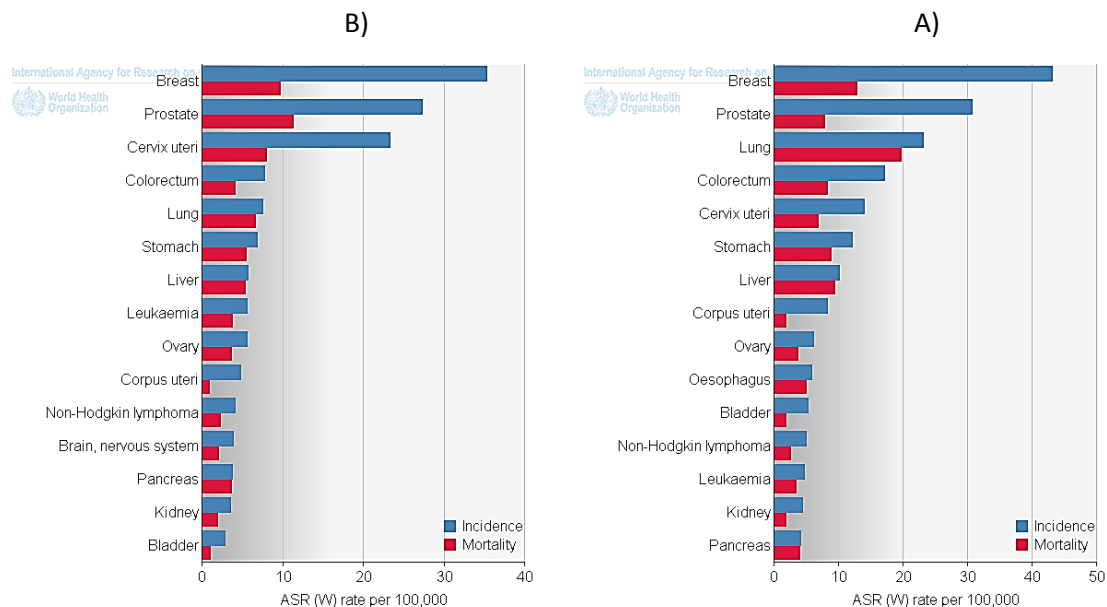


Figura 4. A) Incidencia del cáncer a nivel mundial, siendo los cánceres de mama, próstata, pulmón, colorrectal, cervicouterino y estómago los cinco principales en ambos sexos. **B)** Incidencia del cáncer en México, en los primeros lugares se encuentra el de mama, próstata, cervicouterino, colorrectal y de pulmón en ambos sexos, según GLOBOCAN 2012. Disponible en: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx

Cáncer Cervicouterino

El cáncer cervicouterino a nivel mundial ocupa el quinto lugar de incidencia y el sexto lugar por causas de muerte y la cuarta más frecuente entre las mujeres de 25 a 69 años, con un estimado de 528 mil casos diagnosticados anualmente, 266,000 defunciones anuales, 87% de las cuales ocurren en países subdesarrollados (GLOBOCAN, 2012).

En México la Secretaría de Salud reporta que el CaCu es la segunda causa de mortalidad por neoplasias malignas en la mujer al producir hasta 11 muertes por día. En México, GLOBOCAN, 2012 reporta que el CaCu ocupa el segundo lugar de incidencia con 13,900 casos nuevos, y la segunda causa de muerte con 265,672 fallecimientos. Las entidades con mayores tasas son Chiapas, Oaxaca, Veracruz y Campeche (INEGI, 2017).

El cáncer cervicouterino es una alteración celular que se origina en el epitelio del cérvix, que se manifiesta inicialmente a través de lesiones precursoras de lenta y progresiva evolución, éstas pueden confinarse en la superficie epitelial o un cáncer invasor a zonas distantes del tumor primario (CSG, 2010).

El cáncer cervicouterino se origina en las células que revisten el cuello uterino, la parte inferior del útero (matriz). Los dos tipos principales de células que cubren el cuello del útero son las células escamosas (en el exocérvix) y las células glandulares (en el endocérvix), éstos dos tipos de células confluyen en un lugar llamado zona de transformación. La ubicación exacta de la zona de transformación cambia a medida que envejece y si se presentan partos (Fig. 5).

La mayoría de los cánceres cervicouterinos se originan en las células de la zona de transformación. Estas células no se tornan en cáncer de repente, sino que las células normales del cuello uterino primero se transforman gradualmente con cambios precancerosos, como la aparición de verrugas, los cuales se convierten en cáncer.

El CaCu se clasifica de acuerdo a los tipos histológicos que se presentan:

- Escamocelular: También denominado epidermoide o espinocelular, 9 de 10 casos de los cánceres de cuello uterino son carcinomas de células escamosas y surge de la parte exterior del cuello uterino (ASC, 2014).
- Adenocarcinoma: Es menos frecuente y surge del tejido glandular del canal cervicouterino interno (endocérvix). Su pronóstico es más grave que el del escamocolumnar (ASC, 2014).

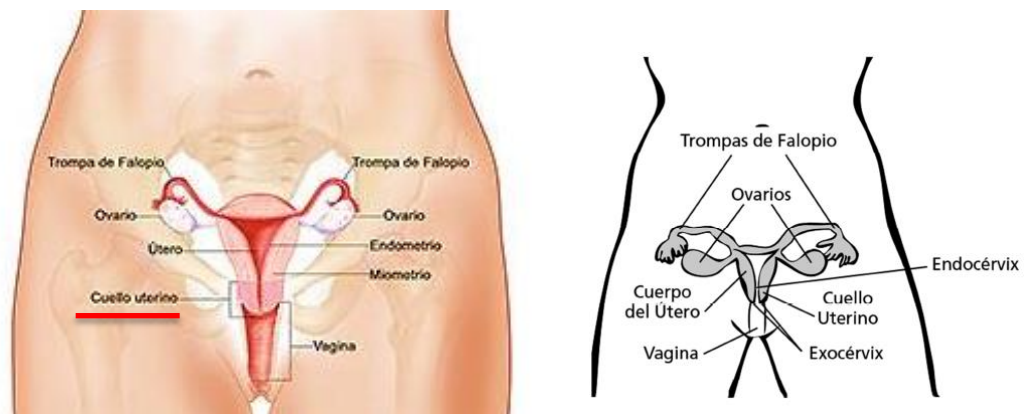


Figura 5. Anatomía del cuello uterino, que muestra la posición del endocérvix y la del exocérvix, así como la zona de transformación donde se da la generación del cáncer. Tomado y modificado de INC, 2017.

Factores de riesgo

Varios factores de riesgo aumentan la probabilidad de padecer cáncer de cuello uterino. Las mujeres sin estos factores de riesgo raramente padecen dicha enfermedad, aunque estos factores de riesgo aumentan las probabilidades de padecer cáncer de cuello uterino, muchas mujeres que los tienen, no lo padecen.

- **Virus del Papiloma Humano:** La prevalencia del VPH en CaCu es de 99.7%, demostrando la causa fundamental de la aparición de este carcinoma. Harald Zur Hausen fue Premio Nobel en 2009 al demostrar que el VPH es el agente causal de CaCu. En general, 50% de las mujeres estarán infectadas con VPH dentro de los 4 años de haber iniciado vida sexual activa (Acuña, 2013).

El VPH es un grupo de más de 150 virus relacionados, algunos de los cuales causan un tipo de crecimiento llamado papilomas, lo que se conoce más comúnmente como verrugas. El VPH se puede transmitir de una persona a otra durante el contacto con la piel. Una forma en la que el VPH se transmite es mediante el sexo, incluyendo el sexo vaginal, anal y oral (ASC, 2014).

El VPH es miembro de la familia Papovaviridae, que se caracterizan por ser pequeños, con un genoma de ADN circular, de doble cadena, de aproximadamente 8000 pb de longitud. Se encuentran catalogados de manera general en dos tipos: de alto y bajo riesgo de oncogenicidad. Dentro de los de alto riesgos se encuentran 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 67, 68 y de bajo riesgo se encuentran los tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72 y 81, éstos están presentes en las lesiones benignas (OMS, 2017). Para la aparición del CaCu es una infección resistente del VPH de alto riesgo especialmente los tipos 16 y 1, éstos suelen presentarse de manera más habitual.

En la infección latente el ADN viral permanece en el núcleo de manera circular, éste se mantiene sin replicarse y no ocurren cambios morfológicos, cuando se da una herida expuesta en las regiones del cuello uterino el virus comienza a replicarse, con generación de viriones, ésta se lleva a cabo en células escamosas diferenciadas, la pérdida del control de la proliferación celular son los genes virales transformantes E6/E7. La proteína E6 De 15 aa que liga Zinc y ésta forma un complejo con p53 y la enzima ubiquitina ligasa, produciendo su degradación. E7 es una proteína de 100 aa, ligante de Zinc que experimenta fosforilación permitiéndole unirse a través de su extremo N-terminal, a la proteína del retinoblastoma Rb, alterando su función (Rivera, 2006).

- **Edad:** La infección es más común en mujeres sexualmente activas, se estima que en mujeres de 18 a 30 años de edad.

- **Antecedentes familiares:** El cáncer de cuello uterino puede presentarse con mayor frecuencia en algunas familias. Cuando se tiene una descendencia directa es decir madre, abuela o hermanas lo padecen, algunos investigadores sospechan que algunos casos de esta tendencia familiar son causados por una condición hereditaria que hace que algunas mujeres sean menos capaces de luchar contra la infección con VPH que otras (ASC, 2014).
- **Tabaquismo:** Estudios epidemiológicos han demostrado que las pacientes con historial de tabaquismo tienen el doble de probabilidades de contraer infección por el VPH, siendo este un factor positivo para desarrollar CaCu (OMS, 2017).
- **Número de partos:** los cambios hormonales relacionados con el embarazo y los cambios hormonales en el momento del parto se han determinado como factores de riesgo potentes para desarrollar CaCu, debido a las lesiones que se producen y permiten la infección viral de VPH, especialmente cuando tienen más de tres partos (OMS, 2017).
- **Cambios frecuentes de pareja:** Se ha encontrado una asociación entre el número de parejas sexuales por cada mujer, entre más parejas tenga a lo largo de su vida, mayor será el riesgo (Rivera, 2006).

Cáncer de Mama

Es uno de los tipos de cáncer considerados problema de salud pública ya que es una de las principales causas de muerte en la población femenina, el cáncer de mama es el tumor con mayor incidencia en países en vías de desarrollo y desarrollados (SS, 2015).

A nivel mundial el cáncer de mama es la segunda neoplasia más frecuente en la población con una frecuencia estimada de 1.67 millones de nuevos casos diagnosticados anualmente, representando el 25% de los casos de cáncer en mujeres, es también la principal causa de muerte por un tumor maligno en la mujer latinoamericana con 43,208 defunciones al año (INEGI, 2017). Para México en el año 2013, se registraron 5,405 defunciones en mujeres por cada 100,000 mujeres ocupando el primer lugar en mortalidad por cáncer en la mujer (SS, 2015). A pesar de que el cáncer de mama es considerado típicamente femenina, también puede presentarse en varones, en una incidencia mucho menor, menos de 1% (0.5%), en tipo histológico predominante es el ductal invasor que representa el 90% de los casos (Cárdenas, 2013).

El cáncer de mama es el crecimiento anormal y desordenado de células del epitelio de los conductos o los lobulillos, El cáncer de mama puede originarse en diferentes partes del seno. La mayoría de los cánceres de seno comienza en los conductos que llevan la leche hacia el pezón (cánceres ductales), pero también pueden originarse en las glándulas que producen leche (cánceres lobulillares) (ASC, 2014). Las células cancerosas pueden diseminarse a través de la sangre o de los vasos linfáticos a todo el cuerpo invadiendo a otros tejidos (Fig. 6).

El cáncer de mama se puede clasificar por su lugar de origen del seno:

- Carcinoma ductal: Es el tipo de cáncer más frecuente, se presenta en 7 de cada 10 mujeres y éste se origina de las células que recubren los conductos lácteos del seno y éste puede ser *in situ*: El carcinoma ductal *in situ* (también conocido como carcinoma intraductal) se considera un cáncer de seno no invasivo o preinvasivo, en éste tipo las células no han invadido otros tejidos del seno. Invasivo: El carcinoma ductal invasivo o infiltrante es el tipo más común de cáncer de seno. Este cáncer comienza en un conducto lácteo del seno, penetra a través de la pared del conducto y crece en el tejido adiposo del seno. En este punto puede tener la capacidad de propagarse (hacer metástasis) hacia otras partes del cuerpo a través del sistema linfático y el torrente sanguíneo (ASC, 2014).
- Carcinoma lobulillar: Es el segundo tipo más común de cáncer de seno, presente en 1 de cada 10 mujeres con cáncer de seno. Este cáncer empieza en un lobulillo del seno (glándulas productoras de leche). Este puede ser *in situ*: en este caso la afección se encuentra en células anormales solo en los lobulillos, o puede ser invasor: cuando el cáncer se ha diseminado desde los lobulillos a tejidos cercanos (ASC, 2014).
- Cáncer inflamatorio de seno: es un tipo de cáncer de seno poco común. Morfológicamente el seno se torna de color rojizo, se hincha y se siente caliente al tacto, la piel puede presentar apariencia de hoyuelo, semejando una naranja, el color rojo y el calor ocurren porque las células cancerosas bloquean a los vasos linfáticos de la piel (ASC, 2014).

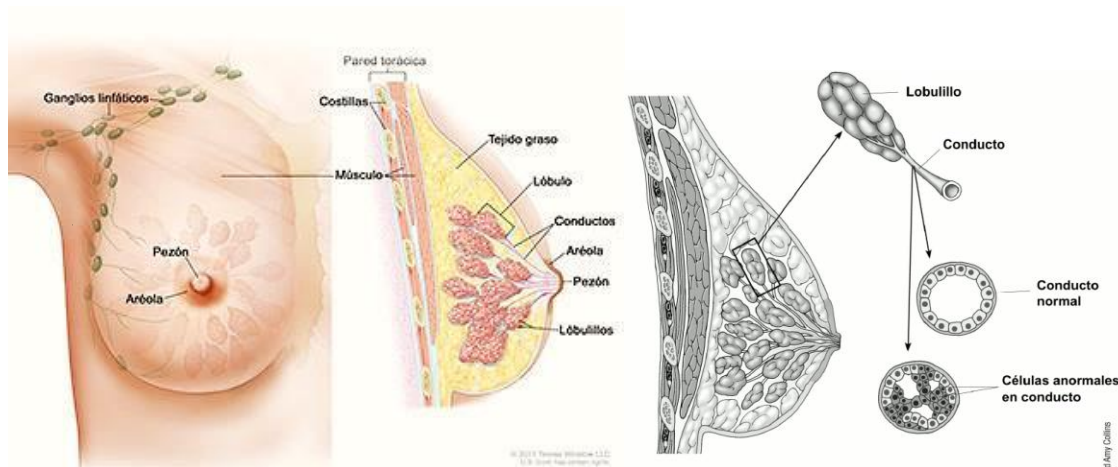


Figura 6. Anatomía del seno de una mujer, donde se muestra su morfología, los cánceres de mama se producen en los conductos (que transportan la leche hacia el pezón) y los lobulillos (glándulas encargadas de la producción de leche). Tomada de INC, 2017.

Factores de riesgo

Los factores de riesgo que se relacionan con la aparición del cáncer de mama son:

- **Edad:** Aunque el cáncer de mama puede afectar a cualquier mujer, el riesgo de padecerlo aumenta con la edad y la mayor incidencia se concentra entre los 50 y los 65 años.
- **Factores hormonales (reproducción y menstruación):** Las mujeres que hayan tenido más ciclos menstruales debido a que comenzaron la menstruación a una edad temprana (antes de los 12 años) presentan un riesgo ligeramente mayor de padecer cáncer de seno. Este aumento en el riesgo podría deberse a una exposición más prolongada a las hormonas estrógeno y progesterona durante la vida (ASC, 2014).
- **Obesidad:** El sobrepeso o la obesidad después de la menopausia aumentan el riesgo de cáncer de seno. Antes de la menopausia, sus ovarios producen la mayor cantidad de estrógeno, y el tejido adiposo produce solamente una pequeña cantidad. Por otro lado, después de la menopausia (cuando los ovarios dejan de producir estrógeno), la mayor parte del estrógeno de una mujer proviene del tejido adiposo. Un exceso de tejido adiposo después de la menopausia puede elevar los niveles de estrógeno y aumenta su probabilidad de padecer cáncer de seno (ASC, 2014)
- **Tratamiento hormonal sustitutivo:** La administración del tratamiento hormonal de larga duración (más de 5 años) que combina estrógenos y progesterona para tratar los síntomas de la menopausia no se recomienda. Debido a que se ha

demostrado que se valora un aumento de riesgo estimado de 3 casos adicionales al año por cada 1000 mujeres.

- **Antecedentes familiares:** Es importante señalar que la mayoría de las mujeres (alrededor de 8 de cada 10) que padecen cáncer de seno no tiene antecedentes familiares de esta enfermedad, pero: Las mujeres que tienen parientes consanguíneos cercanos con cáncer de seno tienen un mayor riesgo de padecer la enfermedad. El que un familiar de primer grado (madre, hermana o hija) padezca cáncer de seno casi duplica el riesgo de una mujer. El riesgo aumenta aproximadamente tres veces, si dos familiares de primer grado padecen la enfermedad (INC, 2017). Se cree que alrededor del 5 al 10 por ciento de los casos de cáncer de seno son hereditarios, lo que significa que se originan directamente de defectos genéticos (llamados mutaciones) que se adquieren de uno de los padres. La causa más común de cáncer de seno hereditario es una mutación hereditaria en los genes BRCA1 y BRCA2. En las células normales, estos genes ayudan a prevenir el cáncer al producir proteínas que ayudan a evitar el crecimiento anormal de las células. Las versiones mutantes de estos genes no pueden detener el crecimiento anormal, y pueden ocasionar el cáncer (ASC, 2014).
- **Consumo del alcohol:** El consumo de bebidas alcohólicas está claramente asociado a un aumento en el riesgo de padecer cáncer de seno. El riesgo aumenta con la cantidad de alcohol consumido. En comparación con las mujeres que no ingieren alcohol, las que consumen una bebida alcohólica diaria tienen un aumento muy ligero en el riesgo. Aquéllas que toman de dos a cinco bebidas al día tienen alrededor de 1 ½ veces más riesgo que las mujeres que no toman alcohol (ACS, 2014).

Cáncer de Pulmón

El cáncer de pulmón, con un estimado de 1.35 millones de casos nuevos cada año, es una de las enfermedades más graves y uno de los de mayor incidencia en el ser humano, es responsable de altos índices de mortalidad oncológica a escala mundial y la causa principal de mortalidad relativa al cáncer, con un estimado de casos nuevos de 244, 180 y 164, 770 muertes anticipadas en 2012 (Pérez Guerra, 2017). Su pronóstico global es malo con una supervivencia total a los 5 años del 15 %, debido a que se diagnostica en un estadio avanzado, cuando el paciente ya presenta síntomas (OMS, 2017).

Para México se reporta una incidencia de 9,148 casos y una mortalidad de 8,807 casos (OMS, 2008), en el 2010 se reportaron 74,685 muertes por cáncer de las cuales 6, 795 son por cáncer de pulmón ubicándose en primer lugar en nuestro país, el 68% de estas muertes se dieron en el género masculino. El cáncer de pulmón es más frecuente en la población masculina, sin embargo, se ha observado un aumento en la población femenina (ASC, 2016). El cáncer de pulmón se da

por la transformación de células epiteliales que reviste todo el árbol respiratorio y las células alveolares, este cáncer presenta una alta capacidad metastásica (Fig.7).

El cáncer de pulmón se clasifica en dos tipos principales: cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas, esta clasificación se da dependiendo de su morfología bajo el microscopio:

- **Cáncer de pulmón de células pequeñas o microcíticas:** Cerca del 13% de los cánceres de pulmón son cáncer de pulmón de células pequeñas, este tipo tiende a diseminarse con rapidez (INC, 2008). Las células de este tipo de cáncer parecen granos de avena de forma ovalada al verlas al microscopio; crece con rapidez y se disemina muy rápido hacia otros órganos. Este tumor es sumamente agresivo. Se disemina con mayor frecuencia a los ganglios linfáticos, al cerebro, hígado y glándulas suprarrenales (INC, 2008). Sin tratamiento tiene una media de supervivencia de solo 2 a 4 meses desde el momento de diagnóstico. Muestra la mayor relación con el tabaquismo, ya que el 98% de los pacientes que lo presentan con historia de tabaquismo (Moctezuma, 2009).
- **Cáncer de pulmón de células no pequeñas:** La mayoría de los cánceres de pulmón (cerca del 87%) son cánceres de pulmón de células no pequeñas, es el cáncer más frecuente, casi siete de cada ocho personas diagnosticadas con cáncer de pulmón lo padecen. Este tipo se disemina con más lentitud que el cáncer de pulmón de células pequeñas (INC, 2008).

Los tres tipos principales de cáncer de pulmón no microcíticos son: adenocarcinoma, ocupa el primer lugar en frecuencia epidemiológica (50%) es el tipo más común en pacientes no fumadores y suele localizarse en la periferia (pleura y pared torácica); carcinoma de células escamosas, representa el 30 % de todos los casos de cáncer de pulmón, muestra una fuerte relación con el consumo de tabaco, las células son delgadas y planas, asemejándose a escamas de pescado, su crecimiento es relativamente lento y suele localizarse en la parte central del pulmón y carcinoma de células grandes, ocupa el 5% de casos y puede surgir en cualquier parte del pulmón, tiene un mal pronóstico y también es asociado con el tabaquismo (ASC, 2016).

Factores de riesgo

La incidencia de cáncer de pulmón ha crecido como consecuencia del hábito de fumar, debido a que el humo de tabaco causa la mayoría de los casos de cáncer de pulmón, generado como consecuencia de las lesiones del humo sobre las células (INC, 2017).

- **Tabaquismo:** Fumar es definitivamente el factor de riesgo más importante del cáncer de pulmón. Se cree que aproximadamente 80% de todas las muertes por

cáncer del pulmón se deben al hábito de fumar, y este número es probablemente aún mayor para el cáncer de pulmón microcítico. Es poco común que una persona que nunca haya fumado padezca cáncer de pulmón (ASC, 2016). Se han encontrado casos donde el cáncer de pulmón se presenta en “fumadores pasivos” o también llamados pacientes que inhalan humo de segunda mano (o humo de tabaco ambiental), son personas que no fuman, pero respiran el humo que otros producen; se cree que el humo de segunda mano causa más de 7,000 muertes por cáncer de pulmón cada año (INC, 2017).

- **Exposición a radón:** El radón es un gas radiactivo que se produce naturalmente cuando se descompone el uranio en el suelo y las rocas. No se puede ver, no tiene sabor ni tiene olor. Según la U.S. Environmental Protection Agency (EPA), el radón es la segunda causa principal de cáncer de pulmón, y es la causa principal entre los no fumadores (ASC, 2016).
- **Exposición a asbesto:** Las personas que trabajan con asbesto (como en algunos molinos, minas, fábricas textiles, lugares donde se usa material de aislamiento, y astilleros) tienen una probabilidad varias veces mayor de morir de cáncer de pulmón. El riesgo de cáncer de pulmón es mucho mayor en los trabajadores expuestos al asbesto y que también fuman. Cuando se inhala el asbesto las células del árbol respiratorio se dañan (ASC, 2016).

Cáncer de Próstata

El cáncer de próstata es una de las neoplasias malignas más frecuente en los hombres y se incrementa conforme aumenta la edad. El 87.6% de las defunciones se registraron en la población mayor de 65 años (SS, 2001). Para México a partir de estudios sobre autopsias se ha encontrado que el 10.6% en los varones de 50 a 59 años, el 43.6% entre los 80 y 89 años y el 83% de los varones de 90 a 99 años tienen cáncer de próstata (INC, 2017).

A nivel mundial, es la cuarta neoplasia más común en el hombre con un 16.5% de mortalidad y una incidencia del 21.4 % (GLOBOCAN, 2012). En México la incidencia es de 14,016 casos de cáncer de próstata (21.4%) del total de 65,540 casos de cáncer, con una mortalidad de 6,367 casos (16.5%) (Sotomayor, 2012).

La próstata es una glándula que sólo tienen los hombres. El cáncer de próstata se origina cuando las células de la próstata comienzan a crecer sin control, esta glándula produce parte del líquido que conforma el semen. La próstata se encuentra debajo de la vejiga y delante del recto, su tamaño cambia con la edad. En los hombres más jóvenes, la próstata es del tamaño aproximado de una nuez. Sin embargo, puede ser mucho más grande en hombres de más edad. Algunos cánceres de próstata pueden crecer y propagarse rápidamente, pero la mayoría crece lentamente (ASC, 2016) (Fig. 7).

Más del 95% de todos los carcinomas prostáticos son adenocarcinomas, el 97% de los tumores se originan en la periferia. La histología del cáncer de próstata es muy importante; se ha observado que un 95% son adenocarcinomas originados en la porción glandular de la próstata y sólo un 4% es transicional, escamoso o endometroide, éstos derivan de los conductos y por lo tanto son hormono independiente. El 1% son sarcomas (SS, 2001).

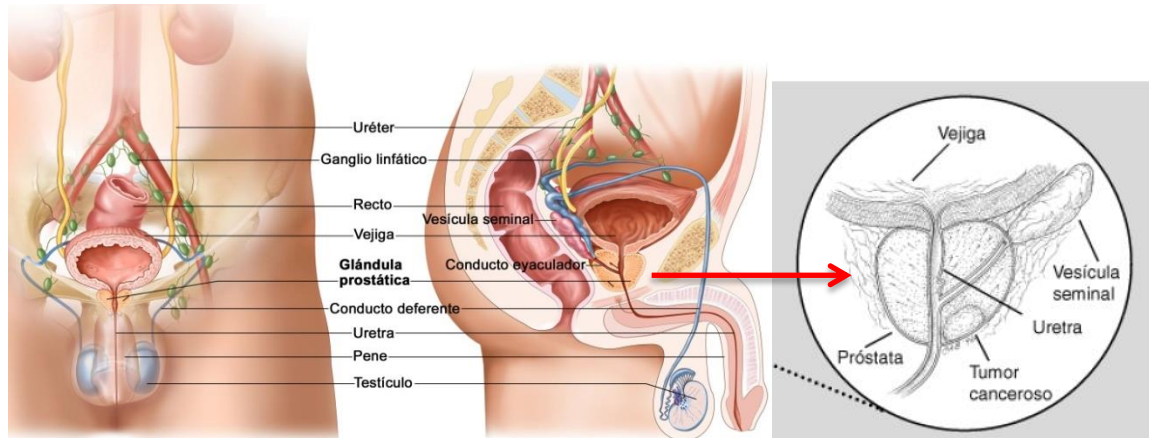


Figura 7. Anatomía de la próstata, las células cancerosas obstruyen la función de la glándula y los tejidos adyacentes, cuando el tumor aumenta de tamaño produce dolor severo. Tomado y modificado de INC, 2017.

Factores de riesgo

- **Edad:** En este tipo de cáncer la edad es de los factores de riesgo más importantes. Es poco común que el cáncer de próstata afecte a los hombres menores de 40 años, pero la probabilidad de padecer cáncer de próstata aumenta rápidamente después de los 50 años. Alrededor de 6 de 10 casos de cáncer de próstata se detectan en hombres mayores de 65 años (ASC, 2016).
- **Antecedentes familiares:** Parece ser que el cáncer de próstata afecta más a algunas familias, lo cual sugiere que en algunos casos puede haber un factor hereditario o genético. También existiría una predisposición familiar, pariente en primer grado tiene un riesgo 10% mayor de tener un cáncer prostático (SS, 2001).
- **Alimentación** La función exacta que desempeña la alimentación en el desarrollo del cáncer de próstata no está clara, aunque se han estudiado varios factores. Algunos estudios han sugerido que los hombres que consumen una gran cantidad de calcio (proveniente de alimentos o complementos) pueden tener un mayor riesgo de padecer un cáncer de próstata. Es posible que los productos lácteos (los

cuales a menudo tienen mucho calcio) también puedan aumentar el riesgo (ASC, 2016).

- **Mutaciones genéticas hereditarias:** Algunas mutaciones genéticas pueden ser transmitidas de una generación a otra, y se encuentran en todas las células del cuerpo. Estas mutaciones son hereditarias. Los cambios genéticos hereditarios causan aproximadamente de 5% a 10% de los cánceres de próstata. El cáncer causado por genes hereditarios se denomina cáncer hereditario. HOXB13: este gen es importante en el desarrollo de la glándula prostática. Las mutaciones en este gen han sido vinculadas al comienzo temprano del cáncer de próstata (cáncer de próstata diagnosticado a una edad temprana) que tiende a darse en algunas familias. Afortunadamente, esta mutación es poco común (ASC, 2016).

Tratamientos

Hay cerca de 200 tipos diferentes de cáncer, que afectan a cuatro de cada 10 personas en algún momento de su vida, por lo que no es fácil hallar un tratamiento eficaz para el cáncer de una persona en particular (Benedi, 2006). Los servicios de un tratamiento, en un contexto social, tiene como objetivo curar la enfermedad o prolongar la vida del paciente de forma considerable mientras se garantiza una buena calidad de vida (OMS, 2017).

Actualmente el tratamiento contra el cáncer está determinado por su localización y el grado de avance en el que se ha diagnosticado, de manera general se utiliza tres tratamientos que varían de acuerdo a cada individuo, éstos pueden ser aplicados de manera individual o combinados también llamado tratamiento multidisciplinar (Gaviria, 2007): La cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia son los tratamientos que han proporcionado un cierto grado de efectividad sobre esta enfermedad. Cabe mencionar que ninguno de estos tratamientos garantiza que el cáncer quede erradicado por completo o vuelva a presentarse.

Se puede dividir a los diferentes tratamientos en (INC, 2017)

1. Tratamiento local: Cirugía y radioterapia; controlan la enfermedad en áreas localizadas y específicas.
2. Tratamiento sistémico: Quimioterapia, tratamientos dirigidos e inmunoterapia. Destruyen células en todo el cuerpo.

Cirugía

La cirugía o intervención quirúrgica, consiste en la extirpación del tumor o del tejido afectado, según la región donde se encuentre, no produce un daño mayor a otros órganos del cuerpo, aunque éste resulta efectivo cuando se localiza la masa tumoral, puede presentar algunas desventajas, como son hemorragias, infección postoperatoria, sangrado y largo tiempo de recuperación. Si el cáncer se encuentra en metástasis este tratamiento resulta poco eficiente (Gaviria, 2007).

Radioterapia

La radioterapia, terapia de rayos X o irradiación consiste en la aplicación de radiaciones ionizantes sobre el campo donde se encuentra el tumor con el fin de erradicarlo y/o su crecimiento y la multiplicación de estas células cancerosas donde es aplicada la radiación. Estas radiaciones, destruyen el material genético de las células cancerosas, haciendo que el daño sea irreparable (Rodríguez, 2010). La finalidad de la radioterapia es destruir el mayor número posible de células cancerosas y limitar el daño que sufre el tejido sano de

alrededor (INC, 2017). Se utiliza en casos iniciales que no pueden ser operados y en estados avanzados junto con otro tratamiento.

Quimioterapia

La quimioterapia utiliza medicamentos para reducir los tumores y minimizar el riesgo de que el cáncer se extienda a otras partes del organismo, los medicamentos también son llamados antineoplásicos, un mismo fármaco puede tener más de un modo de acción sobre la célula tumoral, aunque habitualmente predomina uno de ellos. En la quimioterapia los fármacos se administran vía intravenosa o vía oral, que van por la circulación sanguínea para matar a las células cancerosas de todo el cuerpo (OMS, 2017).

Dependiendo de la administración de los quimioterapéuticos se pueden catalogar en (Euguino, 2005):

- Quimioterapia de inducción o neoadyuvante: La quimioterapia se administra en primer lugar, antes de cualquier tratamiento local como la radioterapia o la cirugía. Teniendo como objetivo disminuir el tamaño del tumor, realizando tratamientos menos agresivos.
- Quimioterapia concomitante: Se administra de forma simultánea a la radioterapia. Permite mejorar la eficacia del tratamiento.
- Quimioterapia adyuvante: Se realiza de forma complementaria después de la cirugía, para prevenir recaídas.

La clasificación que se utiliza actualmente se basa en la diana o punto de acción del antineoplásico: antineoplásicos que actúan sobre el ADN, antineoplásicos que actúan sobre receptores de membrana y antineoplásicos que actúan sobre el sistema inmunitario (Benedí, 2006).

A pesar de la efectividad de los antineoplásicos sobre las células tumorales, éstos no son selectivos porque atacan a células normales que se encuentran en una división constante como son las células epiteliales, capilares etc. por ello las enfermedades neoplásicas se deben tratar con la máxima dosis tolerable para producir el mayor porcentaje de muerte celular posible (Benedí, 2006) resultando tóxicos para el organismo.

Como todos los medicamentos, éstos presentan efectos secundarios como son las náuseas, vómitos, diarrea, alteración en las células perceptivas del gusto, daños a la médula ósea; generando bajos niveles de plaquetas, anemias e inmunodepresión (Euguino, 2005).

Inmunoterapia

La inmunoterapia son tratamientos que refuerzan el sistema inmunitario de la misma persona para que luche contra el cáncer. Algunos tipos de cáncer logran evadir el sistema inmune o debilitarlo para no ser detectados y eliminados, permitiendo a las células

cancerosas crezcan y se diseminen a los tejidos cercanos. Conociendo como es que las células evaden el sistema inmunitario, se ha dado pauta al desarrollo de estrategias para reforzar la respuesta inmunitaria contra los tumores.

En la búsqueda de tratamientos que resulten altamente efectivos contra el cáncer, donde éstos garanticen una calidad de vida digna del paciente, erradiquen o controlen la enfermedad, se han realizados estudios que involucran productos de origen natural. Sin embargo, ha sido difícil identificar componentes específicos responsables de este efecto. Muchos fitoquímicos han demostrado ser biológicamente activos y pueden interactuar para proteger contra el cáncer (Lôic, 2002).

Flavonoides

Los estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de verduras, frutas y té se asocia con un bajo riesgo de cáncer. Los flavonoides constituyen un grupo de sustancias naturales polifenólicas que se encuentran presentes de forma natural en diferentes flores, frutas, verduras, semillas y bebidas derivadas de plantas como el té y el vino tinto, y son los responsables de su color característico. Los flavonoides, forman un grupo de alrededor de 3,000 compuestos fenólicos que tienen una estructura química similar (Soriano, 2003). Los flavonoides cumplen diferentes funciones en las plantas, como antioxidantes, protectores de las radiaciones ultravioletas y como antibióticos contra microorganismos fitopatógenos (Escamilla, 2009).

La síntesis de los flavonoides tiene lugar en las plantas a partir de unidades de acetato y aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y la tirosina, después, estas dos últimas, dan lugar a los ácidos cinámico y parahidroxicinámico; siendo que al condensarse con las unidades de acetato dan origen a la estructura cinamol de los flavonoides. Más tarde se forman los derivados glicosilados o sulfatados (Escamilla, 2009) por lo que pueden presentarse en forma de aglicona y glicosilados. Se han identificado más de 5000 variedades de flavonoides que se agrupan en flavonas, flavonoles, antocianinas, flavanoles, flavanonas e isoflavonas (Fig. 8).

Los flavonoides comparten una estructura química básica, que consiste en dos anillos aromáticos unidos por una cadena de tres carbonos que forman un anillo heterocíclico oxigenado, las diferencias en el anillo como el estado de oxidación y los grupos funcionales, es la base de la clasificación de los flavonoides. Los grupos funcionales hidroxilo se encuentran en los tres anillos y estos grupos son sitios de unión a carbohidratos. Los flavonoides que están unidos a una o más moléculas de azúcar son conocidos como flavonoides glicosilados y los que no cuentan con azúcares se denominan agliconas (Erdman, 2007).

Los flavonoides al ser incluidos en la dieta diaria han sido evaluados para algunas enfermedades donde se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorales y antioxidantes. De los flavonoides más abundantes se encuentran: la tangeretina, naringinina, genisteina, rutinina y la quercetina. La Quercetina representa el 60-75% del total de los flavonoles consumidos (Escamilla, 2009).

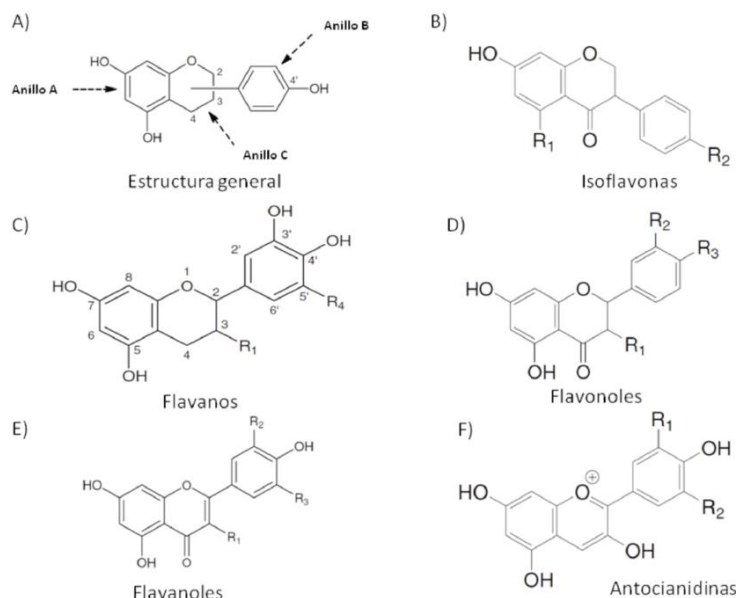


Figura 8. Estructura de los principales flavonoides. La diferencia entre ellos radica principalmente en el grupo -OH y en el grado de saturación que presenta el anillo C. En la imagen se muestran en A) la estructura general de flavonoides, B) Isoflavonas, C) Flavanos, D) Flavonoles, E) Flavanoles y F) Antocianidinas. Disponible en <https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Estructura-de-los-principales-flavonoides>

Quercetina

La Quercetina es uno de los flavonoles representativo de todos los flavonoides, éste se encuentra en frutas y verduras de manera natural; por ejemplo: los arándanos presentan las mayores cantidades de quercetina, 147 mg/100 g; la cebolla, 54 mg/100 g, mientras que en las bebidas derivadas de las plantas como el té blanco tiene concentraciones de 2.5 mg/100 ml (Vicente, 2013).

La quercetina está presente en la dieta diaria y se estima un consumo del 60 al 70 % diarios, sin embargo también se encuentra comercializado como suplemento alimenticio (AESAN, 2013). En los alimentos, la quercetina se puede encontrar en forma de aglicona (sin unión a azúcar), de glicósido (unido a un azúcar) o incluso en ambas formas (Vicente, 2013). (Fig. 9)

De este modo presenta una absorción de 52% del total ingerido. El azúcar unido a la quercetina hace que la molécula sea más hidrofílica y que tenga mayor peso molecular (Lamson, 2000). La vida media de la quercetina no está descrita claramente. En humanos se ha estimado que es de 31-50 horas, con un pico de concentración en plasma a la media hora y otro a las 8 horas tras la ingesta de 100 mg (Vicente, 2013).

La quercetina tiene numerosos efectos beneficiosos para la salud humana, incluyendo actividad antitumoral, protección cardiovascular, prevención de las cataratas, efectos antihipertensivos, antioxidante, antiinflamatorio (Midlenton, 2000).

Galati y O'Brien (2004) también revisaron la capacidad de ciertos flavonoides para prevenir el desarrollo de tumores y también planteó la posibilidad de interacciones flavonoides-fármacos. Los efectos anticancerígenos y antiinflamatorios de la quercetina se relacionan a las propiedades antioxidantes y de eliminación de radicales libres (Stavric, 1994; Formica, 1995).

Se ha demostrado un efecto antiproliferativo donde se han realizado estudios sobre diferentes líneas de cáncer, sin embargo, no se ha podido determinar a qué se debe este efecto inhibitorio (Nguyen, 2004), se ha sugerido que la acción de los flavonoides es probablemente mediada por cualquiera interacción con los sitios de unión de estrógenos tipo II (Ranelletti, 1992)

Tiene actividad antiproliferativa *in vitro* contra varias células cancerosas de origen humano. Detiene el ciclo celular en la transición G1/S en células de cáncer de colon y cáncer gástrico, así como en células leucémicas (Galati, 2004). Estas propiedades descritas de la quercetina la convierten en un candidato prometedor para el tratamiento y prevención de varios tipos de cáncer.

Además de la Quercetina, existen otros flavonoides que estructuralmente son muy parecidos a ésta, ejemplo de ello son la Quercetagina y la Patuletina, los cuales están poco distribuidos en el mundo vegetal y su estudio es muy pobre. Por ello, este proyecto, tiene la intención de evaluar la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de la Quercetina en diferentes líneas tumorales, cuyos resultados permitan ser punto de comparación con la Quercetagina y la Patuletina, para establecer una relación entre la estructura y sus actividades biológicas, así como el determinar su potencial como agentes anticancerígenos.

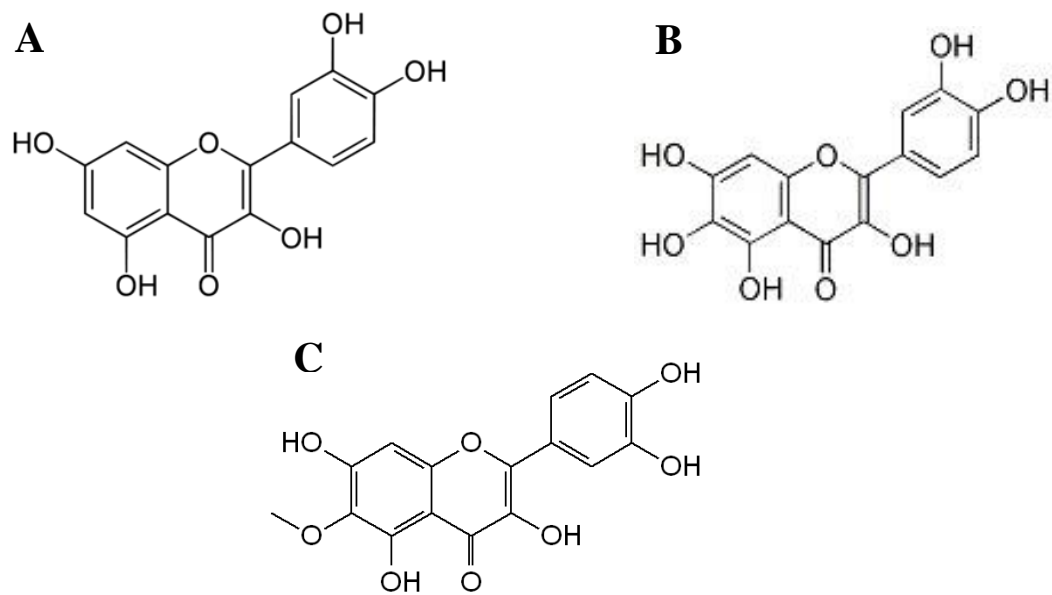


Figura 9. A. Estructura de la quercetina (3, 30, 40,5, pentahidroxiflavona) es uno de varios flavonoles dietéticos naturales compuestos, que pertenecen a un amplio grupo de polifenóles. La quercetina se puede obtener de las plantas mediante la extracción de los glucósidos de quercetina seguidos de hidrólisis para liberar la aglicona y la posterior purificación; B. Estructura de la Quercetagetina (6-Hydroxiquercetina); C. Estructura de la Patuletina (6-methoxyquercetina).

Planteamiento del problema

Los tratamientos que se emplean contra el cáncer resultan ser poco eficientes cuando el cáncer es metastásico y los tumores son de difícil acceso. Además, los fármacos quimioterapéuticos resultan ser muy citotóxicos y de baja selectividad, generando efectos colaterales graves para el paciente. Por ello, en los últimos años ha surgido el interés por el estudio farmacológico de compuestos naturales, que presenten actividad antiproliferativa, de baja citotoxicidad y de acción selectiva, capaces de inducir en las células tumorales una muerte por apoptosis, con la intención de caracterizarlos como agentes anticancerígenos con potencial terapéutico. Entre los compuestos que han causado un gran interés debido a sus actividades biológicas, se encuentran los flavonoides. Por ello los flavonoles han presentado una ventana de investigación para ser considerados como fuertes candidatos para ser estudiados como agentes anticancerígenos. La Quercetina es un flavonol que ha sido descrito con propiedades antiproliferativas, antioxidantes, bactericidas, entre otras, lo cual lo posiciona como un punto de partida en el estudio de los flavonoles que potencial anticancerígeno, por lo cual fue evaluado en las líneas celulares tumorales de cáncer cervicouterino CaSki, cáncer de mama MDA-MB-231, cáncer de pulmón SK-LU-1 y cáncer de próstata PC-3

Justificación

El cáncer representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial con 14 millones de casos nuevos y 8.2 muertes al año. Se estima que los casos aumenten a 22 millones en las siguientes dos décadas en los países en vías de desarrollo, representando un problema de salud pública que afecta en conjunto a la población. Dentro de los tipos de cáncer con mayor incidencia a nivel mundial se encuentra el cáncer cervicouterino, mama, pulmón y próstata. A nivel nacional, en la mujer Mexicana se encuentran el cáncer de mama y el cáncer cervicouterino, mientras que en los varones el cáncer de próstata es el más incidente y para ambos sexos, el cáncer de pulmón tiene una alta incidencia. Por ello, es necesario la implementación o mejora de los tratamientos aplicados al cáncer.

Hipótesis

Se ha descrito que los flavonoides y sus derivados presentan actividad antiproliferativa y apoptótica sobre líneas celulares tumorales, sugiriendo que el compuesto Quercetina, perteneciente al grupo de los flavonoides, presente características antiproliferativas y apoptóticas en las líneas tumorales SK-LU-1, CaSki, MDA-MB-231 y PC3 así como en células no tumorales.

Objetivos

General

Evaluar la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de la Quercetina en cultivos de células de cáncer cervicouterino (CaSki), cáncer de mama (MDA-MB-231), cáncer de pulmón (SK-LU-1) y cáncer de próstata (PC-3), así como en células no tumorales (cultivos de células linfocíticas humanas provenientes de sangre periférica).

Particulares

- Evaluar el efecto antiproliferativo de la Quercetina en las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231, SK-LU-1 y PC-3, expresada como la concentración necesaria del compuesto para abatir en un 50% la densidad celular (IC_{50}), mediante la técnica de tinción con cristal violeta.
- Evaluar el efecto necrótico de la Quercetina, en los cultivos de las líneas tumorales CaSki, MDA-MB-231, SK-LU-1 y PC-3, a través de la actividad de la enzima citoplasmática Lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes provenientes de los cultivos celulares.
- Evaluar la actividad apoptótica de la Quercetina en las líneas celulares CaSki, MDA-MB231, SK-LU-1 y PC-3, a través de la observación de características morfológicas celulares, típicas de las células apoptóticas, mediante la tinción con el fluorocromo DAPI, así como la detección de la caspasa-3 activa determinada por citometría de flujo.
- Evaluar si las concentraciones de IC_{50} determinadas en las líneas tumorales, afectan el potencial proliferativo de células linfocíticas de sangre periférica humana, mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceína.
- Evaluar si las concentraciones de IC_{50} determinadas en las líneas tumorales inducen a las células linfocíticas de sangre periférica humana, a una muerte necrótica mediante la detección de la actividad de la enzima citoplasmática LDH en los sobrenadantes celulares.

Procedimiento

1. Preparación del stock de la Quercetina

Un miligramo de Quercetina fue pesado y solubilizado en 100 microlitros de Etanol absoluto, con una concentración final de 10 microgramos/1 microlitro.

Cultivo de células tumorales CaSki, MDA-MB-231, SK-LU-1 y PC-3

Las líneas celulares de cáncer cervicouterino (CaSki), cáncer de mama (MDA-MB-231), cáncer de pulmón (SK-LU-1) y cáncer de próstata (PC-3) fueron obtenidas del ATCC.

Las líneas celulares fueron sembradas en cajas Petri de cristal de 2.5cm de diámetro, con medio de cultivo RPMI, con suplemento de L-glutamina y bencilpenicilina, rojo de fenol y 5% de suero de neonato para las líneas celulares CaSki y SK-LU-1. En la línea celular PC-3 se usó 5% de suero fetal bovino, mientras que en la línea celular MDA-MB-231 se usó suero fetal bovino al 15% y DMEM como medio de cultivo. El Suero fue desactivado previamente a 57 °C por 30 minutos. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora a 37 °C, en una atmósfera de humedad saturante y CO₂ al 5%. Las células fueron utilizadas a partir de un cultivo celular en fase de proliferación a un 60 % de saturación en condiciones óptimas.

3. Determinación de la concentración requerida para la inhibición del 50% de la población (IC₅₀) de células tumorales.

De las líneas celulares tumorales CaSki, MDA-MB-231, SK-LU-1 y PC-3 se sembraron 3,000 células por pozo, en cajas de cultivo de 96 pozos (Corning, USA), en 100 microlitros de medio de cultivo RPMI con su respectivo suero durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se adicionó 100 microlitros de RPMI y sus respectivos sueros con concentraciones de 0 a 100 microgramos de Quercetina por ml, utilizando controles 1. Control al cual solo se le cambió el medio de cultivo por medio de cultivo fresco y 2. Control vehículo donde se agregó 10 microlitros de ETOH absoluto en 1ml de RPMI durante 24 horas. Posteriormente se evaluó el número celular mediante la técnica de incorporación de cristal violeta de Koeng y colaboradores (1989), donde a la placa de 96 pozos se le retiró el medio de cultivo y se le agregó 20 microlitros de glutaraldehído al 1.1% durante 20 minutos en agitación moderada, transcurrido el tiempo se retiró el glutaraldehído y la placa fue lavada con agua desionizada y se dejó secar. Se agregó el colorante de cristal violeta al 0.1% en 20 microlitros de ácido fórmico y se dejó actuar durante 20 minutos más en agitación moderada, transcurrido el tiempo, se recuperó el colorante y la placa fue lavada con agua desionizada y se dejó secar una vez más. Para finalizar la tinción, se agregó 20 microlitros de ácido acético al 10% durante 20 minutos en agitación moderada para solubilizar el

colorante incorporado al núcleo celular. La placa fue leída en un lector de placas para ELISA a una longitud de onda de 590 nm. Cada condición se realizó por sextuplicado, los resultados obtenidos fueron expresados como porcentaje del número celular y presentados en porcentaje celular mediante la siguiente fórmula % de proliferación celular = (Absorbancia del tratamiento) (100%)/(Promedio de absorbancia del control). Mediante regresión lineal, para obtener una curva dosis-respuesta, se obtuvo la IC_{50} utilizando el programa de Microsoft Office Excel 2010 con la ecuación de la tendencia lineal, $IC_{50} = (50-b)/-R^2$. Se realizaron tres repeticiones independientes de cada ensayo para cada línea celular.

4. Determinación de la muerte celular por necrosis en células tumorales mediante la detección de la enzima LDH (Lactato deshidrogenasa).

De las líneas celulares tumorales CaSki, MDA- MB-231, SK-LU-1 y PC-3 se sembraron 3,000 células por pozo, en cajas tipo Corning de 96 pozos, en 100 microlitros de medio de cultivo RPMI con su respectivo suero durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se adicionó 100 microlitros de RPMI y sus respectivos sueros con concentraciones de 0 a 100 microgramos de Quercetina por ml, utilizando controles 1. Control al cual solo se le cambio el medio de cultivo por medio de cultivo fresco, 2. Control vehículo donde se agregó 10 microlitros de ETOH absoluto en 1 ml de RPMI y 3. Control positivo a LDH donde solo se le cambio el medio de cultivo por medio de cultivo fresco durante 24 horas a 37°C, en una atmósfera de humedad al 5% de CO₂. A las 23 horas de estímulo, al control positivo se le cambio el medio de cultivo por medio de cultivo fresco al 1% de tritón X-100, la placa permaneció bajo las mismas condiciones hasta cumplirse las 24 horas.

Para determinar la actividad de la enzima LDH liberada al medio de cultivo, se recuperaron los sobrenadantes de cada tratamiento en una caja de fondo en V Corning de 96 pozos, la placa fue centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos. En una placa de 96 pozos se colocaron 50 microlitros por pozo de cada tratamiento (Control, vehículo etanol, positivo a LDH e IC₅₀ de quercetina) y se añadió 50 microlitros de la solución reactiva a LDH. La placa fue incubada a temperatura ambiente, protegida de la luz durante 20 minutos, transcurrido el tiempo de reacción se agregó la solución de paro de ácido acético al 10% y se evaluó la absorbancia a 490 nm en un lector de placas tipo ELISA. Por último en el programa para computadora Microsoft Office Excel 2010, se calculó el % de actividad de LDH utilizando la siguiente fórmula: % citotoxicidad = (Absorbancia muestra – Absorbancia basal)(100%)/(Absorbancia tritón X-100 – Absorbancia basal). Los datos se analizaron haciendo una comparación con el control (tratamiento que solo contiene medio de cultivo). Se realizaron tres repeticiones independientes de cada ensayo para cada línea celular.

5. Efecto de la quercetina en la morfología celular y condensación de la cromatina en células tumorales por medio de la tinción con el fluorocromo DAPI.

En cajas Petri de vidrio de 50 mm, fueron colocados cubreobjetos de 0.5 x 1 cm, las cuales se cubrieron con aluminio, junto con unas pinzas y fueron esterilizadas durante 30 minutos en calor seco a 230 °C. En cajas de plástico tipo Corning de 24 pozos se sembraron 20,000 células por pozo con 500 microlitros de medio de cultivo correspondientes a cada línea celular (CaSki, MDA- MB-231, SK-LU-1 y PC-3) (la placa será dividida por la mitad), en 12 pozos se colocaron los portaobjetos, esta mitad fue destinada para realizar la técnica de tinción con DAPI y la otra mitad fue destinada para la técnica de tinción con cristal violeta para confirmar las IC50 obtenidas para cada línea y se dejó durante 24 horas en una incubadora a 37°C, en una atmósfera de humedad al 5% de CO₂. Posteriormente las células fueron estimuladas de la siguiente forma: 1. Control al que solo se le cambia el medio de cultivo por medio de cultivo fresco, 2. Control vehículo al cual se le agregó la concentración de etanol requerida para preparar la concentración de la IC50 de cada línea celular y 3. Control positivo a apoptosis (camptotecina) con una concentración de 50 microgramos por ml. Para los tratamientos de cada línea se utilizó la concentración IC50 de Quercetina obtenida, la placa se dejó en incubación durante 24 horas. Concluidas las 24 horas se retiró el medio de cultivo de toda la placa y la mitad de la placa sin cubreobjetos fue teñida con cristal violeta como se describió anteriormente. La otra mitad fue fijada con 300 microlitros de paraformaldehído al 2% en PBS (previamente filtrado a través de un filtro de membrana (milipore) con diámetro de poro de 0.22 micrómetros) durante 15 minutos a temperatura ambiente y agitación constante, posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS de 15 minutos, seguidos de una permeabilización de las células con tritón X-100 al 0.5% en PBS a 4 ° C durante 5 minutos se lavó nuevamente 2 veces más con PBS. Por último se agregaron 5 µl de fluorocromo DAPI en condiciones de obscuridad sobre cada cubreobjetos y se dejó actuar durante 1 minuto a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces más con PBS para proceder a montar las muestras en portaobjetos, usando medio de montaje antifolding. Las preparaciones fueron observadas y fotografiadas en un microscopio de epifluorescencia Eclipse TSR2-FL-NIKON. Se realizaron tres repeticiones independientes de cada ensayo para cada línea celular.

6. Detección de caspasa 3 en cultivos de células tumorales

En cajas de plástico tipo Corning de 24 pozos se sembraron 20, 000 células por pozo con 500 microlitros de medio de cultivo respectivo para cada línea celular y se incubaron durante 24 horas. En dos cajas Petri de 2.5 ml se sembraron 150.000 células con medio de cultivo respectivo para cada línea celular y se incubaron durante 24 horas. Concluidas las 24 horas las células fueron estimuladas de la siguiente forma: 1. Control al que solo se le cambio el medio de cultivo por medio de cultivo fresco, 2. Control vehículo al cual se le agrego la concentración de etanol requerida para preparar la concentración de la IC50 de cada línea celular, 3. Control positivo a apoptosis (camptotecina) con una concentración de 10 microlitros por ml.4. Condición sin marca, al cual se le cambio el medio de cultivo por medio de cultivo fresco y que sirvió para la calibración del citómetro y 5. Condición Anticuerpo al cual se le cambio el medio de cultivo por medio de cultivo fresco. Se mantuvieron 24 horas en incubación.

Transcurridas las 24 horas, las células fueron despegadas con verseno para CaSki, SK-LU-1, verseno al 10% de tripsina para la línea MDA-MB-231 y medio de cultivo RPMI al 5% de suero fetal bovino para PC-3, estas fueron cosechadas en un tubo de 15 ml para cada condición de cada línea celular tumoral, todas las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. A cada tubo se le retiro el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 250 microlitros de PBS filtrado, una vez resuspendidas fueron fijadas en 250 microlitros de metanol absoluto y se dejaron 1 hora a una temperatura de 4°C. Transcurrido el tiempo cada condición fue lavada tres veces con PBS filtrado, para después agregar 50 microlitros de anticuerpo primario, anticaspasa 3 activa (anticuerpo producido en conejo, SIGMA) a una dilución de 1:1000, a las condiciones: control, vehículo, camptotecina (positivo), IC50 de cada línea celular. Mientras que a las condiciones: sin marca y anticuerpo secundario se les agregó 50 microlitros de PBS. Se dejaron con el anticuerpo durante 24 horas a una temperatura de 4 °C. Después de 24 horas las muestras fueron lavadas tres veces con PBS filtrado, se agregaron 50 microlitros de anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo FIT-C (anticuerpo de ratón, anti conejo, anti Caspasa 3 activa), en una dilución en PBS de 1:500 a las condiciones: control, vehículo, camptotecina (positivo), IC50 de cada línea celular y anticuerpo secundario. A la condición sin marca, se le agregaran 50 microlitros de PBS. Todas las muestras se mantuvieron a 37 °C durante 3 horas protegidas de la luz, transcurrido el tiempo cada condición fue lavada tres veces con PBS filtrado y pasadas a tubos para citometría. Las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo FACS-ARIA 2. Los datos se procesaron en el programa Flowing Software 2.5.1 haciendo una comparación del % de caspasa 3 activa de cada tratamiento con el control. Se realizaron tres repeticiones independientes de cada ensayo para cada línea celular.

7. Efecto de la Quercetina sobre la proliferación de linfocitos humanos (células no tumorales) marcados con carboxifluoresceína

En tubos vacutainer se obtuvieron 25 mililitros de sangre periférica de un donante sano, se colocaron en un tubo de vidrio estéril de 15 ml, 6 ml de Histopaque (Sigma- Aldrich USA), luego 6 ml de sangre evitando que el pipeteo fuera brusco (obteniendo una concentración de ficoll- sangre de 1:1), contando con un total de 4 tubos y fueron centrifugados de la siguiente manera: a 300 rpm por 5 minutos, después de este tiempo se aumentó a 600 rpm por 5 minutos y así sucesivamente hasta que se aumentó la velocidad a 1500 rpm, cuando se llegó a 1500 rpm se dejaron por 30 minutos más. De forma que las células mononucleares se separaron por gradiente de densidad, el plasma fue retirado de manera cuidadosa para evitar revolver el anillo de linfocitos, posteriormente el anillo fue recolectado de manera cuidadosa en un tubo de vidrio cónico de 15 ml limpio y estéril, una vez recolectados los 4 tubos en 2 tubos de vidrio se agregaron 5 ml de RPMI sin suero, se realizaron 3 lavados y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se colectaron ambos botones celulares en un tubo cónico con 5ml de RPMI sin suero y estos fueron contados.

Una vez obtenido el total de Linfocitos se separaron 2 millones: 1 millón en un volumen de 1 ml de RPMI al 20 % de SFB y 1 millón más fue llevado a un mililitro con RPMI al 20% SFB más 20 microlitros de fitohemaglutinina. Al resto de linfocitos fueron adicionados con 10 microlitros por ml de carboxifluoresceína y se dejaron reposar durante 15 minutos en la oscuridad total, transcurrido el tiempo se lavaron los linfocitos 3 veces con RPMI al 5% de SFB a 1500 rpm durante 5 minutos, se separaron dos millones más: 1 millón fue fijado con 300 microlitros de paraformaldehído al 2% y 1 millón más fue llevado a 1 ml de RPMI al 20% de SFB. El resto de células marcadas con carboxifluoresceína fueron llevadas al volumen final de 1 millón de células por 1 ml y se les agregó 20 microlitros de fitohemaglutinina por ml de medio de cultivo que fueron resuspendidos.

Se sembró una placa de 96 pozos tipo Corning con 200, 000 linfocitos en 200 microlitros de RPMI al 20% de SFB por pozo, con sus respectivos controles y fueron incubados a 37 °C con 5% de CO₂ a una atmósfera saturada de humedad durante 48 horas.

Transcurridas las 48 h se retiraron 100 microlitros de medio de cultivo de cada pozo, para administrar cada tratamiento. Los tratamientos se prepararon con las concentraciones IC₅₀ de cada línea celular tumoral en un volumen de 100 microlitros con una concentración doble de cada IC₅₀, de manera que al ser administrados los tratamientos la concentración IC₅₀ era en proporción 1:1 es decir IC₅₀ por cada 100 microlitros de medio de cultivo. Los linfocitos ya estimulados fueron incubados a 37 °C con 5% de CO₂ a una atmósfera saturada de humedad durante 24 horas más.

Transcurridas las 24 horas se recolectaron los linfocitos por cada condición en tubos de centrifuga en donde se agregaron 500 microlitros de verseno para separar las colonias celulares, se centrifugaron los tubos a 1500 rpm durante 5 minutos y se realizaron 2 lavados con 500 microlitros de PBS, por último se centrifugaron una vez más y se resuspendieron en 500 microlitros de PBS y los tubos fueron analizados por citometría de flujo (FACS-ARIA 2), una vez obtenidos los datos fueron analizados en el programa estadístico Flowing Software 2.5.1. Se realizaron tres repeticiones independientes de cada ensayo para cada línea celular.

8. Determinación de la citotoxicidad en linfocitos humanos por medio de la evaluación de la LDH

Pasadas las 72 horas necesarias para la activación de linfocitos, se centrifugó la placa a 1500 rpm durante 5 minutos y se recolectaron los linfocitos de uno de los controles que contiene RPMI al 20 % de SFB y se les agregaron tritón X-100 al 2% durante una hora. En el resto de las condiciones se colectó el medio de cultivo para evaluar el % de LDH presente en los sobrenadantes de los cultivos de los linfocitos. Se agregaron 40 microlitros de medio de cultivo en una placa tipo Corning de 96 pozos y se adicionaron 50 microlitros de la mezcla de reacción preparada a cada pozo y se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente en obscuridad total. Por último se midió la absorbancia en un lector de placas tipo ELISA a 490 nm.

Los datos obtenidos experimentalmente fueron presentados como la media \pm S.D. de tres ensayos independientes y fueron analizados estadísticamente usando un análisis de varianza (ANDEVA) seguido de la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$, comparados con el control usando el programa estadístico GraphPad InStat

Resultados

1. Actividad antiproliferativa de la Quercetina en células tumorales CaSki, MDA-MB-231, SK-LU-1 y PC-3

Para determinar el efecto antiproliferativo del flavonol quercetina, cultivos de las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231, SK-LU-1 y PC-3 fueron tratados con el flavonol quercetina en concentraciones de 0 a 100 µg/ml por 24 h y el número (densidad) celular fue evaluado mediante la técnica de tinción con el colorante cristal violeta y la concentración requerida del compuesto para abatir en un 50% el número celular (IC₅₀) fue calculado (Fig. 10).

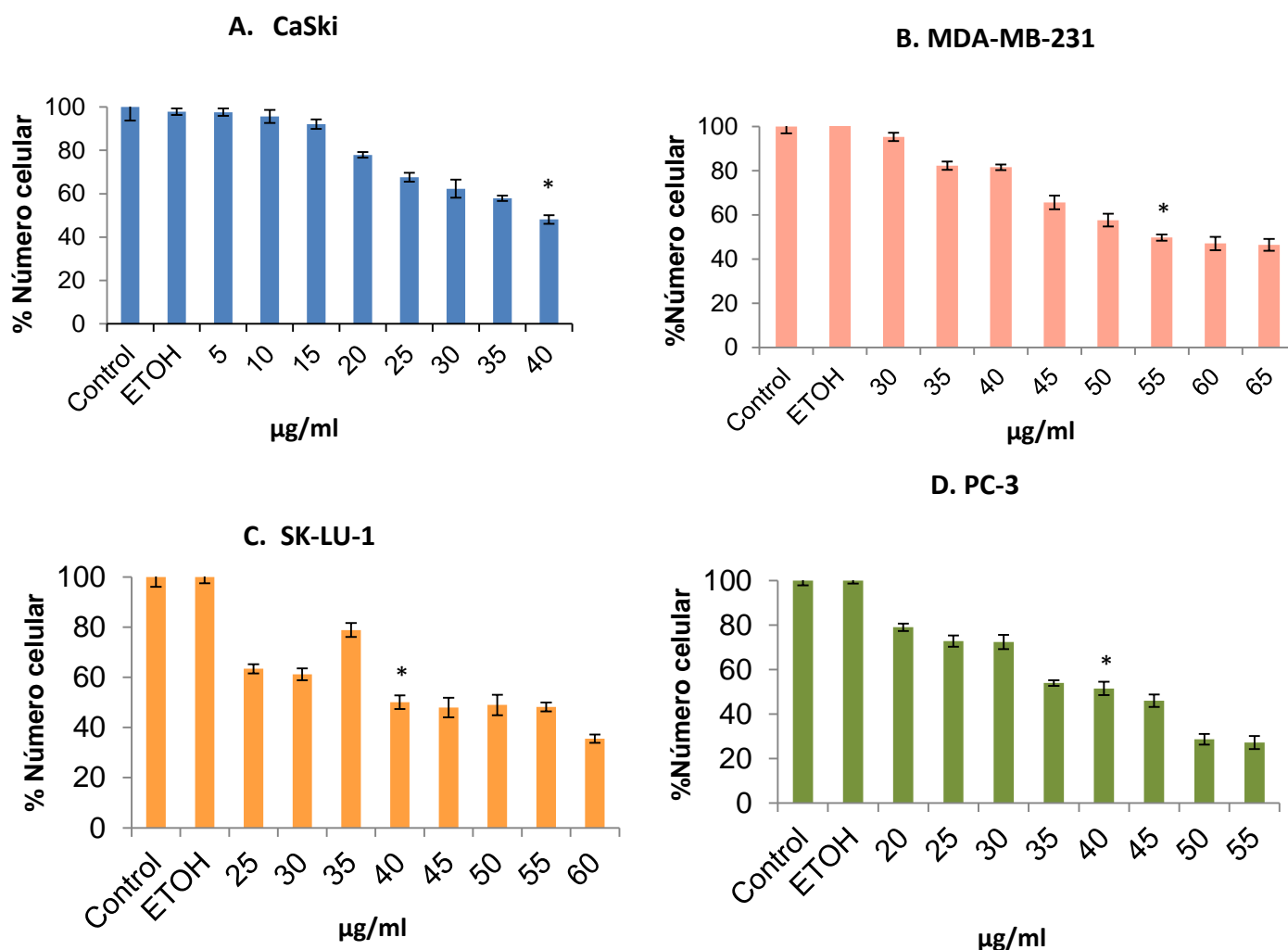


Figura 10. Efecto antiproliferativo de la Quercetina en las líneas celulares tumorales CaSki, MDA-MB-231, SK-LU-1 y PC-3. Los datos obtenidos son de tres ensayos independientes, los cuales fueron sometidos a una prueba de ANDEVA seguido de una prueba de Tukey (*p ≤ 0.05 vs control)

Línea celular	IC ₅₀	μM
PC-3	41 μg/ml	136 μM
SK-LU-1	39 μg/ml	129 μM
CaSki	39 μg/ml	129 μM
MDA-MB-231	55 μg/ml	182 μM

Tabla 1. Valores de la concentración de la Quercetina para inhibir el 50 % de la población celular (IC₅₀), para las líneas celulares tumorales CaSki, MDA- MB-231, SK-LU-1 y PC-3 expresada en μg/ml y en μM.

Como se puede apreciar en la fig. 10, la quercetina afectó el potencial proliferativo de todas las líneas celulares de manera dosis-dependiente, es decir, mientras la concentración de quercetina aumenta, el número celular disminuye. En la tabla 1 se muestran los valores de IC₅₀ calculados para cada línea celular, indicando que las células MDA-MB-231 presentan una mayor resistencia a la Quercetina, mientras que las células PC-3, SK-LU-1 y CaSki muestran una sensibilidad similar al compuesto.

2. Actividad necrótica de la Quercetina en las líneas celulares tumorales CaSki, MDA- MB-231, SK-LU-1 y PC-3

Para establecer si la quercetina induce una muerte celular por necrosis en las líneas celulares tumorales, cultivos de células CaSki, MDA- MB-231, SK-LU-1 y PC-3 fueron tratados con quercetina a las concentraciones de las IC₅₀ respectivas y la actividad de LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares y considerada un marcador de muerte necrótica o de la pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática (Fig.11).

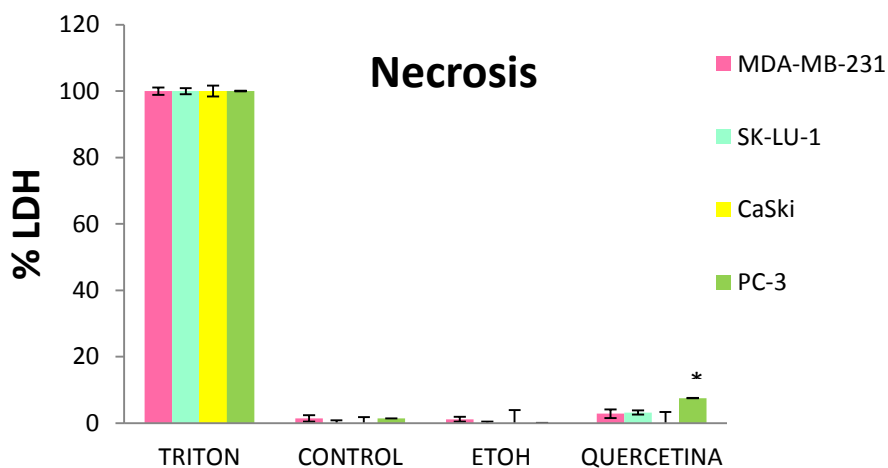


Figura 10. Actividad de LDH presente en los sobrenadantes de cultivos de células tumorales tratadas con Quercetina. Cultivos de células tumorales CaSki, MDA-MB-231, SK-LU-1 y PC-3 fueron tratados con la quercetina a las concentraciones de IC₅₀ respectivas y la actividad de la enzima citoplasmática LDH (Lactato deshidrogenasa) presente en los sobrenadantes de las líneas celulares tumorales fue evaluada mediante el kit Citotox 96. Los datos mostrados son representativos de tres ensayos independientes, los cuales fueron sometidos a una prueba de ANDEVA seguido de una prueba de Tukey (*p ≤ 0.05 vs control)

Línea celular	%LDH
CaSki	0%
SK	3%
PC-3	7%
MDA-MB-231	1%

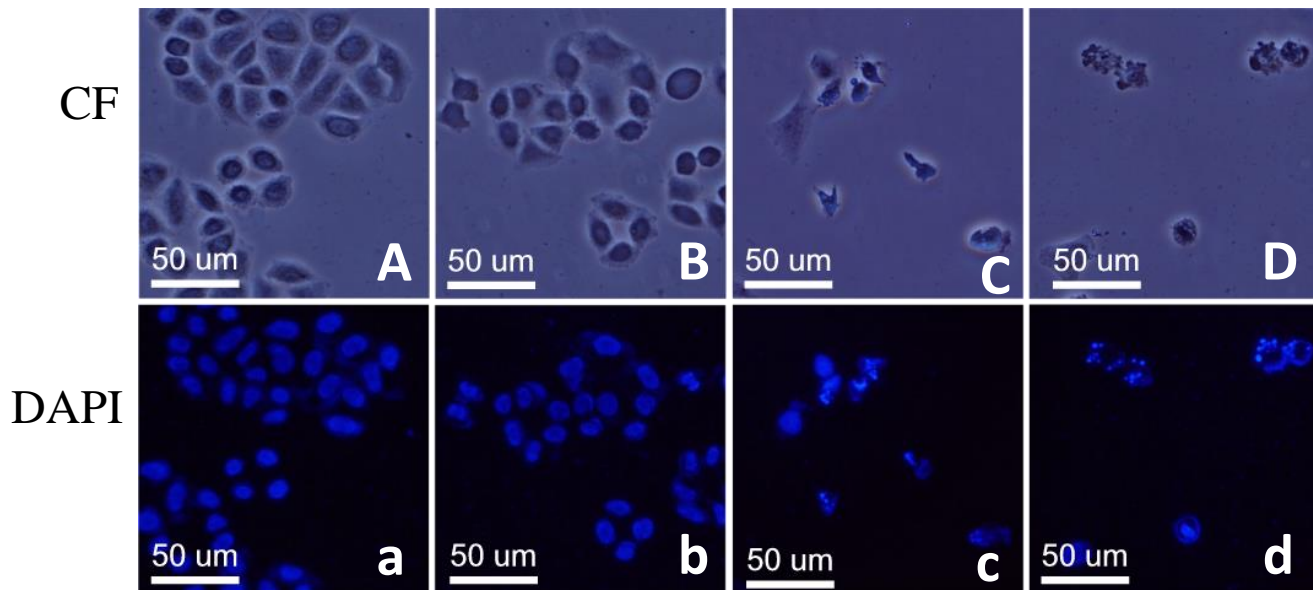
Tabla 2. Actividad de LDH presente en los sobrenadantes de cultivos de células tumorales tratadas con Quercetina.

Los resultados mostrados en la figura 11 y tabla 2, establecen que la quercetina induce en las células tumorales una nula o baja actividad de la enzima citoplasmática, indicando que la quercetina no induce a las células CaSki, MDA-MB-231, SK-LU-1 y PC-3 a una muerte necrótica y el decremento en el número celular es debido a una causa diferente a la muerte necrótica.

3. Actividad apoptótica de la quercetina en las células tumorales CaSki, MDA-MB-231, SK-LU-1 y PC-3

La muerte celular por apoptosis se caracteriza por cambios morfológicos: contracción celular, la condensación de la cromatina, núcleos más compactos, formación de cuerpos apoptóticos, pérdida de las prolongaciones citoplasmáticas, entre otras. Con el fin de evaluar si la quercetina induce a las células CaSki, MDA-MB-231, SK-LU-1 y PC-3 a una muerte apoptótica, cultivos de las cuatro líneas celulares fueron tratadas con la quercetina a sus respectivas IC₅₀ durante 24 h y posteriormente fueron teñidas con el fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y la morfología celular fue observada por microscopía de contraste de fases y epifluorescencia (Eclipse TSR2-FL-NIKON) (Fig. 12)

CaSki



MDA-MB-231

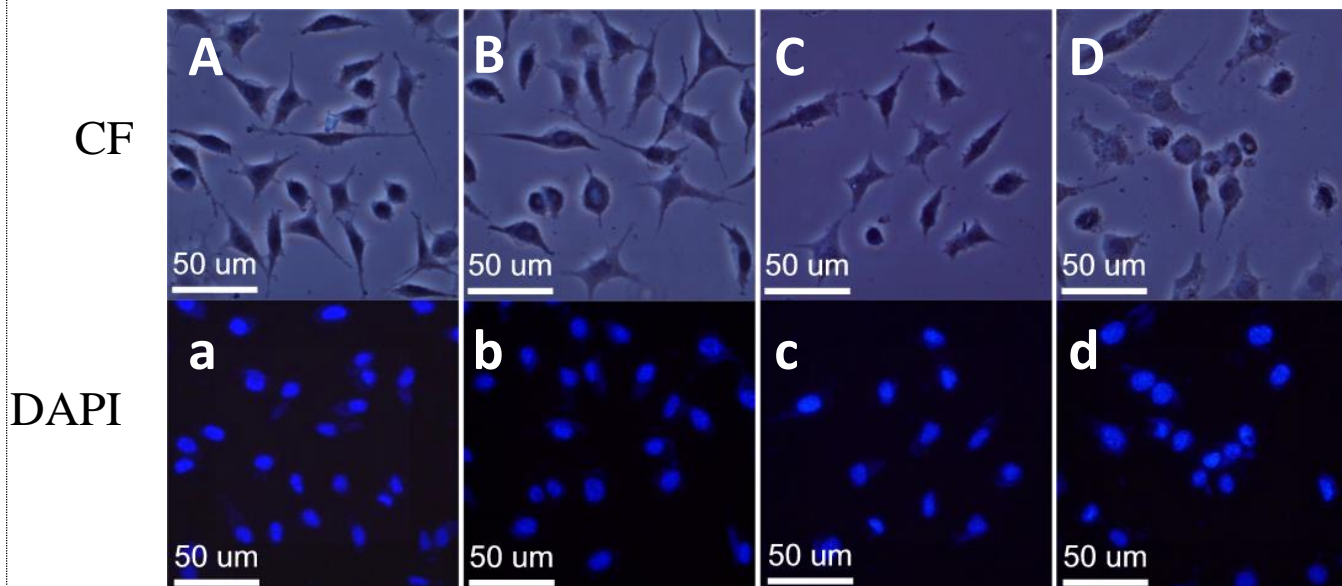


Figura 11. Efecto de la quercetina en la morfología de las células CaSki, MDA-MB-231, SK-LU-1 y PC-3.17, 000 células fueron sembradas en cubreobjetos de 1×1 cm en $500 \mu\text{l}$ de RPMI al 5% STN y se trataron con las respectivas IC_{50} de quercetina por 24 horas. Posteriormente fueron fijadas y teñidas para ser observadas al microscopio de epifluorescencia. Contraste de fases (A, B, C, D), DAPI (a, b, c, d). Se observan (A, a) Control; (B, b) ETOH; (C, c) Camptotecina; (D, d) Quercetina. Ensayo representativo de tres repeticiones.

Los resultados mostrados en la figura 12 dejan ver que las células control presentan una morfología poliédrica con proyecciones citoplasmáticas, con citoplasma extendido y abundante y núcleos de tamaño y forma regular con una distribución homogénea de la cromatina. Sin embargo, en las células tratadas con la quercetina, las células presentan una forma esférica sin proyecciones citoplasmáticas, con poco citoplasma y células contraídas donde en algunas se pueden observar cuerpos apoptóticos (Contraste de fases). Los núcleos son pequeños cuya cromatina se encuentra condensada y en algunas células, los núcleos se encuentran fragmentados, sugiriendo que la quercetina induce a las células tumorales a presentar una morfología típica de las células apoptóticas.

4. Detección de caspasa-3 activa en las células tumorales CaSki, MDA-MB-231, SK-LU-1 y PC-3, tratadas con quercetina.

Con el propósito de concluir que la quercetina induce muerte celular apoptótica en las células tumorales, cultivos de células CaSki, MDA-MB-231, SK-LU-1 y PC-3 fueron tratadas con la quercetina a sus IC50 respectivas y la caspasa-3 activa fue determinada por inmunocitoquímica y cuantificada por citometría de flujo (Figura 13) (Tabla 3).

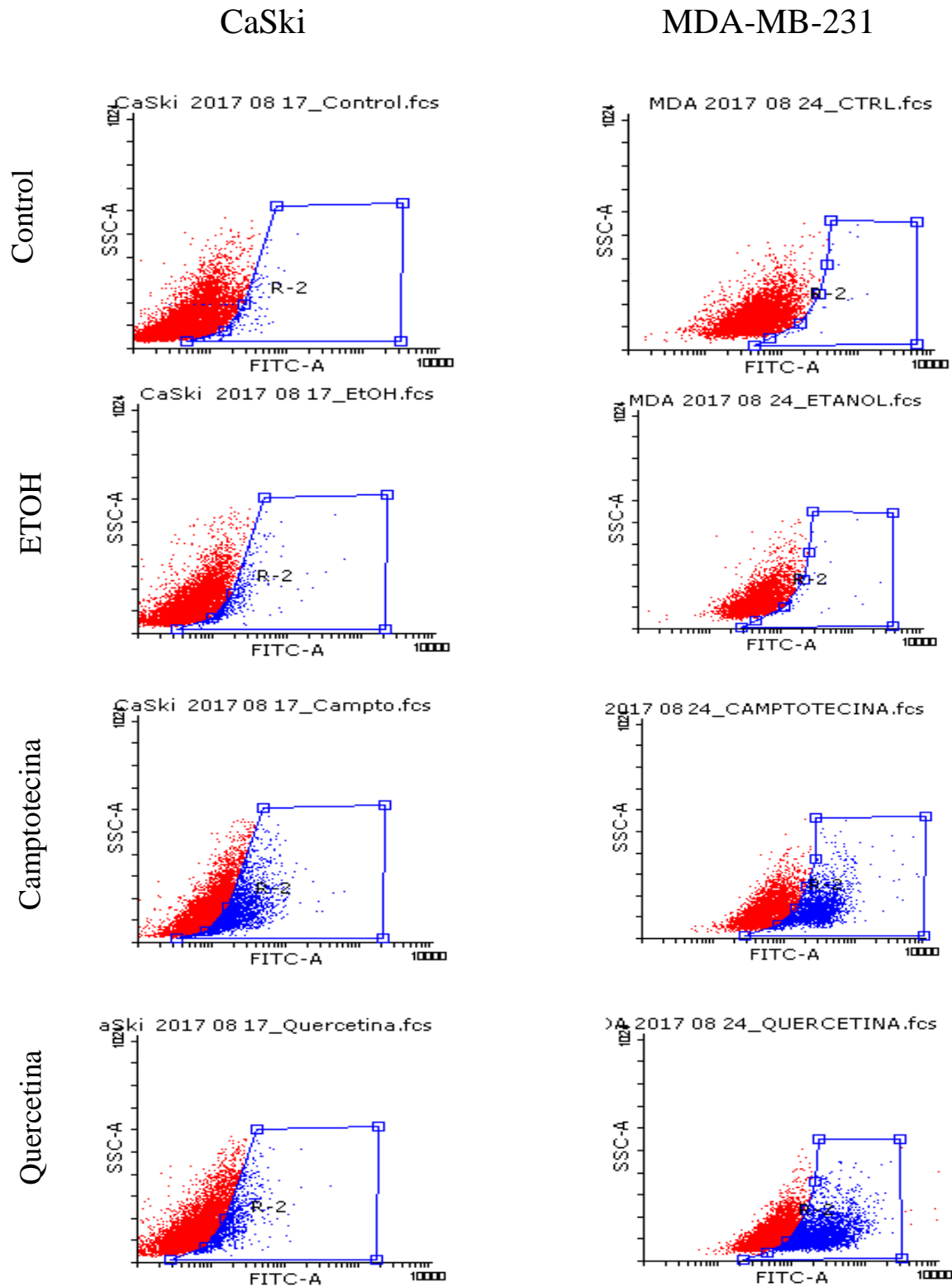


Figura 13. Cuantificación de la caspasa 3 activa en las líneas celulares tumorales CaSki, MDA-MB-231, SK-LU-1 y PC3 tratadas con quercetina. Los valores son representativos de por lo menos tres experimentos. La cuantificación se realizó mediante citometría de flujo.

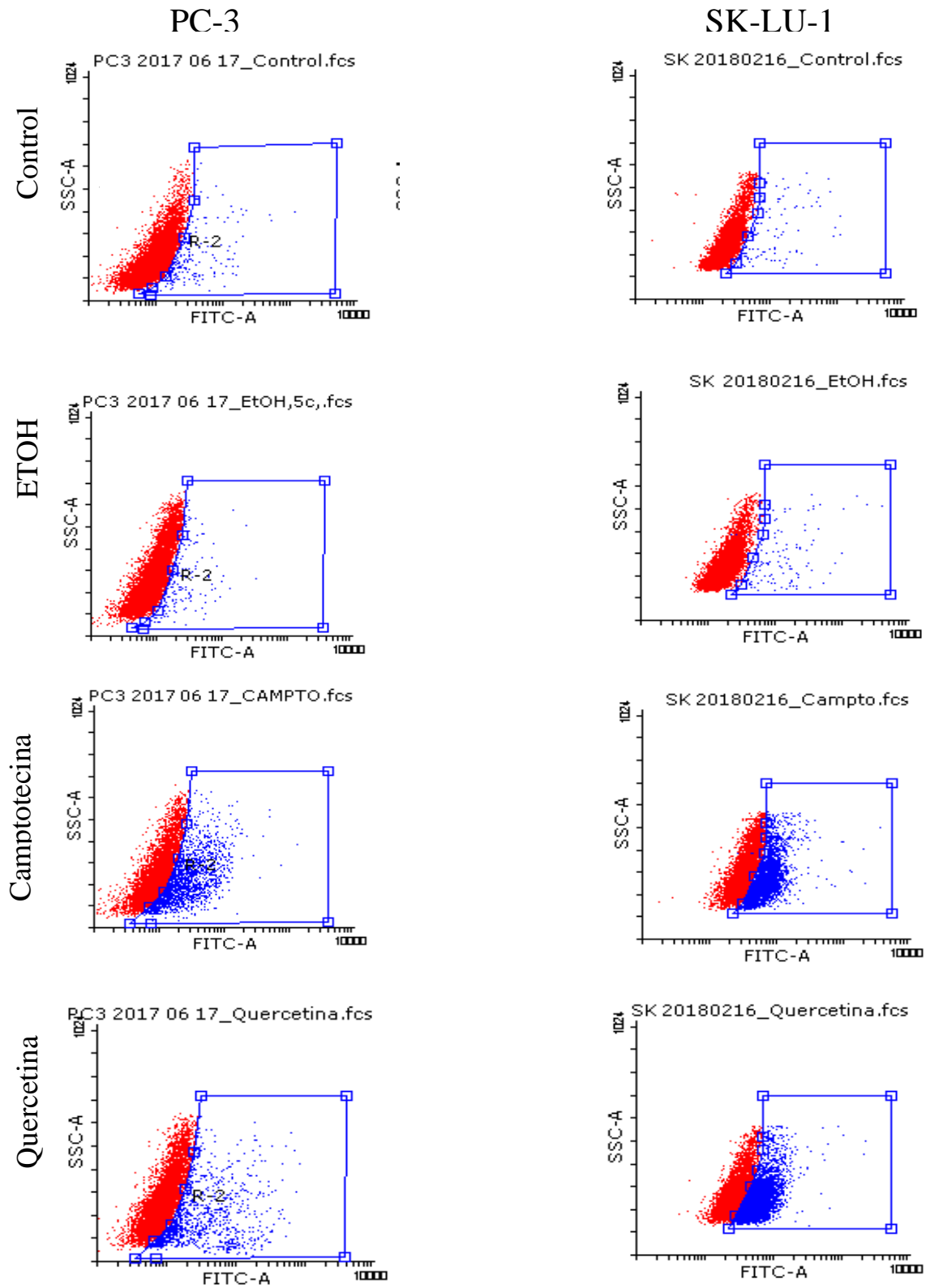


Figura 14. Cuantificación de la caspasa 3 activa en las líneas celulares tumorales CaSki, MDA-MB-231, SK-LU-1 y PC3 tratadas con quercetina. Los valores son representativos de por lo menos tres experimentos. La cuantificación se realizó mediante citometría de flujo

R-2: % of Vis	MDA-MB-231	CaSki	PC-3	SK-LU-1
Control	0.45	2.02	2.36	1.44
ETOH	1.58	5.58	2.25	1.56
Camptotecina	33.09	27.35	21.67	40.66
Quercetina	42.41	10.83	13.16	40.72

Tabla 3. Porcentaje de expresión de caspasa 3 activa de las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231, SK-LU-1 y PC-3. Evaluada a las 24 horas del tratamiento.

Los resultados obtenidos en la figura 13 y tabla 3, muestran que la quercetina induce a las células tumorales a presentar la caspasa-3 activa. Sin embargo, las células MDA-MB-231 y SK-LU-1 son las que presentaron esta caspasa en mayor porcentaje, sugiriendo que estas células son más sensibles al efecto apoptótico de la quercetina que las otras líneas tumorales.

5. Actividad antiproliferativa en células no tumorales

Se ha determinado que el flavonol quercetina presenta una actividad antiproliferativa y apoptótica en las líneas celulares tumorales CaSki, MDA-MB-231, SK-LU-1 y PC-3, se evaluó la quercetina en cultivos de células linfocíticas humanas. Los linfocitos se obtuvieron de sangre periférica de donadores sanos y estos fueron tratados con las concentraciones IC₅₀ de las células tumorales, durante 24 horas, con la finalidad de conocer si la quercetina tenía algún efecto antiproliferativo sobre los linfocitos, estos se evaluaron mediante la técnica de incorporación de carboxifluoresceína. (Fig. 14)

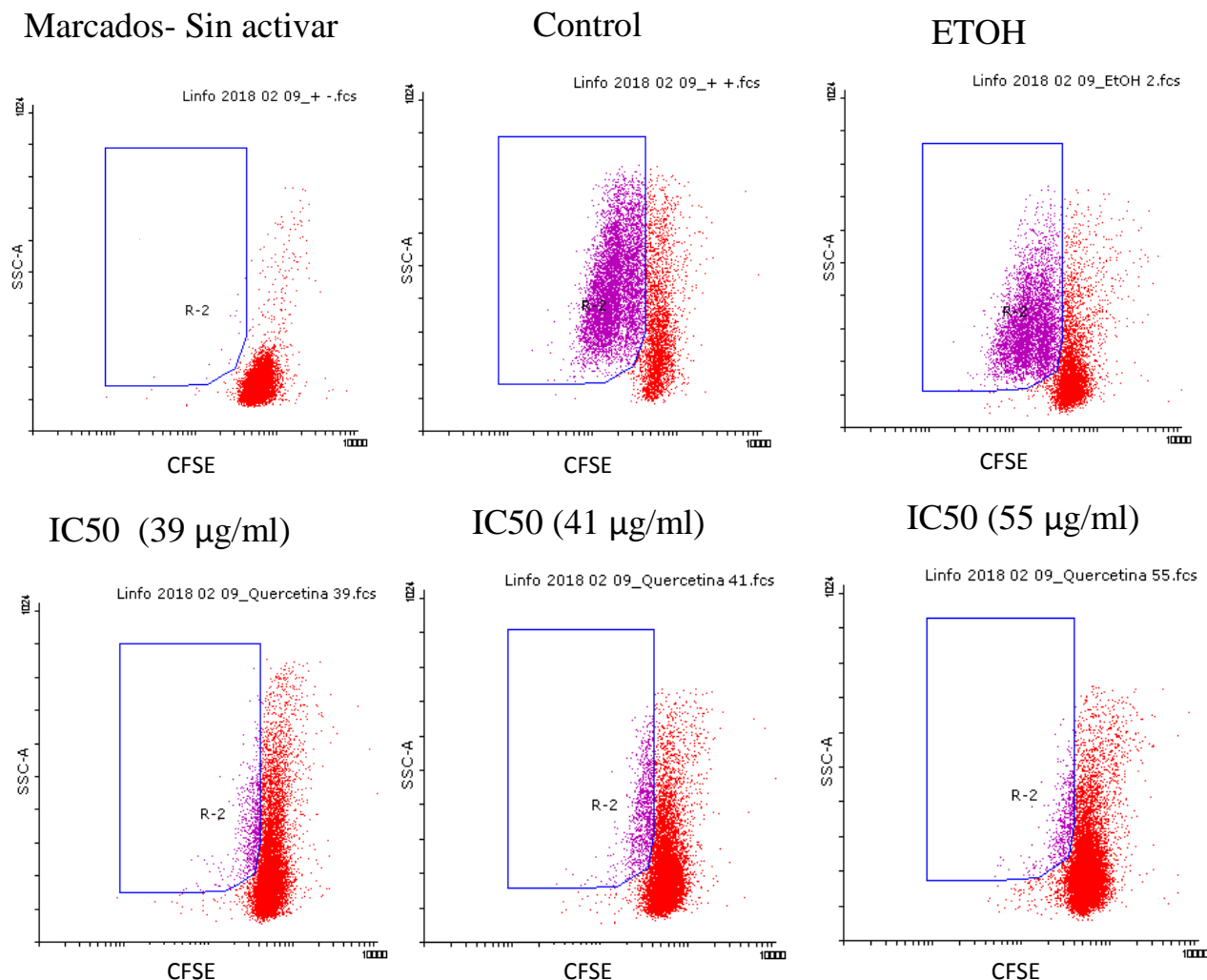


Figura 15. Efecto antiproliferativo de la quercetina en células no tumorales, evaluado mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceína, cuantificados por citometría de flujo. Los resultados muestran que a concentraciones de 39, 41 y 55 $\mu\text{g/ml}$ se inhibe la proliferación en un 90 %. El control sin activar, son aquellos linfocitos que están marcados con carboxifluoresceína pero no están activados, es decir no tienen fitohemaglutinina. Las condiciones control, ETOH, 3.9, 4.1, 5.5 son linfocitos que están marcados con carboxifluoresceína y activados con fitohemaglutinina. Los datos obtenidos son de tres ensayos independientes, los cuales fueron sometidos a una prueba de ANDEVA seguido de una prueba de Tukey (* $p \leq 0.05$ vs control)

Se evaluaron 10,000 eventos para cada condición, las células fueron tratadas con 39, 41 Y 55 $\mu\text{g/ml}$ de quercetina que corresponden con las IC50 de las líneas celulares CaSki, SK-LU-1 (39 $\mu\text{g/ml}$); PC-3 (41 $\mu\text{g/ml}$) y MDA-MB-231 (55 $\mu\text{g/ml}$). La región marcada representa a las células en proliferación. Se ha encontrado que las células linfocíticas tratadas con quercetina presentan un efecto antiproliferativo de aproximadamente el 90 %. Para evaluar una posible muerte por necrosis se evaluaron los sobrenadantes del cultivo de linfocitos humanos, donde se determinó la actividad de la enzima citoplasmática LDH. (Fig. 15)

	% Proliferación
Etanol	52 %
Quercetina IC50 39 $\mu\text{g/ml}$	12 %
Quercetina IC50 41 $\mu\text{g/ml}$	18 %
Quercetina IC50 55 $\mu\text{g/ml}$	9 %

Tabla 4. Porcentaje de proliferación de Linfocitos humanos evaluados a las 24 horas de tratamiento. Se observa una inhibición de la proliferación del 80 %, a las concentraciones IC50 de las células tumorales las que corresponden, 39 $\mu\text{g/ml}$ a SK-LU-1 y CaSki; 41 $\mu\text{g/ml}$ a PC-3; 55 $\mu\text{g/ml}$ a MDA-MB-231. Los datos obtenidos son de tres ensayos independientes.

Necrosis en linfocitos

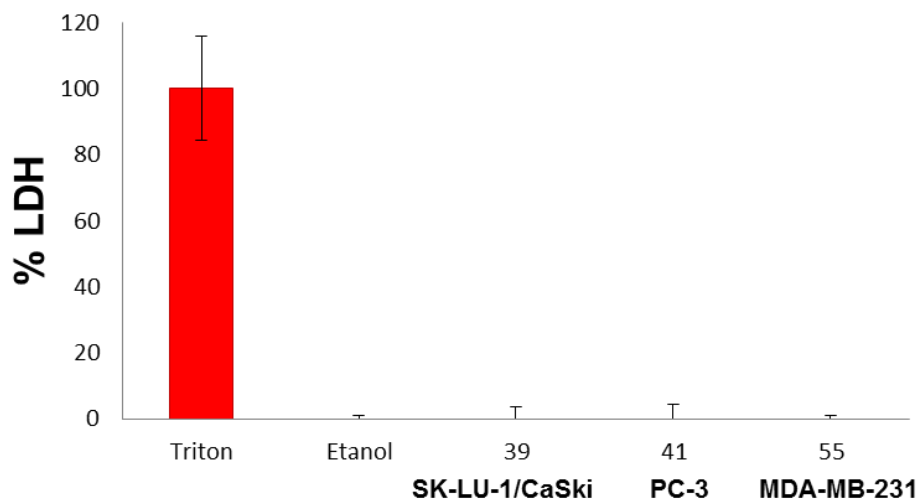


Figura 16. Evaluación de la actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos humanos, tratados con quercetina. Se observa una actividad de la enzima del 0 % a las concentraciones de las IC50 obtenidas de las líneas celulares tumorales, lo que sugiere otro tipo de muerte o detección del ciclo celular en células no tumorales. Los datos obtenidos son de tres ensayos independientes, los cuales fueron sometidos a una prueba de ANDEVA seguido de una prueba de Tukey (* $p \leq 0.05$ vs control).

Análisis de resultados

Dentro de los flavonoides consumidos en alto porcentaje en la dieta humana destaca la quercetina a la cual se le ha atribuido actividad antitumoral, protección cardiovascular, prevención de las cataratas, efectos antihipertensivos, antioxidante, antiinflamatorio, entre otras (Midlenton, 2000). Sin embargo, y no obstante que es un compuesto fuertemente estudiado, su papel como agente antitumoral aún no es claro. Su actividad antiproliferativa y apoptótica ha sido evaluada en algunas líneas celulares sin llegar a concluir sus propiedades antitumorales debido a que en algunos reportes, la técnica para evaluar proliferación celular no es la más adecuada, además, la mayoría carece de pruebas en células normales.

En este trabajo, la actividad antiproliferativa de la quercetina es contrastante con lo descrito en la literatura, donde Nguyen en 2004, reportó la actividad antiproliferativa de la quercetina en la línea celular de cáncer de pulmón A549, con una IC_{50} de 0.45-2.28 micromolar, mientras que en nuestros resultados la actividad antiproliferativa de la quercetina para la línea celular de cáncer de pulmón SK-LU-1 fue de 129 μ M.

Resultados que sugieren que la respuesta a la quercetina en las líneas celulares de pulmón es dada por la sensibilidad específica de la línea celular. De la misma manera, Su-Yu en 2009 reportó una IC_{50} de 55 μ M para la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 y Yan-Ding en 2017, reportó una IC_{50} de 48 μ g/ml para la línea celular de cáncer de próstata PC-3, valores que al compararlos con los obtenidos en este trabajo, establecen una actividad antiproliferativa de la quercetina, sin embargo, los valores no son del todo parecidos a pesar de que se trata de las mismas líneas celulares, sugiriendo que la respuesta a la quercetina podría también variar entre la misma línea.

Por otro lado, en este trabajo se mostró que las líneas celulares que presentan mayor sensibilidad (es decir requieren menor concentración del compuesto para abatir el 50% de la población celular) al compuesto son las de cáncer cervicouterino (CaSki) y de pulmón (SK-LU-1) con una IC_{50} de 39 μ g/ml (129 μ M), mientras que la línea que presenta una menor sensibilidad al compuesto son la de cáncer de mama (MDA-MB-231) con una IC_{50} de 55 μ g/ml (182 μ M).

Con respecto a la actividad necrótica de la quercetina, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la quercetina no induce a las células tumorales a una muerte necrótica, resultados que están de acuerdo con lo descrito por Vicente *et al*, quien en 2013 reportó que no encontró efectos tóxicos de ningún tipo causados por quercetina, ni como un agente genotóxico, citotóxico ni mutagénico. Estudios epidemiológicos a largo plazo sugieren que en humanos la suplementación de quercetina parece ser segura ya que no se ha asociado con ningún efecto adverso, y además se relaciona con la protección frente a diferentes enfermedades (Vicente, 2013).

Estos resultados indican que la actividad antiproliferativa de la quercetina en las células tumorales es llevada a cabo mediante una acción diferente a la muerte necrótica, hecho

relevante si se compara con los fármacos que actualmente se aplican al tratamiento del cáncer, cuya actividad antiproliferativa está basada principalmente en la actividad necrótica y que es considerada la causa principal de los efectos colaterales, sugiriendo que la quercetina presentaría menores efectos colaterales y que sería mejor tolerada debido a su baja actividad necrótica.

Con respecto a la actividad apoptótica de la quercetina, en un estudio realizado en el Instituto del Frío del CSIC, se demostró que la quercetina es capaz de inducir apoptosis en células tumorales de cáncer de hígado (HepG2). Las dosis más elevadas indujeron muerte celular mediante incremento en la activación de las caspasas 3 y 9, así como inhibición de la proteína quinasa AKT y de la fosforilación de la proteína quinasa ERK. Además, se produjo un incremento de los factores proapoptóticos Bcl-2 y una disminución de los antiapoptóticos Bcl-XL (Granado, 2006). SuYu en 2009 evaluó a la quercetina en la línea celular MDA-MB-231, donde encontró que la quercetina no aumentaba la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), pero aumentaba los niveles de Ca^{2+} citosólico, además de reducir el potencial de membrana. Encontró además que la quercetina promovía la activación de caspasa 3 y 9. Los resultados referentes a la apoptosis de la quercetina obtenidos en este trabajo, concuerdan con lo descrito anteriormente, estableciendo que la quercetina induce a las células tumorales a expresar una morfología típica de células apoptóticas, así como de presentar la caspasa-3 activa.

Los resultados demostraron la presencia de la caspasa 3 activa a las 24 horas del tratamiento, la línea celular MDA-MB-231 mostró el porcentaje mayor de caspasa-3 activa con un 43%, coincidiendo con lo reportado por SuYu, 2009, sugiriendo que la muerte celular por apoptosis es mediada por la caspasa 3. Yan-Ding en 2017 reportó un efecto apoptótico en líneas de cáncer de próstata PC-3, donde encontró un efecto antitumoral y la inducción de la muerte por apoptosis, por medio de estrés oxidativo en dosis mayores a 40 μ M, además de tener un efecto prooxidante sobre esta línea celular. En la línea celular de cáncer cervicouterino se encontró un 13 % de caspasa 3 activa a las 24 horas de tratamiento. Cheng en 2016 realizó un estudio con nano partículas de quercetina, donde se reportó una muerte celular por autofagia y apoptosis en células de cáncer cervicouterino CaSki, mediante inmunohistoquímica y análisis de citometría de flujo.

No obstante, la abundancia de trabajos que describen a la quercetina con actividad antiproliferativa no necrótica y con actividad apoptótica, no está claro su efecto en cultivos de células no tumorales. Al respecto, los resultados obtenidos en este trabajo establecen que la quercetina induce una fuerte inhibición de la proliferación de linfocitos humanos (>50%) a las 24 horas de tratamiento, sugiriendo que la quercetina podría ejercer un papel inmunosupresor.

Además, se mostró que la quercetina no ejerce actividad necrótica en estas células a las concentraciones determinadas para las células tumorales, indicando que la actividad antiproliferativa de la quercetina en células linfocíticas es debido a una causa diferente a la necrosis, reiterando que los efectos colaterales relacionados a la actividad necrótica serían menores en comparación con los fármacos tradicionales como el cisplatino. Sin embargo, la

quercetina ha sido evaluada en modelos murinos, pero no se ha descrito algún efecto citotóxico, nefrotóxico, etc. (Vicente, 2013), sugiriendo que su efecto inmunosupresor podría ser poco significativo como un efecto colateral, sin embargo, sería pertinente evaluar su efecto inmunosupresor con mayor detalle para dejar claro y concluido este punto.

Conclusiones

La Quercetina presenta un efecto antiproliferativo sobre las líneas celulares tumorales CaSki, MDA- MB-231, SK-LU-1 y PC-3, con valores IC_{50} de 39 $\mu\text{g/ml}$ (129 μM) para CaSki y SK-LU-1, para PC-3 41 $\mu\text{g/ml}$ (136 μM) y 55 $\mu\text{g/ml}$ (182 μM) para MDA-MB-231. Siendo la dosis más alta, obtenida para cáncer de mama (MDA-MB-231).

La Quercetina no induce una muerte celular por necrosis en ninguna de las líneas celulares tumorales.

La Quercetina induce características de una morfología de muerte por apoptosis, así como la activación de caspasa 3 evaluada a las 24 horas de tratamiento, con un porcentaje de 48%, 15%, 13% Y 40% en las líneas tumorales MDA-MB-231, PC-3, CaSki y SK-LU-1 respectivamente.

La Quercetina tiene un efecto antiproliferativo del 90% en células no tumorales, en linfocitos humanos, a las 24 horas de ser tratados con las IC_{50} obtenidas para las células tumorales.

ANEXO

Línea celular	IC ₅₀ Quercetina	% LDH	IC ₅₀ Patuletina	% LDH	IC ₅₀ Quercetagetina	%LDH
PC-3	41 µg/mL	7 %	-	-	20 µg/mL	38 %
SK-LU-1	39 µg/mL	3 %	18 µg/mL	0 %	19 µg/mL	15 %
CaSki	39 µg/mL	0 %	37 µg/mL	2 %	88 µg/mL	30 %
MDA-MB-231	55 µg/mL	1 %	89 µg/mL	3 %	60 µg/mL	23 %

Tabla 5. IC₅₀ y % de la actividad de LDH de la Quercetina, Patuletina y Quercetagetina en las líneas celulares tumorales, resultando las IC₅₀ de la quercetina, las que presentan menos variabilidad de una línea a otra, así como un menor y nulo porcentaje de actividad de la enzima LDH en los sobrenadantes de los cultivos de células tumorales, descartando una muerte celular por necrosis. IC₅₀ obtenidas por el grupo de Investigación Diferenciación celular y Cáncer. UNAM. FES Zaragoza

Bibliografía

- Acuña T.M. (2013). Cáncer cervicouterino: Guía diagnóstica. *Oncología* 111.
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). (2013). Consultado: 20 de Agosto de 2017. Disponible en: <http://www.aesan.msc.es/>
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J. (2006). *Biología Molecular de la célula*. Quinta edición. Garland Science. United States of America: 1-2 pp.
- American Cancer Society (ASC). (2016). Cáncer de pulmón microcítico (células pequeñas). Consultado 05 de enero del 2018. Disponible en: <https://www.cancer.org/es.html>
- Benedí, J. (2006). Fármacos Antineoplásicos I. *Farmacia Profesional*. 20 (2): 60-64 pp.
- Brighton & Wood, M.(2005). *The Royal Marsden Hospital Handbook of Cancer Chemotherapy*. New York: Churchill Livingstone. 576
- Cardenas S.J., Bargalló R.E., Erazo V.A., Maffs M.E., Poitevin C.A. (2013). Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Consultado: 18 de enero del 2018. Disponible en; http://www.consensocancermamario.com/documentos/FOLLETO_CONSENSO_D E_CANCER_DE_MAMA_6aRev2015c.PDF
- Cáscales A.M., (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Anales Real Academia Nacional de Farmacia*. 69 (1): 9-15 pp.
- Cheng-lin L.Y., P.W., C.S., K.W., L.D., J.Z., H.Y. (2016). The effect of quercetin nanoparticle on cervical cancer progression by inducing apoptosis, autophagy and anti-proliferation via JAK2 suppression. *ELSEVIER. Biomedicine & Pharmacotherapy*. 82: 595-605 pp.
- Consejo de Salubridad General (CSG). (2010). Diagnóstico y tratamiento del Cáncer Cervicouterino. CENETEC. Consultado 24 de enero del 2018. Disponible en: <http://www.imss.gob.mx/profesionales/guiasclinicas/gpc.htm>
- Díaz L., Cala O., Pinto C., Lizcano A., Cornejo V., (2003). El ciclo celular. *Med UNAB*. 16(6): 21-29 pp.

- Elmore S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 35 (4). 495 - 516 pp.
- Erdman, J. (2007). Flavonoids and Heart Health. *Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop. Nutri.* 0022-3166/07
- Escamilla J, C. I. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de la Facultad de Medicina.* 52(2): 73-75 pp.
- Euguino V.A., Fernández S.B., García A.G., García S.J. A. (2005). *Cáncer de pulmón una guía práctica.* Asociación Española contra el Cáncer. Madrid, España.
- Formica, J.V., R. W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* 33: 1061–1080 pp.
- Gaviria A.M. (2007). Calidad de vida relacionada con la salud, afrontamiento del estrés y emociones negativas en pacientes con cáncer en tratamiento quimioterapéutico. *Psicología desde el Caribe.* 20: 50-75.
- Galati G., O’B., P.J. (2004). Potential Toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for chemopreventive and anticancer properties. *Free Radic. Biol. Med.* 37 (3): 287–303 pp.
- GLOBOCAN. (2012). Estimated Cancer Incidence, Mortality and prevalence worldwide in 2012. Consultado 18 de enero del 2018. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- Granado-Serrano AB, M.MA, B.L., G.L., R.S. (2006) Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *Journal nutrition.* 136: 2715-2721 pp.
- Instituto Nacional del Cáncer (INC). (2017). Naturaleza del cáncer. Consultado: 3 de Diciembre de 2017. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza>
- Instituto Nacional del Cáncer (INC). (2008). Lo que usted necesita saber sobre: Cáncer de pulmón. Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2017). Datos Nacionales: “Estadísticas a propósito del... día mundial contra el cáncer (4 de febrero)” (1 de Febrero de 2017). Consultado: 20 de Agosto del 2017. Disponible en: www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf

- Jordán J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. *Bioquímica*. 22(6):100-106.
- Lizarbe I.M.A., (2007). El suicidio y la muerte celular. *Revista de la real academia de las Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 101 (2):1-33.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D. y Darnell J. (2005). *Biología celular y molecular*. Quinta edición. Medica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 1-3.
- Lôic L.M. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids: a review. *Biomed Pharmacother*. 56 (2002): 296–301pp.
- Murray R. K., Bender D., Botham K., Kennelly P., Rodwell V. Weil P. (2013). *Harper: Bioquímica ilustrada*. Treintava edición. Mc Graw Hill. China. 1-4 pp.
- Moctezuma V.C.R., Patiño Z.M. (2009). Cáncer de Pulmón. *Canales de Radiología México*. 1:33-35.
- Middleton J., E.K., C. T., T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*. 42 (4): 673–751 pp.
- Nair H.K., R.K.V, A.R, M.S, C.R, S.S.A. (2004). Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 63-69.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). Cáncer. Consultado: 05 de enero 2018. Disponible en <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
- Pérez G. (2017). Cáncer de pulmón: aspectos clínicos y diagnósticos en pacientes afectados del Policlínico “Marta Abreu”. *Acta Médica del Centro*. 11:3. 49-56 pp.
- Pomilio A.B. (2012). Investigación en Química de Productos Naturales en Argentina: Vinculación con la Bioquímica. *Acta Bioquímica clínica Latinoamérica*. 46 (1): 73-82 pp.
- Quezada M. A. (2007). El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias. *UAM. Cd de México*. 5(12): 5-10
- Ranelletti F.O., R.R., L.L.M.. (1992) Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. *Int. J. Cancer*. 50: 486—492 pp.

Ríos, M. H. (1999). Oncogenes y Cáncer. *Revista Cubana de Oncología*. 15 (2). 131-139 pp.

Rivera Z.R. Delgado D.J., Painel P.V., Barrero P., Larraín H. (2006). Mecanismo de infección y transformación neoplásica producido por virus de papiloma humano en el epitelio cervical. *Revista Chilena de ginecología y Obstetricia*. 71:2.135-140 pp.

Rodríguez G.M., Rodríguez P.T. (2010). Revisión sistémica rápida sobre radioterapia en cáncer de pulmón. Agencia de evaluación de Tecnologías. Ministerio de Ciencia e Innovación. 62 p

Rojas D.A. (2017). Investigación en Productos naturales. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Facultad de Ciencias y Filosofía. Consultado: 20 de enero de 2018. Disponible en <http://facien.cayetano.edu.pe/investigacion-lid/lista-de-laboratorios-de-investigacion-y-desarrollo/67-unidad-de-investigacion-en-productos-naturales>

Shashank K., A.K. (2013). Review: article chemistry and biological activities of flavonoids, an overview. *The Scientific World Journal*. 162750. 1-17 pp.

Secretaria de Salud (SS). (2001). Programa de Acción: Cáncer de Próstata. Consultado: 21 de Agosto de 2017. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas>

Secretaria de Salud (SS). (2015). Información estadística del cáncer. Consultado: 18 de Agosto del 2017. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>

Sociedad Americana del Cáncer (ACS). (2014). Cáncer de cuello uterino (cervical). Consultado 05 de enero del 2018. Disponible en: <https://www.cancer.org/es.htm>

Soriano R.E. (2003). Los Metabolitos de las plantas y las Células Cancerosas I: Los Flavonoides. *REB*. 22(4): 191-197 pp.

Sotomayor Z.M. (2012). Cáncer de Próstata. Departamento de Urología INNSZ. Médica Sur. Disponible en: http://www.senado.gob.mx/comisiones/igualdad_genero/reu/docs/

Stavric, B. (1994). Quercetin in our diet: From potent mutagen to probable anticarcinogen. *Clin. Biochem*. 27: 245–248 pp.

Su-Yu C., Y. W., J. C., J.Y., H. L., M.T., WG.W, S.K., D. C. (2009). Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *SAGE. Journals*. 28 (8)

Taylor R.C., Cullen S.C., Martin S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 9:231-241 pp.

T.T.T.Nguyen, E.T., T.H.N., P.T.D., T.H.H. H.H. (2004). The role of activated MEK-ERK: pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis*. 25 (5): 647—659 pp.

Vicente V. L., P.M, M.A.I. (2013). Eficacia y Seguridad de la Quercetina como Suplemento Alimenticio. *Revista Toxicológica*. 30 (2): 171-181 pp.

Yan D., K.R., H. D., F.S., J.C., Y.G., Y.L., W.T., Y.Z. (2017).

Apéndice

Preparación de reactivos

- **Medio de cultivo RPMI-1640**

RPMI-1640 (Laboratorio Microlab)	10.42 g
NaHCO ₃ (Sigma-Aldrich, E.U.A)	2 g

Los reactivos se disuelven en 800ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCL 1N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado con vacío a través de una membrana con poro de 0.47 μ m. Se almacena a 4° C. El medio de cultivo se complementa con 5% de suero de ternera neonatada (STN), en la porción requerida y posteriormente es nuevamente filtrada en vacío a través de una membrana con poro de 0.47 μ m.

- **Medio de cultivo D-MEM**

D-MEM (Laboratorios Microlab)	13.42 g
NaHCO ₃ (Sigma-Aldrich, E.U.A)	3.7 g

Los reactivos se disuelven en 800ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCL 1N y se afora a 1000 ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado con vacío a través de una membrana con poro de 0.47 μ m. Se almacena a 4° C. El medio de cultivo se complementa con 5% de suero fetal bovino (SFB), en la porción requerida y posteriormente es nuevamente filtrada en vacío a través de una membrana con poro de 0.47 μ m.

- **Desactivación del suero**

El suero fetal bovino (SFB) como el suero de ternera neonatada (STN) se colocan en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelados, posteriormente se coloca a baño maría a 56 ° C durante 30min. Posteriormente es transvasado en alícuotas de 50ml en tubos cónicos de plástico estériles.

- **Verseno**

Esta solución se empleó para despegar las células tumorales adherentes y funciona como agente quelante que secuestra los iones calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utiliza:

Etilen-diamen-tetra-acético (EDTA) (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.40 g
---	--------

Cloruro de Sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich, E.U.A)	8.00 g
Cloruro de Potasio (KCl) (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.40 g
Tris (Sigma-Aldrich, E.U.A)	3.04 g

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

- **Solución de Tripsina**

La solución fue utilizada para el desprendimiento de las células tumorales (MDA-MB-231), es preparada al 0.05% en verseno en condiciones estériles.

- **Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)**

Se utiliza para mantener a las células en condiciones fisiológicas estables durante periodos cortos. La capacidad amortiguadora es proporcionada por las sales de fosfato. Para su preparación se utiliza:

Fosfato diácido de potasio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.20 g
Fosfato monoácido de sodio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	2.16 g
Cloruro de sodio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	8.0 g
Cloruro de potasio (Sigma-Aldrich, E.U.A)	0.20 g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtros de una membrana con diámetro de 22µm. Se almacena a 4 °C, hasta su uso.

- **Glutaraldehido**

Esta solución se utilizó para fijar las células, manteniendo la integridad estructural de los tejidos y células. La tendencia a formar uniones cruzadas entre proteínas hace al glutaraldehido un excelente fijador. Se prepara de la siguiente manera: a 1.57 ml de glutaraldehido (70% v/v) se le agregan 98.43 ml de agua bidestilada y se almacena a una temperatura de 4°C.

- **Solución de Cristal Violeta (0.1%)**

Para preparar 500 ml de cristal violeta en una concentración de 0.1% se requiere previamente preparar una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 Mm con un pH de 6. Posteriormente se adiciona el cristal violeta, se diluye y se filtra usando papel Whatman número 2. Se almacena a temperatura ambiente.

NaOH (Sigma-Aldrich, E.U.A)	3.96 g
Ácido Fórmico (Sigma-Aldrich, E.U.A)	4.28 g
Cristal Violeta (Sigma-Aldrich, E.U.A)	1.0 g

- **Solución de ácido acético (10%)**

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

- **Paraformaldehido (2%)**

Paraformaldehido al 2% en PBS, se disuelve a baño maría sin que la temperatura rebase los 60 ° C. Se almacena a 4 °C.

- **Camptotecina**

La camptotecina se utiliza como positivo a muerte apoptótica, se prepara agregando 5 mg de camptotecina en 1 ml de DMSO. Posteriormente es transvasado en alícuotas de 50 µl en tubos eppendorf estériles y se almacena a temperatura ambiente.