

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

---

---

**ESCUELA DE ESTUDIOS SUPERIORES DEL JICARERO**

**“EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE QUERCETINA Y  
LUTEOLINA EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE  
CÁNCER CÉRVICO UTERINO”.**

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**P R E S E N T A:**

**KARINA ELGUEA ARROYO**

**DIRECTOR:**

**DR. VICTOR HUGO BERMÚDEZ MORALES**

**JOJUTLA, MORELOS**

**AGOSTO, 2021**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Instituto Nacional  
de Salud Pública



El presente proyecto se realizó en el Instituto Nacional de Salud Pública, bajo la dirección de:

Dr. Victor Hugo Bermúdez Morales, CISEI-INSP.

Asesores del proyecto:

Dra. Valeri Domínguez Villegas, FCQel-UAEM.

Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez, CIQ-UAEM.

M. en M. M. Isaura Quinta Padilla, EESJicarero-UAEM.

M. en B. Fernando Luis Reyna Flores, CISEI-INSP.

Cumpliendo las indicaciones correspondientes al comité de bioética del INSP, con número de protocolo aprobado: No. 1403 (Anexo 1), bajo las normas mexicanas:

-NOM-087SEMARNAT-SSA1-2002. Manejo de residuos peligrosos biológico infecciosos (RPBI).

-NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Animal Biosafety, ID: 13654 Collaborative Institutional Training Initiative (CITI Program), Research Ethics and Compliance Training. Fort Lauderdale, FL

33301, USA.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primera instancia agradezco a mi director de tesis, **Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales** (CISEI-INSP), por compartirme de su conocimiento y dejar en mí una inquietud por la investigación al dejarme formar parte de su equipo de laboratorio, gracias por brindarme siempre su apoyo.

A mis sinodales Dra. Valeri Domínguez Villegas (FCQeI-UAEM), Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez (CIQ-UAEM), M. en M. M. Isaura Quinta Padilla (EESJicarero-UAEM) y M. en B. Fernando Luis Reyna Flores (CISEI-INSP), por el conocimiento adquirido durante las clases y estancia en el laboratorio, gracias por sus comentarios y correcciones al proyecto.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, por su apoyo para adquirir nuevos aprendizajes y compartir grandes momentos.

## **DEDICATORIA**

A mi madre que también desempeña el papel de padre, por siempre apoyar mis sueños, confiar plenamente en mí y ser mi pilar. Gracias por todo lo que me has enseñado.

A Alejandro por darme su apoyo incondicional y siempre confiar en mis decisiones.

A mis amigos que ahora son parte de mi familia, gracias por todos los momentos que compartimos en la universidad.

A mi hermano por darme mi mayor motivación llamada Naiara.

A mis profesores quienes compartieron su conocimiento y me motivaron durante toda la carrera.

**“Un sutil pensamiento erróneo puede dar lugar a una indagación fructífera  
que revela verdades de gran valor”**

***Isaac Asimov***





Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**VALERI DOMINGUEZ VILLEGAS | Fecha:2021-08-06 09:37:59 | Firmante**

nc2G9jg9V+2WehixJEk4Fq8h+kL0r40ATRFJMjq0Bts1Bo64SCxMshFTxcHpNue4vBgJBxDIHW7UhxafT4q5xzKI2rphgm3FuXSYsG4KAB  
MdNKNMO404gdbx64pM5Qi0MylAfub  
6TIp65iF7BMCac6TQ3DOS/2A4O7+fLV7Fr9fR2DCHc5Q6PU5wcrpDx7ZWTaGsf/exRNIJu9y7BQxoH26fnnSdBp2OKVQ9ejcQsXJTLzefM  
1EBWRrHrJcGrL/CZd971OqZV1n6xMbDbYsm+Xkha85MRNUysEPEolyMr5Qr+TaNeaWXWIPaikMkTWx/0Ho1o13HtCqZj8SxrkYAaw==

**MARIA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMIREZ | Fecha:2021-08-06 09:53:20 | Firmante**

fBzxEYb3YWNfBTgB9gXU3Jyc0fs/7e+b3d6Ep44odp6cXZga82w8Pu/R6b29pqv2dPMYjNufUdH8a0bx/TO3p+Tvq8HIOJQhLOL/KTuJR+6  
O91yA1pTVuP73rzalSgv4By8dsXtWT  
VeX2v8SnPxoSM3UuBvJSc//hqKYUN38qGd/uSB6GBldGkcWpK6i6KJi+sd/ZmT9iNuAQof72coDmIUgC9fzDAARCAvge4H4IXs49dolY6mS  
HVRMySuOQACmsjrFt2T0PxLm8AC b5lbWjCST6e4WZD/V2x2DnGhXUUN7cm07rN/QmysY/7UIpFr+8SqqMthUQUXc68GvIYybcg==

**FERNANDO LUIS REYNA FLORES | Fecha:2021-08-06 12:51:12 | Firmante**

BAVU7esqJAOY46TyYfL9lenQ1PufwNMvSvCP9+hx/agOdMNITYHbKserNhgZdSabv8K+DsBcO9Fg07U6FqSr98h3c0HYPDwo9EEv2hctz  
k6twBITvZd477KSlNqmsJjrCjz9jpBeil  
hkvt8NGBvgtgoonyoe7qWt0DateNzE0POjIPdmKAUuqjtOL/gd5am71gdhf9dAsi6pZEIhoxR2a3CPqa5Pk/TWB4wn/OzlmIkf2Khl+GdDBDi  
mJNsJnfAxp6S66UMfuaU3YSw6ycBxQFe66sOg2QiDkCI4ELFI+87mZyr4r+srOvFOnxI0wul+vEcBxgQi8cWgoHAJDvNQ==

**ISAURA QUINTANA PADILLA | Fecha:2021-08-07 11:49:36 | Firmante**

XXTOUyXtzB8cMu+jQhBU0Js3dQMxp7O4SYITOs7HUmh9LRIB3cCGXDmREu+w0SuvZD6P4ahnZA2StwUbA+wdC5B6BsUqJKPmh4R  
Nc/g2d0jvLFJFF4bG1NOI4WSb5u7p1  
7iBbm74o4YBSU4WHRyYNpXLvRj1/r9iMCmv+sOLFG4j0syzxrX+JJa3iKT4dYsRuV3oQxuY51Zu4wAUCexehkfWfgcvVpBZwQIS1rzxhq  
XFHMs919K511I9uQENy3opuN9Jrx8z2l5LumGZFHOsZlnzO2lqFbGCH8tu6mt8NhyipHwQGRs69h2z9Bjoe2qIE3HXe/e9uXCf/xw0jw==

**VICTOR HUGO BERMÚDEZ MORALES | Fecha:2021-08-09 12:04:34 | Firmante**

IOAzt91TkpJqmVijONeinSjQrsagpYPSRly7tti34rm9j87gjODmuBB5SyCXch6XoUWSAVOTAcnv3zDhCJF+prumoOtJQ32JTEIeYsZsf/srxv  
nYdtx1KuwZsectNBbAzR/2RHnUVzm  
cRqu6qbTc2Ow/h+6+ZQHJY8h9IZ1kApBA6HOjoTVjtedaePJ6inxFN40EJzii6rfQ8qx++J/b+ZVQyq7yuR11P8iBEJOzlgjuJbybtbZDqlygaT  
GRdkg7cLk0WLlx325km9Ql7q2VY5jevGGu6DvrTSghv4OzQbvyamCvie3MriCW5E8IRvJ1yfPTYXMz5XXgQ9Sba3PrA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica oescaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



GgxIXB

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/25HJYcEhXVmk9nlUMV5MGbKr9Z66TE4r>

## ÍNDICE GENERAL

Página

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>ANTECEDENTES</b> .....	2
FLAVONOIDES.....	2
MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FLAVONOIDES.....	3
QUERCETINA .....	4
LUTEOLINA .....	5
PROCESO OXIDATIVO.....	6
EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER CÉRVICO UTERINO Y VPH .....	8
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.....	10
GENOTIPOS DE VPH .....	12
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y CÁNCER CÉRVICO UTERINO .....	14
LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO .....	16
FASE PROLIFERATIVA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.....	16
CARCINOGENESIS EN RELACIÓN CON EL NIVEL DE ESTRÉS OXIDATIVO .....	17
VÍAS DE APOPTOSIS .....	19
MECANISMOS ANTICANCERÍGENOS DE LOS FLAVONOIDES.....	20
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	22
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	22
<b>HIPÓTESIS</b> .....	22
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	22
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	23
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
<b>1. CULTIVO CELULAR</b> .....	23
1.1 Línea celular BMK-16/myc.....	23
1.2 Línea celular HeLa.....	23
1.3 Línea celular SiHa.....	24
<b>2. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR</b> .....	24
2.1 Ensayo de MTT con la línea celular BMK-16/myc .....	24

2.2 Ensayo de MTT con la línea celular HeLa .....	25
2.3 Ensayo de MTT con la línea celular SiHa .....	25
<b>3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE PROLIFERACIÓN CELULAR .....</b>	<b>26</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>32</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>33</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>34</b>
ANEXO 1.....	39
ANEXO 2.....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Estructura química de flavonoides (Julián, 2009).....	3
<b>Figura 2.</b> Estructura química de quercetina (UNIIQUIM, 2017). ....	5
<b>Figura 3.</b> Estructura química de luteolina (UNIIQUIM, 2017).....	5
<b>Figura 4.</b> Respuesta celular frente a la formación de EROS. (Adaptado de Corrales, 2012).....	7
<b>Figura 5.</b> Estimacion de la mortalidad del cáncer cérvico uterino seccionada por edades, 2018 ( CIIC, GLOBOCAN, 2018). ....	8
<b>Figura 6.</b> Tasa de mortalidad por CaCu de acuerdo con el IMSS, 2011 *Tasa de mujeres de 25 años o más (Hernández et al., 2015).....	9
<b>Figura 7.</b> Genoma del VPH (Leal y Cortés, 2001). ....	10
<b>Figura 8.</b> Infección del cérvix por Virus del Papiloma Humano (Bermúdez, 2018). .....	15
<b>Figura 9.</b> Proliferación celular en el desarrollo de CaCu (Adaptado de frazer, 2004). ....	17
<b>Figura 10.</b> Efecto carcinogénico en relación con el nivel de estrés oxidativo (Adaptado de Valko, 2006). ....	18
<b>Figura 11.</b> Vías de inducción a apoptosis (Modificado de Cell migration lab, 2017). .....	20
<b>Figura 12.</b> Representación de acción oxidante de flavonoides en células con cáncer (tomada de Ezequiel et al., 2003). ....	21

## ÍNDICE DE TABLAS

Página

<b>Tabla 1.</b> Descripción de las características funcionales de los genes en VPH (Castro, 2006). .....	11
<b>Tabla 2.</b> Tipos de cáncer que se asocian a diferentes genotipos del VPH, entre los cuales se resaltan en negritas los más patógenos, mientras que el signo de interrogación hace referencia a la presencia de un genotipo sin estar confirmado (Rivera et al., 2002). .....	13

## ÍNDICE DE GRAFICAS

Página

<b>Grafica 1.</b> Evaluación de efecto antiproliferativo en la línea celular BKM-16/myc, tratado con una concentración de 100 uM de quercetina, las cuales fueron medidas a las 0, 24, 48 y 72 hrs. ....	27
<b>Grafica 2.</b> Evaluación de efecto antiproliferativo en la línea celular BKM-16/myc, tratado con una concentración de 20 uM de luteolina, midiendo la densidad óptica a las 0, 24, 48 y 72 hrs. ....	28
<b>Grafica 3.</b> Evaluación de efecto antiproliferativo en la línea celular HeLa, tratada con una concentración de 250 uM de luteolina, midiendo la densidad óptica a las 0, 24, 48 y 72 hrs. ....	29
<b>Grafica 4.</b> Evaluación de efecto antiproliferativo en la línea celular SiHa, tratada con una concentración de 250 uM de luteolina, midiendo la densidad óptica a las 0, 24, 48 y 72 hrs. ....	29

## **ABREVIATURAS**

**CaCu:** Cáncer Cérvico Uterino

**VPH:** Virus del Papiloma Humano

**E6:** Oncogén E6 traído del VPH

**E7:** Oncogén E7 tardío del VPH

**CIN:** Neoplasia Intraepitelial Cervical

**RL:** Radicales Libres

**EROs:** Especies Reactivas de Oxígeno

**RE:** Retículo Endoplasmático

**TNF:** Factores de Necrosis Tumoral

**BMK-16/myc:** Línea celular de origen epitelial de riñón de ratón, transformada con el genoma completo de VPH 16 y expresa los oncogenes E6 y E7 de VPH 16.

**HeLa:** Línea derivada de una muestra de cáncer cérvico uterino de origen humano transformada con el VPH 18.

**SiHa:** Línea celular derivada de una muestra de cáncer cérvico uterino de origen humano transformada VPH 16.

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**RNA:** Ácido ribonucleico

**MTT:** Ensayo colorimétrico di-metil-tiazol (MTT).

## RESUMEN

Los flavonoides son metabolitos secundarios de origen vegetal y se caracterizan por tener acciones antioxidantes que protegen al organismo contra diferentes agentes oxidativos, debido a las propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (Limon *et al.*, 2010). Dentro de los flavonoides hay diversas familias a las que pertenecen la quercetina y luteolina, se ha propuesto que tienen un gran potencial terapéutico contra enfermedades que involucran procesos de estrés oxidativo incluyendo el cáncer, en este sentido se ha demostrado que tienen efectos sobre la viabilidad celular en líneas derivadas de cáncer (Pérez, 2003).

En diversos tipos de tumores se presenta un aumento de estrés oxidativo acompañado de un proceso inflamatorio que condiciona un avance y progresión de la neoplasia. Este evento se ha caracterizado ampliamente en el desarrollo de cáncer cérvico uterino asociado a la infección por el Virus del Papiloma Humano (VPH), por lo tanto, se ha propuesto inhibir el proceso de estrés oxidativo para evitar la progresión de la malignidad. En este sentido diversos flavonoides se han sugerido que pueden ejercer inhibición del estrés oxidativo, por lo que tendrá efectos antiproliferativos sobre líneas celulares derivadas de cáncer.

Por lo cual, en el presente proyecto se analizaron los flavonoides quercetina y luteolina descritos con alto potencial antioxidante, lo que permite repercutir en la viabilidad celular. Evaluando así el efecto de quercetina y luteolina sobre la viabilidad y proliferación celular en las líneas celulares, BMK-16/myc (ratón) y SiHa (humana) transformadas con el genoma del VPH 16, además de la línea celular HeLa (humana) transformada con el VPH 18, esto basados en ensayos colorimétricos de di-metil-tiazol (MTT).

La viabilidad celular en las líneas derivadas de cáncer cérvico uterino, mostro que quercetina tuvo un efecto de inhibición en la proliferación celular a partir de las 24 hrs, siendo este de forma continua, mientras que la luteolina presenta un efecto transitorio.

El efecto antiproliferativo de ambos flavonoides es importante en el proceso de progresión del cáncer, por lo que es importante su seguimiento como herramienta terapéutica para esta patología en las líneas celulares BMK-16/myc, SiHa y HeLa.

**PALABRAS CLAVES:** Antiproliferativo, Quercetina, Luteolina, flavonoides, BMK-16/myc, SiHa, HeLa, Cáncer cérvico uterino.

## INTRODUCCIÓN

Los flavonoides son metabolitos secundarios de origen vegetal que se encuentran principalmente en las frutas, verduras, plantas y sus derivados. Los flavonoides se dividen en seis grupos: flavonas, flavanonas, flavanoles, isoflavonas, flavonoles y antocianidinas (Martínez, 2002). Estos compuestos son pigmentos que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas, etc. (Limon *et al.*, 2010).

La capacidad antioxidante de los flavonoides radica en sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres. Además, los flavonoides inhiben a las oxidasas, como lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa, evitando la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos. Adicionalmente, los flavonoides inhiben las enzimas involucradas en los procesos oxidativos (Escamilla *et al.*, 2009); los cuales están presentes en diversos procesos inflamatorios y otros padecimientos como el cáncer (Infante, 1997).

Por otro lado, se ha demostrado que los flavonoides tienen efectos antiproliferativos en líneas celulares derivadas de pacientes con cáncer, además de su acción inductora de muerte celular programada (apoptosis) en las células tumorales (Ham *et al.*, 2014). Estos efectos se han observado en las líneas celulares derivadas de cáncer de hígado, próstata y pulmón (Vicente *et al.*, 2013). Por lo tanto, se ha propuesto que pueden tener efectos sobre otros tipos de cáncer y es necesario tener evidencia científica.

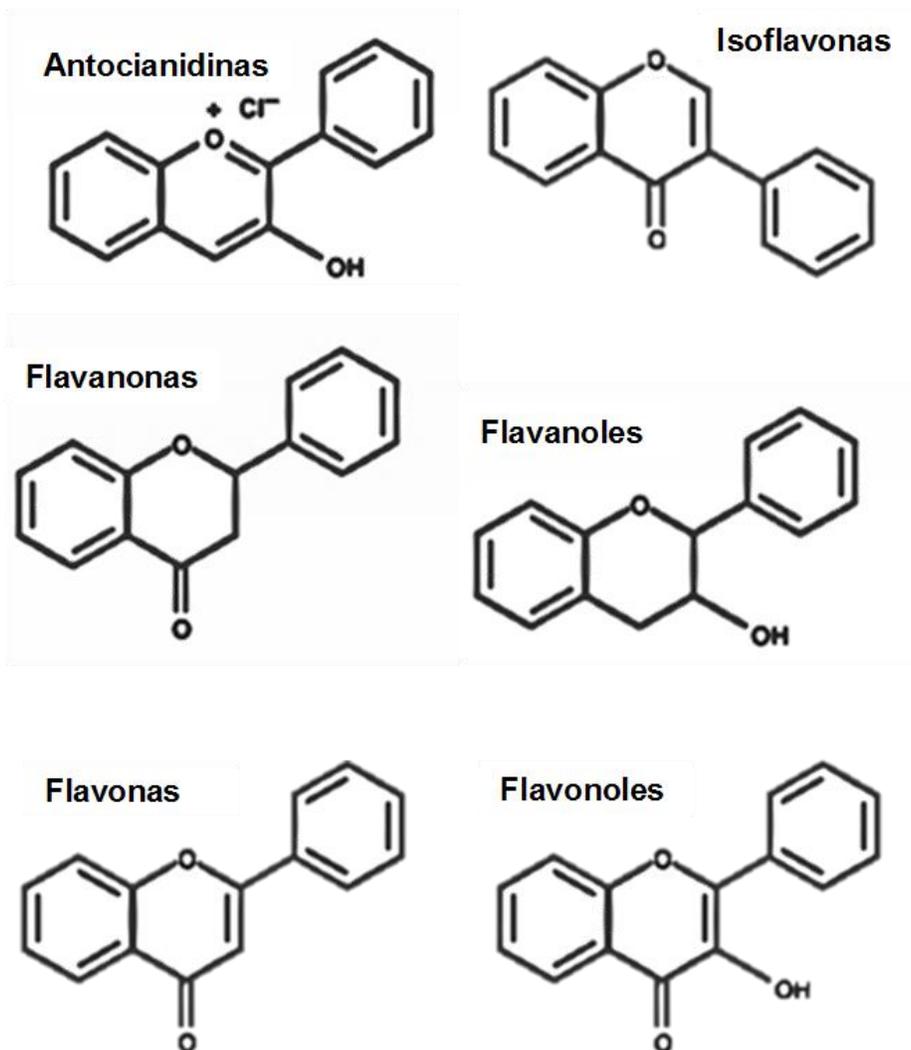
Particularmente en cáncer cérvico uterino (CaCu) asociado a la infección por el virus del papiloma humano (VPH), se ha detectado que presenta aumento de estrés oxidativo y un proceso inflamatorio durante el desarrollo de esta neoplasia (Londoño, 2006). El uso de flavonoides para inhibir estos procesos podría ser de gran relevancia terapéutica. Recientemente se ha reportado que la luteolina tienen efectos sobre la inhibición de los oncogenes E6 y E7 del VPH importantes para la transformación celular (Ham *et al.*, 2014). Así la luteolina adicional a su capacidad

para inhibir los oncogenes E6 y E7 del VPH, podría ejercer un efecto antiproliferativo en células tumorales derivadas de CaCu. Nuestro interés fue utilizar la luteolina en combinación con el flavonoide quercetina para aumentar los efectos antiproliferativos y antiinflamatorios en las células tumorales VPH positivas.

## **ANTECEDENTES**

### **FLAVONOIDES**

Los flavonoides son metabolitos secundarios de origen natural, provenientes de las frutas, verduras y plantas, dentro de estos se pueden encontrar gran diversidad de flavonoides, los cuales se encuentran anidados en diferentes grupos, además de distinguirse por su grado de oxidación, cantidad de grupos hidroxílicos y los azúcares ligados a la moléculas, De esta manera los flavonoides, se dividen en: flavonas, flavanonas, flavanoles, isoflavonas, flavonoles y antocianidinas (Figura 1) (Delgado, 2015). La clasificación es dependiendo de su capacidad y composición química, se pueden encontrar mayormente como glucósidos o en forma libre. Sin embargo, la clasificación de estos compuestos de bajo peso molecular, se basa en función del estado de oxidación del anillo heterocíclico (anillo C) y de la disposición del anillo B. Las características que poseen en estos anillos hacen que las capacidades sean diferentes, por lo tanto, cada potencial antioxidante es diferente y es por ello que las interacciones entre estos aumentan el efecto al momento de actuar como secuestradores de radicales libres (RL) (Álvarez y Orallo, 2003).



**Figura 1.** Estructura química de flavonoides (Julián, 2009).

## MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FLAVONOIDES

Los flavonoides son moléculas estructuralmente de bajo peso molecular, estos comparten una estructura difenilpirano, compuesta por dos anillos fenilo (A y B) ligados a un anillo C de pirano heterocíclico, gracias a la composición estructural que estas mantienen les permite tener diferentes patrones y sustituciones en el anillo C, por otro lado los átomos de carbono se biosintetizan de dos maneras

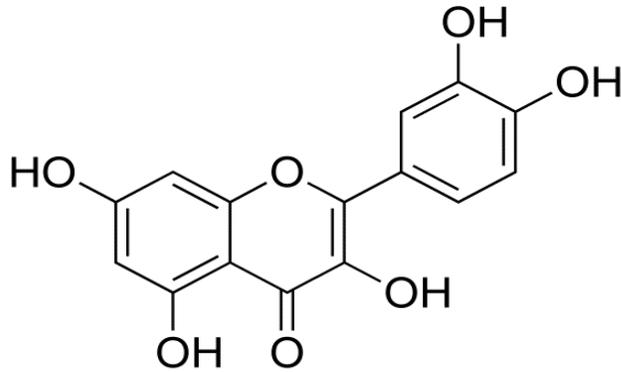
diferentes, el anillo "A" se biosintetiza a través de la ruta de los poliacetatos, mientras que el anillo "B" y la unidad "C3" realizan la ruta de ácido. Estas características permiten una clasificación y capacidad en función de sus características estructurales (Álvarez y Orallo, 2003).

Principalmente desempeñan un papel importante en biología vegetal, ya que controlan las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación celular, entre otras funciones como la donación de electrones, haciendo así presente su capacidad antioxidante, además de que los grupos hidro-fenolicos que tienen son quelantes de hierro y otros metales (Palacios y Boticario, 2011).

Aunque estos metabolitos ejercen su protección a las frutas, verduras, etc., en la actualidad sean implementado en estudios dirigidos a desarrollar tratamientos para enfermedades de importancia en salud pública. Así, debido a su acción estos químicos se han podido usar en diferentes patologías como: diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones virales, úlceras y como, antialérgicos y antimicrobianos (Leyva *et al.*, 2016). Adicionalmente, se ha demostrado que los flavonoides protegen de la fotooxidación a la vitamina E, en la membrana celular reduce la citotoxicidad de lipoproteínas de baja densidad, también tienen asociación con la síntesis de óxido nítrico. Además, los flavonoides inhiben la actividad o expresión génica de otros mediadores proinflamatorios, aparte de COX, y regulan/disminuyen los factores transcripción en procesos inflamatorios y vías antioxidantes (Niedzwiecki *et al.*, 2016).

## **QUERCETINA**

La quercetina se caracteriza por tener un grupo ceto en el carbono C4 y una insaturación entre los carbonos C2 y C3, poseen un grupo hidroxilo adicional en el carbono C3 (Figura 2), además de contar con una gran conjugación con otros compuestos gracias al anillo B, por lo cual tienen una gran capacidad antioxidante, permitiendo mayor eficacia en el mecanismo de acción.



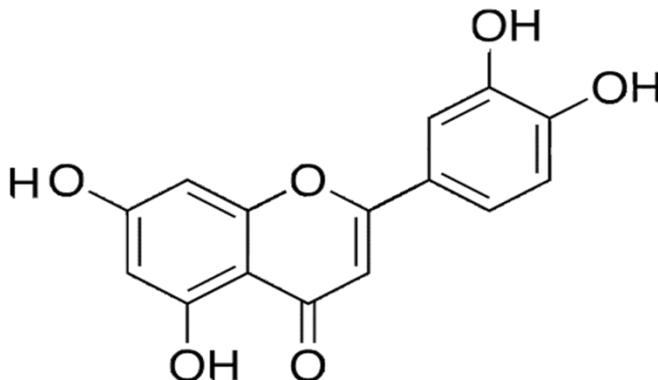
**Figura 2.** Estructura química de quercetina (UNIIQUIM, 2017).

Este flavonoide que pertenece a los flavonoles es un metabolito que se consume comúnmente dentro de la dieta, aunque no en una cantidad suficiente para obtener los beneficios. Particularmente este metabolito ha sido estudiado a lo largo del tiempo, es reconocido por su potencial para emplearse en diversas patologías como:

la diabetes mellitus, cardiopatías, infecciones virales, úlceras, además de tener efecto en anticancerígeno, debido a que no daña las células sanas y es citotóxica con células cancerosas a través de varios mecanismos (Shafabakhsh y Asemi, 2019). También se ha demostrado que protegen de la fotooxidación a la vitamina E en la membrana celular, además inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, evitando la citotoxicidad (Linlin *et al.*, 2015).

## LUTEOLINA

La luteolina cuenta con un grupo ceto en el carbono C4 y una insaturación entre los carbonos C2 y C3 (Figura 3), encontrándose principalmente en forma glicosilada,



**Figura 3.** Estructura química de luteolina (UNIIQUIM, 2017).

este metabolito pertenece a la familia de las flavonas, siendo de los flavonoides menos abundantes en los alimentos.

Se han reportado estudios en los que se evalúan los efectos antimutagénicos, antiagregante plaquetario, antitumoral, antiinflamatorio, antialérgica y

antibacteriana. Además de poseer un alto potencial oxidantes en comparación con

la quercetina, debido a sus propiedades de eliminación de radicales y citoprotectores, en especial cuando interactúan con otros antioxidantes ejerce efectos anticancerígenos, antiinflamatorios y antioxidantes (Jullian y Olea, 2009). Así mismo, se tiene registro que la luteolina exhibe un efecto anticancerígeno en varias líneas celulares de cáncer, aunque no se sabe con exactitud con que mecanismo lo hace, pero se ha demostrado que inhibe los oncogenes E6 y E7 (Jung *et al.*, 2004).

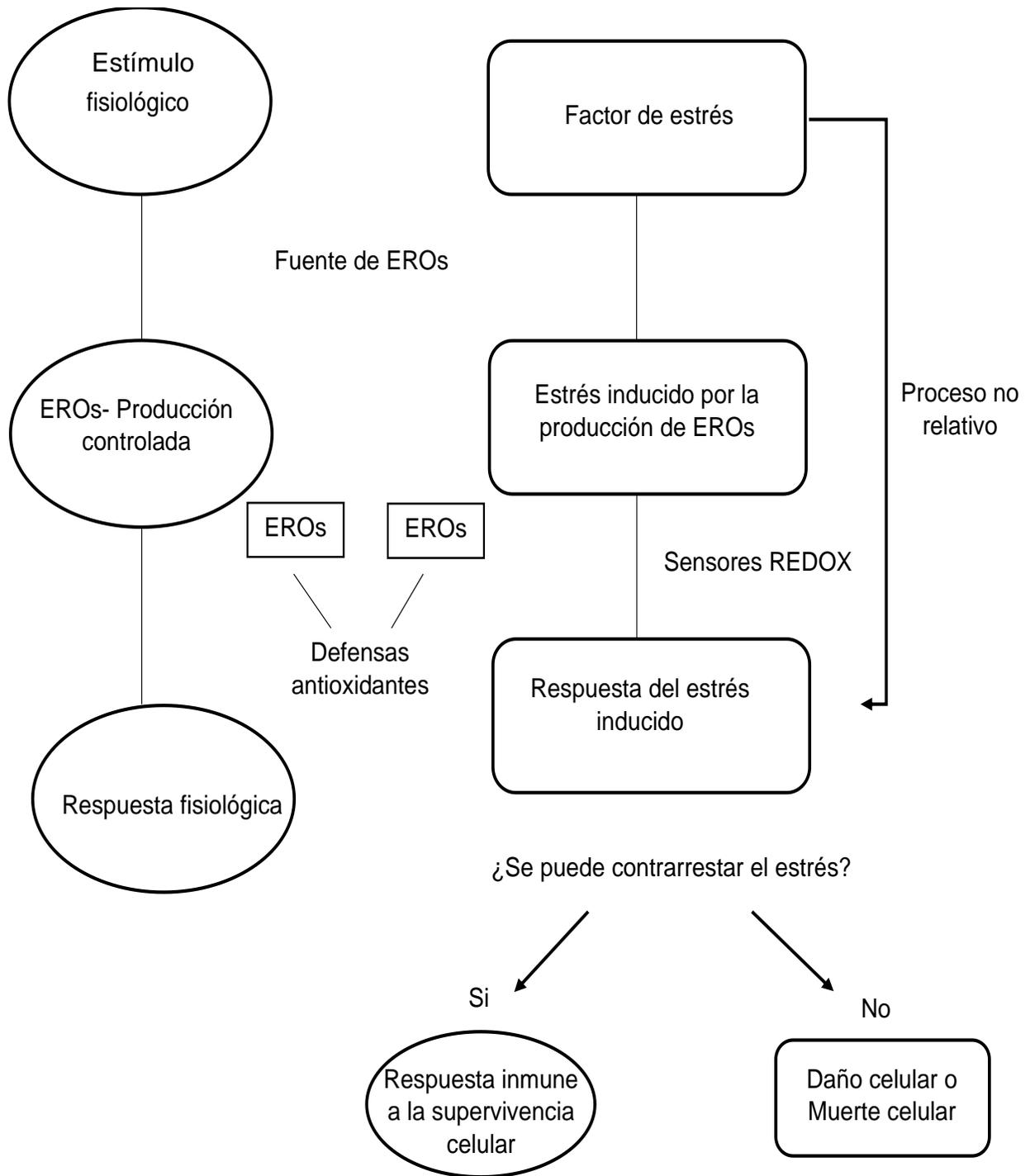
Por otro lado, la luteolina también es capaz de inducir apoptosis por estrés, Wang y colaboradores en un estudio (2017), proponen los mecanismos por los que estos actúan sobre células con cáncer, determinando que algunos de estos son la inducción de la proapoptosis, detención del ciclo celular y la inhibición de la metástasis. Este evento se relaciona con la activación del estrés del retículo endoplasmático (RE), por lo que determinaron que la luteolina podría inducir apoptosis, esto mediada por estrés y disfunción mitocondrial del RE (Ham *et al.*, 2014).

## **PROCESO OXIDATIVO**

Los procesos oxidativos se remiten a dos momentos básicos: 1). Oxidación, que implica pérdida de electrones de hidrógeno con la ganancia de oxígeno en la molécula, y 2). Reducción, que significa ganancia de electrones de hidrógeno con la pérdida del oxígeno. Así, el oxidante reduce la reacción con aquella molécula que oxida. Este proceso es cotidiano en el organismo, el cual aumenta en presencia de ciertos factores y representa el conocido par oxidoreductor o balance redox.

En algunos casos la inestabilidad atómica de los radicales libres colisiona con una biomolécula y le sustrae un electrón, ocasionando una oxidación, perdiendo así su función específica y estabilizando a la molécula en la célula. Si se trata de ácidos grasos polisaturados, se dañan las estructuras ricas en ellas como las membranas celulares y las lipoproteínas (Londoño, 2006). En las primeras se altera la permeabilidad conduciendo al edema y la muerte celular, otra molécula que es dañada por los radicales libres es el DNA; en el daño a los ácidos nucleicos produce bases modificadas, lo que ocasiona serias consecuencias en el desarrollo de

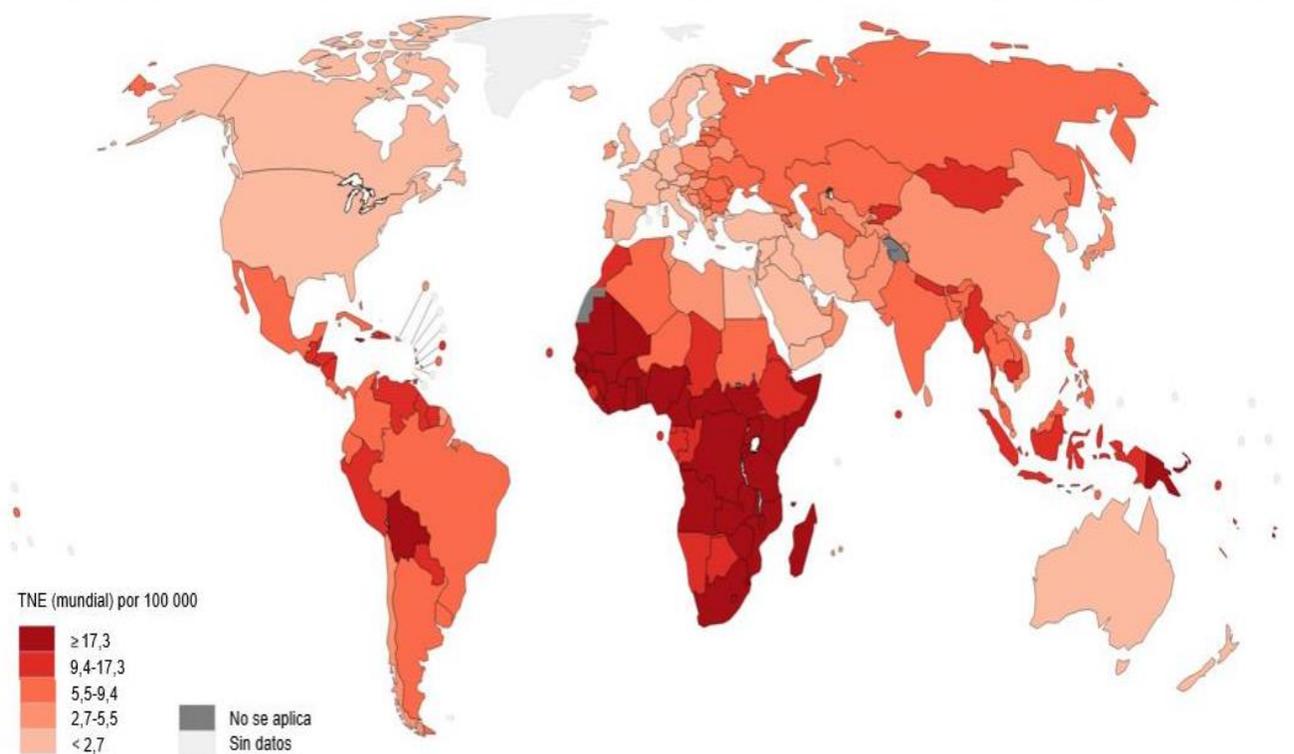
mutaciones y carcinogénesis, o la pérdida de expresión por daño del gen específico (Figura 4) (García *et al.*, 2012).



**Figura 4.** Respuesta celular frente a la formación de EROS. (Adaptado de Corrales, 2012).

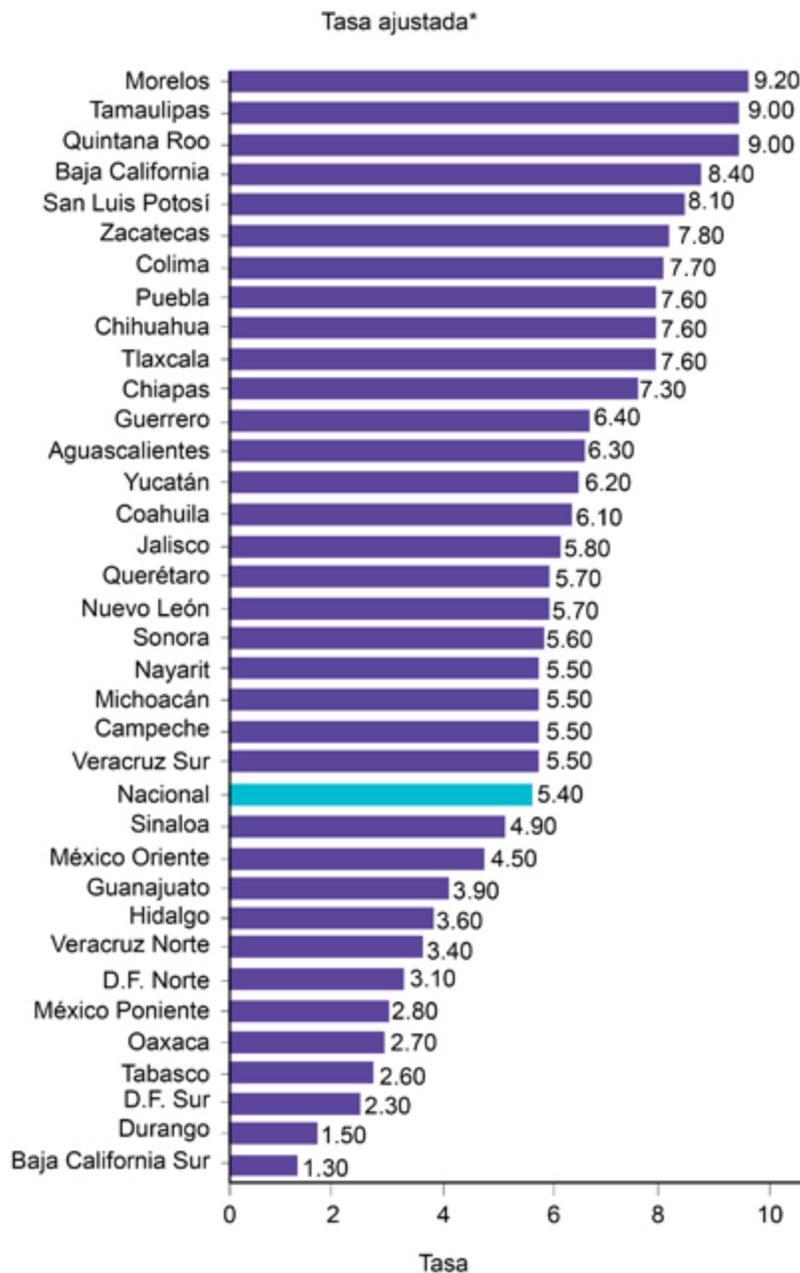
## EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER CÉRVICO UTERINO Y VPH

La OMS registra que el CaCu es el cuarto cáncer más frecuente en la población femenina a nivel mundial. Para el 2018 se registraron 570, 000 nuevos casos que representan el 7,5 % de las muertes femeninas por cáncer. Aproximadamente más de 311 000 defunciones por año son atribuibles al cáncer de cuello uterino, donde más del 85 % se producen en países de ingresos bajos y medianos (Ferlay *et al.*, 2018). La proporción de mortalidad en mujeres con CaCu supera el 60 % en muchos países de ingresos bajos y medianos, duplicando la cifra de países de ingresos altos, donde es menor a 30 % (Figura 5).



**Figura 5.** Estimación de la mortalidad del cáncer cérvico uterino seccionada por edades, 2018 ( CIIC, GLOBOCAN, 2018).

En México, el CaCu es la segunda causa de muerte por neoplasias en mujeres mayores a 25 años (Figura 6), por el cual fallecen 10,4 % de mujeres; así, como una población femenina estimada para el 2012 de 60 millones, 6240 mujeres mueren anualmente por esta enfermedad (Siegel *et al.*, 2015).



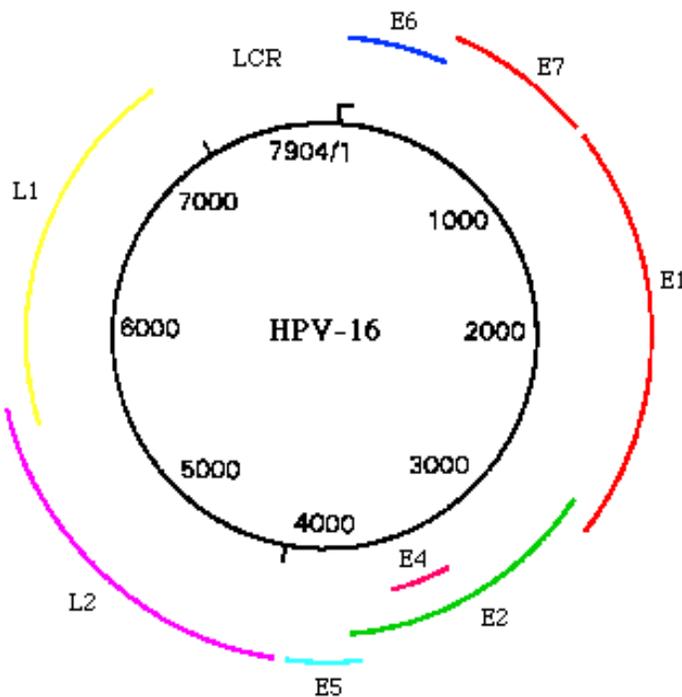
**Figura 6.** Tasa de mortalidad por CaCu de acuerdo con el IMSS, 2011 \*Tasa de mujeres de 25 años o más (Hernández *et al.*, 2015).

Por otro lado, se ha demostrado que el virus del papiloma humano (VPH) es el principal agente etiológico asociado al CaCu. Actualmente se detectaron más de 200 genotipos de VPH's, al menos 14 son oncogénicos (también conocidos como de alto riesgo). La transmisión de estos virus es principalmente por contacto sexual, donde gran porcentaje de la población se infecta poco después de iniciar su vida sexual. La prevalencia de infección por VPH alrededor del mundo es mujeres va de un 2 % a un 44 %, más alta entre mujeres jóvenes, decayendo conforme la edad aumenta. Además, la incidencia de infección con tipos virales oncogénicos es más alta que aquella con tipos virales no oncogénicos (López y Lizano, 2006).

Los genotipos de VPH 16 y 18 son causantes del 70 % de los canceres de cuello uterino y de las lesiones precursoras.

### VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

El virus del papiloma humano (VPH) es el agente causal de varios tipos de cáncer, uno de los tipos de cáncer más comunes desarrollados como causa de este virus



**Figura 7.** Genoma del VPH (Leal y Cortés, 2001).

es el cáncer cérvico uterino, lo que trae como consecuencia ser la segunda causa de muerte generada por neoplasias en la población femenina y por ende ser un problema de salud pública global (Hernández *et al.*, 2001).

Los virus del papiloma humano, son virus de DNA de doble cadena

que pertenecen a la familia *papovaviridae* (Figura 7), estos no poseen una envoltura, y tienen un tamaño de aproximadamente 52-55 nm<sup>2</sup> (Sanabria, 2008). Cuenta con 8000 pares de bases constituidos por ocho genes y una región regulatoria no codificante. Estas partículas virales están compuestas por una cápside proteica que se encuentra formada en un 95 % por la proteína L1, en un 5 % por la proteína L2 y las cuales se ensamblan para formar un capsómero heicosaédricas (Castellsagué, 2008).

La región larga de control (LCR) es considerada como región reguladora del genoma viral, la cual contiene sitios de unión para factores de transcripción y hormonales, que pueden ser reconocidos por proteínas de la célula huésped necesarios para que el virus pueda completar su ciclo de replicación. El genoma del VPH codifica para dos tipos de genes, aquellos que son codificados en las etapas tempranas de la infección, conocidos como E (lo cual hace referencia a su temprana activación). Se localizan 6 genes tempranos: E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7 (aunque se considera que E4 es un gen tardío) y dos tardíos: L1 y L2. Los genes tempranos codifican proteínas involucradas en la replicación y regulación viral, así como en su capacidad carcinogénica (Tabla 1). Por otro lado, los genes tardíos codifican las proteínas estructurales que conforman la cápside viral (Jung *et al.*, 2004).

**Tabla 1.** Descripción de las características funcionales de los genes en VPH (Castro, 2006).

<b>Genes de VPH-AR</b>	<b>Funciones</b>
<b>LCR</b>	-Región no codificante, pero es necesaria para la replicación del virus y el control de la expresión genética.
<b>E5</b>	-Modula el proceso de transformación. -Posee la capacidad de unirse al receptor del factor de crecimiento epidermal, además de incrementar su expresión en la superficie celular al inhibir su degradación.
<b>E6</b>	Se une a E6AP, formando un complejo que degrada a p53.

	Provoca inhibición de la apoptosis celular y aumento de la proliferación de las células dañadas.
<b>E7</b>	E7 se une a pRb, disocia el complejo pRb/E2F, promueve su degradación y la activación de E2F. Induce la progresión del ciclo celular, la iniciación de la mitosis y la inhibición de la diferenciación celular.
<b>E1</b>	Funciona como un iniciador de la replicación, se une específicamente al origen de replicación viral.
<b>E2</b>	Regula la replicación y la transcripción del ADN viral. Reprime la transcripción de E6 y E7.
<b>E4</b>	Regula la expresión de genes tardíos, controla la maduración viral y la salida de los viriones.
<b>L1</b>	Proteína estructura, representa el 80 % de la cápside viral
<b>L2</b>	Proteína estructural que se asocia internamente al subgrupo de capsómeros formados por L1.

---

## **GENOTIPOS DE VPH**

Hasta el momento se han descrito más de 200 genotipos del virus del papiloma humano (VPH) según la OMS, dentro de los cuales 100 genotipos son virales y se han descrito 85 tipos; alrededor de 40 genotipos son los que pueden infectar el área genital, pero solamente 15 se han relacionado con el cáncer de cuello uterino y lesiones pre malignas de estas zonas mucosas, esos son catalogados como virus de alto riesgo debido a su alto potencial oncogénico (tabla 2) (Sanabria, 2008). Estos virus del papiloma humano a su vez se clasifican en cutáneos y mucosos. Los tipos de VPH mucosos están asociados más con lesiones benignas considerando así a los genotipos: 6 y 11, de " bajo riesgo", estos se encuentran en verrugas genitales. Los VPH que se asocian con lesiones malignas son los genotipos: 16, 18, 30, 32, 33, 35, 45, 51 y 52, principalmente son identificados como virus de "alto riesgo". Los de mayor riesgo son 16 y 18, por ser los oncogénicos más comunes

causantes del 70 % de los cánceres cervicales en el mundo. Otras clasificaciones menos estrictas incluyen a los tipos 56, 58 y 59, 68, 73 y 82, y los tipos 26, 53 y 66 como probablemente carcinogénicos (Rivera *et al.*, 2002).

**Tabla 2.** Tipos de cáncer que se asocian a diferentes genotipos del VPH, entre los cuales se resaltan en negritas los más patógenos, mientras que el signo de interrogación hace referencia a la presencia de un genotipo sin estar confirmado (Rivera *et al.*, 2002).

<b>Tipos de lesiones</b>	<b>VPH más fuertes</b>	<b>VPH menos fuertes</b>
Ca. Cervical	6, 16, 18, 31, 45	6, 10, 11, 26, 33, 35, 39, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 66, 68, 73? Otros no clasificados.
Ca. Ano genital	6, 16, 18	11, 31, 33
Ca. De piel no melanoma	5, 8, 17	
Ca. Amígdala	16	18, 33
Ca. Orofaringeo	16	3, 11, 18, 33, 57
Ca. Laríngeo	16	6, 11, 18, 35
Ca. Esófago	18, 18	6, 11
Ca. Mama		33?
Ca. Próstata	16, 18	?
Ca. Ovario	?	?
Ca. Uretra	16	
Ca. Escamoso en epidermis verruciforme	5, 8	14, 17, 20, 47

## **VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y CÁNCER CÉRVICO UTERINO**

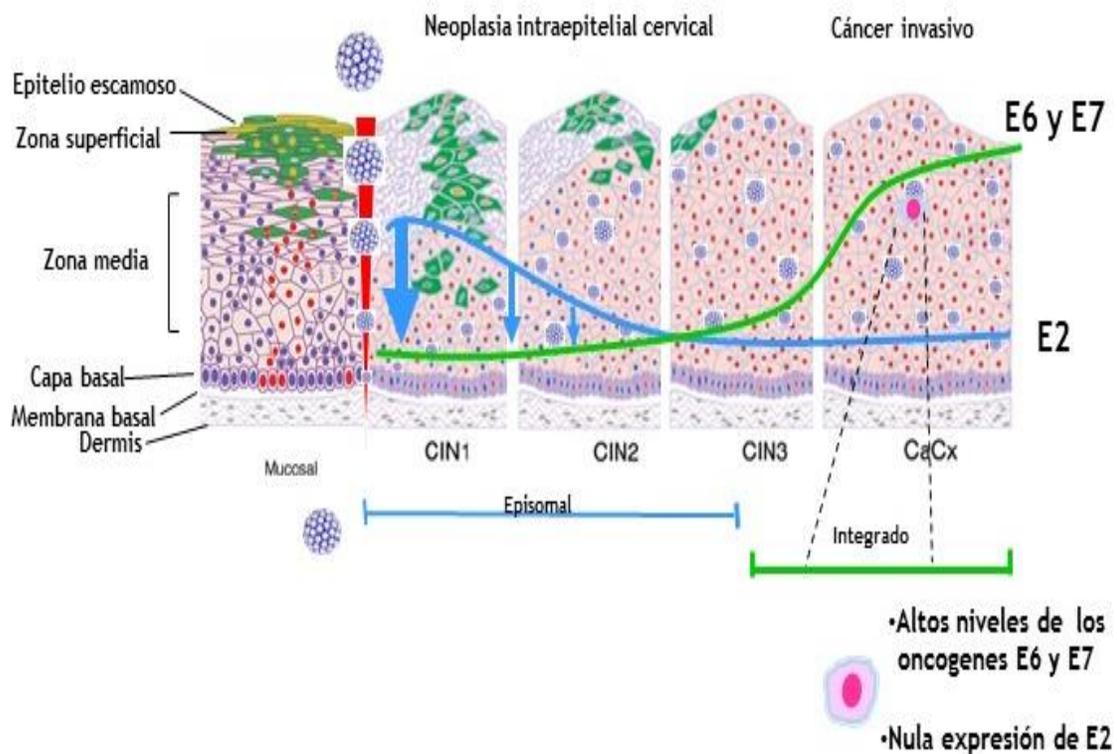
Se ha descrito que la infección por VPH de alto riesgo es una condición necesaria, más no suficiente para el desarrollo de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) y de cáncer. La infección persistente por genotipos oncogénicos de VPH de alto riesgo como 16 y 18, son los principales factores etiológicos en el desarrollo del cáncer cérvico uterino (Hopman *et al.*, 2005). El 97 % de las neoplasias cervicales y tumores malignos contienen el VPH, y dado que existen otros factores directamente relacionados con la asociación viral, se ha determinado que no siempre es necesaria para la transformación maligna, por lo consiguiente, es ligada a carcinoma de células escamosas.

La infección por VPH es una enfermedad de transmisión sexual, donde hombres y mujeres se ven involucrados en la cadena epidemiológica. Tomando diferentes papeles como: asintomáticos VPH positivos, transmisores y pueden desarrollar infección VPH productiva y generar lesiones o neoplasias. Todos estos factores hacen que la infección por VPH esencialmente este directamente relacionada con la actividad sexual, involucrando número de parejas sexuales como un factor fundamental para considerar individuos de alto riesgo (Lizano, 2009).

Las afectaciones producidas por la infección del VPH van a depender de los diversos genotipos en el mismo. Se han identificado algunos tipos, los cuales solo inducen lesiones productivas (benignas) que no se asocian a cáncer. En dichas lesiones solo se detecta expresión de los productos virales, los cuáles no son oncogénicos y se generan solo verrugas bien localizadas no tumorales.

En algunos casos al término de la infección natural solo una parte de las mujeres logran desarrollar anticuerpos contra el VPH, los cuales no siempre resultan ser protectores (Stanley, 2007). Durante el proceso de infección, el VPH infecta al epitelio cervical de manera localizada y una gran parte de las infecciones son eliminadas o resueltas por el sistema inmune, por lo tanto, da como resultado exposición insuficiente al sistema inmune, teniendo como efecto que la partícula del papiloma use diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune del huésped (Kanodia, 2007).

Si la infección viral persiste asociada a una microabrazación de la mucosa cérvico vaginal, donde el VPH tiene acceso a las células de la capa basal del epitelio. En estas células el virus se replica y genera viriones, las células epiteliales diferenciada conllevan las partículas virales. En los primeros estadios del carcinoma cervical, el virus se encuentra en forma extracromosomal, no integrado como un episoma. En este proceso se expresan las proteínas tempranas E1, E2, E4 y E5, las proteínas tardías como L1 y L2. Cuando el virus se integra al genoma celular, el genoma viral se rompe en el gen E2 y este proceso está asociado con la expresión de las oncoproteínas E6 y E4 de VPH. (21) Estas proteínas degradan a las p53 y pRb que regulan el ciclo celular. La carencia de p53 y pRb desencadenan procesos de transformación e inmortalización celular y el virus controla la célula epitelial (Mateos *et al.*, 2016). En este proceso se inicia la carcinogenesis cervical involucrando la migración de las células tumorales a tejidos distantes, como un proceso metastásico (Figura 8).



**Figura 8.** Infección del cérvix por Virus del Papiloma Humano (Bermúdez, 2018).

## **LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO**

-La línea celular BMK-16/myc es derivada de células primarias epiteliales de riñón de ratón recién nacido (BMK) cepa BLAL/c, que fueron transfretadas de manera estable con el genoma de VPH 16 que expresan los oncogenes E6 y E7 (Crook *et al.*,1989).

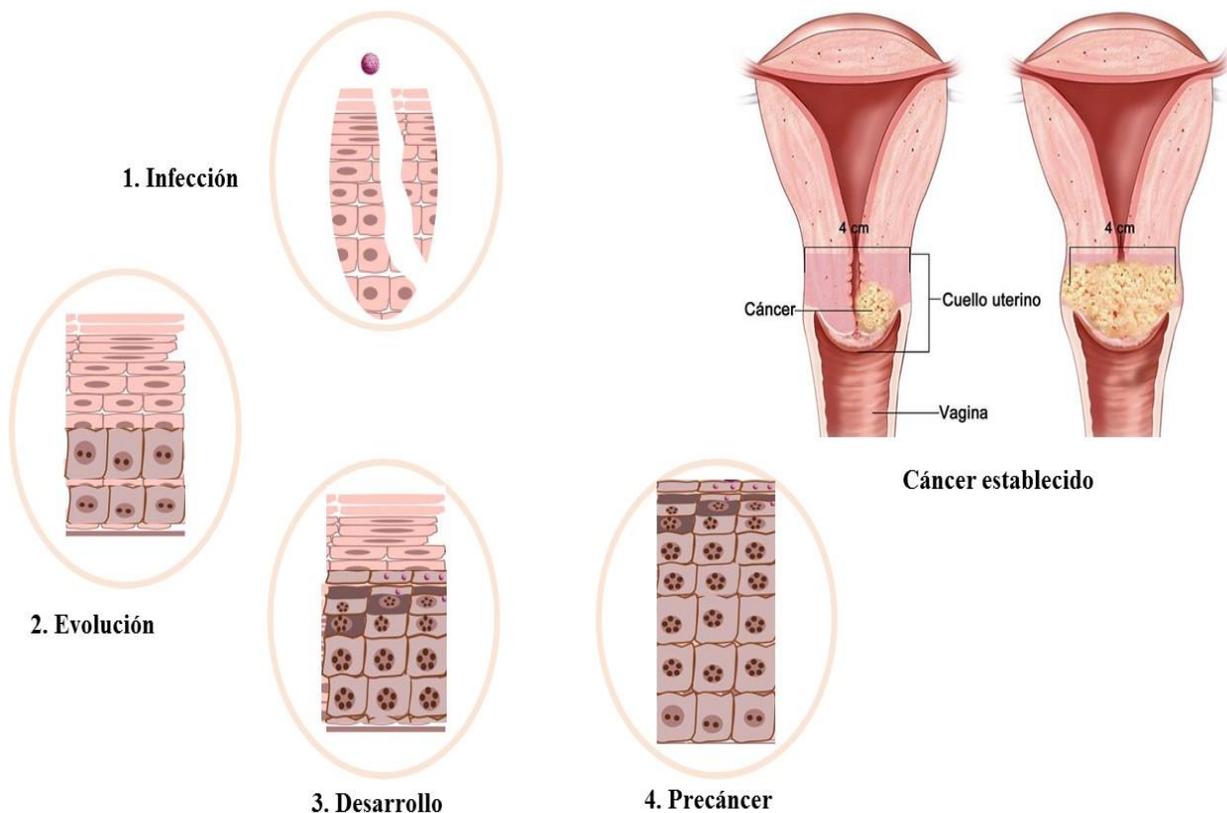
-Línea celular HeLa de origen humano (*Homo sapiens*), derivada de una muestra de adenocarcinoma en cuello uterino de una paciente de 31 años de edad con etnicidad negra. Las células son positivas para la queratina mediante tinción con inmunoperoxidasa. Se ha informado que las células HeLa contienen secuencias del virus del papiloma humano 18 (HPV-18) (ATCC, 2021).

- Línea celular SiHa de origen humano (*Homo sapiens*), derivada de una muestra de carcinoma de células escamosas de cuello uterino de una paciente de 55 años de edad con etnicidad asiática. Esta línea se estableció a partir de una muestra de tejido primario obtenido después de la cirugía realizada al paciente. Se informa que la línea contiene un genoma integrado del virus del papiloma humano tipo 16 (HPV-16, 1 a 2 copias por célula) (ATCC, 2021).

## **FASE PROLIFERATIVA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO**

La proliferación es muy importante en el desarrollo del cáncer cérvico uterino, ya que dicho evento da pauta para el comportamiento de las células y por ende a la progresión de esta patología, en este proceso entran algunos oncogenes de gran impacto. La expresión de E6 y E7, de un ARNm bajo el control del promotor temprano LCR, evita que la célula basal interrumpa el ciclo celular una vez que este migra al sustrato suprabasal del epitelio. Estas proteínas retardan la diferenciación celular y promueven la proliferación mediante interacciones con proteínas celulares responsables del control celular. Todo esto se ve involucrado en el proceso de

desarrollo desde la infección hasta el precáncer, donde ocurre aumento de proliferación y empieza el cambio morfológico celular iniciando el proceso de carcinogénesis (Figura 9), teniendo la capacidad de invadir otros tejidos y órganos, causando así una metástasis (Solís, 2015).



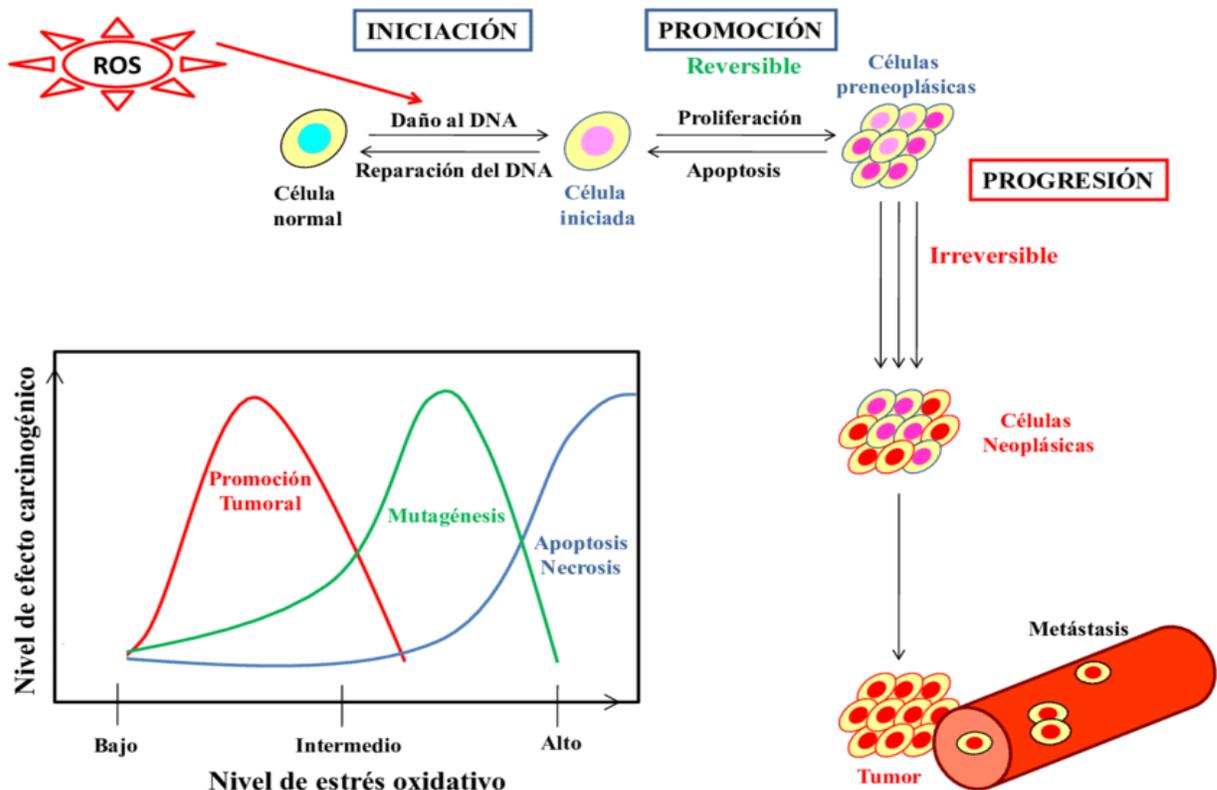
**Figura 9.** Proliferación celular en el desarrollo de CaCu (Adaptado de frazer, 2004).

## CARCINOGENÉNESIS EN RELACIÓN CON EL NIVEL DE ESTRÉS OXIDATIVO

La división celular se comprende por una serie de métodos que tienen efectos estimulantes e inhibitorios, en el proceso de carcinogénesis se ven involucrados varios agentes, ya que el cáncer es de origen clonal, deben de ocurrir mutaciones para que la célula normal cambie su fenotipo y se convierta en una célula neoplásica. Una de las mutaciones puede ocurrir debido al estrés oxidativo como consecuencia de la sobreproducción de EROs, las cuales causan daños a células y

tejidos por su capacidad de reaccionar a distintas biomoléculas, generando daño al DNA, implicado en la carcinogénesis.

Estas mutaciones ocasionan las modificaciones genéticas de la misma, lo que permite la modificación de los productos que en condiciones normales codificaría el gen, con lo cual se establece un proceso carcinogénico (Figura 10).



**Figura 10.** Efecto carcinogénico en relación con el nivel de estrés oxidativo (Adaptado de Valko, 2006).

En el proceso de la carcinogénesis se ven involucradas tres etapas: iniciación, promoción y progresión. Durante el desarrollo del cáncer se ha demostrado que la presencia de EROs tiene un papel fundamental en hacer la progresión sea más rápida (Civetta *et al.*, 2011).

## VÍAS DE APOPTOSIS

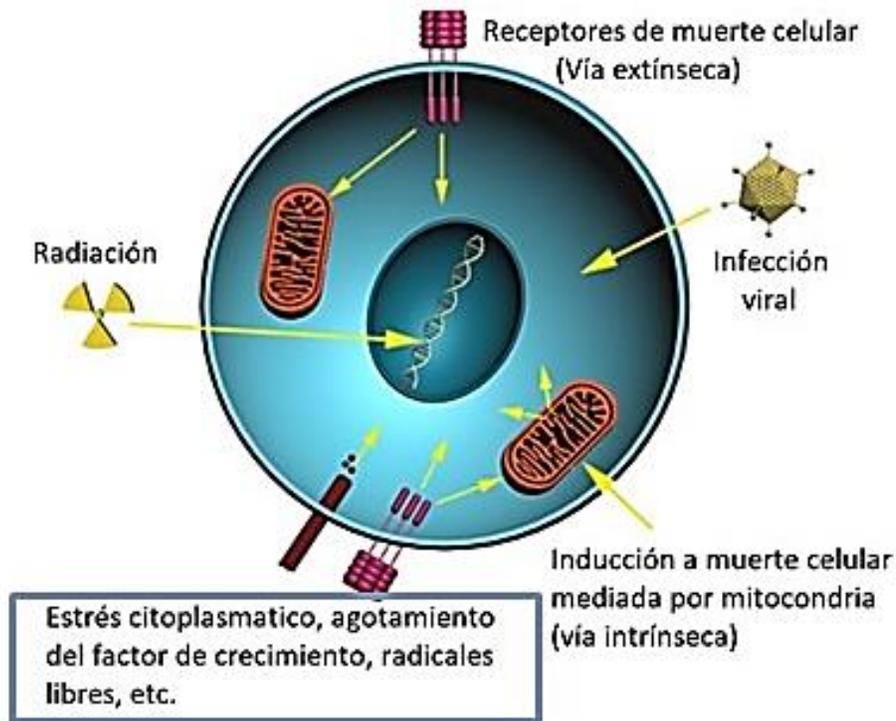
La apoptosis es un mecanismo de muerte celular, en el cual hay una reducción del volumen celular, condensación de cromatina, fragmentación nuclear, activación de caspasa, fragmentación del DNA, vesiculación de la membrana plasmática y formación de cuerpos apoptóticos, estos para posteriormente ser fagocitados por otras células estables para su eliminación (Michael, 2000).

La apoptosis tiene un papel importante en lo que respecta a la muerte celular cuando hay un daño en el DNA es irreparable. Algunas mutaciones oncogénicas, que inhiben la apoptosis conducen a la iniciación, progresión y/o metástasis del cáncer (Boticario y Cascales, 2008).

En la apoptosis hay dos vías la extrínseca e intrínseca (Figura 11), la primera se activa cuando un ligando específico se une con su receptor de muerte en la superficie celular, entre las moléculas que pueden inducir el inicio de apoptosis están: Factores de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ ), ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) y ligando Fas (Fas L), cada uniéndose con su receptor correspondiente. Cuando se activa este mecanismo se produce un estímulo de muerte, lo cual posterior de las activaciones de las pro-caspasas que actuarán sobre sustratos diana, para inducir las características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis: condensación citoplasmática y nuclear, hidrólisis específica de proteínas celulares, ruptura endolítica del DNA en fragmentos y condensación del contenido celular en cuerpos apoptóticos (Lavrik *et al.*, 2005).

En la vía extrínseca la mitocondria tiene un papel fundamental, donde también se verán involucradas las proteinasas de la familia de BCL-2, que incluyen a varios miembros pro-apoptóticos y otros anti-apoptóticos. Estos se activarán cuando perciban un estímulo extracelular (citotóxico, radiación UV, rayos X), o alguna señal intracelular (daño del DNA o inestabilidad nuclear), la membrana externa de la mitocondria sufre cambios en su potencial de membrana y en la transición al citosol, donde el Citocromo C se une al factor activador de las proteasas apoptogénicas,

para la activación de las caspasas, donde se iniciarán los eventos para concluir en muerte celular (Palacios *et al.*, 2011).

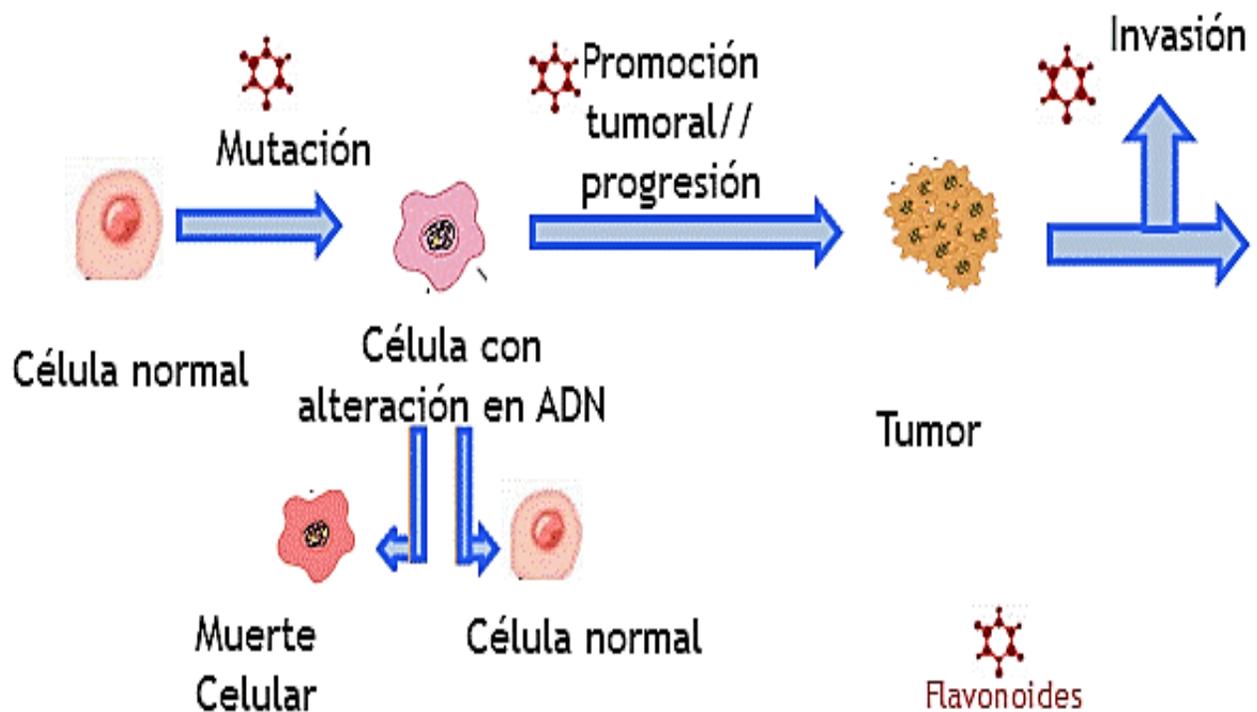


**Figura 11.** Vías de inducción a apoptosis (Modificado de Cell migration lab, 2017).

## MECANISMOS ANTICANCERÍGENOS DE LOS FLAVONOIDES

Debido a procesos de oxidación en la célula el DNA puede dañarse y sufrir mutaciones por lesión directa de los radicales libres sobre las bases, o en forma directa afectando la actividad de las proteínas específicas (como proto-oncogenes y anti-oncogenes), por lo tanto, los flavonoides podrían ser de mucha utilidad en las primeras fases de cáncer o inhibición en las etapas posteriores de progresión o invasión (Figura 12).

En las etapas del proceso carcinogénico, las fases de promoción y progresión, se caracterizan por la inestabilidad a la regulación de proliferación y diferenciación celular. Algunos flavonoides intervienen sobre estas etapas en diferentes tipos celulares, lo que puede efectuar efectos preventivos, de igual forma se pueden ver involucrados en la inhibición de cinasas, enzimas de la ruta metabolización del ácido araquidónico e interactuar con receptores estrogénicos (Álvarez y Orallo, 2003).



**Figura 12.** Representación de acción oxidante de flavonoides en células con cáncer (tomada de Ezequiel *et al.*, 2003).

## **JUSTIFICACIÓN**

Se tiene evidencia de que los flavonoides tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes, antihemorrágicas, vasodilatadoras, antineoplásicas, antivirales, antibacterianas, antialérgicas, hepatoprotectoras y antiproliferativas en células tumorales, por lo cual tienen un potencial terapéutico para diversas enfermedades incluyendo el cáncer. Adicionalmente estos compuestos presentan ventajas respecto otros compuestos naturales, como lo es en su uniformidad de la configuración química (Jung *et al.*, 2004).

Particularmente en cáncer cérvico uterino (CaCu) se ha demostrado un aumento de estrés oxidativo y está asociado con la progresión de la enfermedad. Por lo que el control o la inhibición del proceso oxidativo en CaCu usando flavonoides, como la quercetina y luteolina, podrían inhibir el proceso oxidativo y la proliferación celular además de impedir el crecimiento tumoral. De esta manera los flavonoides podrían ser utilizados en el tratamiento del CaCu y sus lesiones precursoras. El presente proyecto tiene como objetivo evaluar el efecto antiproliferativo de los flavonoides quercetina y luteolina en líneas celulares derivadas del cáncer cérvico uterino, que podrían sentar las bases para su posible tratamiento contra CaCu y sus lesiones precancerosas asociadas a la infección por el VPH.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La quercetina y luteolina tendrán efecto antiproliferativo en líneas celulares derivadas del cáncer cérvico uterino?

## **HIPÓTESIS**

Los flavonoides quercetina y la luteolina tendrán un efecto antiproliferativo celular en las líneas celulares BMK-16/myc, SiHa y HeLa.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar el efecto antiproliferativo de quercetina y luteolina en cultivos celulares derivados de cáncer cérvico uterino.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar el efecto antiproliferativo de los flavonoides quercetina y la luteolina en la línea celular BMK-16/myc.
- Determinar el efecto antiproliferativo de los flavonoides quercetina y la luteolina en la línea celular SiHa.
- Determinar el efecto antiproliferativo de los flavonoides quercetina y la luteolina en la línea celular HeLa.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. CULTIVO CELULAR**

Parte del material biológico consistió en las líneas celulares derivadas de CaCU: **BMK-16/myc, HeLa y SiHa**, las cuales fueron obtenidas del material criopreservado del CISEI (INSP).

Las líneas celulares BMK-16/myc, HeLa y SiHa, se cultivaron en medio de cultivo DMEM (Medio Eagle's Meedium), suplementado con el 10 % de SFB (Suero Fetal Bovino), en cajas T-25 y T-75, tratadas para cultivo de células adherentes en monocapa. Los cultivos fueron mantenidos durante el proceso bajo condiciones constantes a 37 °C, con un pH de 7.0 -7.2, y una humedad relativa del 95 % saturante al 5 % de CO<sub>2</sub>, en una incubadora.

#### **1.1 Línea celular BMK-16/myc**

Las BMK-16/myc, es derivada de una línea celular de origen epitelial de riñón de ratón, transformada con el genoma completo de VPH 16 y con la sobre expresión del gen c-myc, además que expresa los oncogenes E6 y E7 de VPH 16.

#### **1.2 Línea celular HeLa**

Las células HeLa, es una línea derivada de una muestra de cáncer cérvico uterino de origen humano transformada con el VPH 18, positivas para queratina por tinción con inmunoperoxidasa.

### **1.3 Línea celular SiHa**

Línea celular derivada de una muestra de cáncer cérvico uterino de origen humano, el cual contiene el genoma integrado del VPH 16.

## **2. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR**

El ensayo de proliferación y viabilidad celular, se realizó basándose en la técnica colorimétrica MTT, en el cual se utilizó compuesto de tetrazolium. Este compuesto reacciona con las enzimas deshidrogenasas mitocondriales en las células vivas y forma cristales de formazan, con esto se determina el número de células viables en la proliferación, así como la citotoxicidad, adherencia celular, quimiotaxis y apoptosis. Los cristales al ser disueltos con DMSO o etanol, dan una coloración que se puede cuantificar a 540 nm.

### **2.1 Ensayo de MTT con la línea celular BMK-16/myc**

El ensayo de proliferación y viabilidad celular se realizó a partir de un cultivo confluyente de células BMK-16/myc, posteriormente se realizó el ensayo de dos grupos experimentales (control (A) y tratamiento (B)) con 15,000 células aproximadamente en cada pozo, en una placa de 96 pozos, los grupos experimentales fueron tratado como se describe:

Grupo A): Células sin tratamiento, Grupo B): Células tratadas con 100  $\mu$ M con quercetina. Mientras que para luteolina de igual forma se trabajó con 2 grupos experimentales de dos pozos: Grupo A): Células sin tratamiento, Grupo B): Células tratadas con 20  $\mu$ M con luteolina.

La viabilidad celular se midió a 0, 24, 48 y 72 horas, la reacción se realizó sustituyendo el medio de cultivo y se agregó 100  $\mu$ L de PBS 1X. El cual contiene 10 mg/ml del reactivo de MTT, posteriormente por 4 horas se mantuvieron bajo una atmósfera oscura, húmeda relativa del 95 % y saturante al 5 % de CO<sub>2</sub>, en una incubadora a una temperatura 37 °C. Posteriormente, se eliminó el reactivo de MTT y los cristales formados se diluyeron con 100  $\mu$ L de DMSO. Una vez disuelto, obtuvo una coloración en el medio que se leyó a una absorbancia óptima de una longitud de onda de 540nm, siendo la lectura directamente proporcional al número de células

metabólicamente activas (Promega, 2009), este proceso se realizó para cada hora, respectivamente.

## **2.2 Ensayo de MTT con la línea celular HeLa**

El ensayo de proliferación y viabilidad celular se realizó a partir de un cultivo confluyente de células HeLa, posteriormente se realizó dos grupos experimentales a) Control sin tratamiento y b) Tratamiento con flavonoides con 250  $\mu$ M con quercetina. En los ensayos se utilizaron 10,000 células aproximadamente en cada pozo en una placa de 96 pozos, los grupos fueron tratados como se describe.

La viabilidad celular se midió a 0, 24, 48 y 72 horas. La reacción se realizó para cada hora respectivamente, sustituyendo el medio de cultivo y se agregó 100  $\mu$ L de PBS 1X. El cual contiene 10 mg/ml del reactivo de MTT, posteriormente por 4 horas se mantuvieron bajo una atmósfera oscura, húmeda relativa del 95 % y saturante al 5 % de CO<sub>2</sub>, en una incubadora a una temperatura 37 °C. Posteriormente, se eliminó el reactivo de MTT y los cristales formados se diluyeron con 100  $\mu$ L de DMSO. Una vez disuelto, obtuvo una coloración en el medio que se leyó a una absorbancia óptima de una longitud de onda de 540nm, siendo la lectura directamente proporcional al número de células metabólicamente activas (Promega, 2009), este proceso se realizó para cada hora respectivamente.

## **2.3 Ensayo de MTT con la línea celular SiHa**

El ensayo de proliferación y viabilidad celular se realizó a partir de un cultivo confluyente de células SiHa, posteriormente se realizó dos grupos experimentales a) Control sin tratamiento y b) Tratamiento con flavonoides con 250  $\mu$ M con quercetina. En los ensayos se utilizaron 10,000 células aproximadamente en cada pozo, en una placa de 96 pozos, los grupos fueron tratados como se describe.

La viabilidad celular se midió a 0, 24, 48 y 72 horas. La reacción se realizó para cada hora respectivamente, sustituyendo el medio de cultivo y se agregó 100  $\mu$ L de PBS 1X. El cual contiene 10 mg/ml del reactivo de MTT, posteriormente por 4 horas se mantuvieron bajo una atmósfera oscura, húmeda relativa del 95 % y saturante

al 5 % de CO<sub>2</sub>, en una incubadora a una temperatura 37 °C. Posteriormente, se eliminó el reactivo de MTT y los cristales formados se diluyeron con 100 uL de DMSO. Una vez disuelto, obtuvo una coloración en el medio que se leyó a una absorbancia óptima de una longitud de onda de 540nm, siendo la lectura directamente proporcional al número de células metabólicamente activas (Promega, 2009), este proceso se realizó para cada hora respectivamente.

### **3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE PROLIFERACIÓN CELULAR**

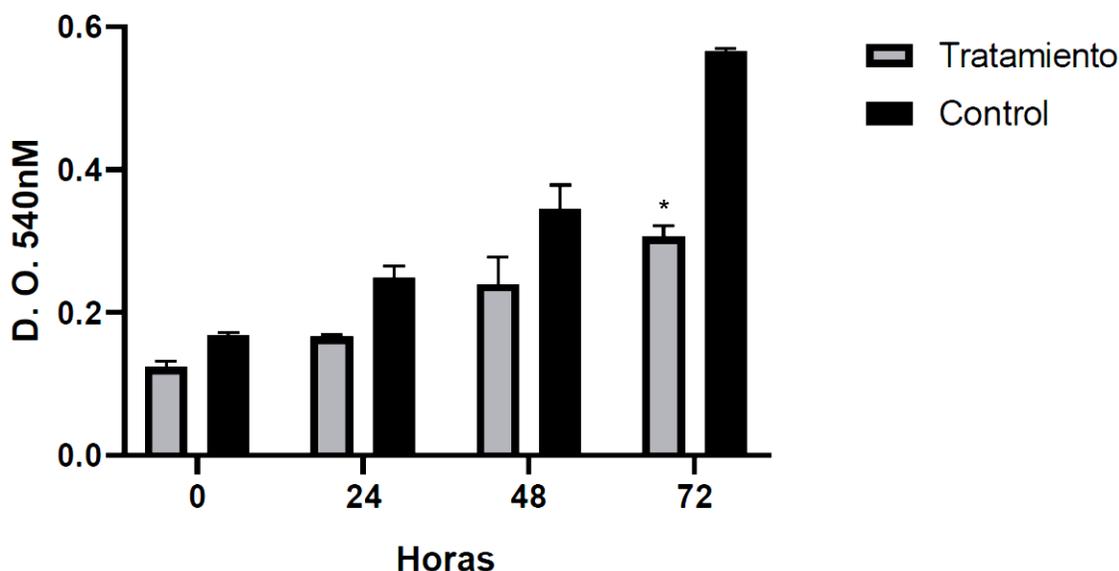
Los datos serán analizados con el software GraphPd Prism 5. Para los estudios de proliferación, la prueba ANOVA se realizó considerando triplicados de tres ensayos independientes, considerando así un valor de significancia  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

Para determinar el efecto antiproliferativo de quercetina sobre la línea celular BMK-16/myc, se realizaron ensayos de MTT para la evaluación de la viabilidad celular como se describe en la metodología.

La gráfica 1, muestra que la quercetina presenta efecto antiproliferativo a partir de las 24 hrs posterior al tratamiento a la concentración de 100  $\mu$ M, el efecto se observó hasta las 72 hrs \*  $p < 0.05$  considerando el valor estadísticamente significativo cuando se comparó con el grupo control (células sin tratamiento).

**Evaluación del efecto antiproliferativo quercetina**

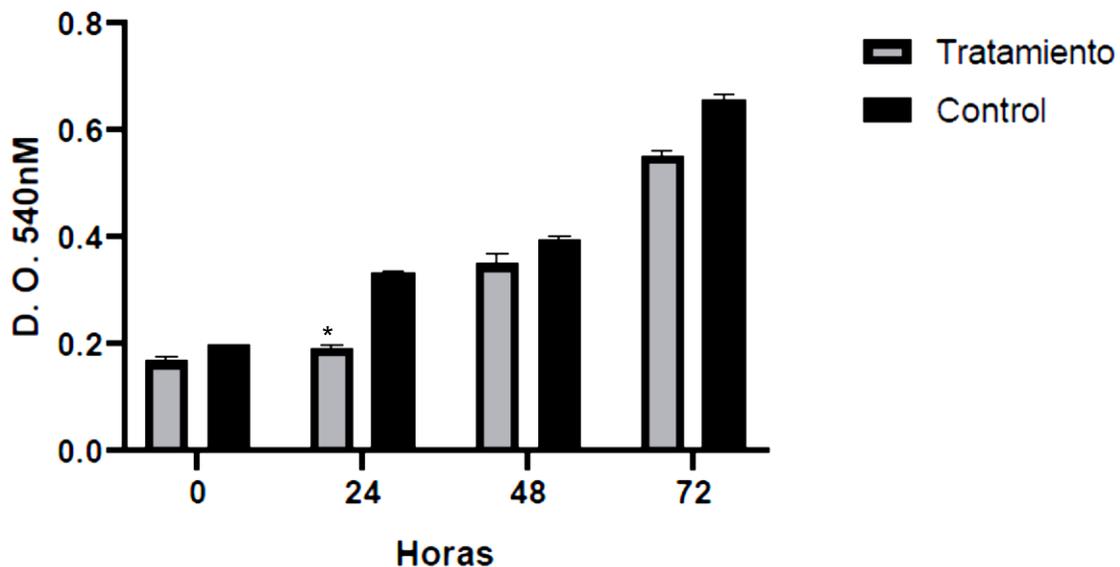


**Grafica 1.** Evaluación de efecto antiproliferativo en la línea celular BKM-16/myc, tratado con una concentración de 100  $\mu$ M de quercetina, las cuales fueron medidas a las 0, 24, 48 y 72 hrs.

Adicionalmente, se evaluó el efecto antiproliferativo de Luteolina sobre la línea celular BMK16/myc con la concentración de 20  $\mu$ M usando el ensayo de MTT

(gráfica 2). Se determinó que la luteína tiene un efecto antiproliferativo hasta las 24 hrs posterior al tratamiento, (detectando diferencias significativas respecto al grupo control \*  $p < 0.05$ ), no obstante este efecto no se mantiene a las 72 hrs, existiendo así un aumento en la proliferación celular a las 72hrs; sin embargo, fue menor al crecimiento celular de las células sin tratamiento (control)  $p < 0.05$ .

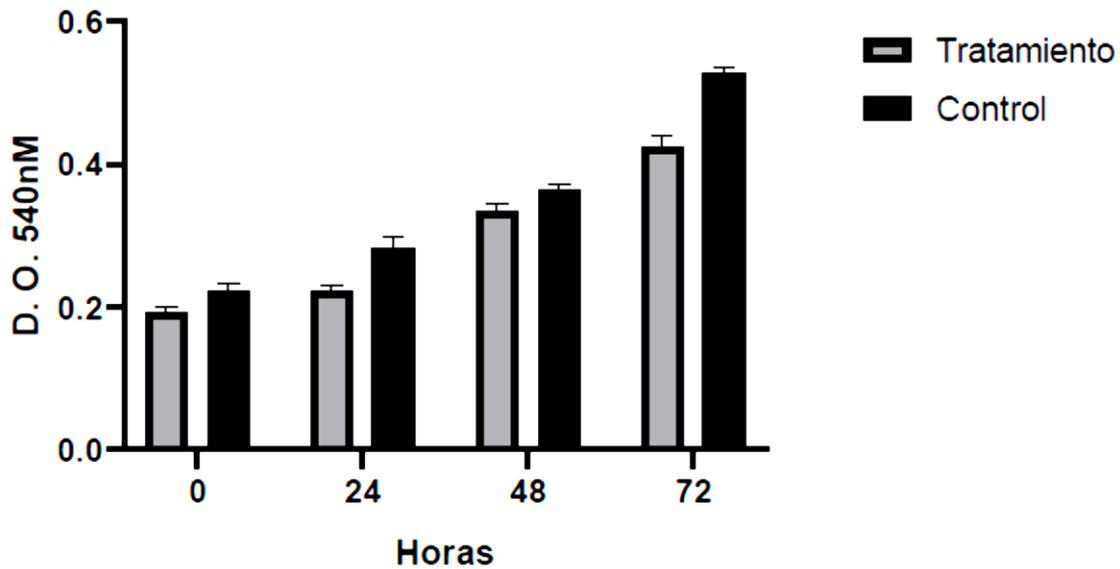
### Evaluación del efecto antiproliferativo Luteolina



**Gráfica 2.** Evaluación de efecto antiproliferativo en la línea celular BKM-16/myc, tratado con una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de luteolina, midiendo la densidad óptica a las 0, 24, 48 y 72 hrs.

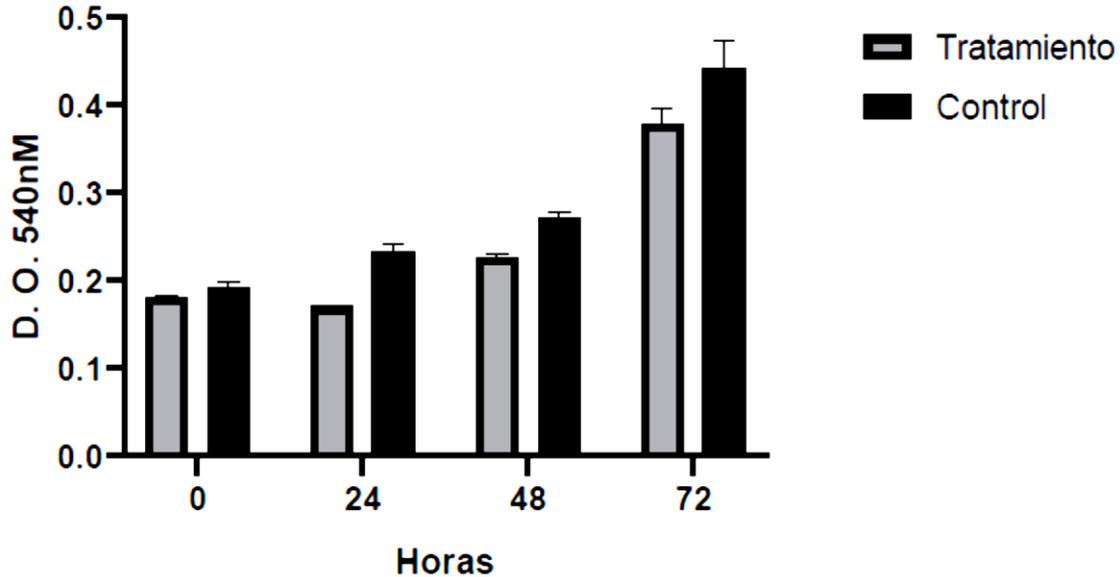
Por otro lado, se utilizaron las líneas celulares HeLa (gráfica 3) y SiHa (gráfica 4) humanas transformadas con el VPH 18 y 16 respectivamente, en ambas líneas celulares se detectó bajo efecto antiproliferativo por la quercetina, no detectando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), esto a pesar de que se evaluó el efecto de la quercetina a una concentración inicial de 100  $\mu\text{M}$ , pero al no obtener resultados con dicha concentración para ambas líneas celulares, se optó por aumentarla a una concentración de 250  $\mu\text{M}$  sobre las líneas celulares transformadas con el VPH.

### Evaluación del efecto antiproliferativo quercetina en HeLa



**Grafica 3.** Evaluación de efecto antiproliferativo en la línea celular HeLa, tratada con una concentración de 250  $\mu$ M de luteolina, midiendo la densidad óptica a las 0, 24, 48 y 72 hrs.

### Evaluación del efecto antiproliferativo quercetina en SiHa



**Grafica 4.** Evaluación de efecto antiproliferativo en la línea celular SiHa, tratada con una concentración de 250  $\mu$ M de luteolina, midiendo la densidad óptica a las 0, 24, 48 y 72 hrs.

## DISCUSIÓN

Los flavonoides son metabolitos secundarios que interactúan con las especies reactivas de oxígeno, las cuales están involucradas en diversas enfermedades como el cáncer, debido a que esta patología tiene un proceso inflamatorio que condiciona el avance de la neoplasia.

El efecto de metabolitos como quercetina y luteolina ha sido reportado en diferentes líneas celulares derivadas del cáncer como, cáncer de próstata, vejiga y pulmón (Pérez, 2003), indicando la importancia del efecto terapéutico de estos flavonoides para el cáncer. En el presente trabajo se analizaron los efectos antiproliferativos de quercetina y luteolina en las líneas celulares BMK-16/myc (ratón) y SiHa (humana) transformadas con el genoma del VPH 16, además de la línea celular HeLa (humana) transformada con el VPH 18. En el caso de las células BMK-16/myc se determinó que ambos flavonoides presentan un efecto antiproliferativo a la concentración 100 uM (Quercetina) y 20 uM (luteolina). Interesantemente, en este trabajo se demostró que la luteolina tiene un mayor efecto antiproliferativo que la quercetina en la línea celular BMK-16/myc. Es necesario establecer los mecanismos involucrados en los efectos sobre la viabilidad celular. Una hipótesis se puede deber al hecho que las células tumorales están en constante división celular y su metabolismo es muy acelerado, por tal motivo hay un aumento de radicales libres y por consecuencia un aumento en el estrés oxidativo. Los flavonoides pueden tener efecto en la estabilización del estrés oxidativo, ejerciendo efecto sobre las oncoproteínas E6 y E7 del VPH. La baja expresión de E6 y E7, liberan de la degradación a las proteínas supresoras de tumor p53 y pRB (Leyva *et al.*, 2016). Este evento es muy relevante, ya que particularmente p53 es un sensor de daño celular y del genoma, este detecta cambios irreversibles del ciclo celular y del metabolismo celular incluyendo inestabilidad cromosómica y de más eventos producto de la célula transformada. La célula la dirige a arresto celular para reparar daños, y si no se corrigen, la célula es dirigida a muerte celular por apoptosis, lo cual se refleja como baja actividad en la proliferación detectada en ensayos de proliferación celular.

Por otro lado, se tienen resultados preliminares de los flavonoides quercetina y luteolina en células humanas derivadas de cáncer cérvico uterino. Los resultados indican que se presenta inhibición discreta de la proliferación celular, estadísticamente no significativa. Hasta el momento no podemos realizar una discusión e interpretación más profunda, hasta repetir los ensayos y que sean reproducibles, ya que hay reportes donde se indica que la luteolina si ejerce efecto antiproliferativo en la line celular HeLa.

La implicación terapéutica del uso de los flavonoides en neoplasias y otras enfermedades es ahora muy relevante, ya que se ha demostrado que los flavonoides no solo tienen efecto sobre su acción antioxidante, sino que además se ha determinado que tiene un papel central en la regulación de la respuesta inmune, anti-inflamación y en la angiogénesis. La investigación de este tipo de moléculas abre varias vías de acción y es necesario profundizar para entender su mecanismo de acción para una intervención terapéutica y muy probablemente profiláctica. Aunque en la actualidad hay varios tipos de terapias para estas neoplasias la mayoría de estos tratamientos solo se pueden enfocar hacia un lado, ya sea preventivo o terapéutico, además de que traen consigo efectos secundarios que suelen ser perjudiciales para la salud o bien, solo son enfocados hacia una parte del desarrollo de la neoplasia. Sin embargo, el uso de estos metabolitos con fines terapéuticos tiene muchas ventajas, ya que al ser confirmado su efecto en las neoplasias generadas por CaCu podrían emplearse en ambas fases, tanto preventiva como terapéuticas, cabe destacar que dentro de estas moléculas de origen natural tienen diferencias en su mecanismo de acción.

Por otro lado, los avances en el uso de estos metabolitos traen consigo un gran parte aguas en la conjugación de terapias, o bien, en el uso de transportadores específicos para obtener un mayor efecto en sitios diana, ya que *Fazlullah* y colaboradores en un estudio plantean el retraso del crecimiento tumoral, tomando en cuenta esto se podrían plantear que la migración de células dañas es menor, con un posible efecto focalizado para aplicaciones tópicas, esto para reducir las lesiones ocasionadas con esta patología.

En estudios más recientes, nos plantea el uso de nanopartículas como solución a la baja biodisponibilidad de los flavonoides, Dobrzynska y colaboradores realizaron una revisión a diferentes estudios donde emplearon uso de nanotecnología. Durante la revisión se presentan estudios en diferentes líneas celulares de cáncer como: A546, B16F10, MCF7, HePG2, CT26 y H292, en las cuales se experimentó el uso de quercetina y diferentes nanopartículas que obtuvieron un resultado prometedor en la inhibición de proliferación y crecimiento tumoral en comparación con la quercetina libre. En el caso de las líneas H292 y GL261 fueron probadas con luteolina y nanopartículas, y aunque arrojaron resultados con mayor eficacia en la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el uso de luteolina sola, los autores hacen referencia a la falta de estudios para este flavonoide en especial (Dobrzynska *et al.*, 2020).

Es por ello que experimentos como los que se realizaron en este trabajo son importantes, debido a que nos dan la oportunidad de explotar al máximo los beneficios de estos metabolitos, para poder obtener un mayor índice de eficacia sin perder el objetivo de la reducción de toxicidad sistémica por drogas, que es lo que se espera al usar productos de origen natural.

## **CONCLUSIÓN**

Se determinó que la Quercetina presenta efecto antiproliferativo sobre la línea celular BMK16/myc a la concentración de 100  $\mu$ M.

En el caso de la Luteolina se mostró un efecto transitorio en las 24 y 48 hrs en la línea celular BMK-16/myc a una concentración de 20  $\mu$ M.

La quercetina, mostró efecto antiproliferativo discreto sobre las líneas celulares SiHa y HeLa a una dosis de 250  $\mu$ M.

## PERSPECTIVAS

- Aumentar las concentraciones de ambos flavonoides sobre el efecto antiproliferativo en las líneas celulares.
- Conjugar ambos flavonoides sobre el efecto antiproliferativo en las líneas celulares.
- Determinar la  $IC_{50}$  de los flavonoides sobre el efecto antiproliferativo en las líneas celulares.
- Determinar el efecto antitumoral de ambos flavonoides.
- Analizar el mecanismo de apoptosis en la línea celular BMK-16/myc.

## LITERATURA CITADA

- Álvarez, E. y Orallo, F. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción contra el cáncer. Departamento de farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago. Pp. 140.
- Boticario, C. y Cascales, M. (2008). Apoptosis y cáncer. En: Innovaciones en cáncer UNED Madrid. Pp. 215-249.
- Castellsagué, X. (2008). Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cáncer. *Gynecol oncol.* Pp. 110.
- Castro, L. (2006). Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Iseritia Laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Pontificia universidad Javeriana. Bogotá, D.C. Pp. 104: 28-34.
- Civetta M., y Domingo J. (2011). Carcinogénesis. *Salud Pública de México*, Pp. 53(5), 405-414.
- Crook, T., Almond, N., Murray, A., Stanley, M. and Crawford, L. (1989). Constitutive expression of c-myc oncogene confers hormone independence and enhanced growth-factor responsiveness on cells transformed by human papilloma virus type 16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Biochemistry.* Vol. 86. Pp. 5713-5717.
- Corrales, L. y Muñoz, M., (2012) Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Pp. 13.
- Delgado, L. (2015). Mecanismos de acción implicados den la actividad de flavonoides. *Caenorhabdtis elegans* y líneas células, Departamento de química analítica, nutrición y bromatología. Universidad de Salamanca. Pp. 202.31.
- Dobrzynska, M., Napierala, M. y Florek, E. (2020). Flavonoid Nanoparticles: A promising approach for cancer therapy. *Biomelecules.* MDPI. Vol. 10 Pp. 2-17

- Escamilla, E., Cuevas, E. Y Guevara, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Departamento de Enfermedades Neurodegenerativas. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Rev. Fac Med UNAM Vo. 52. Pp 73-75.
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I. y Bray F. (2018). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today>
- García, E., Saldaña A. y Saldaña L. (2013). El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. Revista Habanera de Ciencias Médicas Vol. 2 N°2. Pp. 197-196.
- Ham, S., Kihong, K., Kwon, T., Bak, Y., Lee, D., Song, Y., Park, S., Park, Y., Kim, M., Kang, J., Honh, T. y Yoon, D. (2014). Luteolin induces intrinsic apoptosis via inhibition of E6/E7 oncogenes and activation of extrinsic and intrinsic signaling pathways in HPV-18- associated cells. Oncology reports. Pp. 2691:2684-2686.
- Hernández, J., Cano, A., Escobar, M., Santiago, O. y Sánchez, L. (2001). Actividad citotóxica de la flavonona glabranina y de su derivado sobre líneas celulares provenientes de cáncer cérvico-uterino. 2ºcongreso nacional de química médica. UNAM. Pp. 5.
- Hopman, A., Kamps, A., Smedts, F., Speel, E., Herrington, S. y Rmaekers, F. (2005). HPV *in situ* hybridization: Impact of different protocols on the detection of integrated HPV. Int J cancer. Pp.419.
- Infante, R. (1997) Clin. Invest. Arterioesclerosis. Vol 9. Pp.19-22.
- Jullian, C, y Olea, C. (2009). Estudio termodinámico y estructural de los complejos de inclusión luteolina-ciclodextrinas. UDC. Pp.53

- Jung, W., Taehoon, C., Donggeun, S., Kwang, W., Hyung-Sik, K., Duck, J. y In-Kwon, H. (2004). Strategies against human papillomavirus infection and cervical cancer. *J Microbiol.* Pp 42:55-66.
- Kanodia, S., Fache, L. y Kast, W. (2007). Mechanisms used by human papilloma virus to escape the hots immune response. *Curr cancer drug targest.* Pp.89:79.
- Lavrik I, Golks, A. y Krammer P. (2005) Death receptor signaling. *J. Cell Sci.* Pp.118: 265-267.
- Leyva, N., Gutierrez, E. y Ambriz, D. (2016) Flavonoids as cytokine modulators A possible therapy for inflammation-related diseases. *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI. Pp.15.
- Limon, D., Díaz, A., Mendieta, L., Luna, F., Zentero, E. y Guevara, J. (2010). Los flavonoides: Mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *Mensajes Químicos*, Vol. XXXIV.UNAM. Pp.153:145- 146.
- Linlin, J., Hupimg, M., Pengcheng, F. Rongmin, G. y Zhengping, J. (2015). Antioxidant potencial, total phenolic and total flavonoid contents of rhododendron antthopogonoides and its protective effect on hypoxia-induce injury in PC12 cells. *Complementary & alternative medicine.* Pp. 12.
- Lizano, M., Carrillo, A. y Contraras, A. (2009). Infección por virus del papiloma humano: Epidemiología, historia natural y carcinogénesis. Unidad de investigación biomédica en cáncer. Instituto Nacional de Cancerología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. Pp.205.
- Londoño, J. (2006). Antioxidantes: Importancia biológica y métodos para medir su actividad. Capítulo 9. Parte II. Pp. 34.
- López, J. y Ancízar, F. (2006). Integración viral y cáncer de cuello uterino. *Rev. Col. Cienc.Quím. Farm.* Vol. 35 (1). Pp. 5-32.

- López, A. y Lizano, M. (2006). Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: Historia que no termina. Unidad de Investigación Biomedica en Cáncer. UNAM-INCan. Cancerología Pp. 31-55
- Martinez, S. (2002). Flavonoids: properties and anti-oxidizing action. Nutr Hosp. 17(16) Pp.271:10-12.
- Mateos, M., Pérez, S., Pérez, M. y Rodríguez, M. (2016). Diagnóstico microbiológico de la infección por el virus del papiloma humano. Procedimientos en microbiología clínica. EIM. Pp. 32.
- Michael, OH. (2000) The biochemistry of apoptosis. Nature. Pp.407: 770-777.
- Niedzwiecki, A., Roomi, M., Kalinovsky, T. y Rath, M. (2016). Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. Nutrients. MDPI. Pp.170.
- Palacios, E., Miro, M. y Boticario, C. (2011). Muerte celular y cáncer: las vías de la apoptosis y de la autofagia como dianas en la terapia del cáncer. Anales de la real academia de doctores de España. Pp. 191-215.
- Pérez, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Revista cubana invest biomed. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas Víctor de Girón. Pp. 57:53-55.
- Promega. (2009). CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay: Instructions for use of products G4000 and G4100. En línea: <http://www.promega.com/tbs/tb112/tb112.pdf>
- Quiñones, M., Miguel, M. y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutrición hospitalaria. ISSN 0212-1611. CIAL, CSIC-UNAM. vol.27, n.1, pp.76-89. ISSN 1699-5198.
- Rivera, R. Aguilera, T. y Larrain, H. (2002). Epidemiología del virus papiloma humano (HPV). Departamento de obstetricia y ginecología. Pp. 11.

- Sanabria, J. (2008). Virus del papiloma humano. Universidad de Ciencias Médicas “Dr. Ernesto Che Guevara de la Serna”. Pinar del rio. Pp. 23.
- Shafabakhsh,R. y Asemi, Z. (2019). Quercetin: a natural compound for ovarian cancer treatment. Pp.58.
- Siegel, R, Jiemin, Ma, Zou Zhaochui, Jemal, A. (2015). Cancer statistics. CA Cancer J Clin. Pp. 64:9-29.
- Solís, T. (2015). Estudios de las posibles conformaciones de los flavonoides quercetina y dihidroquercetina por métodos de mecánica cuántica. Facultad de Ciencias Físico-matemáticas. BUAP. Pp.55:9-11.
- Stanley, M. (2007). HPV: a master avoiding the hots defensos. HPV today. Pp.11
- Vicente, V., Prieto, M. y Morales, A. (2013). Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. Unidad Toxicológica. Universidad de Salamanca. Rev. Toxicológica. Pp.171-173.

## **ANEXO 1**

### **EVALUACIÓN DE PROLIFERACIÓN CELULAR**

#### **MONTAJE DE PLACA**

##### **Material**

- Cultivo celular de BMK-16/myc.
- Medio de cultivo DMEM.
- PBS 1x (Buffer de Fosfato Salino).
- Tripsina EDTA (sigma: T4049-100MI).
- Azul de tripano.
- Cámara de Neubauer.
- Incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C.
- Campana de flujo laminar.
- Placa de 96 pozos.
- Equipo de laboratorio (Cajas de Cultivo Celular, Pipetas estériles, Puntas (1 ml, 200 ul y 10 ul), Micropipetas, vaso precipitado con cloro al 10 %, contenedor para pipetas, sanita de papel, Tubos de cultivo tipo falcón de diferentes volúmenes).

##### **Protocolo**

1. Esterilizar el material de laboratorio en la campana de flujo laminar con luz UV por un lapso no mayor a 15 minutos con el flujo activado. Excepto tripsina y medio de cultivo.
2. A una caja de cultivo celular de células BMK-16/myc colocar 5ml de PBS 1x, para realizar un lavado.
3. Retirar PBS de la caja de cultivo y añadir 150 ul de tripsina.
4. Dejar aproximadamente 5 minutos la tripsina en la caja de cultivo celular.
5. Inactivar la tripsina de la caja de cultivo celular con 1 ml (de ser necesario ocupar más medio) de medio DMEM.
6. Recuperar las células en un tubo Falcón de 15 ml.

7. Centrifugar el tubo falcón con células a 10 min por 2000 rpm.
8. Decantar el sobrenadante del tubo.
9. Resuspender el pelet con 1 ml de medio de cultivo.
10. Tomar 30 ul de células y 30 ul de azul de tripano.
11. Cargar 10 ul del stock de células con azul de tripano a la cámara de Neubauer.
12. Hacer el conteo de células.
13. Posteriormente hacer regla de tres directa, para poder colocar 15,000 células por cada pozo.
14. Colocar la cantidad de células en cada pozo y poner la cantidad restante de medio DMEM hasta llegar a un volumen final de 200 ul.

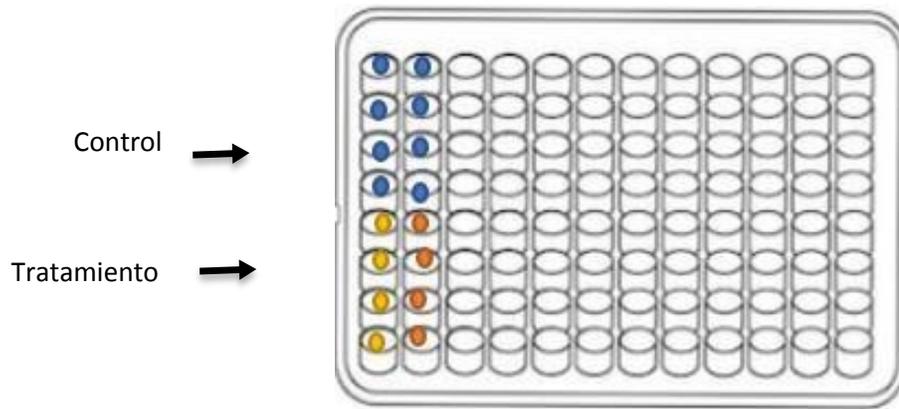
## **ANEXO 2**

### **ENSAYO DE MTT Material**

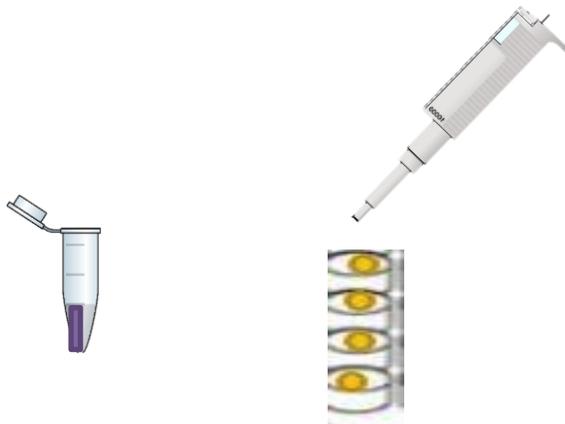
- Incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C.
- Campana de flujo laminar.
- Placa de 96 pozos con células BMK-16/myc
- Stock de Quercetina.
- Stock de Luteína.
- MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide) 0.5 mg/ml.
- DMSO (dimetilsulfóxido).
- Medio de cultivo (DMEM).
- Equipo de laboratorio (Cajas de Cultivo Celular, Pipetas estériles, Puntas (1 ml, 200 ul y 10 ul), Micropipetas, vaso precipitado con cloro al 10%, contenedor para pipetas, sanita de papel, Tubos de cultivo tipo falcón de diferentes volúmenes).

## Protocoló

1. Esterilizar el material de laboratorio en la campana de flujo aminor con luz Uv por un lapso no mayor a 15 minutos con el flujo activado. Excepto MTT, medio de cultivo DMEM, Quercetina, Luteolina y DMSO.
2. Se retiran de medio (DEMEM) 100 ul de los pozos correspondientes al control y tratamiento de las horas correspondientes.



3. Se agregan 100 ul de MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide) 0.5 mg/ml a cada pozo.



4. Se homogeniza el MTT en cada pozo suavemente con la pipeta correspondiente al volumen.
5. Colocar papel aluminio hasta cubrir la placa por completo.
6. Meter la placa a la incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 4 hrs.



7. Sacar la placa de la Incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C.
8. Retirar 100 ul de solución de cada pozo.
9. Colocar 100 ul de DMSO a cada pozo y homogenizar suavemente hasta deshacer los cristales.
10. Dejar incubando la placa por 20 min cubierta con papel aluminio.
11. Hacer lectura en el lector de Elisa a 540 nm.