

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

Maestría en Ciencias Químico Biológicas

“Efecto apoptótico y anti-migratorio de la combinación de
Acacetina 7-O-rutinosida y mitoxantrona en células de
cáncer de próstata”

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

Lic. QFBT URIEL GRANADOS MACÍAS

DIRIGIDA POR

Dra. JESICA ESTHER ESCOBAR CABRERA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO. NOVIEMBRE, 2018.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencias Químico Biológicas

Efecto apoptótico y anti-migratorio de la combinación de Acacetina 7-O-rutinosida
y mitoxantrona en células de cáncer de próstata

Tesis

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Lic. QFBT URIEL GRANADOS MACÍAS

DIRIGIDA POR:

DRA. JESICA ESTHER ESCOBAR CABRERA

SINODALES

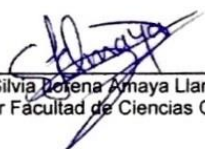
Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera
Presidente

Dra. María Guadalupe García Alcocer
Secretario

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Vocal

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez
Suplente

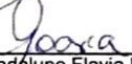
Dr. Francisco Quintanilla Guerrero
Suplente


Dra. Silvia Berena Amaya Llano
Director Facultad de Ciencias Químicas








Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Santiago de Querétaro
Noviembre 2018

Agradecimientos

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) le agradezco la beca recibida durante la maestría.

Expreso mi profundo agradecimiento a mi asesora de tesis Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera por su apoyo, instrucción y colaboración durante el desarrollo de este trabajo de investigación. A la Dra. Guadalupe García Alcocer le agradezco su dedicación como coordinadora de este posgrado y las múltiples sugerencias y consideraciones durante el desarrollo de la investigación. Al Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez por sus valiosos aportes durante la maestría y ya desde hace varios años atrás. Al Dr. Francisco Quintanilla Guerrero por colaborar en la formación de mi licenciatura y hasta hoy en la formación de mi maestría. A la Dra. Laura Cristina Berumen Segura por su paciencia, tiempo y consejos para el desarrollo de esta tesis. Todos formaron un maravilloso comité tutorial, siempre ayudándome a mejorar como estudiante, investigador y persona.

A mis compañeros de posgrado dentro del laboratorio de unidad de investigación genética, Heliana Hernández Paredes por siempre estar como mi amiga, mi confidente, mi hermanita de maestría siempre apoyándome incondicionalmente, Dulce María Caraveo por ser mi amiga y mi acompañante a todo con tu peculiar tono de voz, Elizabeth Martínez por tenerme paciencia y compartirme tus conocimientos en el laboratorio, Jesús Mendiola por ese un gran amigo con quien compartí muchos momentos inolvidables durante la maestría, Claudia Gutiérrez por ser esa mamá cuidadora en el laboratorio.

A mi familia la cual es pequeña únicamente siendo 6 personas, agradezco sobre todo a mis abuelos Estela Ortega y Jorge Macías quienes siempre están cuando los necesito, compartiéndome sus historias, regañándome, ayudándome a cada día ser una mejor persona, no me alcanzaría las hojas ni la vida para expresarles lo mucho que estoy agradecido, ni para decirles lo mucho que los amo y lo mucho que agradezco a la vida de poder tenerlos a mi lado. A mis padres que nunca me dejan

y siempre están ahí regañándome, felicitándome, apoyándome y sobre todo amándome. Mi tía que con su peculiar forma de ser tampoco dejó de estar pendiente de mí.

Finalmente, me queda decir muchas gracias a todas las personas que estuvieron a mi lado durante este proceso de crecimiento personal y laboral, las cuales fueron muchas, que siempre estuvieron pendiente de mí, tanto familiares como amigos. Gracias.

RESUMEN

El cáncer de próstata es uno de los padecimientos más frecuentes a nivel mundial, ocupando el 3er lugar de los cánceres más diagnosticados y la segunda causa de muerte por cáncer en hombres a nivel mundial. Existen diversas formas de tratar este padecimiento donde destacan la cirugía, radioterapia y quimioterapias; algunos tratamientos resultan tener diversos efectos secundarios y llegan a ser muy agresivos. El desarrollo de nuevas terapias para esta patología es de gran interés. Como el uso de tratamientos coadyuvantes, que consisten en la ingesta de algunos compuestos orgánicos de origen natural. En estudios anteriores se ha demostrado que los compuestos orgánicos naturales como los flavonoides tienen una importante actividad apoptótica y anti-migratoria de células de cáncer. Estos resultados han generado el interés de estudiar el efecto de los flavonoides en conjunto con un fármaco utilizado en la quimioterapia. En este trabajo, se evaluó el efecto de la combinación de la acetina 7-O-rutinosida (flavonoide) con mitoxantrona sobre la proliferación de células de cáncer de próstata andrógeno independiente PC-3, mediante una curva concentración respuesta y el efecto sobre la migración de células cancerígenas, por el ensayo herida. Los resultados mostraron que la combinación de ambas moléculas disminuyeron la proliferación celular con las concentraciones de mitoxantrona desde 1.8 μM y 4.5 μM de acetina 7-O-rutinosida para PC-3; mientras que en el ensayo de migración para células andrógeno dependientes los tratamientos inhibieron la migración celular a todas las horas evaluadas. La combinación de los tratamientos indujo mayor efecto apoptótico que los tratamientos individuales. En este trabajo se llegó a la conclusión que la combinación de los tratamientos tienen un mejor efecto en la inhibición de la proliferación, de la migración y en la inducción de la apoptosis.

Palabras clave: Cáncer de próstata, flavonoides, tratamientos alternativos, proliferación, apoptosis, migración celular.

ABSTRACT

Prostate cancer is one of the most frequent diseases worldwide, ranking 3rd in the most diagnosed cancers and the second cause of cancer death in men worldwide. There are several ways to treat this condition where surgery, radiotherapy and chemotherapy stand out; some treatments turn out to have different side effects and they become very aggressive. The development of new therapies for this pathology is of great interest. As the use of adjuvant treatments, which consist of the intake of some organic compounds of natural origin. Previous studies have shown that natural organic compounds such as flavonoids have an important apoptotic and anti-migratory activity of cancer cells. These results have generated interest in studying the effect of flavonoids in conjunction with a drug used in chemotherapy. In this work, we evaluated the effect of the combination of acacetin 7-O-rutinoside (flavonoid) with mitoxantrone on the proliferation of independent androgen prostate cancer cells PC-3, using a concentration response curve and the effect on migration of cancer cells, by the wound trial. The results showed that the combination of both molecules decreased cell proliferation with mitoxantrone concentrations from 1.8 μ M and 4.5 μ M of 7-O-rutinoside acacetin for PC-3; whereas in the migration assay for androgen-dependent cells the treatments inhibited cell migration at all hours evaluated. The combination of the treatments induced a greater apoptotic effect than the individual treatments. In this work, it was concluded that the combination of treatments has a better effect in the inhibition of proliferation, of migration and in the induction of apoptosis.

Key words: Prostate cancer, flavonoids, alternative treatments, proliferation, apoptosis, cell migration.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ACRÓNIMOS	xiii
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Cáncer	3
2.2 Próstata	5
2.2.1 Cáncer de próstata	5
2.2.2 Tipos de cáncer de próstata	10
2.2.3 Etapas del cáncer de próstata	10
2.3 Diagnóstico de cáncer de próstata	11
2.3.1 Cociente de PSA libre/total (PSA l/t)	11
2.3.2 Biopsia de próstata	12
2.4 Tratamientos	12
2.4.1 Tratamiento para cáncer de próstata: Radioterapia definitiva	12
2.4.2 Tratamiento diferido para cáncer de próstata (CaP)	13
2.4.3 Tratamiento para cáncer de próstata: Prostatectomía radical	13
2.4.4 Tratamiento Hormonal para cáncer de próstata	13
2.4.5 Tratamientos complementarios y alternativos	14
2.5 Flavonoides	14
2.5.1 Actividad antioxidante	15
2.5.2 Mecanismos de acción de los flavonoides frente al cáncer	15
2.5.3 Protección frente a mutágenos activos	17
2.5.4 Mecanismos anticancerígenos de los flavonoides. Inhibición de la proliferación	17
2.5.5 Señal de transducción	18

2.5.6 Inhibición de la actividad de los oncogenes: confinamiento del ciclo celular y acción pro-diferenciadora	18
2.5.7 Otros mecanismos	19
2.5.8 Mecanismos anticancerígenos de los flavonoides en la fase invasiva	19
2.6 Acacetina 7-O-rutinosida	20
2.6.1 Efecto de la acacetina 7-O-rutinosida (linarin) frente al cáncer	21
2.7 Mitoxantrona	22
2.7.1 Mecanismo de acción	22
2.7.2 Farmacocinética y farmacodinamia de mitoxantrona	23
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	25
5. HIPÓTESIS	25
6. OBJETIVOS	25
6.1 Objetivo general	25
6.2 Objetivos específicos	25
7. MATERIALES Y MÉTODOS	26
7.1 Cultivo celular	26
7.1.1 Línea celular PC-3	26
7.2 Determinación del efecto antiproliferativo	27
7.3 Evaluación de efecto apoptótico	27
7.4 Estudio del efecto anti-migratorio	27
7.5 Análisis estadístico	28
8. RESULTADOS	29
9. DISCUSIÓN	53
10. REFERENCIAS	57

ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Página
1. Tasa de morbilidad en el 2014 por principales tumores malignos según cada tipo de cáncer y sexo	5
2. Clasificación taxonómica de la planta <i>Buddleja officinalis</i>	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
1. Carcinogénesis	4
2. Aparato reproductor masculino	6
3. Etapas de cáncer de próstata	11
4. Estructura de la acacetina 7-O-rutinosida	20
5. Ejemplo de la realización de un ensayo herida	35
6. Efecto de la mitoxantrona en la proliferacion de fibroblastos humanos a 24 horas	29
7. Efecto de la mitoxantrona en la proliferacion de fibroblastos humanos a 24 horas	30
8. Efecto de la mitoxantrona en la proliferacion de fibroblastos humanos a 72 horas	31
9. Efecto del flavonoide acacetina 7-O-rutinosida en la proliferacion de fibroblastos humanos a 24 horas	32
10. Efecto del flavonoide acacetina 7-O-rutinosida en la proliferacion de fibroblastos humanos a 48 horas	32
11. Efecto del flavonoide acacetina 7-O-rutinosida en la proliferacion de fibroblastos humanos a 72 horas	33
12. Efecto del quimioterapéutico mitoxantrona en la proliferación de células no andrógeno dependientes de cáncer de próstata a 24 horas	34
13. Efecto del quimioterapéutico mitoxantrona en la proliferación de células no andrógeno dependientes de cáncer de próstata a 48 horas	34
14. Efecto del quimioterapéutico mitoxantrona en la proliferación de células no andrógeno dependientes de cáncer de próstata a 72 horas	35
15. Efecto del acacetina 7-O-rutinosida en la proliferación de células no andrógeno dependientes de cáncer de próstata a 24 horas	36
16. Efecto del acacetina 7-O-rutinosida en la proliferación de células no andrógeno dependientes de cáncer de próstata a 48 horas	36
17. Efecto del acacetina 7-O-rutinosida en la proliferación de células no andrógeno dependientes de cáncer de próstata a 72 horas	37

18. Efecto de la combinación de mitoxantrona con acacetina 7-O-rutinosida sobre la proliferación de fibroblastos humanos a 24 horas	38
19. Efecto de la combinación de mitoxantrona con acacetina 7-O-rutinosida sobre la proliferación de fibroblastos humanos a 48 horas	39
20. Efecto de la combinación de mitoxantrona con acacetina 7-O-rutinosida sobre la proliferación de fibroblastos humanos a 72 horas	39
21. Efecto de la combinación de mitoxantrona con acacetina 7-O-rutinosida sobre la proliferación de la línea celular PC-3 a 24 horas	41
22. Efecto de la combinación de mitoxantrona con acacetina 7-O-rutinosida sobre la proliferación de la línea celular PC-3 a 48 horas	41
23. Efecto de la combinación de mitoxantrona con acacetina 7-O-rutinosida sobre la proliferación de la línea celular PC-3 a 72 horas	42
24. Efecto de mitoxantrona sobre la migración en la línea celular PC-3	43
25. Efecto del acacetina 7-O-rutinosida sobre la migración en PC-3	44
26. Efecto de la combinación del acacetina 7-O-rutinosida con mitoxantrona sobre la migración en la línea celular PC-3	45
27. Efecto de los tratamientos individuales de mitoxantrona, acacetina 7-O rutinosida y la combinación a 6 horas de exposición sobre la migración en la línea celular PC-3	46
28. Efecto de los tratamientos individuales de mitoxantrona, acacetina 7-O rutinosida y las combinaciones a 12 horas de exposición sobre la migración en la línea celular PC-3	47
29. Efecto de los tratamientos individuales de mitoxantrona, acacetina 7-O rutinosida y las combinaciones a 24 horas de exposición sobre la migración en la línea celular PC-3	48
30. Efecto del tiempo de tratamiento sobre la inhibición de la migración	49
31. Efecto de los tratamientos individuales de acacetina 7-O-rutinosda a 6, 12 y 24 horas de exposición sobre la migración en la línea celular PC-3.	49
32. Efecto de la combinación del acacetina 7-O-rutinosida y mitoxantrona, sobre la migración celular en PC-3	50
33. Efecto de la Mitoxantrona sobre la apoptosis en células PC-3	51
34. Efecto de la acacetina 7-O-rutinosida sobre la apoptosis en PC-3	52

35. Efecto de la combinación del acacetina 7-O-rutinosida y mitoxantrona sobre la apoptosis en células PC-3	53
36. Mecanismo propuesto de acción del acacetina 7-O-rutinosida	55

ACRÓNIMOS

PR	Prostatectomía radical
RTE	Radioterapia externa
CaP	Cáncer de próstata
NIH	National Institutes of Health
RTC-3D	Radioterapia conformada tridimensional
RTMI	Radioterapia modulada por intensidad
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
EORTC	Organización Europea para la Investigación del Cáncer
TPA	Tratamiento de privación androgénica

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial, en el 2012 se le atribuyeron 8,2 millones de muertes. El cáncer de próstata (CaP) es el segundo cáncer más frecuente en hombres a nivel mundial (OMS, 2017). En México ocupa el cuarto lugar en los cánceres más diagnosticados por debajo de cáncer de pulmón, mama y colon.

Con base en los registros y proyección de la CONAPO en el año 2030 el 19.6% de la población mundial será mayor de 65 años; tomando en cuenta que la probabilidad de desarrollar cáncer de próstata para los varones de 60 años es del 15%, es sencillo de entender la dimensión de este padecimiento en un futuro próximo (CONAPO, 2014). Más del 65% de todos los cánceres de próstata se diagnostican en hombres de más de 65 años (OMS, 2017).

Esta enfermedad tiene una importante incidencia y mortalidad por lo que es de interés investigar sobre nuevos tratamientos para dicha patología. La incidencia de esta patología se da por la existencia de diversos factores ambientales los cuales juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Dichos factores se consideran fundamentales para identificar agentes inductores, promotores o protectores de este tipo de neoplasia, así como para definir opciones terapéuticas (Parnes *et al.*, 2004).

En la actualidad existen componentes químicos de las plantas productos de su metabolismo secundario, como es el caso de los flavonoides, con características importantes que los han hecho muy atractivos para la investigación en el tema de opciones terapéuticas anticancerígenas. Se ha demostrado, que los flavonoides interfieren en procesos oncogénicos en modelos *in vitro* por distintos mecanismos, lo que los hace posibles agentes de utilidad en las primeras fases del cáncer o en la inhibición de las etapas posteriores de progresión o invasión (Álvarez y Cambeiro, 2003).

Previamente, se ha demostrado que los flavonoides tienen efectos antiinflamatorios, analgésicos, antioxidantes y antimicrobianos, donde dichas características los hacen una opción terapéutica para tratar enfermedades oncológicas en conjunto con tratamientos ya implementados (Álvarez y Cambeiro, 2003).

Uno de los principales quimioterapéuticos implementados para tratar el CaP es la mitoxantrona el cual es un inhibidor de la topoisomerasa tipo II, que es la encargada de liberar la tensión del ADN mientras se lleva a cabo la replicación. La mitoxantrona se une a varias zonas del ADN de forma inespecífica evitando que la topoisomerasa II lleve a cabo su acción, lo que deriva en el rompimiento del ADN generando un daño irreparable y activando el mecanismo de apoptosis en las células cancerígenas. Este anti-neoplásico se une de manera inespecífica a células proliferantes y no proliferantes causando efectos secundarios como la disminución de la producción de células sanguíneas, náuseas, vómitos y fiebre; estos efectos secundarios tienen una incidencia mayor del 30% en los pacientes tratados con este quimioterapéutico. Existen otros efectos secundarios menos frecuentes que van de un 10% al 29%, pero no menos graves como debilidad, llagas en la boca, caída del cabello, diarrea, arritmia y coloración azul en la esclerótica y/o en la orina, insuficiencia cardíaca, bradicardia sinusal, mielosupresión anemia; neuritis, convulsión, hemorragias e hipotensión (Chemocare, 2017).

En anteriores estudios se ha demostrado que la combinación de fármacos antineoplásicos con compuestos de origen natural como los flavonoides tienen un mayor efecto en la inducción de apoptosis, anti-migratorio y anti-proliferativo que si se utiliza sólo el fármaco (Flaig *et al.*, 2007).

Por lo anterior, el objetivo de este proyecto es evaluar el efecto apoptótico y anti-migratorio del flavonoide acacetina 7-O-rutinosida en combinación con la mitoxantrona frente al cáncer de próstata, y con ello poder tener opciones terapéuticas aparte de las ya establecidas para combatir este cáncer de manera temprana y menos agresiva.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

La patología del cáncer es un amplio grupo de enfermedades que puede presentarse en cualquier parte del organismo desarrollando la mayoría de las veces un tumor maligno o neoplasia maligna. Las células de cáncer se caracterizan por tener una multiplicación rápida de células anormales extendiéndose más allá de sus límites habituales e invadiendo tejidos adyacentes del cuerpo y en algunos casos se diseminan a otros tejidos u órganos distantes este último proceso se denomina metástasis y es la causa principal de la muerte del paciente (OMS, 2017). En esta patología los genes de supresión tumoral son alterados de manera que lleva a la pérdida de su función; también se producen cambios en los protooncogenes que al sufrir una mutación se denominan oncogenes, los cuales sufren una sobreexpresión de su función y promueven la carcinogénesis (Feinberg y Tycko, 2004).

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad en el mundo, en 2012 se registraron alrededor de 14 millones de nuevos casos y se prevé que el número de nuevos casos aumente aproximadamente en un 70% en los próximos 20 años. A nivel mundial es la segunda causa de muerte en el mundo, en 2015, ocasionó 8,8 millones de muertes. Casi una de cada seis muertes en el mundo se debe a esta enfermedad (OMS, 2018).

En México durante el 2014, dos de cada 10 casos de cáncer en varones de 20 años y más, se debieron a tumor maligno en órganos digestivos, mientras que en las mujeres del mismo grupo de edad, tres de cada 10 mujeres con cáncer padecieron de tumor maligno de mama (tabla 1), siendo estos tipos de cánceres las principales neoplasias malignas para cada sexo, seguido del cáncer en órganos genitales (11.4% en varones y 17.6% en mujeres)(CONAPO, 2014).

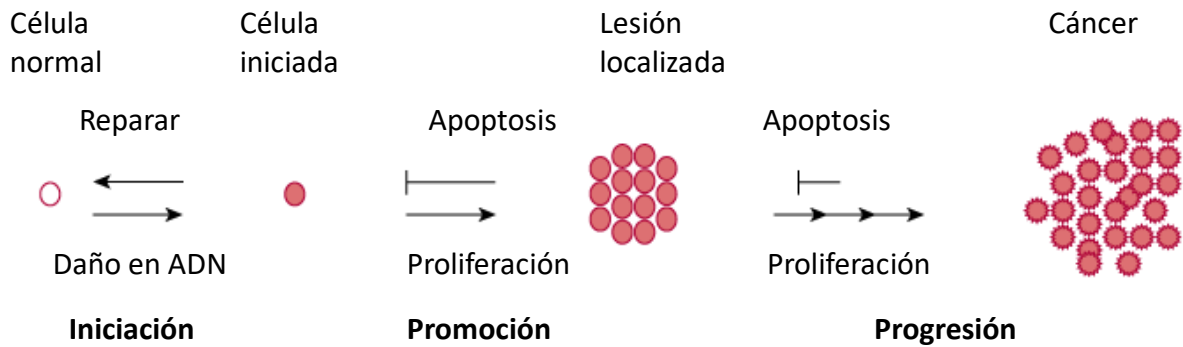


Figura 1. Carcinogénesis (McGraw-Hill, 2010)

Las etapas del cáncer están basadas en un proceso llamado carcinogénesis el cual es un proceso dinámico por medio del cual una célula normal se convierte en maligna, a consecuencia del mal funcionamiento de los genes supresores de tumores y oncogenes. Este proceso está dividido en 3 etapas: 1) iniciación, es un proceso inicial de alteración de una célula a nivel de su genoma, donde se dan tres procesos fundamentales para la célula: metabolismo, reparación del ADN y proliferación celular. La alteración de cualquiera de estos tres procesos puede iniciar el proceso de la carcinogénesis (BioCancer, 2010a); 2) la promoción; el agente promotor se define como aquel compuesto químico capaz de causar la expansión selectiva de las células iniciadas. Los agentes promotores producen una alteración en la transducción de señales celulares, por lo tanto, su mecanismo de acción reside en una alteración de la expresión génica mediada a través de receptores específicos (BioCancer, 2010c). 3) La progresión; el agente progresor es aquel compuesto químico capaz de convertir una célula iniciada o en estado de promoción en una célula potencialmente maligna, a través de la mutación de genes supresores de tumores y protooncogenes. La progresión de la carcinogénesis se puede producir también mediante la incorporación en el genoma de información genética exógena o alteraciones cromosómicas espontáneas, lo que causa un proceso denominado metástasis (BioCancer, 2010c).

Tabla 1. Tasa de morbilidad hospitalaria por principales tumores malignos de la población de 20 años y más según grupo de edad para cada tipo de cáncer y sexo en 2014 (SSA y CONAPO, 2014; Base de egresos hospitalarios, 2014).

Tumores malignos	Grupo de edad							
	20 a 29	30 a 39	40 a 49	50 a 59	60 a 64	65 a 74	75 a 79	80 y más
Hombres								
Células germinales	28.47	18.12	6.22	3.18	2.76	3.21	2.75	2.87
Órganos hematopoyéticos	16.80	12.99	17.45	21.87	26.22	40.48	48.81	37.05
Sistema linfático y tejidos afines	10.77	11.70	16.13	28.03	44.28	52.04	56.89	47.75
Órganos digestivos	3.89	13.41	35.65	80.36	140.78	195.07	198.74	149.37
Órganos respiratorios e intratorácicos	1.87	2.59	7.27	20.62	45.84	81.94	104.78	76.18
Órganos genitales masculinos	0.63	1.29	4.24	23.04	65.45	147.68	205.91	154.85
Mama	0.41	0.57	2.08	3.34	4.37	7.59	8.69	5.87
Mujeres								
Órganos genitales femeninos	12.92	38.61	67.28	90.59	104.99	100.34	85.45	80.70
Órganos hematopoyéticos	11.16	9.71	16.05	21.78	25.90	31.30	26.94	24.55
Mama	7.43	40.21	124.90	203.19	218.24	209.06	155.89	94.78
Sistema linfático y tejidos afines	7.04	8.45	11.26	22.16	31.83	43.27	47.73	35.22
Células germinales	5.49	8.72	25.18	40.00	41.43	40.88	28.10	18.01
Órganos digestivos	3.65	10.19	32.36	69.10	105.72	134.65	149.86	118.43
Órganos respiratorios e intratorácicos	0.76	2.49	4.37	12.48	17.28	28.44	42.21	23.85

2.2 Próstata

2.2.1 Cáncer de próstata

El cáncer de próstata es un tumor maligno que empieza a crecer en la glándula prostática y que en sus etapas iniciales no presenta síntomas específicos. La próstata es un órgano retroperitoneal localizado debajo de la vejiga urinaria y delante del recto, rodeando el cuello vesical y parte de la uretra. En un adulto normal pesa aproximadamente 20 gramos y mide 3 cm de largo. La anatomía de la próstata se divide en diferentes lóbulos: el anterior, o porción anterior de la glándula situada delante de la uretra, el lóbulo medio situado entre los dos conductos eyaculadores, los dos lóbulos laterales (derecho e izquierdo) separados por la uretra prostática, que constituyen la mayor parte de la glándula, y finalmente el lóbulo posterior que corresponde a la parte posteromedial de los lóbulos laterales. Esta zona puede ser palpada mediante un tacto rectal (Leo, 2016).



Figura 2. Aparato reproductor masculino (Angelito, 2003).

También existe una clasificación por zonas de la glándula prostática: la zona periférica y la central que componen casi el 95% de la próstata normal, la zona periuretral de transición y la zona fibromuscular anterior. La zona periférica constituye la mayor parte del tejido prostático apical, lateral y posterior representando un 70% del tejido glandular. En esta zona se originan el 70% de los carcinomas de próstata. La zona de transición representa entre el 5 y el 20% del tejido prostático. Cuando las células de esta región proliferan, se origina la Hiperplasia Prostática Benigna (HPB); en la zona de transición también aparecen el 20% de los CaP. La zona central rodea los conductos eyaculadores; sólo un 2.5% de los CaP reportados se originan en esta zona (Kroon, 2015).

Existen cinco tipos de capas celulares diferentes que conforman la glándula prostática:

El tipo epitelial predominante corresponde a células secretoras luminales que se disponen como una capa continua de células columnares polarizadas, las cuales son dependientes de andrógenos que secretan proteínas, expresan marcadores como la citokeratina 8, el marcador de superficie celular CD57 y el Receptor de Andrógenos (AR). También secretan Antígeno Prostático Específico (PSA) y Fosfatasa Ácida Prostática (PAP). Las células basales son el segundo tipo de célula epitelial predominante, forman una monocapa por debajo del epitelio columnar que

rodea cada glándula, son células relativamente poco diferenciadas que expresan p63 y las citokeratinas de alto peso molecular 5 y 14, así como CK903. Las células basales no tienen actividad secretora y expresan niveles bajos de AR. Las células neuroendocrinas son un porcentaje discreto de las células que componen el epitelio prostático normal pero secretan péptidos neuroendocrinos esenciales para el crecimiento y diferenciación de las células que las rodean. Las células basales expresan marcadores neuroendocrinos como la cromogranina A y la serotonina, y no expresan AR (Abate-Shen y Shen, 2000). Las células intermedias expresan marcadores tanto de células basales como de células secretoras y/o neuroendocrinas. Las células intermedias expresan las citokeratinas 5 y 8/18 y son negativas para p63. Se ha postulado que se trata de células proliferativas progenitoras que se hallan en un proceso de transición hacia la diferenciación en un fenotipo secretor (Davis *et al.*, 2002). Las células madre se encuentran en la capa basal de la glándula y fueron descritas como las responsables de la regeneración de la próstata en experimentos cíclicos de privación de andrógenos (Aboushwareb y Atala, 2008). La tasa de supervivencia en hombres con cáncer de próstata a 5 años es del 99%, a 10 años es del 98% y a 15 años es del 95% (CONAPO, 2014).

2.2.2 Etiología del cáncer de próstata

Una de las causas por las cuales se puede desarrollar cáncer de próstata es por cambios en el ADN, que se les denominan mutaciones, las que pueden activar a los oncogenes o desactivar a los genes supresores de tumores. Estas mutaciones en el ADN pueden ser heredadas o pueden ser adquiridas durante la vida de la persona. Las mutaciones que pasan de una generación a otra se les denomina mutaciones hereditarias, las cuales son causantes de aproximadamente del 5% a 10% de los casos de cáncer de próstata. Hay varios genes que se ven alterados por mutaciones heredadas como los genes de reparación del ADN como MSH2 y MLH1: estos genes tienen como función corregir errores en el ADN que se cometen cuando la célula está proliferando. También está el gen HOXB13 el cual es importante en el desarrollo de la glándula prostática. Las mutaciones en este gen han sido asociadas con el comienzo temprano del cáncer de próstata, pero esta mutación es poco común. Los hombres con mutaciones hereditarias en estos genes tienen una

condición que los hace poseer un mayor riesgo de padecer cáncer colorrectal, próstata y otros tipos de cáncer (Leo, 2016). En los últimos años se encontraron mutaciones en el homólogo PTEN, que es un gen supresor de tumores involucrado en el control del crecimiento celular de células prostáticas. El gen supresor de tumores p53 que está involucrado en la reparación de ADN y regulación de apoptosis se encuentra mutado en una pequeña fracción en cánceres de próstata, el cual este está asociado con tumores metastásicos (Cheng, 2011). Aparte de los ya mencionados existen más genes hereditarios que han sido vinculados al cáncer de próstata, como pueden ser RNASEL. Este es un gen supresor de tumores donde su función normal consiste en causar muerte celular, cuando hay un daño en la célula, la mutación en este gen está implicada en un 13% de los casos de cáncer de próstata. Los genes BRCA1 y BRCA2 también son supresores de tumores los cuales ayudan a reparar errores en el ADN de una célula o en dado de caso de que no se pueda corregir el daño, llega a causar la muerte de la célula dañada. Los cambios en estos genes particularmente en BRCA2, son responsables de un pequeño número de cánceres de próstata (Liede *et al.*, 2004). Las proteínas codificadas por los genes MAD1L1, ATBF1, PLXNB1, CHEK2, EPHB2 y CDH1, interaccionan con las proteínas BRCA1, BRCA2 o HOXB13, actuando como genes supresores de tumores (Fletcher y Houlston, 2010).

Existen algunas mutaciones que se dan a lo largo de la vida de una persona. A estos cambios se les denominan mutaciones adquiridas. Cada vez que una célula se divide se generan dos nuevas células donde cada una tiene una copia del material genético de la célula madre. Este proceso puede llegar a sufrir errores ya que no es perfecto, lo que deja al material genético con daños. La presencia de estos cambios del ADN no está claro con qué frecuencia se pueden dar ya que se deben a eventos aleatorios y los distintos factores de riesgo a lo que se está expuesto, tampoco se sabe con exactitud con qué frecuencia son influenciados por otros factores pero aproximadamente la tasa de error durante la replicación es de 1/10,000 en la incorporación inicial de nucleótidos y de 1/1,000,000,000 durante la síntesis de nuevas cadenas. En general, cuando las células proliferan de manera más rápida y crecen de manera más acelerada, existen mayores probabilidades de que ocurran

las mutaciones. Por consiguiente, cualquier factor que acelere este proceso puede generar que el cáncer sea más probable.

Como ejemplo, en el caso del cáncer de próstata los andrógenos como la testosterona promueven el crecimiento celular prostático. En algunos casos los niveles altos de andrógenos, puede contribuir al riesgo de cáncer de próstata en algunos hombres. La vía de señalización de andrógenos se encuentra sobre expresada por la alta activación del factor de crecimiento análogo a la insulina -1 (IGF1) e interleucina 6 (IL-6) lo que puede generar más probabilidades de padecer cáncer de próstata(Chen *et al.*, 2008).

Existen factores que pueden causar mutaciones adquiridas en las células de cáncer de próstata como los factores ambientales, como el fumar, el estar expuesto a diversos mutagénos, la exposición a radiación UV, estar en contacto con virus oncogénicos como el virus de la leucemia T, virus de Esptein Barr y Virus de la hepatitis B (Carter *et al.*, 2013).

El cáncer de próstata se puede clasificar según la etapa en la que se encuentra dentro de la clasificación TNM donde la T hace referencia a la extensión del tumor principal; la N si el cáncer es propagado a los ganglios linfáticos cercanos; M si el cáncer se ha propagado a otras partes del cuerpo (metástasis). En la categoría T se divide de T1 a T4 existiendo subcategorías. En T1 el tumor no es palpable ni es visible en estudios por imagen, como una ecografía transrectal, en T2 el tumor ya es palpable o se observa mediante un estudio por imágenes pero aún se encuentra dentro de la próstata. En T3 el cáncer se extendió fuera de la próstata y se propaga a las vesículas seminales, y en T4 el cáncer ha crecido hacia los tejidos adyacentes de la próstata, como al esfínter uretral, al recto, vejiga y/o a la pared de la pelvis. En la categoría N, esta describe si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos; Se encuentra dividida en: a) NX donde los ganglios linfáticos adyacentes no fueron evaluados, b) N0 representa el cáncer que no se ha propagado a ningún ganglio linfático adyacente y c) N1 el cáncer se ha propagado a uno o más ganglios linfáticos cercanos. La categoría M describe si el cáncer se ha propagado a partes distantes del cuerpo; y se subdivide en a) M0 el cáncer no se ha propagado más allá de los ganglios linfáticos cercanos, en b) M1 hay propagación más allá de los

ganglios linfáticos cercanos. Dentro de esta última clasificación existe una subclasificación, M1a donde el cáncer se propaga a los ganglios linfáticos distantes, M1b el cáncer se propagó a los huesos, M1c el cáncer se propagó a otros órganos tales como los pulmones, el hígado o el cerebro (Leo, 2016).

2.2.3 Clasificación del cáncer de próstata

La mayoría de los cánceres de próstata son adenocarcinomas. Estos cánceres se desarrollan a partir de las células de la glándula (las células que producen el líquido prostático que se agrega al semen). Los otros tipos de cáncer de próstata incluyen: sarcomas, carcinomas de células pequeñas, tumores neuroendocrinos (aparte de los carcinomas de células pequeñas) y carcinomas de células transicionales (Leo, 2016). Existen algunos cánceres de próstata que pueden crecer y propagarse rápidamente, pero la mayoría son de crecimiento lento, y su crecimiento depende de muchos factores como la afrodescendencia (que en este grupo el cáncer de próstata es bastante común y suele ser de crecimiento rápido y más agresivo), antecedentes familiares positivos, obesidad y tabaquismo (Zapatero, 2004).

2.2.4 Etapas del cáncer de próstata

El cáncer de próstata está dividido en cuatro etapas distintas, donde en las primeras tres etapas el tumor se encuentra exclusivamente dentro de la glándula prostática (Figura 3). La primera etapa se caracteriza por un tumor dentro de la glándula prostática, en donde el tumor es indetectable por tacto y los niveles de PSA en sangre comienzan a ser elevados del rango normal que es arriba de 4,0 ng/ml. En la segunda etapa el tumor generado dentro de la glándula prostática comienza a ser detectable ligeramente por tacto, lo que quiere decir que el crecimiento de la glándula comienza a ser mayor. En la tercera etapa, el tumor es cien por ciento detectable por tacto. En la última etapa, el tumor sigue siendo detectable por tacto y se inicia el crecimiento fuera de la glándula prostática, hasta llegar al punto de que se disemine a otras partes del cuerpo, proceso conocido como metástasis (Theil *et al.*, 2016).

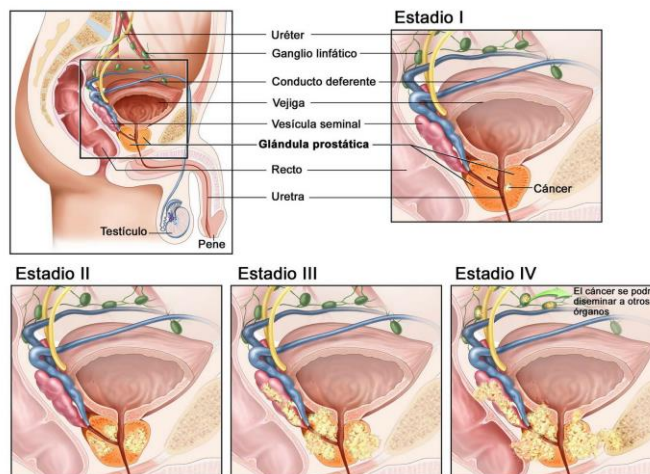


Figura 3. Etapas del cáncer de próstata (Alila, 2010).

2.3 Diagnóstico de cáncer de próstata

Los principales y primeros instrumentos diagnósticos para obtener indicios de cáncer de próstata son el tacto rectal, la concentración sérica de antígeno prostático específico (PSA) y la ecografía transrectal (ETR). Para realizar un diagnóstico definitivo, éste se basa en la presencia de adenocarcinoma en muestras de biopsia de próstata. El examen histopatológico también permite la gradación y determinación de la extensión del tumor (McCoy, 2016).

2.3.1 Cociente de PSA libre/total (PSA l/t)

El cociente de PSA libre/total (PSA l/t) es el concepto más investigado y utilizado en la práctica clínica para diferenciar entre hiperplasia benigna prostática y cáncer de próstata. Este cociente se utiliza para estratificar el riesgo de cáncer de próstata en los varones con una concentración total de PSA entre 4 y 10 ng/ml. En un estudio prospectivo multicéntrico se identificó cáncer de próstata en la biopsia en el 56 % de los varones con un PSA l/t < 10, pero sólo en el 8 % de aquellos con un PSA l/t > 25. La determinación de la concentración de PSA revolucionó el diagnóstico del cáncer de próstata (Catalona *et al.*, 2016). El PSA es una serina proteasa afín a la

calicreína, que se produce casi únicamente en las células epiteliales de la próstata. Por tanto, las concentraciones séricas pueden aumentar en presencia de hipertrofia benigna de próstata, prostatitis y otras enfermedades no malignas. El valor de PSA como variable independiente es un mejor factor predictivo de cáncer (Heidenreich *et al.*, 2010).

2.3.2 Biopsia de próstata

Hasta ahora, existen diversos biomarcadores que se usan para asesorar a pacientes sobre la necesidad de practicar una biopsia de próstata la cual ha de determinarse en función de la concentración de PSA, un tacto rectal sospechoso o ambos siendo el PSA un biomarcador para cáncer de próstata (Scher *et al.*, 2015). También debe tenerse en cuenta la edad biológica del paciente, las posibles enfermedades concomitantes y las consecuencias terapéuticas. El primer valor elevado de PSA no conlleva a una biopsia inmediata. El valor de PSA debe comprobarse al cabo de unas semanas, con el mismo análisis en condiciones normalizadas en el mismo laboratorio diagnóstico, utilizando los mismos métodos (Eastham *et al.*, 2003; Stephan *et al.*, 2006).

2.4 Tratamientos para cáncer de próstata

2.4.1 Radioterapia definitiva

La radioterapia externa (RTE) en cáncer de próstata es uno de los tratamientos que se implementan de primera instancia y se complementa con prostatectomía radical (PR) o braquiterapia en cáncer de próstata localizado. Sin embargo, el consenso National Institutes of Health (NIH) establecido en 1988 (Consensus statement, 1988) sigue estando vigente: la RTE obtiene los mismos resultados en cuanto a supervivencia a largo plazo que la cirugía. Además, la RTE depara una calidad de vida al menos tan buena como la conseguida con la cirugía y actualmente se usa RTE en conjunto con otros tratamientos para tratar la enfermedad de manera más eficiente y tratar de otorgar una calidad de vida mejor (Jones *et al.*, 2011). Este tratamiento es recomendable usarlo cuando el cáncer se encuentra entre la etapa

uno a la tercera, ya que el tumor se encuentra aún localizado dentro de la glándula prostática (Heidenreich *et al.*, 2010).

2.4.2 Tratamiento diferido para cáncer de próstata (CaP)

El tratamiento del CaP, incluso en la enfermedad clínicamente localizada, es cada vez más complejo debido a las diversas opciones terapéuticas disponibles, que presentan una eficacia oncológica equivalente, pero con efectos secundarios relacionados con el tratamiento significativamente diferente. Las decisiones relativas al tratamiento en cada estadio clínico y grupo de riesgo de CaP deben basarse en guías clínicas nacionales y europeas, indicando claramente la que se utilice en el proceso de toma de decisiones. Además, puede ser aconsejable una estrategia multidisciplinar desde el comienzo en los pacientes con CaP de alto riesgo, porque es muy probable que el tratamiento adyuvante sea necesario en la enfermedad localmente avanzada (Heidenreich *et al.*, 2010).

2.4.3 Prostatectomía radical

El tratamiento quirúrgico del CaP consiste en una prostatectomía radical (PR), que supone la extirpación de toda la próstata entre la uretra y la vejiga, así como la resección de ambas vesículas seminales, junto con tejido adyacente suficiente para obtener un borde negativo. En varones con CaP localizado y una esperanza de vida ≥ 10 años, el objetivo de una PR por cualquier abordaje ha de ser la erradicación de la enfermedad, al tiempo que se mantiene la continencia y, siempre que sea posible, la potencia sexual (Bianco *et al.*, 2005).

No existe un umbral de edad para la PR y no debe descartarse este procedimiento basándose únicamente en la edad (Cooperberg *et al.*, 2010).

2.4.4 Tratamiento Hormonal para cáncer de próstata

En 1941, Huggins y Hodges evaluaron el efecto favorable de la castración quirúrgica y la administración de estrógenos sobre la progresión del CaP metastásico, demostrando por primera vez la respuesta del CaP a la privación androgénica (Huggins *et al.*, 1941; Huggins y Hodges, 2002).

Desde los estudios fundamentales de Huggins y Hodges, las estrategias que suprimen los andrógenos se han convertido en el pilar del tratamiento del CaP avanzado. Más recientemente, sin embargo, se ha producido un cambio a un uso cada vez mayor del tratamiento hormonal en varones jóvenes con enfermedad más precoz (es decir, no metastásica) o recidivante después de un tratamiento definitivo, ya sea como tratamiento en monoterapia primario o como parte de una estrategia multimodal. Los antiandrógenos se usan como terapia hormonal, los cuales actúan bloqueando los receptores androgénicos, compitiendo con la dihidrotestosterona en la unión con su receptor proteico intracelular, obstruyendo la función de los andrógenos sobre la proliferación. Los agonistas de hormona liberadora de la hormona luteinizante se usan como tratamiento ya que reducen los niveles de andrógenos producidos por los testículos (McLeod, 2003).

2.4.5 Tratamientos complementarios y alternativos

Los métodos complementarios consisten en tratamientos que se usan junto con su atención médica habitual. Por otro lado, los tratamientos alternativos son los que se usan en lugar del tratamiento indicado por el médico. Aunque algunos de estos métodos pueden ser útiles para aliviar los síntomas o ayudar a sentirse mejor, muchos de ellos no han demostrado ser eficaces al utilizarse como tratamiento único. Por lo tanto, la combinación de los tratamientos indicados por el médico con los alternativos resulta ser una opción viable para tratar esta patología. Los tratamientos alternativos más implementados están directamente relacionados con el factor alimenticio, los cuales aportan determinados nutrientes como vitaminas, minerales o flavonoides, estos últimos han despertado gran interés debido a las propiedades anticancerígenas que han mostrado (Leo, 2016).

2.5 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana, se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como

vino y cerveza. Se han identificado más de 5.000 flavonoides diferentes. Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23 mg/día, siendo la quercetina el predominante con un valor medio de 16 mg/día. En un principio, fueron consideradas sustancias sin acción beneficiosa para la salud humana, pero más tarde se demostraron múltiples efectos positivos, debido a su acción antioxidante. Diversos estudios indican que algunos flavonoides poseen acciones prooxidantes, éstas se producen sólo a dosis altas. Constatándose en la mayor parte de las investigaciones la existencia de efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos, y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías. Además los flavonoides en general se les ha otorgado propiedades apoptóticas y anti-migratorias (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

2.5.1 Actividad antioxidante

Las propiedades antioxidantes de los flavonoides de un compuesto son consideradas *a priori* como favorables para la prevención de la oncogénesis. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) están involucradas en las distintas etapas del proceso cancerígeno, ya que pueden oxidar directamente el ADN o activar mutágenos, los promotores tumorales estimulan su producción. La inflamación es un proceso en el que se generan ERO y está muy relacionada con la carcinogénesis (Goïty, 2007).

2.5.2 Mecanismos de acción de los flavonoides frente al cáncer

Existen diversos flavonoides que tienen la propiedad de inhibir que un agente precursor sea transformado a un agente mutágeno por algún factor externo durante la elaboración de los alimentos, mientras que otros tienen otras propiedades, como dificultar la absorción del promotor tumoral en el tubo digestivo. Estos efectos anticancerígenos que tienen los flavonoides se le atribuyen a la modulación de las enzimas metabólicas hepáticas. Las enzimas del citocromo P450 forman parte de la primera línea de acción frente a moléculas exógenas y, en algunas ocasiones, provocan la activación de diferentes agentes carcinógenos (Drago, 2007).

Por lo tanto, la inhibición, la activación o la inducción de dichas enzimas pueden llegar a modificar de manera importante el metabolismo de algunos mutágenos. Por otro lado, los carcinógenos por medio de glucuronidación y sulfatación pueden ser desactivados, aumentando su solubilidad y facilitando su eliminación (Álvarez y Cambeiro, 2003).

Los flavonoides pueden intervenir en la metabolización de los agentes mutagénicos, o de sus precursores, por una doble vía. Por un lado, pueden provocar la síntesis de enzimas metabólicas y por otro, pueden estar involucrados en la actividad enzimática directamente en algunos casos inhibiendo dicha actividad o bien aumentándola. El sistema más extensamente estudiado ha sido el de citocromo P450 y, dentro de sus isoenzimas, la 1A es de la que más información se tiene hasta ahora (Drago, 2007).

Pese a estas consideraciones, el papel de los flavonoides en la prevención de la cancerización no se puede predecir a partir de estos datos, debido a que la acción *in vivo* puede ser muy diferente. De hecho, muchos de los compuestos activos *in vitro* resultan inactivos *in vivo*, mientras que otros, en principio menos prometedores, resultan inductores de la expresión de enzimas de fase II y algunas isoenzimas del citocromo P450 (Álvarez y Cambeiro, 2003).

El patrón de actividad de los flavonoides sobre las enzimas metabólicas varía en función del tejido estudiado e incluso en función de la vía de administración para el caso de los polifenoles. Mientras que *in vitro* las catequinas del té inhiben las P450 monooxigenasas, *in vivo*, tanto el té negro, como el verde inducen en la rata algunas de las isoenzimas del sistema P450, enzimas de tipo antioxidante. Además, el té con alto contenido de flavonoides puede interferir en procesos de las fases de promoción y proliferación celular, contrarrestando la inhibición de las comunicaciones intercelulares o modificando el metabolismo del ácido araquidónico. Por su parte, las propiedades anticancerígenas de los flavonoides procedentes de plantas del género *Citrus* se centran presumiblemente en la

capacidad de inducir las enzimas detoxificantes de fase II hepáticas, aunque también pueden participar otros mecanismos, puesto que en algún caso se ha observado inhibición de la metástasis tumoral (Álvarez y Cambeiro, 2003).

2.5.3 Protección frente a mutágenos activos

Los flavonoides tienen la propiedad de inhibir la activación de procarcinógenos, algunos también pueden actuar atrapando el mutágeno o interponiéndose entre éste y su célula diana. La eficacia inhibidora varía según el tipo de mutágeno, frente al que actúen y dependerá, por un lado, de la estructura química del flavonoide y, por otro, de la polaridad de la molécula. La quercetina y la genisteína son dos de los flavonoides más estudiados *in vivo*. Se han mostrado activos por vía tópica y oral frente a oncomas inducidos por distintos tipos de agentes (Badea *et al.*, 2010).

La resistencia de las células cancerígenas a los fármacos se asocia comúnmente a la sobreexpresión de la glicoproteína P, un transportador de la membrana plasmática para la expulsión de agentes exógenos, ya sean terapéuticos o tóxicos. Algunos flavonoides tienen un efecto modulador sobre este transporte y, a través de él, estimular el flujo de carcinógenos hacia el exterior de la célula. Por otro lado, la inhibición de la expresión y de la actividad de esta proteína puede también favorecer la acumulación de fármacos antitumorales en células neoplásicas, mientras que la estimulación provoca el efecto contrario. Pese a estas controversias, la utilidad terapéutica de este mecanismo puede ser mucha (Álvarez y Cambeiro, 2003).

2.5.4 Mecanismos anticancerígenos de los flavonoides. Inhibición de la proliferación

Los procesos conocidos como neoplásicos, en sus fases de promoción y progresión, están caracterizados por que alteran la regulación de la proliferación y de la diferenciación celular. Diversos flavonoides tienen acción sobre las últimas etapas de distintos cánceres y su acción es muy diferente dependiendo del tipo celular que se está tratando, esto provoca que el uso de estos compuestos como agentes

citostáticos en las últimas etapas de la carcinogénesis sea más frecuente, y sean utilizados como elementos preventivos de las primeras fases (Álvarez y Cambeiro, 2003). En el 2004 se demostró que el flavonoide quercetina tiene una actividad anti-proliferativa sobre células de cáncer de próstata a los 8 días de tratamiento, a concentraciones de 1.6 hasta 50 μM . Por otro lado, se ha demostrado que el flavonoide baicalin tiene un efecto positivo en la inducción de apoptosis e inhibición de la migración celular en células de cáncer de pulmón a concentraciones de 200 μM a las 24 h de haber sido tratadas (Chien *et al.*, 2011). El flavonoide quercetina mostró actividad anti-proliferativa en células de cáncer de colon a las 48 h del tratamiento con una concentración de 10 μM (Fan *et al.*, 2012). Hesperidina a concentraciones de 50 μM en células de cáncer de pulmón tuvo una actividad anti-proliferativa a las 48 h de la exposición al tratamiento (Hegarty *et al.*, 2012). Existen diversos flavonoides con efecto apoptótico como apigenina, quercetina, baicalina, acacetina 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (Gotink y Verheul, 2010).

2.5.5 Señal de transducción

La maquinaria encargada de la transducción de señales que regulan el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular son una posible diana para tener un efecto anticancerígeno. Por lo tanto, puede tener importancia la capacidad de determinados flavonoides para inhibir cinasas, enzimas de la ruta de metabolización del ácido araquidónico y para interaccionar con receptores estrogénicos. La quercetina es uno de los flavonoides más estudiado en este sentido, y se han llegado incluso a realizar estudios clínicos de fase I, ya que actúa como un potente inhibidor de la aldosa reductasa (Álvarez y Cambeiro, 2003; Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

2.5.6 Inhibición de la actividad de los oncogenes: confinamiento del ciclo celular y acción pro-diferenciadora

Las cinasas de tirosina codificadas por oncogenes son dianas atractivas para la acción anticancerígena. La genisteína ha demostrado ser un inhibidor específico de la proteína cinasa de tirosina del receptor para el factor de crecimiento epidermal

(EGFR) y de la topoisomerasa II, lo que confina la progresión del ciclo celular en la fase G2-M. La inhibición de la actividad cinasa de tirosina de EGFR podría ser también beneficiosa inhibir el desarrollo del cáncer de próstata, donde este receptor desempeña un papel importante. También se han descrito propiedades citostáticas para algunos flavonoides que, por medio de un mecanismo no tóxico para las células normales, impiden la síntesis del ADN, del ARN y/o de proteínas en células tumorales (Álvarez y Cambeiro, 2003). Resulta de mucho interés que ciertos flavonoides como la quercetina sean capaces de provocar la transformación de líneas celulares cancerígenas en células diferenciadas con características fenotípicas de madurez. La acción prodiferenciadora puede estar asociada a la modulación de la actividad cinasa/fosfatasa de tirosina, ya que este equilibrio parece desempeñar un papel en el control de la proliferación y la diferenciación celular (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

2.5.7 Otros mecanismos

La acción citotóxica de algunos flavonoides como la quercetina se asocia con la inhibición del proceso de liberación de lactato, disminuyendo el contenido de 5'-trifosfato de adenosina (ATP), gracias al estímulo de la síntesis del factor transformador del crecimiento beta1 y/o con el bloqueo de canales de potasio. La quercetina y otros flavonoides están también involucrados en la disminución del desarrollo de termotolerancia en las células cancerígenas (Álvarez y Cambeiro, 2003).

2.5.8 Mecanismos anticancerígenos de los flavonoides en la fase invasiva

Durante la metástasis, la neoangiogénesis —formación de nuevos vasos sanguíneos— se incrementa para asegurar la supervivencia del tumor. Fotsis *et al.* en 1997 demostraron que la genisteína y otros flavonoides como luteolina, Ionicerina, quercetina y baicalina procedentes de la soja dietética inhibían esta desregulación en células de cáncer de pulmón, de próstata y en células de leucemia. Las células mastocíticas secretan agentes de neovascularización y su migración es estimulada por péptidos derivados de tumores, por lo que pueden estar involucrados

en el crecimiento tumoral y en la metástasis. La conocida acción inhibidora de muchos flavonoides en la activación y proliferación de los mastocitos puede explicar también parte de los efectos anticancerígenos de estos polifenoles. La genisteína inhibe la inducción estimulada por el factor de necrosis tumoral (TNF) de moléculas de adhesión celular derivadas del endotelio vascular; el papel de éstas y otras moléculas de la matriz extracelular es importantísimo en la unión de células invasivas y no invasivas y, por tanto, pueden participar en la metástasis de tumores malignos. Podrían ser varios los flavonoides, como el acacetina 7-O-rutinosida que inhiben la invasión de células cancerígenas por bloqueo de estas moléculas de adhesión (Fernández *et al.*, 2009).

2.6 Acacetina 7-O-rutinosida

Es un flavonoide que forma parte de la familia flavonol dentro de la clasificación de los flavonoides. Los flavonoides son metabolitos secundarios de un subtipo de polifenoles cuya principal característica estructural es poseer 2 anillos aromáticos y un grupo cetona, son pigmentos vegetales no nitrogenados de coloración amarilla; la acacetina 7-O-rutinosida tiene propiedades antiinflamatorias, analgésicas que son adquiridas gracias a que en su estructura tiene grupos aromáticos y radicales como grupos hidroxilos (Figura 4), es ligeramente soluble en agua y completamente soluble en todos los disolventes orgánicos, tiene un punto de descomposición de 256 °C. También se le conoce como linarin, acacetina rutinosida, acacetina 7 rutinosida (Fernández *et al.*, 2004).

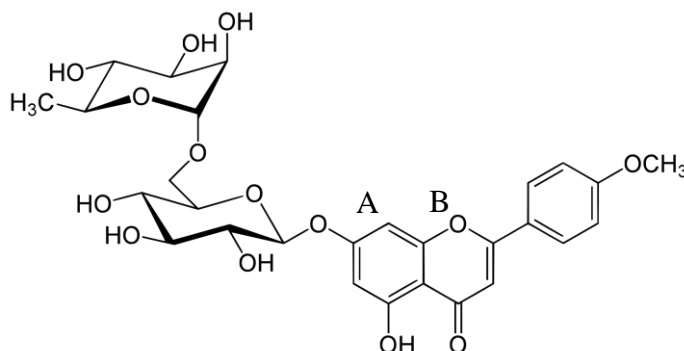


Figura 4. Estructura de la acacetina 7-O-rutinosida (Yikrazuul, 2010)

La acacetina 7-O-rutinosida se encuentra en grandes cantidades en una especie de arbusto caducifolio llamado *Buddleja officinalis* (Tabla 2). Esta planta se localiza en México, principalmente en el norte y uno de los estados donde más predomina esta planta es en el estado de Guanajuato (Martínez-Cruz y Téllez-Valdés, 2004).

Tabla 2. Clasificación taxonómica de la planta *Buddleja officinalis* (Chen, 2007).

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Scrophulariales
Familia	Buddlejaceae
Nombre científico	Buddelja Officinalis

Se ha demostrado que esta planta tiene diversas propiedades, como los efectos antiespasmódico y febrífugo, dichas propiedades se le atribuyen a las hojas. Se utiliza en el tratamiento de la gonorrea, hepatitis, hipertensión, diabetes, nefritis, cáncer, problemas de piel, úlceras y enfermedades del hígado. Todas estas propiedades son atribuidas a su contenido de flavonoides, terpenos, saponinas y lignanos, ya que estos diversos compuestos tienen propiedades analgésicas, antibiótica, astringente, antiinflamatorio, expectorante, diurética, antiseptia urogenital, sedantes, antihepatotóxica, apoptóticas y antimigratorias, estas últimas dos propiedades son atribuidas directamente a los flavonoides que contiene, incluyendo acacetina 7-O-rutinosida (Adedapo *et al.*, 2009)

2.6.1 Efecto de la acacetina 7-O-rutinosida (linarin) frente al cáncer

La acacetina 7-O-rutinosida posee propiedades antiinflamatorias, analgésicas, y recientemente se ha observado una propiedad protectora al daño oxidativo en células osteoblásticas (Kim *et al.*, 2011). Otros estudios han mostrado que la acacetina tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de células de cáncer de mama MCF-7, al aumentar la actividad de la caspasa 7, reducir la expresión de Bcl-

2 y en consecuencia induce la activación de Bax, el cual está involucrado en la sensibilización de la membrana mitocondrial provocando posteriormente la liberación de citocromo C y la activación de la apoptosis (Shim *et al.*, 2007).

Estudios realizados en el 2012, demostraron que el flavonoide acacetina 7-O-rutinosida tiene un bajo efecto sobre la inhibición de la glucosidasa, además, no mostró ningún efecto sobre las alfa amilasas y las aldosas reductasas, lo cual ayuda a que su vida media sea mayor y se encuentre en mayor cantidad en el organismo. En la estructura de la acacetina, los anillos A y B (figura 4) son los que le otorgan las propiedades inhibitorias, siendo sus grupos hidroxilos los que llevan a cabo los procesos de hidroxilación, glicosilación, hidrogenación, metoxilación y metilación, todas estas reacciones debilitan los efectos de las enzimas sobre el linarin (Kim, *et al.*, 2012).

En el 2017 Yang y colaboradores, encontraron que la acacetina 7-O-rutinosida presentó un efecto anti-inflamatorio por medio de la unión del linarin a NF-kB causando la inhibición de la vía AKT, a concentraciones de 14.9, 6.4 y 5.6 mg/g en células de RAW 264.7 (línea celular de tumor inducido por el virus de la leucemia murina de Abselon) y HEK293 (línea celular de células embrionarias de riñón humano) (Yang *et al.*, 2017).

2.7 Mitoxantrona

Es un agente antracenediona antineoplásico que impide la proliferación de células tumorales malignas. Se une directamente al ADN nuclear de forma irreversible, aunque no de forma específica, atacando por igual a células proliferantes y no proliferantes; este medicamento es la segunda opción como quimioterapéutico administrado en pacientes con cáncer de próstata (De Bono *et al.*, 2010).

2.7.1 Mecanismo de acción

La mitoxantrona es un inhibidor de la topoisomerasa tipo II, que al inhibirla romper las hebras del ADN, interrumpe la síntesis y reparación del ADN en células sanas y

cancerosas. De igual forma, inhibe la síntesis de ADN y del ARN, se intercala entre las bases del ADN e interfiere en diversas funciones, por ejemplo inhibe la replicación adecuada del material genético, sin formar radicales libres. También, inhibe la incorporación de uridina en el ARN y de la timidina en el ADN, y es activo en todo el ciclo celular (Sazgarnia *et al.*, 2013)

2.7.2 Farmacocinética y farmacodinamia de mitoxantrona

La absorción es pobre por vía oral; su administración intravenosa va seguida de una rápida y extensa difusión a varios tejidos como líquido pleural, riñones, tiroides, hígado, corazón y glóbulos rojos. Su unión a proteínas plasmáticas es muy alta 95 %, de ésta 76 % a la albúmina. Se metaboliza en el hígado, la dosis se debe reducir en caso de insuficiencia hepática. Se elimina por la vía renal y hepatobiliar. Solo 20-32 % de la dosis se elimina durante los primeros 5 días de la administración, por la orina 6-11 %, por las heces 13-25 %; de las cantidades eliminadas por la orina, 65 % está constituida por mitoxantrona no metabolizada y 35 % por sus 2 metabolitos inactivos y sus conjugados glucuronados. La vida media de eliminación es 12 días rango 5-18 días (De Bono *et al.*, 2010).

La versión inyectable se usa junto con medicamentos esteroides para aliviar el dolor en personas con cáncer de próstata avanzado que no han respondido a otros medicamentos. La mitoxantrona inyectable también se usa junto con otros medicamentos para tratar ciertos tipos de leucemia, además, es utilizada como tratamiento para la esclerosis múltiple al impedir que ciertas células del sistema inmunológico lleguen al cerebro y la médula espinal y los lesionen. Este medicamento se usa para tratar diversos cánceres como son el cáncer de próstata, de mama y de pulmón al detener el desarrollo y la propagación de las células cancerosas. Su efecto ha sido demostrado en estudios *in vitro* en diversas líneas celulares como A549 de cáncer de pulmón y MCF-7 de cáncer mama donde se ha demostrado su efecto apoptótico y anti-migratorio (Sazgarnia *et al.*, 2013). *In vivo*, en ratas Wistar a las cuales se les indujo la producción de tumores en diversos tejidos como en pulmón y próstata, la mitoxantrona demostró tener un gran efecto en la inducción de apoptosis y en la inhibición de la proliferación (Fox, 2004). En

pacientes con cáncer de próstata avanzado ha tenido un efecto benéfico, ya que en estos pacientes se ha visto una reducción significativa de la enfermedad, por consiguiente, es uno de los tratamientos más utilizados para el tratamiento de este tipo de cáncer (De Bono *et al.*, 2010). La mitoxantrona también mostró *in vitro* e *in vivo* una actividad anti-migratoria en células inmunocompetentes a concentraciones de 10 μ M a través de la inhibición de la producción de CD4+, CD8+ y CD14+ expresado en linfocitos y monocitos (Kopadze, 2006).

Con el objetivo de encontrar nuevas moléculas con propiedades anticancerígenas que se utilicen como tratamientos complementarios a los fármacos antineoplásicos establecidos, se propone estudiar el efecto de la combinación del flavonoide acacetina 7-O-rutinosida con la mitoxantrona, para observar si existe un aumento de su efecto en su función antiproliferativa, apoptótica o antimigratoria.

3. JUSTIFICACIÓN

En México, actualmente el cáncer de próstata es un problema de gran relevancia en el ámbito de la salud pública, afectando a varones de edad avanzada sin descartar a los varones de corta edad. Los tratamientos estándares (cirugía, quimioterapia y radioterapia) además de no ser aplicables en todos los casos, en estadios avanzados no son curativos y se asocian a importantes efectos adversos. La acacetina 7-O-rutinosida se encuentra como metabolito secundario en un 35% en las hojas y tallo de las plantas *Buddleja*. Específicamente, la planta *Buddleja officinalis* es endémica de México y se encuentra de manera abundante, lo que facilita su obtención. Estudios previos han demostrado que acacetina 7-O-rutinosida ejerce un efecto sobre la apoptosis y proliferación de distintos tipos de cáncer, lo que convierte a este flavonoide en un excelente candidato para estudiar su acción terapéutica contra células de cáncer de próstata y su posible aumento de efecto en combinación con el antineoplásico mitoxantrona. Por lo que es importante buscar alternativas terapéuticas para usar como complemento de los tratamientos ya existentes para tratar esta enfermedad, con ello también bajar la dosis de la

mitoxantrona para disminuir la posibilidad de presentar los efectos adversos que causa el uso de este antineoplásico y obtener mejores resultados.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La acacetina 7-O-rutinosida en combinación con la mitoxantrona aumentará el efecto apoptótico y anti-migratorio de mitoxantrona en comparación con el tratamiento individual en células de cáncer de próstata?

5. HIPÓTESIS

La acacetina 7-O-rutinosida en conjunto con la mitoxantrona tiene un efecto sinérgico en la inducción de la apoptosis y en la inhibición de la proliferación y migración de células de cáncer de próstata.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la acacetina 7-O-rutinosida en conjunto con la mitoxantrona sobre la proliferación, apoptosis y la migración de células de cáncer de próstata.

6.2 Objetivos específicos

- Estudiar el efecto citotóxico de la acacetina 7-O-rutinosida y la mitoxantrona en fibroblastos humanos.
- Analizar el efecto anti-proliferativo de la acacetina 7-O-rutinosida sobre las línea celular PC-3 de cáncer prostático.
- Evaluar el efecto sobre la proliferación de la mitoxantrona sobre células PC-3

- Cuantificar el efecto anti-proliferativo de la combinación de la acacetina 7-O-rutinosida con la mitoxantrona en células de PC-3 de cáncer de próstata.
- Evaluar con MUSE cell analyzer, la combinación de la acacetina 7-O-rutinosida con mitoxantrona sobre la apoptosis de células PC-3.
- Medir mediante ensayo herida en células de cáncer de próstata, el efecto en la migración celular de la combinación de la acacetina 7-O-rutinosida y la mitoxantrona.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cultivo celular

7.1.1 Línea celular Fibroblastos Humanos

La línea celular Fibroblastos Humanos (HDFn) proveniente de ATCC fue utilizada como modelo de referencia de células sanas. Las células fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y 5ml de Penicilina Estreptomicina (Gibco). El cultivo se mantuvo en condiciones controladas a 38°C y 5% de CO₂.

7.1.2 Línea celular PC-3

La línea celular PC-3 proveniente de ATCC se utilizó como modelo de cáncer de próstata representando un estadio tardío de la enfermedad con una alta capacidad de invasividad (independientes de andrógenos). Las células fueron cultivadas en medio F12K suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y 5ml de Penicilina Estreptomicina (Gibco). El cultivo se mantuvo en condiciones controladas a 37°C y 5% de CO₂.

7.2 Determinación del efecto antiproliferativo

Se cultivaron células PC-3 y HDFn en medio de cultivo F12K y DMEM respectivamente, suplementados con 10% de suero fetal bovino, se dejaron proliferando hasta que se encontraron en confluencia del 90% bajo condiciones de 37°C y 5% de CO₂. Una vez las células confluentes, se trataron con mitoxantrona a concentraciones de 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 µM; otro grupo fue tratado con acacetina 7-O-rutinosida a concentraciones de 7.5, 10, 20, 40, 80, 100 y 200 µM. Ambos grupos se trataron durante 24, 48 y 72 horas. Posteriormente, se eligieron dos concentraciones de acacetina 7-O-rutinosida las cuales fueron evaluadas en combinación con mitoxatrona.

7.3 Evaluación de efecto apoptótico

En este procedimiento fue utilizado el equipo MUSE cell analyzer para medir cuantas células se encuentran en proceso de apoptosis. El equipo está basado en la detección de emisiones fluorescentes donde se unen antígenos relacionados con apoptosis con un fluorocromo cuya emisión es la que detecta el MUSE. Se usaron células de PC-3 de cáncer de próstata previamente tratadas con acacetina 7-O-rutinosida y mitoxantrona, las células que se analizaron estaban en forma de suspensión monodispersa en un medio líquido. La concentración celular fue la adecuada, entre 0.5 a 1.0 x 10⁶ células por mililitro. Se seleccionaron los fluorocromos adecuados en este caso anexina V para la medición de apoptosis y se analizaron los controles negativos, positivos y los grupos tratados con acacetina 7-O-rutinosida 4.5, 13.9 y 98.1 µM, con mitoxantrona 1.7, 2.5 y 5 µM y la combinación de ambos 4.5 + 1.7, 13.9 + 2.5 y 5 + 98.1 µM respectivamente.

7.4 Estudio del efecto anti migratorio

Este ensayo se basa en la observación del comportamiento de una monocapa confluyente de células a la que previamente se le ha realizado una brecha o “herida”, las células encontradas en el borde de la herida se moverán hacia la brecha hasta establecer nuevos contactos célula-célula, cerrando así la herida.

Este ensayo se realizó una “herida” con una punta de pipeta sobre la caja donde se encuentran las células cultivadas, evaluando el tamaño de la herida por medio de capturas de imágenes periódicamente durante todo el tratamiento y con ello se evaluó el efecto anti-migratorio después del tiempo establecido para los tratamientos.

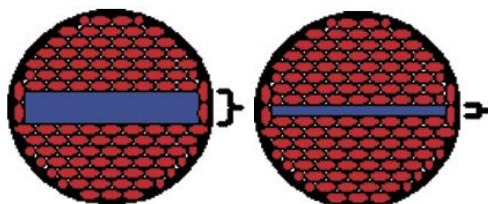


Figura 5. Ejemplo de la realización de un ensayo herida

Para el ensayo herida, las células de cáncer de próstata se sembraron en una placa P6 hasta que las células llegaron a un 90% de confluencia y posteriormente se realizaron 3 heridas sobre la placa. Se estudiaron 4 grupos: un grupo control que contiene solo medio de cultivo, otro tratado con acetina 7-O-rutinosida 4.5, 13.9 y 98.1 μM , el tercer grupo fue tratado con la concentración elegida de mitoxantrona 1.7, 2.5 y 5 μM y el cuarto grupo será tratado con la combinación de la acetina 7-O-rutinosida y la mitoxantrona 4.5 + 1.7, 13.9 + 2.5 y 5 + 98.1 μM respectivamente. Las heridas se revisaron a las 0, 6, 12 y 24 horas de tratamiento y fueron fotografiadas para evaluar el cierre de la misma.

7.5 Análisis estadístico

Los datos de 3 experimentos independientes con 3 réplicas cada uno, fueron analizados con ANOVA por medio del programa prisma 6. Posteriormente se realizó la prueba *post-hoc* de Tukey. Para determinar diferencia significativa entre grupos se tomó un valor de $P < 0.05$. Todos los datos son presentados como la media \pm error estándar.

8. RESULTADOS

8.1 Línea celular Fibroblastos humanos.

8.1.1 Curva de proliferación con mitoxantrona

Se realizó una curva de proliferación con fibroblastos humanos, con el fin de observar el efecto de la Mitoxantrona en células de referencia como lo son la línea celular fibroblastos humanos. Figura 6, muestra el efecto de las concentraciones de 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 μM de mitoxantrona donde se aprecia un comportamiento dependiente de la concentración. Figura 7, muestra que a mayor tiempo de exposición mayor efecto sobre la proliferación de los fibroblastos humanos.

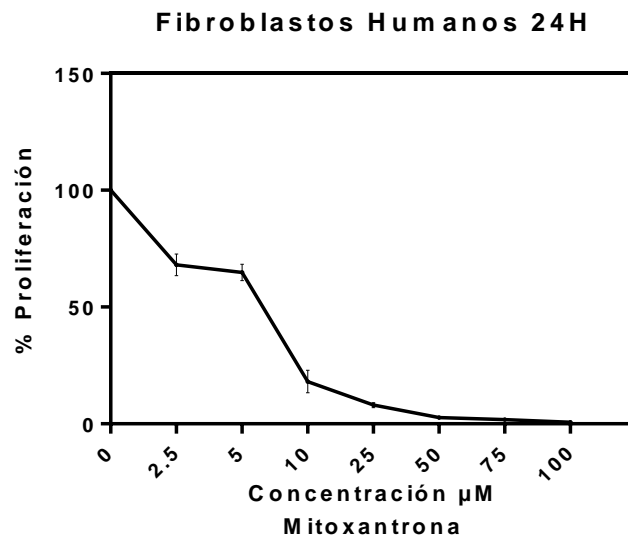


Figura 6. Efecto de la mitoxantrona en la proliferación de fibroblastos humanos con un tiempo de 24 horas de tratamiento. La gráfica representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes.

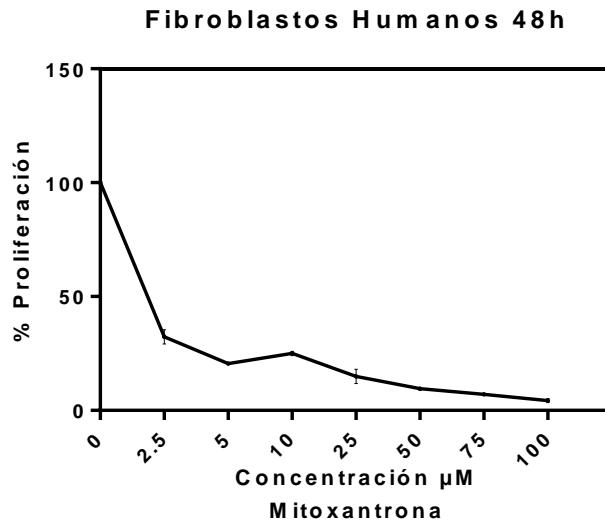


Figura 7. Efecto de la mitoxantrona en la proliferación de fibroblastos humanos con un tiempo de 48 horas de tratamiento. La grafica representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes.

El quimioterapéutico mitoxantrona fue probado sobre la proliferación de fibroblastos humanos a 72 horas, Figura 8, muestra que a la concentración 2.5 μM un porcentaje de proliferación del 20% a diferencia de la concentración 100 μM donde se vio un porcentaje de proliferación de 4% lo que nos dice que a mayor tiempo de exposición mayor efecto sobre la proliferación conservando la tendencia de mayor concentración mayor efecto anti proliferativo.

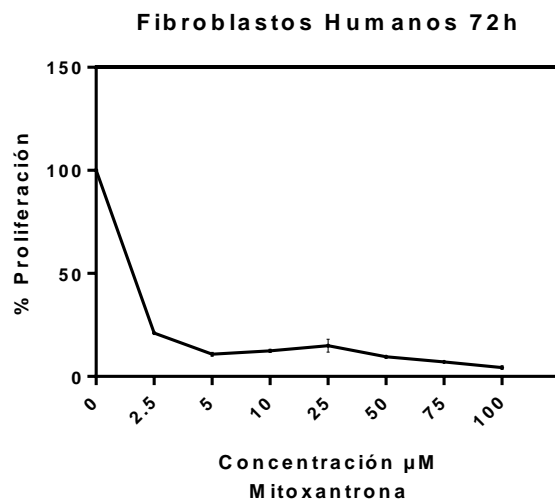


Figura 8. Efecto de la mitoxantrona en la proliferación de fibroblastos humanos con 72 horas de tratamiento. La gráfica representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes.

8.1.2 Curva de proliferación con acetina 7-O- rutinosida

El flavonoide acetina 7-O-rutinosida se utilizó en fibroblastos humanos donde se observó una disminución de la proliferación no menor del 50%. Figura 9, muestra el efecto de las concentraciones 7.5, 10, 20, 40, 80, 100 y 200 μM de acetina 7-O-rutinosida a 24 horas del tratamiento en donde se ve una dependencia a la dosis. Figura 10, muestra que aumentando el tiempo de exposición al flavonoide no hay un aumento del efecto anti proliferativo.

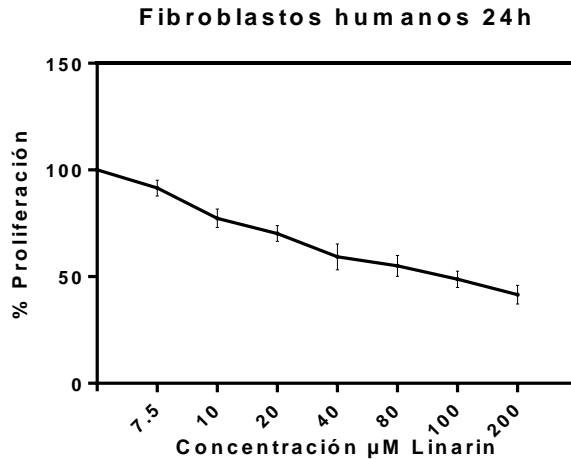


Figura 9. Efecto del flavonoide acacetina 7-O-rutinosida en la proliferación de fibroblastos humanos con 24 horas de tratamiento. La grafica representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes.

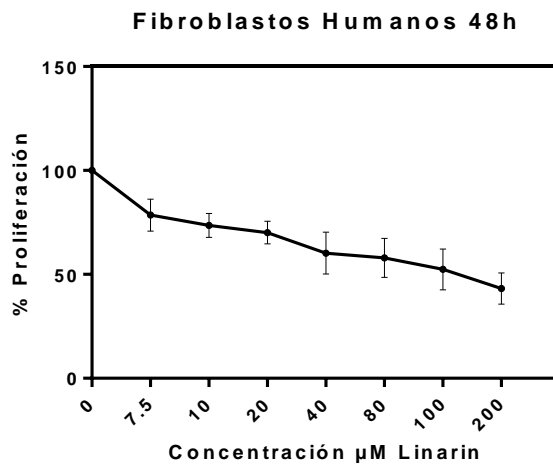


Figura 10. Efecto de acacetina 7-O-rutinosida en la proliferación de fibroblastos humanos con 48 horas de tratamiento. La gráfica representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes.

El flavonoide acacetina 7-O-rutinosida fue evaluado sobre la proliferación de fibroblastos humanos a 72 horas, Figura 11, muestra que a la concentración 7.5 μM hay un porcentaje de proliferación de 69% y en la concentración 40 μM se encontró un porcentaje de proliferación de 54% y a 200 μM un porcentaje de 44% y con ese comportamiento de respuesta al tratamiento podemos ver que no hay un efecto tiempo dependiente, pero conservando su efecto dosis dependiente.

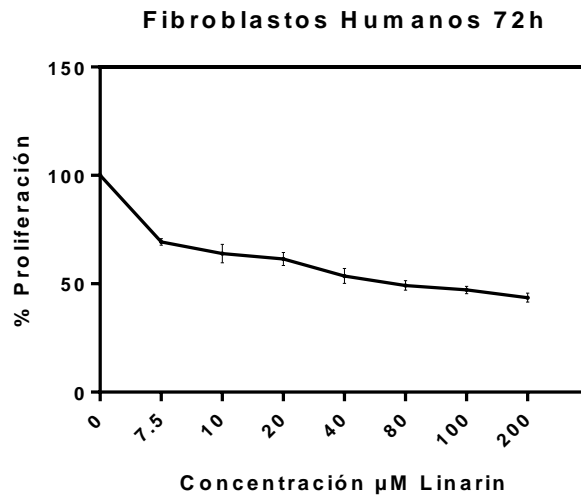


Figura 11. Efecto del flavonoide acacetina 7-O-rutinosida en la proliferación de fibroblastos humanos con 72 horas de tratamiento. La gráfica representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes.

8.2 Línea celular PC-3 de cáncer de próstata

8.2.1 Curva de proliferación con mitoxantrona

En línea celular PC-3 no dependiente de andrógenos de cáncer de próstata se observó una disminución en el porcentaje de células vivas dependiente de la concentración del quimioterapéutico mitoxantrona. Figura 12, se aprecia el efecto de las concentraciones de 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 μM de mitoxantrona a 24 horas de tratamiento. Figura 13, muestra que con 2.5 μM se obtiene un porcentaje de proliferación de 16.5% y en una concentración de 25 μM tuvo un porcentaje de 0.1% y en la concentración de 100 μM se encontró una disminución completa del porcentaje de proliferación, por lo tanto el efecto de la mitoxantrona presenta un efecto no solo dependiente de la concentración si no también dependiente del tiempo.

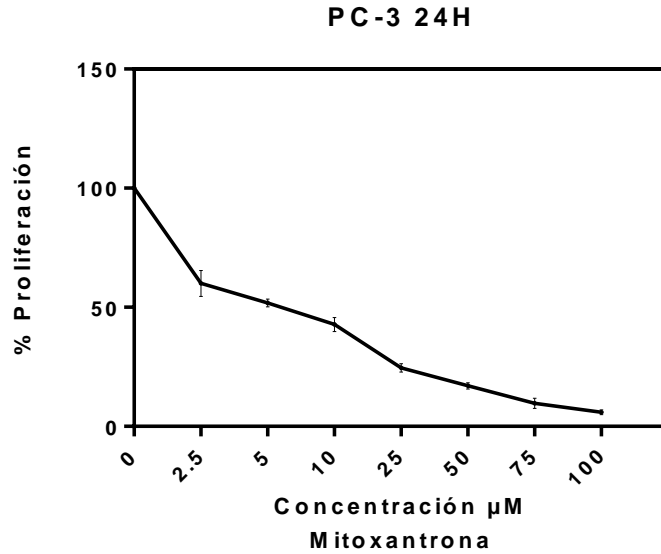


Figura 12. Efecto del quimioterapéutico mitoxantrona en la proliferación de células no andrógeno dependientes de cáncer de próstata con 24 horas de tratamiento. La gráfica representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes.

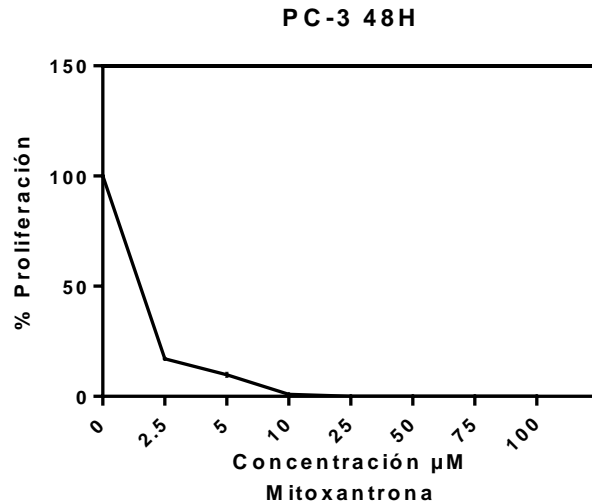


Figura 13. Efecto del quimioterapéutico mitoxantrona en la proliferación de células no andrógeno dependientes con 48 horas de tratamiento. La gráfica representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes.

El quimioterapéutico mitoxantrona fue probado sobre la proliferación de la línea celular PC-3 a 72 horas, Figura 14, muestra que a mayor tiempo de exposición mayor efecto sobre la proliferación conservando la tendencia de mayor

concentración mayor efecto anti proliferativo en células de no andrógeno dependientes PC-3.

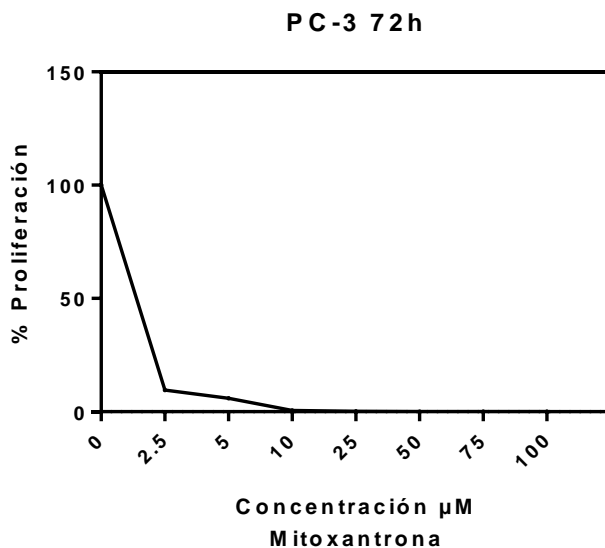


Figura 14. Efecto del quimioterapéutico mitoxantrona en la proliferación de células no andrógeno dependientes de cáncer de próstata con 72 horas de tratamiento. La gráfica representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes.

8.2.2. Curva de proliferación con acetina 7-O-rutinosida

En el tratamiento con el flavonoide acetina 7-O-rutinosida se encontró una dependencia a la concentración en la línea celular PC-3 no dependiente de andrógenos de cáncer de próstata. Figura 15, se aprecia el efecto de las concentraciones de 7.5, 10, 20, 40, 80, 100 y 200 μM del flavonoide acetina 7-O-rutinosida a 24 horas de tratamiento. Figura 16, muestra que a la concentración 7.5 μM tuvo un porcentaje de proliferación de 43% a 48 horas a diferencia de la concentración 200 μM tuvo un porcentaje de 8% y a diferencia de la misma concentración 200 μM a 72 horas dio un porcentaje de 5%, por lo que acetina 7-O-rutinosida presentó un efecto dependiente de la concentración y un comportamiento que indica que a mayor tiempo de tratamiento mayor efecto sobre la proliferación.

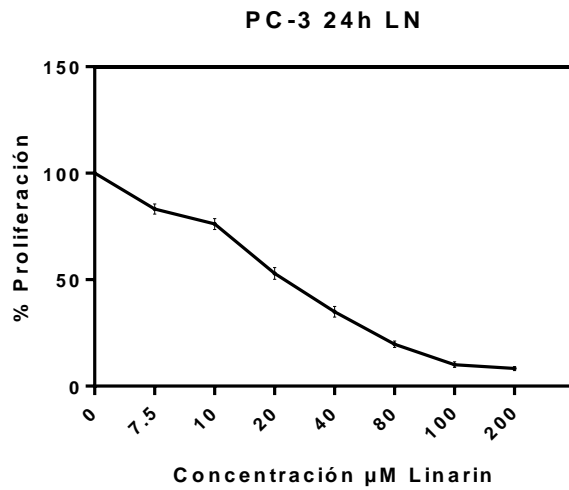


Figura 15. Efecto del acetina 7-O-rutinosida en la proliferación de células no andrógeno dependientes de cáncer de próstata con 24 horas de tratamiento. La gráfica representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes.

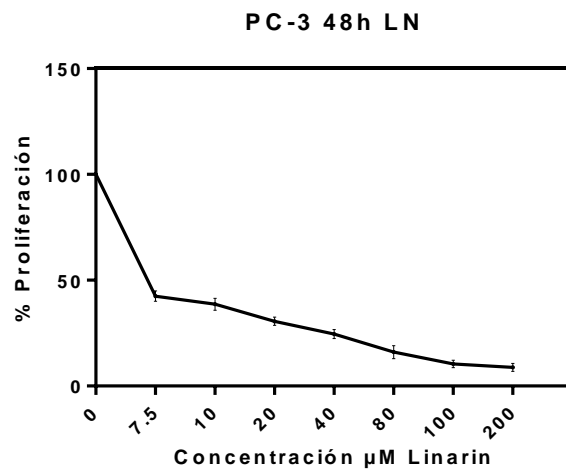


Figura 16. Efecto del acetina 7-O-rutinosida en la proliferación de células no andrógeno dependientes de cáncer de próstata con 48 horas de tratamiento. La gráfica representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes.

El flavonoide acetina 7-O-rutinosida fue probado sobre la proliferación de la línea celular PC-3 a 72 horas, Figura 17, muestra que a mayor tiempo de exposición mayor efecto sobre la proliferación y conservando el efecto dosis dependiente.

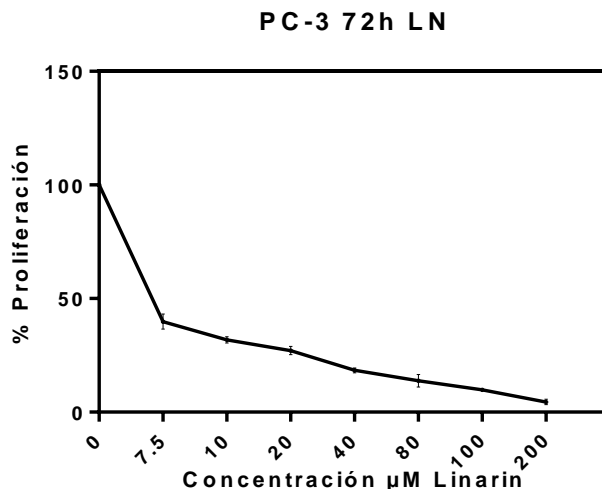


Figura 17. Efecto del acetina 7-O-rutinosida en la proliferación de células no andrógeno dependientes de cáncer de próstata con 72 horas de tratamiento. La gráfica representa la media \pm EE de 3 experimentos independientes.

8.3 Combinación del flavonoide acetina 7-O-rutinosida con mitoxantrona

8.3.1 Línea celular fibroblastos humanos

Para las combinaciones se utilizó el programa CompuSyn el cual determinó las combinaciones inhibitorias (CI) 15, 25 y 50 para las combinaciones de una CI₁₅ se usaron 1.7341 μM de mitoxantrona y 4.50311 μM de acetina 7-O-rutinosida, para una CI₂₅ se usaron 2.55034 μM de mitoxantrona y 13.9356 μM de acetina 7-O-rutinosida y finalmente para obtener una CI₅₀ se usaron 4.96570 μM de mitoxantrona y 98.0872 μM de acetina 7-O-rutinosida.

El tratamiento combinatorio CI₁₅, CI₂₅ y CI₅₀ presentó una disminución en el porcentaje de células vivas del 88.9%, 69.3% y 59.9% respectivamente, estos resultados se obtuvieron con un tratamiento de 24 horas (Figura 18).

En la combinación CI 15, CI 25 y CI 50 se obtuvo una disminución en el porcentaje de células vivas del 77.7%, 64.8% y 54.1% respectivamente a 48 horas de

tratamiento (Figura 19). A las 72 horas presentó una disminución en el porcentaje de proliferación del 63.2%, 53.4% y 41% respectivamente (Figura 20).

Se puede notar que en fibroblastos humanos las combinaciones no mostraron una disminución menor del 50% ni en 24 horas ni a 48 horas únicamente el porcentaje de proliferación se ve disminuido a menos del 50 % en un tratamiento de 72 horas con un CI₅₀ (Figura 20).

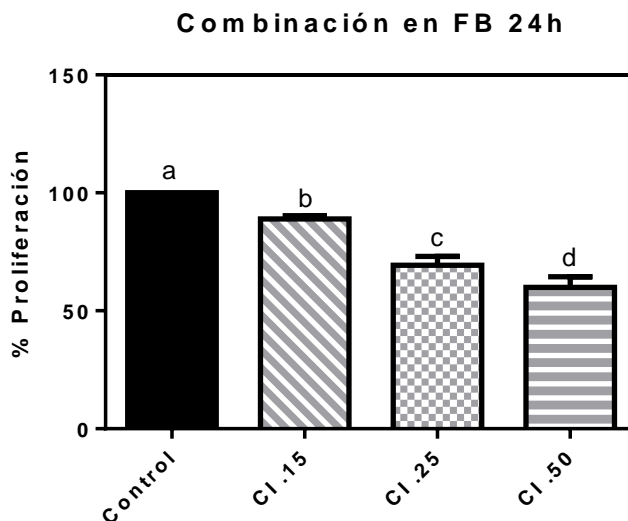


Figura 18. Efecto de la combinación de mitoxantrona con el flavonoide acacetina 7-O-rutinosida sobre la proliferación de la línea celular fibroblastos humanos con 24 horas de tratamiento donde CI 0.15, CI 0.25 y CI 0.50 equivalen a $4.5 + 1.7$, $13.9 + 2.5$ y $5 + 98.1$ μM de mitoxantrona y acacetina 7-O-rutinosida respectivamente. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

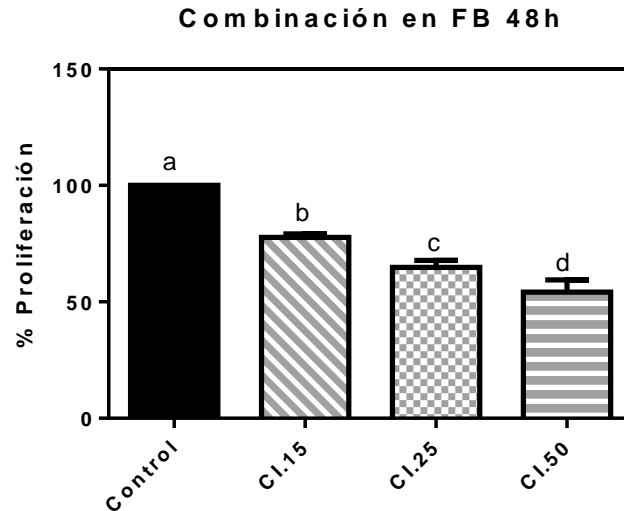


Figura 19. Efecto de la combinación de mitoxantrona con el flavonoide acacetina 7-O-rutinosida sobre la proliferación de la línea celular fibroblastos humanos con 48 horas de tratamiento, donde CI 0.15, CI 0.25 y CI 0.50 equivalen a 4.5 + 1.7, 13.9 + 2.5 y 5 + 98.1 μM de mitoxantrona y acacetina 7-O-rutinosida respectivamente. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

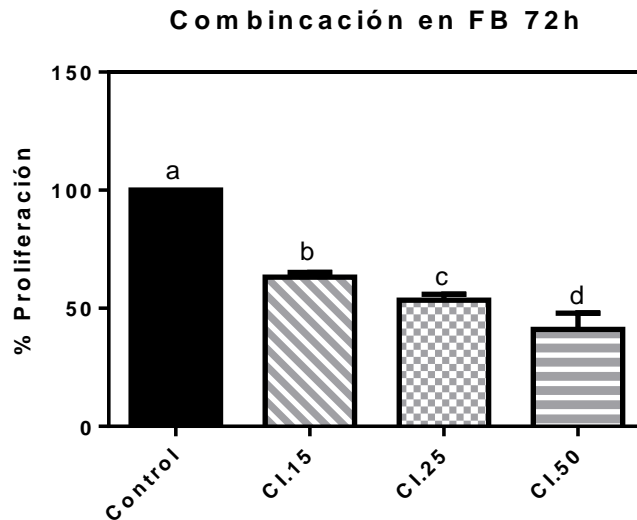


Figura 20. Efecto de la combinación de mitoxantrona con el flavonoide acacetina 7-O-rutinosida sobre la proliferación de la línea celular fibroblastos humanos con 72 horas de tratamiento, donde CI 0.15, CI 0.25 y CI 0.50 equivalen a 4.5 + 1.7, 13.9 + 2.5 y 5 + 98.1 μM de mitoxantrona y acacetina 7-O-rutinosida respectivamente. Se

muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

8.3.1 Combinaciones con células PC-3 de cáncer de próstata

Para determinar las combinaciones en las células de cáncer de próstata se utilizó el programa CompuSyn el cual determinó las combinaciones inhibitorias (CI) 15, 25 y 50. Las combinaciones obtenidas con el programa fueron para una CI₁₅ 1.7341 μ M de mitoxantrona y 4.50311 μ M de acetina 7-O-rutinosida, para una CI₂₅ se usaron 2.55034 μ M de mitoxantrona y 13.9356 μ M de acetina 7-O-rutinosida y finalmente para obtener una CI₅₀ se usaron 4.96570 μ M de mitoxantrona y 98.0872 μ M de acetina 7-O-rutinosida.

El tratamiento combinatorio CI₁₅, CI₂₅ y CI₅₀ presentó una disminución en el porcentaje de células vivas del 83.7%, 65.9% y 50% respectivamente, estos resultados se obtuvieron con un tratamiento de 24 horas (Figura 21).

En la combinación CI₁₅, CI₂₅ y CI₅₀ se obtuvo una disminución en el porcentaje de células vivas del 43.3%, 31.7% y 17.6% respectivamente a 48 horas de tratamiento (Figura 22).

En el tratamiento combinatorio CI₁₅, CI₂₅ y CI₅₀ a las 72 horas presentó una disminución en el porcentaje de proliferación del 23.1%, 14.2% y 6.5% respectivamente (Figura 23).

En las células PC-3 se observa una mayor disminución de porcentaje de proliferación con respecto al control, tanto a mayor concentración como a mayor tiempo

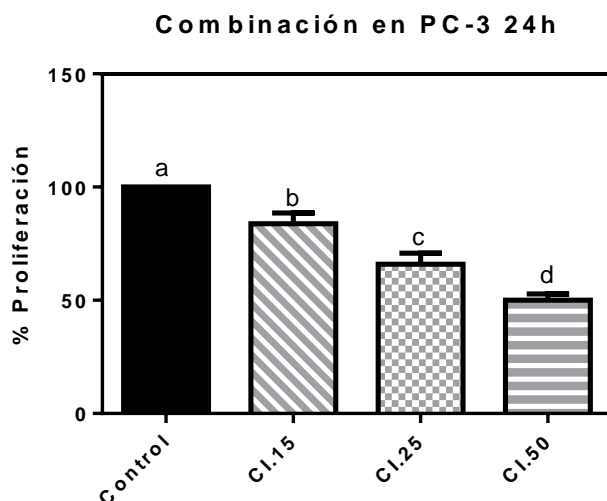


Figura 21. Efecto de la combinación de mitoxantrona con el flavonoide acacetina 7-O-rutinosida sobre la proliferación de la línea celular PC-3 de cáncer de próstata con 24 horas de tratamiento, donde CI 0.15, CI 0.25 y CI 0.50 equivalen a 4.5 + 1.7, 13.9 + 2.5 y 5 + 98.1 μ M de mitoxantrona y acacetina 7-O-rutinosida respectivamente. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

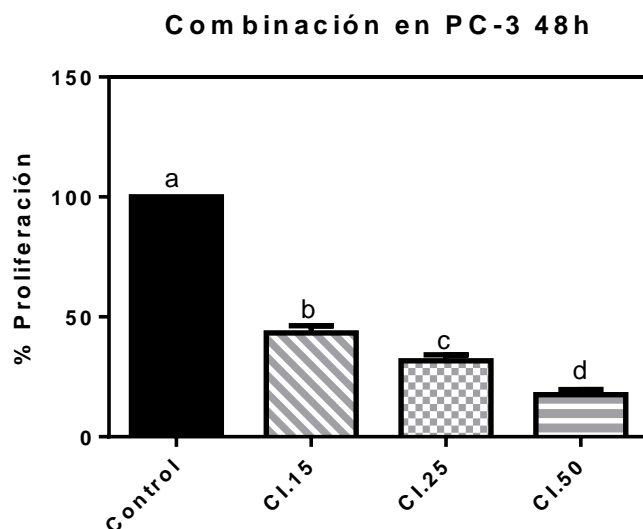


Figura 22. Efecto de la combinación de mitoxantrona con el flavonoide acacetina 7-O-rutinosida sobre la proliferación de la línea celular PC-3 de cáncer de próstata con 48 horas de tratamiento, donde CI 0.15, CI 0.25 y CI 0.50 equivalen a 4.5 + 1.7,

13.9 + 2.5 y 5 + 98.1 μM de mitoxantrona y acetina 7-O-rutinosida respectivamente. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

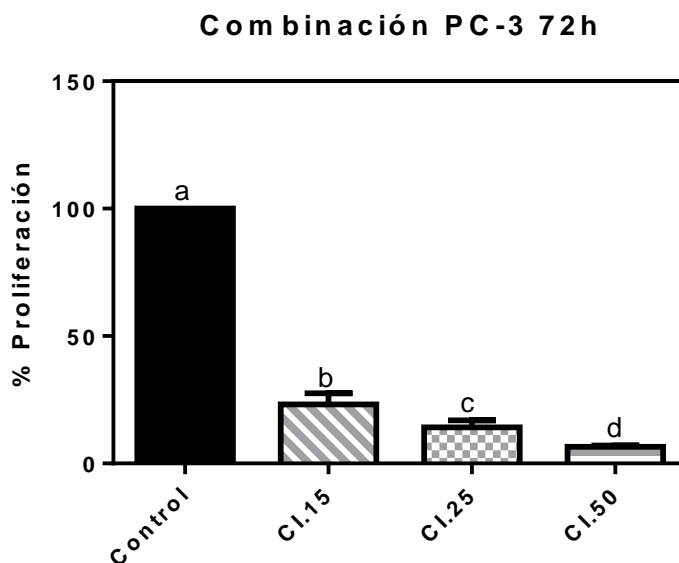


Figura 23. Efecto de la combinación de mitoxantrona con el flavonoide acetina 7-O-rutinosida sobre la proliferación de la línea celular PC-3 de cáncer de próstata con 72 horas de tratamiento, donde CI 0.15, CI 0.25 y CI 0.50 equivalen a 4.5 + 1.7, 13.9 + 2.5 y 5 + 98.1 μM de mitoxantrona y acetina 7-O-rutinosida respectivamente. Se muestra la media \pm DS de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

8.2 Ensayo herida para la combinación de la acetina 7-O-rutinosida y mitoxantrona.

Para evaluar el efecto de la acetina 7-O-rutinosida sobre la migración, se realizó en ensayo herida y se realizó la medición de la herida a las 0, 6, 12 y 24 horas. En la figura 24, se muestra el resultado obtenido con mitoxantrona, donde para las 24 horas se observó un cierre del 50% de la herida en el control, para la concentración de 5 μM se observó una cierre del 45% de la herida, en la concentración 2.55 μM

se encontró un cierre de 47%, y a la concentración 1.7 μM un 49% de cierre de la herida a 24 horas.

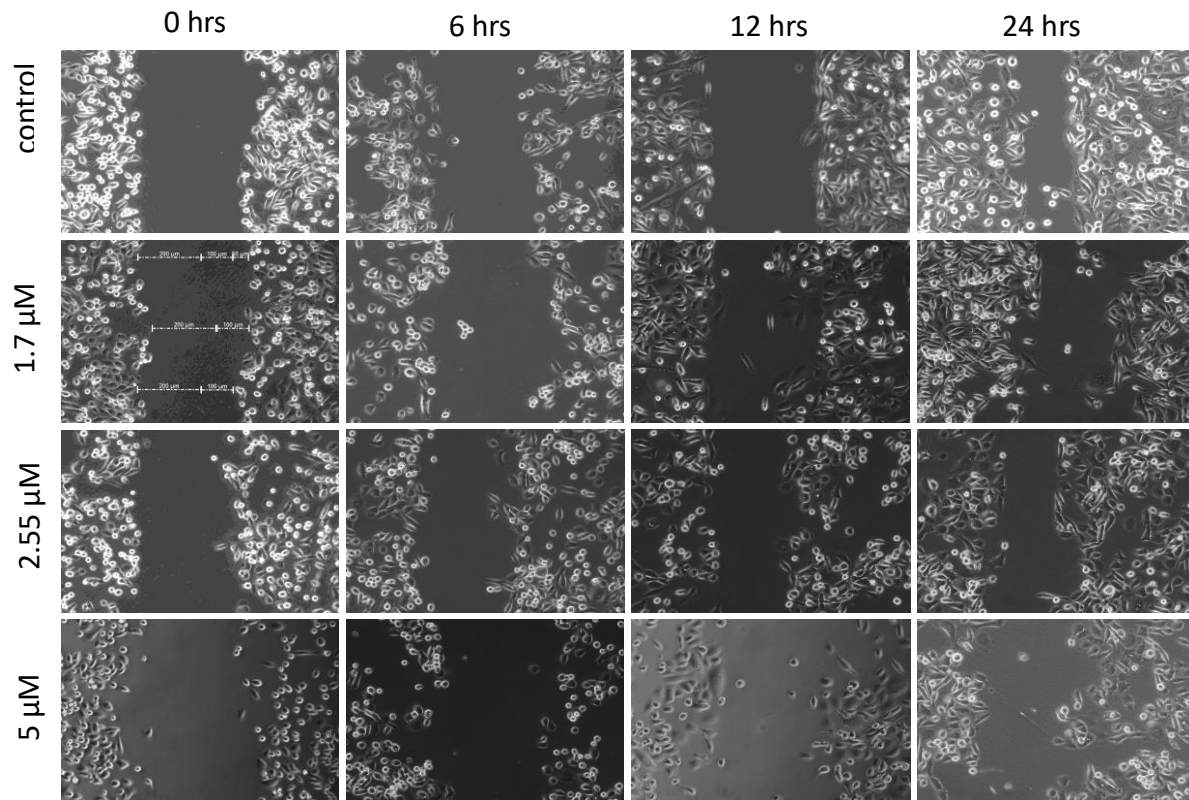


Figura 24. Efecto de mitoxantrona sobre la migración en la línea celular PC-3. Se tuvo un grupo control y se usaron concentraciones 1.7, 2.55, 5 μM a 0, 6, 12, 24 horas.

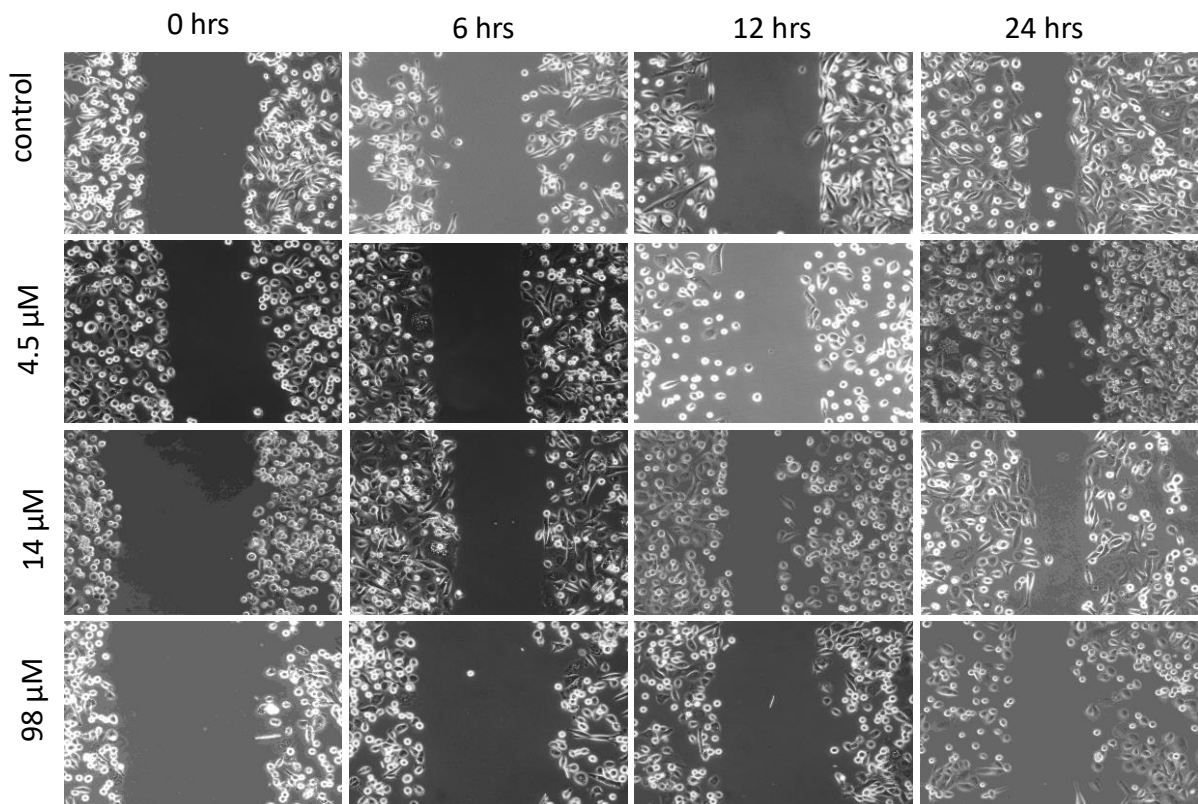


Figura 25. Se muestra el efecto del acacetina 7-O-rutinosida sobre la migración en la línea celular PC-3. Se tuvo un grupo control y se usaron concentraciones 4.5, 14, 98 μM a 0, 6, 12, 24 horas.

Se realizó el ensayo herida para las células andrógeno independientes tratadas con la combinación de acacetina 7-O-rutinosida y mitoxantrona, se utilizaron las concentraciones inhibitorias 15, 25 y 50 a las 0, 6, 12 y 24 horas, donde CI 0.15, CI 0.25 y CI 0.50 equivalen a 4.5 + 1.7, 13.9 + 2.5 y 5 + 98.1 μM de mitoxantrona y acacetina 7-O-rutinosida respectivamente los resultados obtenidos nos muestran que la combinación inhibitoria 50 no presenta un cierre de la herida desde las 6 horas hasta las 24 horas (figura 26).

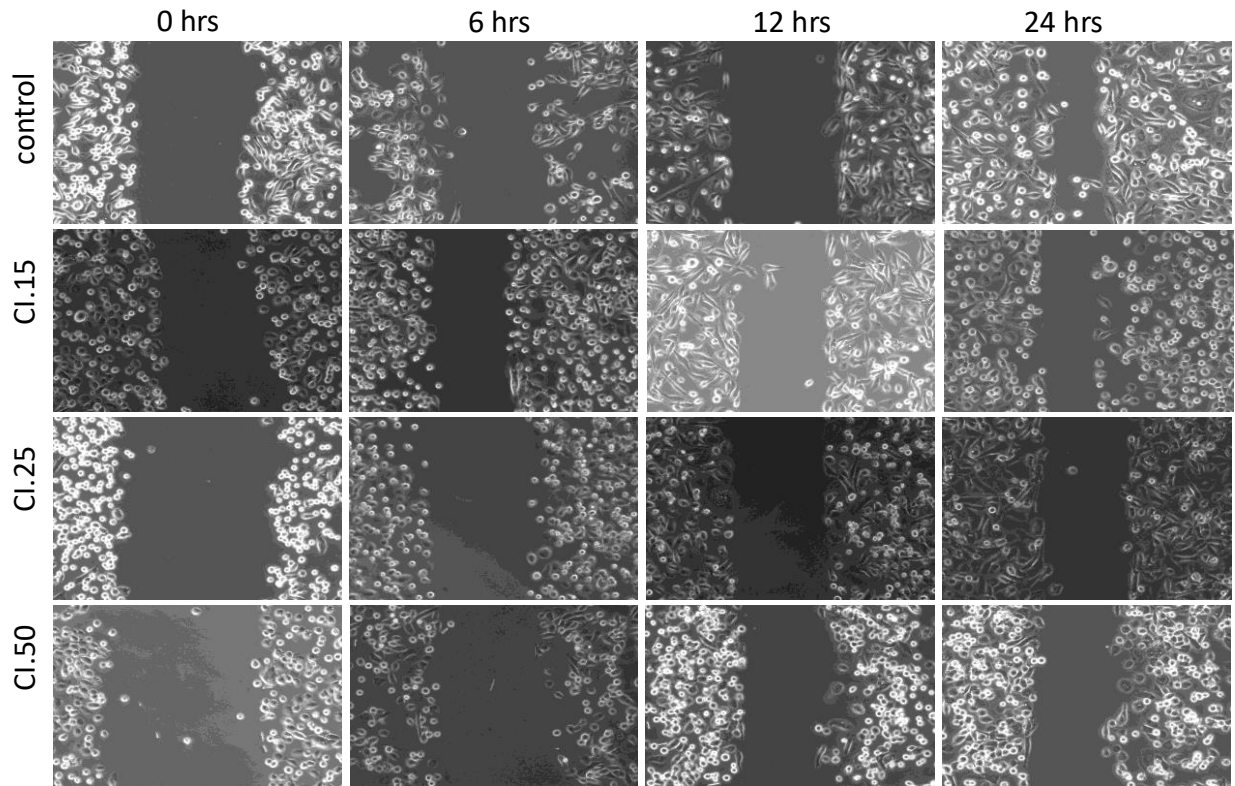


Figura 26. Efecto de la combinación del acacetina 7-O-rutinosida con mitoxantrona sobre la migración en la línea celular PC-3. Se tuvo un grupo control y se usaron concentraciones CI 0.15, CI 0.25 y CI 0.50 a 0, 6, 12, 24 horas.

Se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenido en el ensayo herida para todos los tratamientos individuales y combinados a las 6 horas, no mostrando diferencia significativa entre ninguno de los grupos (Figura 27).

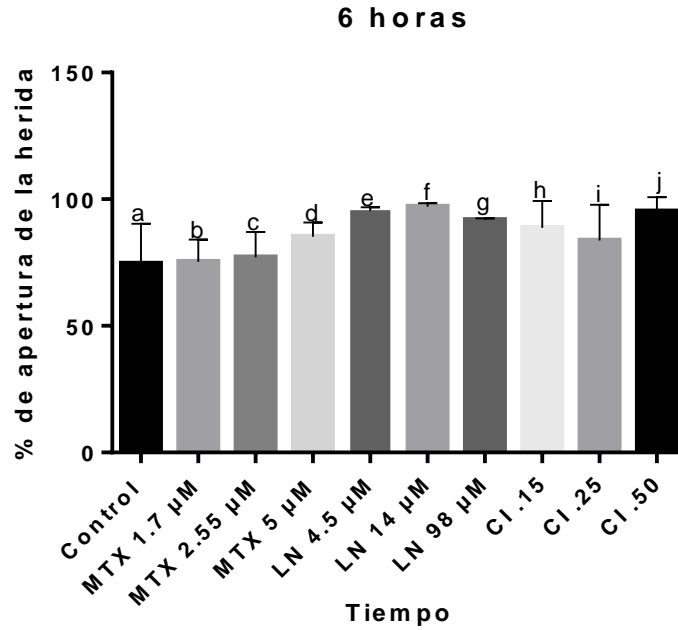


Figura 27. Efecto de los tratamientos individuales de mitoxantrona, acetina 7-O-rutinosida y la combinación a 6 horas de exposición sobre la migración en la línea celular PC-3. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

Al analizar los resultados obtenidos a las 12 horas en el ensayo herida para los tratamientos individuales y combinaciones, mostró únicamente diferencia significativa el tratamiento individual de 1.7 μ M de mitoxantrona con el tratamiento combinatorio CI₅₀ y el tratamiento individual de acetina 7-O-rutinosida 98 μ M (Figura 28).

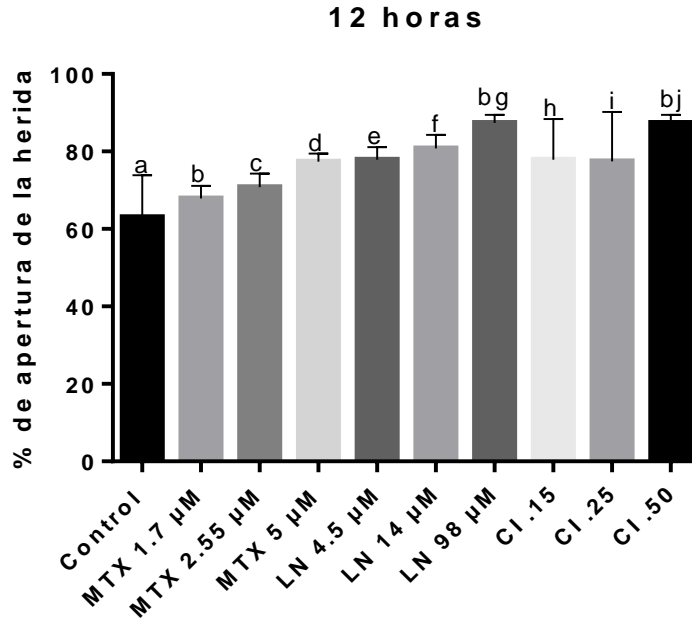


Figura 28. Efecto de los tratamientos individuales de mitoxantrona, acetina 7-O-rutinosida y las combinaciones a 12 horas de exposición sobre la migración en la línea celular PC-3. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

Con los resultados obtenidos del ensayo herida a 24 horas para los tratamientos individuales de mitoxantrona, acetina 7-O-rutinosida y la combinación de estos, encontrando diferencia significativa entre los tratamientos de mitoxantrona 1.7 μ M, 5 μ M con el tratamiento combinatorio CI 0.50 (Figura 29).

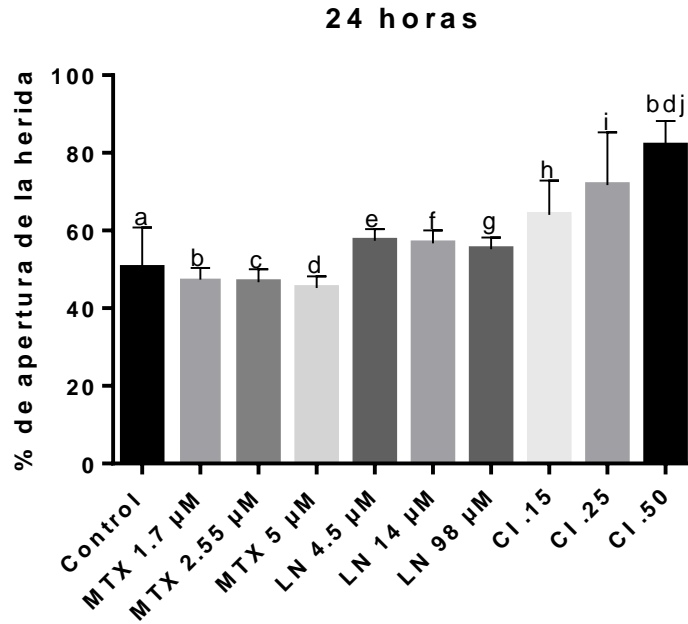


Figura 29. Efecto de los tratamientos individuales de mitoxantrona, acacetina 7-O-rutinosida y la combinación a 24 horas de exposición sobre la migración en la línea celular PC-3. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

Se llevó a cabo el análisis estadístico de los resultados obtenidos en el ensayo herida para los tratamientos individuales de mitoxantrona a las 6, 12 y 24 horas, mostrando que hay un mayor % de apertura de la herida a las 24 horas, no encontrando diferencia significativa entre 6 horas y 12 horas de tratamiento en las concentraciones 1.7, 2.55 y 5 μM , mostrando un cierre de la herida de 55 % a 24 horas con 5 μM (Figura 30). En los resultados obtenidos en el ensayo herida del tratamiento individual de acacetina 7-O-rutinosida 6, 12 y 24 horas y a concentraciones 4.5, 14 y 98 μM mostró un cierre de la herida de 43 %, 44 % y 45 % respectivamente a las 24 horas (Figura 31).

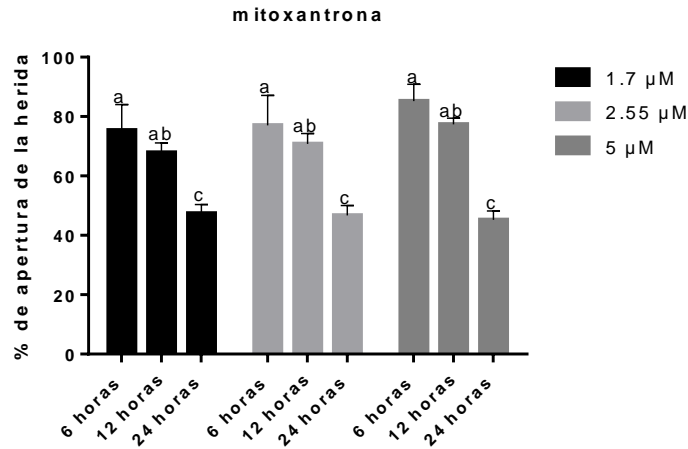


Figura 30. Efecto del tiempo de tratamiento sobre la inhibición de la migración. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

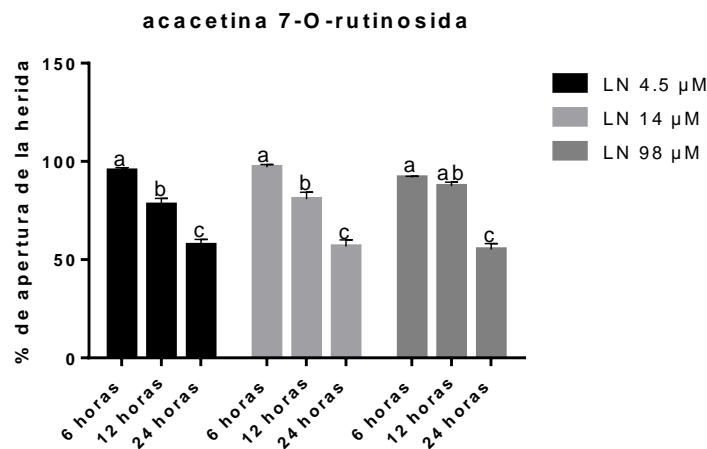


Figura 31. Efecto de los tratamientos individuales de acacetina 7-O-rutinosida a 6, 12 y 24 horas de exposición sobre la migración en la línea celular PC-3. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

Se llevó a cabo el análisis estadístico de los resultados obtenidos en el ensayo herida para las combinaciones, mostrando un cierre de la herida de 11%, 22% y 36% para las 6, 12 y 24 horas respectivamente con la combinación inhibitoria 15; mientras que para la combinación inhibitoria 25 la herida cerró un 16%, 23% y 30%

para las 6, 12 y 24 horas; para la combinación inhibitoria 50 se encontró un cierre de 5%, 13%, 19% a las 6, 12 y 24 horas respectivamente. Se encontró diferencia estadística de los tratamientos con respecto al control pero no entre tratamientos (Figura 32).

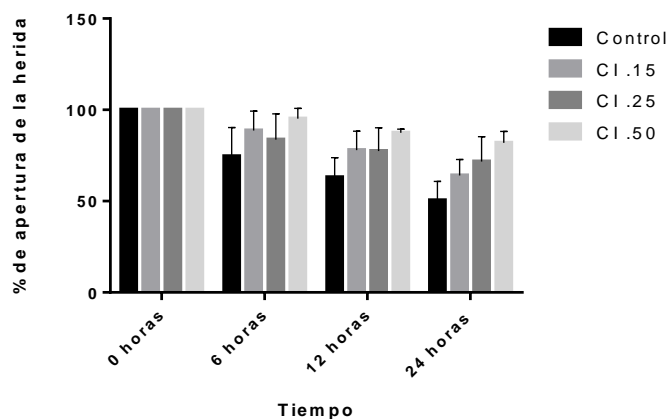


Figura 32. Efecto de la combinación del acetato de 7-O-rutinosida y mitoxantrona, sobre la migración celular en PC-3. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

8.3 Evaluación del efecto apoptótico en células PC-3

Se realizó la evaluación del efecto apoptótico con el quipo MUSE cell analizar, junto con el kit de Annexin V & Dead cell a las células andrógeno independientes PC-3 las cuales fueron evaluadas con el quimioterapéutico mitoxantrona a concentraciones 1.7, 2.55 y 5 μ M las cuales corresponden a su CI 0.15, CI 0.25 y CI 0.50 de manera individual respectivamente, dando como resultado a la concentración 1.7 μ M dio un 39.7% de apoptosis temprana, 2.55 μ M arrojó un porcentaje de 44.23 de apoptosis y la concentración 5 μ M dio 52% de apoptosis temprana (Figura 33).

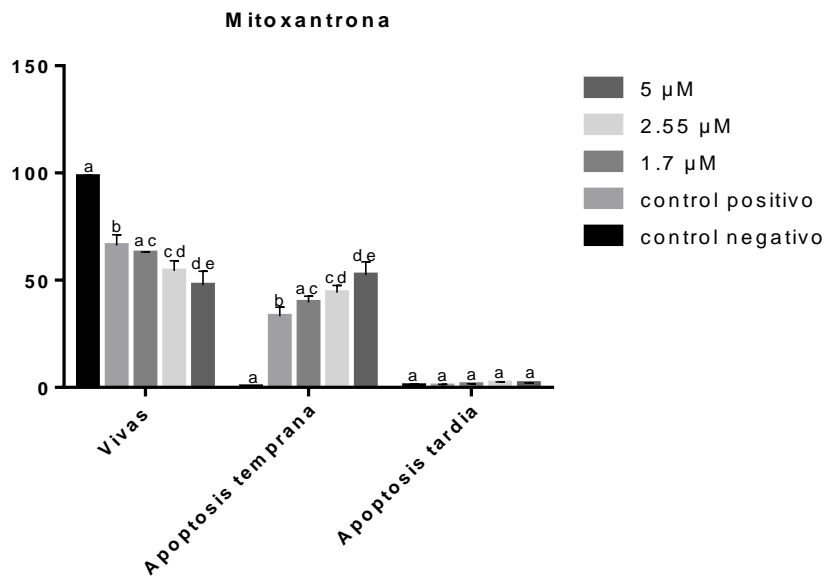


Figura 33. Efecto de la Mitoxantrona sobre la apoptosis en células PC-3. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

También se evaluó el efecto apoptótico de la acetina 7-O-rutinosda con el equipo MUSO cell analyzer junto con el kit de Annexin V & Dead cell a las células PC-3, en este caso se evaluaron las concentraciones 4.5, 14 y 98 μ M, las cuales causaron 49.7, 52.9 y 62.48 por ciento de apoptosis temprana respectivamente (Figura 34).

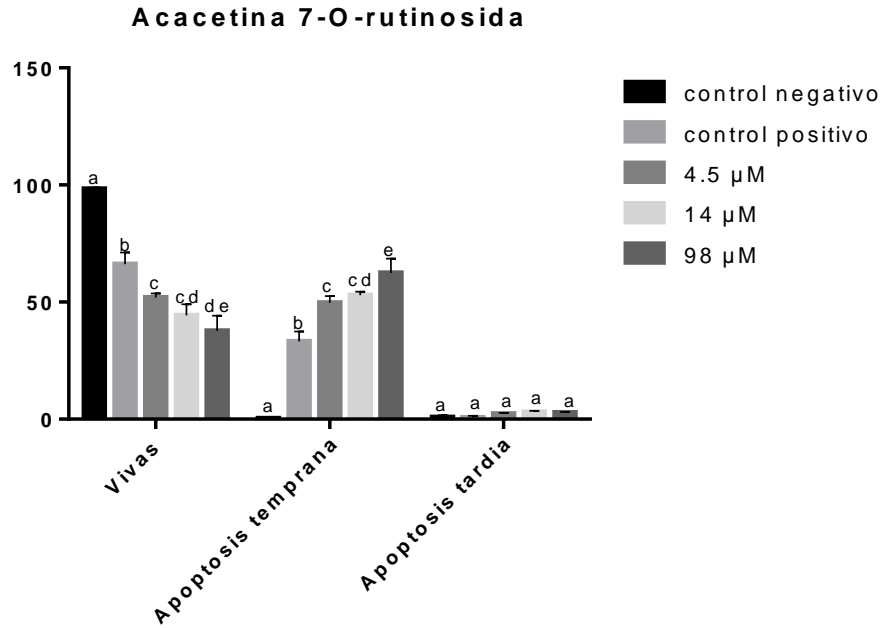


Figura 34. Efecto de la acacetina 7-O-rutinosida sobre la apoptosis en células PC-3. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

La evaluación del efecto apoptótico se realizó con el equipo MUSE cell analyzer, junto con el kit Annexin V & Dead Cell a las células andrógeno independientes PC-3 evaluadas con la combinación del acacetina 7-O-rutinosida y mitoxantrona a concentraciones inhibitorias 15, 25 y 50, dando como resultado más del 50% de células en apoptosis temprana en la concentración inhibitoria 50 a 24 horas (figura 35).

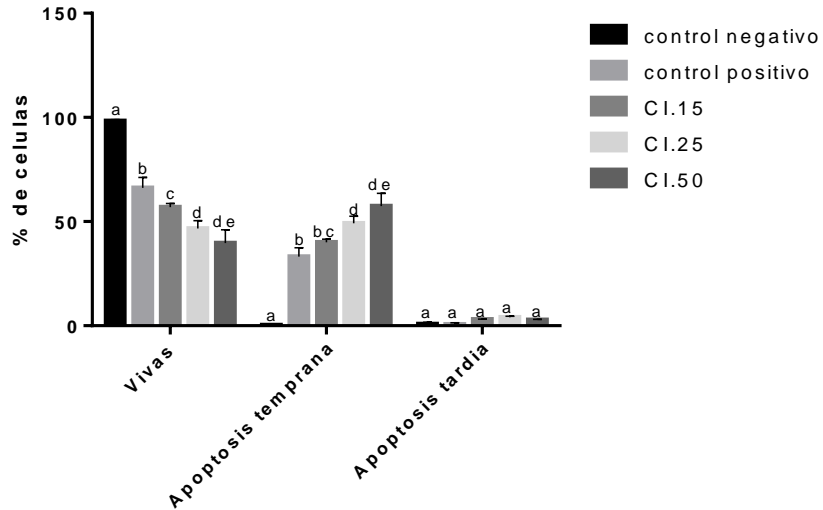


Figura 35. Efecto de la combinación del acetina 7-O-rutinosida y mitoxantrona sobre la apoptosis en células PC-3. Se muestra la media \pm EE de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* Tukey ($P < 0.05$).

9. DISCUSIÓN

Se utilizó la línea celular fibroblastos humanos como línea celular de referencia. En el caso de la curva de proliferación con el quimioterapéutico Mitoxantrona en células de fibroblastos humanos presentó una IC_{50} de $3.48 \mu M$ a 24h que coincide con lo reportado con Manfred Dietel y col. en 1988. El porcentaje de proliferación es inversamente proporcional a la concentración, al exponer las células de fibroblastos humanos a la mitoxantrona por más tiempo (48h y 72h) los IC_{50} son menores a $1 \mu M$, lo que nos dice que la respuesta a la mitoxantrona es proporcional al tiempo de exposición. La mitoxantrona al tener un efecto sobre la topoisomerasa II, llega a provocar arresto celular siendo como efecto una actividad anti proliferativa.

En las curvas de proliferación con acetina 7-O-rutinosida se observó una disminución de la proliferación al 50% con una concentración de $200 \mu M$ a 24, 48 y 72 horas, mostrando un comportamiento dosis dependiente pero no tiempo dependiente. También los resultados mostraron que la acetina 7-O-rutinosida tiene un efecto citotóxico en células sanas como lo son los fibroblastos humanos a

200 μM , a diferencia en las células PC-3 mostro un efecto citotóxico a partir de concentraciones más bajas 7.5 μM .

Para la línea celular PC-3 los tiempos de exposición a la mitoxantrona fueron 24 h, 48 h y 72h, donde se aprecia un porcentaje de proliferación proporcional al tiempo y a la concentración, siendo consistente con lo ya reportado por Wei *et al.* en el 2010 y por Stefan y col. en el 2011.

La acacetina 7-O-rutinosida en células PC-3 mostró una disminución significativa en el porcentaje de proliferación a partir de la concentración 10 μM hasta 200 μM (Figuras 15, 16 y 17). Las células PC-3 mostraron ser más sensibles a la mitoxantrona en comparación de las células de fibroblastos humanos, esto se da ya que la mitoxantrona actúa principalmente durante la fase de síntesis en el ciclo celular, y las células de PC-3 son células cancerígenas las cuales tienen alterado su ciclo de duplicación el cual está entre 16 horas y 24 horas a diferencia de los fibroblastos humanos que es de 24 horas a 36 horas (Laurent *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2011).

Las células PC-3 presentaron ser más sensibles a la acacetina 7-O-rutinoside, se ha demostrado actúa sobre el receptor IGF-1 y este se encuentra sobreexpresado en las células de próstata a diferencia de los fibroblastos humanos que son células sanas. La sobreexpresión del receptor IGF-1 en células de cáncer de próstata es debida a que es necesario para la activación de la vía de los andrógenos, cuando las células se vuelven no dependientes de andrógenos sufren una sobreexpresión de los receptores androgénicos y al no necesitar los andrógenos para la activación de la vía, la vía se igual manera se encuentra sobreexpresada (Fahad *et al.*, 2017).

Existen reportes del uso de estos dos compuestos implementados de manera individual en diversas líneas de cáncer. Xiangyang *et al.* (2017) observaron una actividad anti proliferativa por parte de la acacetina 7-O-rutinosida en células de RAW 264.7 de leucemia murina a través de la inhibición de la vía NF κ -B la cual está relacionada con la supervivencia celular.

Actualmente el mecanismo de acción del acacetina 7-O-rutinosida no se encuentra elucidado en su totalidad, pero con base en lo reportado en diversas líneas celulares

de cáncer y por la diferencia de efecto anti proliferativo entre la línea celular fibroblastos humanos y la línea celular de cáncer próstata, se puede proponer que tiene un efecto sobre el receptor IGF-1 el cual se encuentra sobre expresado en la línea celular PC-3 (figura 36). Fong *et al.* en el 2014 encontraron que la acacetina también tuvo un efecto en la disminución de AKT fosforilado lo cual indica que esta teniendo un efecto en la activación de la vía.

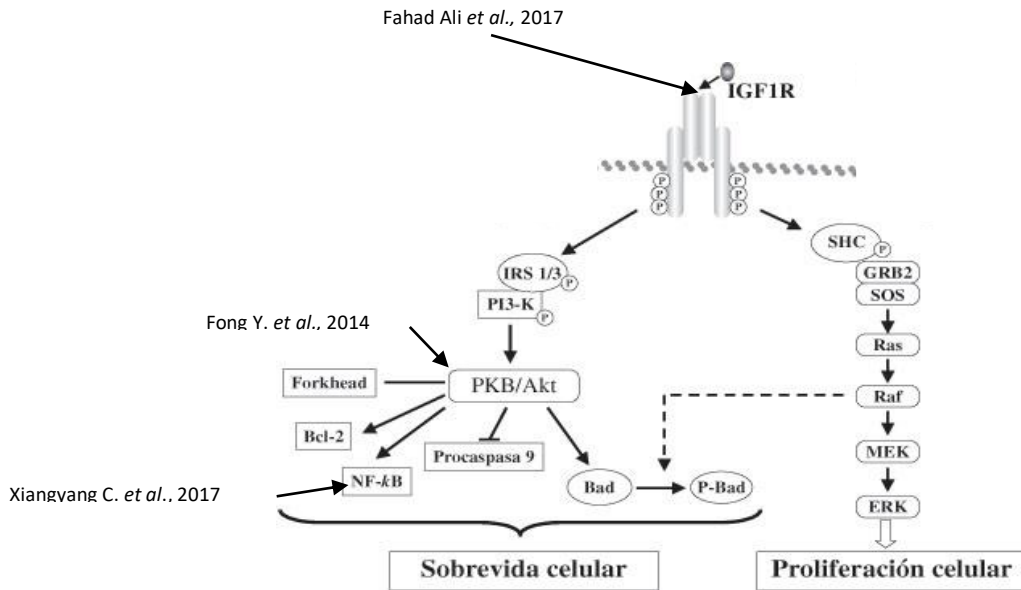


Figura 36. Efecto de la acacetin 7-O-rutinosida modificada 2018.

El ensayo realizado para evaluar el efecto anti proliferativo al combinar el flavonoide acacetina 7-O-rutinosida con mitoxantrona, mostró un mayor efecto.

La mitoxantrona tiene un efecto en la inhibición de la topoisomerasa tipo II la cual causando rompimiento del ADN, este efecto es dosis dependiente ya que a bajas concentraciones únicamente causa arresto celular y en altas dosis causa un daño irreversible provocando apoptosis a la células, donde también este efecto no es específico, ataca a cualquier célula en proliferación. En el caso de la Acacetina 7-O-rutinosida se han encontrado efecto en otras vías y sobre otras moléculas principalmente proponiendo que su mecanismo de acción está relacionado con la interacción con el receptor IGF-1, Akt y NF-κB (Fahad Ali *et al.*, 2017; Fong Y. *et al.*, 2014; Xiangyang C. *et al.*, 2017), por lo tanto la mitoxantrona y la acacetina 7-O-rutinosida actúan en sitios diferentes mostrando un mejor efecto.

En los estudios realizados en este trabajo se encontró que la acecatina tuvo un efecto anti migratorio a las 24 horas con el tratamiento 4.5 μM esto es consistente con los estudios de Zhen *et al.* en el 2017 donde se encontró una disminución de la migración de células de glioma de cerebro H4 a concentraciones 5 μM .

Zi-Gang *et al.* en el 2017, encontraron un efecto en la migración de las células en células de glioma de cerebro tratadas con acacetina 7-O-rutinosida donde se encontró que al utilizar concentraciones entre 100 μM y 200 μM tuvo un efecto anti migratorio a las 48 y 72 horas (Menéndez, 2005).. El mecanismo es desconocido pero hay una relación entre la vía PI3K y la molécula GSK3 la cual está relacionada con la regulación de β -catenina y por lo tanto tiene un efecto sobre la migración (Oyarce, 2011).

En los tratamientos combinados del flavonoide con el quimioterapéutico se encontró un mayor efecto anti migratorio que sus tratamientos individuales.

En el ensayo de apoptosis se utilizaron células PC-3 donde el mecanismo de acción inductor de apoptosis se puede proponer que es a través de la interacción directa con el receptor IGF-1 o con la molécula AKT (Fong *et al.*, 2014; Rana *et al.*, 2005). Se demostró que la acacetina 7-O-rutinosida presentó un efecto inductor de apoptosis en células A549 de cáncer de pulmón a través de la inhibición de la vía AKT por Fong *et al.* (2014) y Rana *et al.* (2005). También se encontró tener un efecto apoptótico en células MCF-7, H4 U251 y A172 (Hui y Xiaoging, 2012; Zi-Gang *et al.*, 2017).

10. Conclusiones

1.- El quimioterapéutico mitoxantrona demostró una reducción de la proliferación en células de cáncer de próstata (PC-3)

- 2.- La acacetina 7-O-rutinosida presento un efecto anti proliferativo en células de andrógeno independientes (PC-3).
- 3.- Las combinaciones de mitoxantrona con acacetina 7-O-rutinosida mostraron un mayor efecto anti proliferativo en las células andrógeno independientes (PC-3), a diferencia de su evaluación individual.
- 4.- El quimioterapéutico mitoxantrona no tuvo un efecto en la migración celular de PC-3 mostrando porcentaje de cierre de la herida igual al control.
- 5.- El flavonoide acacetina 7-O-rutinosida tuvo un efecto en la migración celular de PC-3 a las 24 horas.
- 6.- La migración celular de PC-3 es inhibida por las combinaciones de la mitoxantrona y la acacetina 7-O-rutinosida.
- 7.- La inducción de apoptosis temprana en células PC-3 se vio mayor en tratamientos combinados que en los tratamientos individuales.
- 8.- El efecto anti proliferativo y anti migratorio de las combinaciones es dependiente de la concentración y el tiempo de exposición al tratamiento.

11. REFERENCIAS

Aboushwareb, T., & Atala, A. (2008). Stem cells in urology. *Nature Clinical Practice Urology*, 5(11), 621-631.

Adedapo, A. A., Jimoh, F. O., Koduru, S., Masika, P. J., Afolayan, A. J. (2009). Assessment of the medicinal potentials of the methanol extracts of the leaves and stems of *Buddleja saligna*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9(1), 21.

Álvarez, E., Cambeiro, O. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Offarmacy Journaly*, 22(1), 7.

Angelito. (2003). Esquema del aparato reproductor masculino y órganos próximos. Pagina web. Consultado Febrero-2017.
<https://es.pinterest.com/pin/211598882469994207>

Alila. (2010). Etapas del cáncer de próstata. Página web. Consultado Febrero-2017. <https://es.dreamstime.com/imagen-de-archivo-libre-de-regal%C3%ADas-etapas-del-c%C3%A1ncer-de-pr%C3%B3stata-image27478196>

Badea, M., Olar, R., Marinescu, D., Uivarosi, V., Aldea, V., & Nicolescu, T. O. (2010). Thermal stability of new vanadyl complexes with flavonoid derivatives as potential insulin-mimetic agents. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 99(3), 823-827.

Bianco FJ Jr, Scardino PT, Eastham JA. (2005). Radical prostatectomy: long-term cancer control and recovery of sexual and urinary function ("trifecta"). *Urology*, 83-94.

BioCancer (A). (2010). Principios generales de carcinogénesis: carcinogénesis química y hormonal: Iniciación. Recuperado el 21 de Febrero de 2015, de BioCancer: <http://www.biocancer.com/journal/806/21-iniciacion>

BioCancer (B). (2010). Principios generales de carcinogénesis: carcinogénesis química y hormonal: Progresión. Recuperado el 21 de Febrero de 2015, de <http://www.biocancer.com/journal/808/23-progresion>

BioCancer (C). (2010). Principios generales de carcinogénesis: carcinogénesis química y hormonal: Promoción. Recuperado el 21 de Febrero de 2015, de BioCancer: <http://www.biocancer.com/journal/807/22-promocion>

Carter, H. B., Albertsen, P. C., Barry, M. J., Etzioni, R., Freedland, S. J., Greene, K. L, Penson, D. F. (2013). Early detection of prostate cancer: AUA Guideline. *The Journal of urology*, 190(2), 419-426.

Catalona, W. J., Richie, J. P., Ahmann, F. R., M'Iss, A. H., Scardino, P. T., Flanigan, R. C., Waters, W. B. (2016). Comparison of Digital Rectal Examination and Serum Prostate Specific Antigen in the Early Detection of Prostate Cancer: Results of a Multicenter Clinical: Trial of 6,630 Men. *The Journal of urology*, 197(2), S200-S207.

Chien, S. T., Lin, S. S., Wang, C. K., Lee, Y. B., Chen, K. S., Fong, Y., & Shih, Y. W. (2011). Acacetin inhibits the invasion and migration of human non-small cell lung cancer A549 cells by suppressing the p38 α MAPK signaling pathway. *Molecular and cellular biochemistry*, 350(1-2), 135-148.

Chemocare (2017). Mitoxantrona [Online]. <<http://chemocare.com/es/chemotherapy/drug-info/mitoxantrona.aspx>>. [20 de Julio del 2017].

Chen, G, Sun, W-B, & Sun, H. (2007). Ploidy variation in *Buddleja L.* (Buddlejaceae) in the Sino - Himalayan region and its biogeographical implications. *Botanical Journal of the Linnean Society, The Linnean Society of London*, 154, 305 – 312.

Chen, Y. U., Sawyers, C. L., & Scher, H. I. (2008). Targeting the androgen receptor pathway in prostate cancer. *Current opinion in pharmacology*, 8(4), 440-448.

Cheng, Y. (2011). *Integrative Genetic and Epigenetic Studies to Identify Prostate Cancer Genes at Chromosomal 8p*, Doctoral dissertation, Wake Forest University.

Consejo Nacional de Población [**CONAPO**] (2014). Proyecciones de la población 2010 – 2050 [Online]. < <http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Proyecciones>>. [10 de mayo del 2017].

Cooperberg, M. R., Broering, J. M., & Carroll, P. R. (2010). Time trends and local variation in primary treatment of localized prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(7), 1117-1123.

Davis, L. D., Zhang, W., Merseburger, A., Young, D., Xu, L., Rhim, J. S., ... & Sesterhenn, I. A. (2002). p63 expression profile in normal and malignant prostate epithelial cells. *Anticancer research*, 22(6C), 3819.

De Bono, J. S., Oudard, S., Ozguroglu, M., Hansen, S., Machiels, J. P., Kocak, I., Roessner, M. (2010). Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *The Lancet*, 376(9747), 1147-1154.

Drago S. M. E. (2007). Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(4).

Eastham JA, Riedel E, Scardino PT, Shike M, Fleisher M, Schatzkin A, Lanza E, Latkany L, Begg CB. (2003). Polyp Prevention Trial Study Group. Variation of serum prostate-specific antigen levels: an evaluation of year-to-year fluctuations. *JAMA*, 289(20):2695-700.

Fan, X., Liu, S., Su, F., Pan, Q., & Lin, T. (2012). Effective enrichment of prostate cancer stem cells from spheres in a suspension culture system. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (Vol. 30, No. 3, pp. 314-318). Elsevier.

Feinberg, A. P., Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer*, 4(2), 143-153.

Fernández S., C. Wasowski, A.C.Paladini, M. Marder. (2004). Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacol Biochem Bhav*, 77 (2): S. 399–404.

Fletcher, O., & Houlston, R. S. (2010). Architecture of inherited susceptibility to common cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10(5), 353-361.

Flaig, T. W., Su, L. J., Harrison, G., Agarwal, R., & Glodé, L. M. (2007). Silibinin synergizes with mitoxantrone to inhibit cell growth and induce apoptosis in human prostate cancer cells. *International journal of cancer*, 120(9), 2028-2033.

Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Wähälä K, Montesano R, Schweigerer L .(1997). Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res*, 57:2916–2921.

Fox, E. J. (2004). Mechanism of action of mitoxantrone. *Neurology*, 63(12 suppl 6), S15-S18.

Goity V. L. E. (2007). Estudio químico y farmacológico de un extracto activo de *Buddleja Globosa* Hope, *Buddlejaceae*, Matico y diseño de la metodología analítica, Licenciatura Químico Farmacéutico, Universidad de Chile.

Gotink KJ, Verheul HM. (2010). Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis* 13(1):1–14.

Hegarty, J., Beirne, P. V., Walsh, E., Comber, H., Fitzgerald, T., & Wallace Kazer, M. (2010). Radical prostatectomy versus watchful waiting for prostate cancer. *The Cochrane Library*, 10(11), 6590.

Heidenreich, A, Bolla, M, Joniau, S, Mason, M. D., Matveev, V., Mottet, N., Zattoni, F. (2010). Guía clínica sobre el cáncer de próstata. *European Association of Urology*, 196.

Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I. **(2002).** The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatase in metastatic carcinoma of the prostate. *Journaly Urology* 167(2P 2):948-51.

Huggins C, Stevens RE Jr, Hodges CV. Studies on prostate cancer. II. **(1941).** The effect of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. *Arch Surg*, 43: 209-23.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI] (2017). Estadística a propósito del día mundial contra el cáncer [online].

<http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf>. [10 mayo 2017]

Jones, C. U., Hunt, D., McGowan, D. G., Amin, M. B., Chetner, M. P., Bruner, D. W., & Sandler, H. M. (2011). Radiotherapy and short-term androgen deprivation for localized prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 365(2), 107-118.

Kim, Y. H., Lee, Y. S., Choi, E. M. (2011). Linarin isolated from *Buddleja officinalis* prevents hydrogen peroxide-induced dysfunction in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Cellular Immunology*, 268(2), 112-116.

Kopadze, T., Dehmel, T., Hartung, H. P., Stüve, O., & Kieseier, B. C. (2006). Inhibition by mitoxantrone of in vitro migration of immunocompetent cells: a possible mechanism for therapeutic efficacy in the treatment of multiple sclerosis. *Archives of neurology*, 63(11), 1572-1578.

Kroon, J., Buijs, J. T., Van Der Horst, G., Cheung, H., Van Der Mark, M., Van Bloois, L., & Van Der Pluijm, G. (2015). Liposomal delivery of dexamethasone attenuates prostate cancer bone metastatic tumor growth in vivo. *The Prostate*, 75(8), 815-824.

Liede, A., Karlan, B. Y., & Narod, S. A. (2004). Cancer risks for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of the literature. *Journal of Clinical Oncology*, 22(4), 735-742.

Leo, G.R. (2016). Cáncer de próstata. *American Cancer Society*, 9(5), 1–100.

Martínez-Cruz, J., Téllez-Valdés, O. (2004). Listado florístico de la sierra de Santa Rosa, Guanajuato, México. *Biology Society Botanic*, 74, 31-49.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*, 17(6), 271–278.

McCoy, K. (2016). Cáncer de próstata. *Cáncer*, 801, 261-3141.

McLeod DG. (2003). Hormonal therapy: historical perspective to future directions. *Urology*, 61: 3-7.

Organization Mundial de la Salud [OMS] (2017). Datos y cifras sobre el cáncer [Online]. <<http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>>. [10 de mayo del 2017]

Parnes H, House M, Kagan J, Kausal D, Lieberman R. (2004). "Prostate cancer chemoprevention agent development: The National Cancer Institute, Division of Cancer Prevention". *Jourlanly Urology*, 171:68-75.

Sazgarnia, A., Montazerabadi, A. R., Bahreyni-Toosi, M. H., Ahmadi, A., & Aledavood, A. (2013). In vitro survival of MCF-7 breast cancer cells following combined treatment with ionizing radiation and mitoxantrone-mediated photodynamic therapy. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 10(1), 72-78.

Scher, H. I., Heller, G., Molina, A., Attard, G., Danila, D. C., Jia, X., McCormack, R. (2015). Circulating tumor cell biomarker panel as an individual-level surrogate for survival in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Journal of clinical oncology*, 33(12), 1348-1355.

Shim, H., Park, J., Paik, H., Nah, S., Kim, D. S. H. L., Han, Y. S. (2007). Acacetin-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells involves caspase cascade, mitochondria-mediated death signaling and SAPK/JNK1/2-c-Jun activation. *Molecules and cells*, 24(1), 95.

Stephan C, Klaas M, Muller C, Schnorr D, Loening SA, Jung K. (2006) Interchangeability of measurements of total and free prostate-specific antigen in serum with 5 frequently used assay combinations: an update. *Clinical Chemistry*, 52(1):59-64.

Theil, G., Fischer, K., Weber, E., Medek, R., Hoda, R., Lücke, K., Fornara, P. (2016). The Use of a New CellCollector to Isolate Circulating Tumor Cells from the Blood of Patients with Different Stages of Prostate Cancer and Clinical Outcomes-A Proof-of-Concept Study. *PLoS One*, 11(8), e0158354.

McGraw-Hill Medical Trevor, A. J., Katzung, B. G., Masters, S. B., & Kruidering-Hall, M. (2010). Pharmacology examination & board review. McGraw-Hill Medical.

Yikrazull, (2010). Acacetin 7-O-rutinoside. Página web. Consultado febrero-2017. http://kanaya.naist.jp/knapsack_jsp/information.jsp?word=C00004156

Zapatero, A. (2004). Cáncer de próstata. *Oncología (Barcelona)*, 27(7), 55-58.