



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Efecto citotóxico del extracto acuoso de *Punica granatum*
en la línea celular de carcinoma de cuello uterino SiHa

Tesis que para obtener el título de:
LICENCIADO EN BIÓLOGIA

PRESENTA:
Alfredo Amaury Bautista Solano

DIRECTORA: Dra. Rocío Pérez y Terrón

CO Directora: Dra. Dolores López Morales

Asesora: Dra. Guadalupe Hernández Linares

Octubre 2019



Agradecimientos

A la Dra. Roció Pérez y Terrón por brindarme la oportunidad de trabajar con ella, darme su conocimiento y experiencia, le estaré siempre agradecido.

A la Dra. Dolores López Morales por aceptarme en su laboratorio y contribuir en esta tesis.

A la Dra. María Guadalupe Hernández Linares por permitirme estar en su laboratorio tenerme paciencia, ayudarme y brindarme su conocimiento.

Al M. en C. Gabriel Guerrero Luna por su tiempo, conocimiento y ayuda en mis experimentos.

A todos mis amigos de los laboratorios de Macromoléculas y Biología molecular, a los cuales aprecio y estimo mucho.

A todas las personas que me ayudaron a realizar esta tesis.

Dedicatoria

A mi madre María Guadalupe Solano Flores quien ha dado todo por mí y me ha enseñado el significado de amar, te amo madre.

A mi Abuela Martha Flores Hernández, que ha sido una guía en mi camino como persona, a la que amo y valoro infinitamente.

A Xitlali Sánchez Girón, agradezco que cada día este en mi vida.

Índice

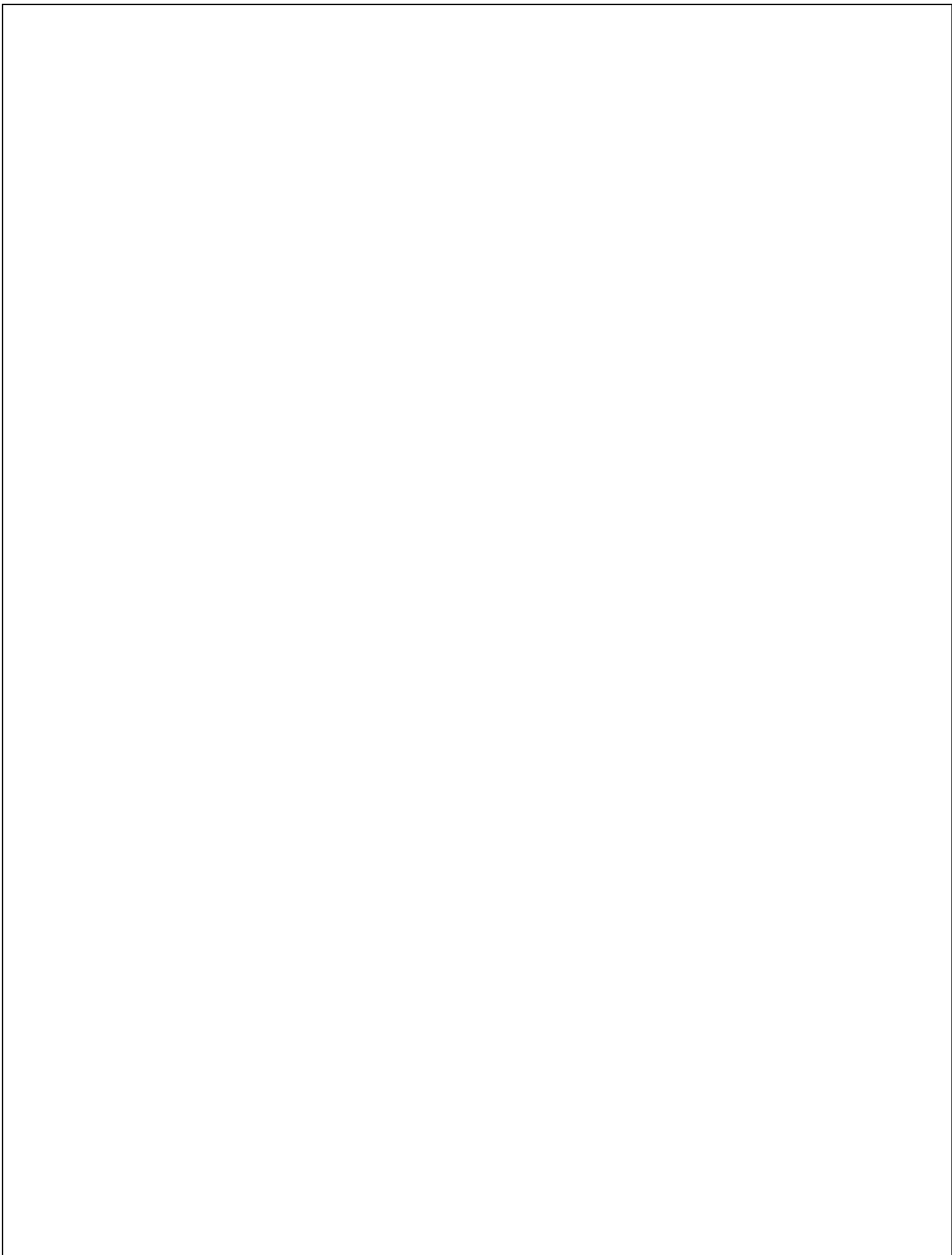
Tabla de contenido

Resumen.....	1
Introducción	2
Marco Teórico.....	6
Ciclo celular.....	6
Muerte celular	10
Cáncer.....	13
Cáncer cervicouterino	14
Tratamientos	18
Metabolismo secundario de plantas	20
Etnobotánica	22
Una fuente de polifenoles: la granada <i>Punica Granatum</i> , Puniceae	23
Polifenoles.....	26
Justificación	31
Hipótesis	32
Objetivos.....	33
Material y métodos	34
Elaboración de extractos hidroetanolicos.....	34
Pruebas fitoquímicas	35
Cultivo de línea celular SiHa.....	38

Ensayos para cuantificar la proliferación celular	40
Viabilidad celular	41
Tinción para viabilidad de núcleos.....	41
Análisis estadístico	43
Resultados	44
Análisis fitoquímico	44
Actividad antiproliferativa	45
Método para el estudio de actividad citotóxica in vitro	46
Determinación de condensación nuclear por tinción de Hoechst ..	47
Discusión	50
Conclusiones	59
Bibliografía	60

Índice de Figuras

Figura 1.- Ciclo celular.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2.- Vías de apoptosis.....	10
Figura 3.- Incidencia de cáncer cervicouterino	12
Figura 4.- Mortal de cáncer cervicouterino.....	13
Figura 5.- Genoma del VPH	15
Figura 6.- Biosíntesis de metabolitos secundarios ...	¡Error! Marcador no definido.
Figura 7.- Estructura molecular de polifenoles.....	19
Figura 8.- Subclases de polifenoles	24
Figura 9.- Estructura química de flavonoides.....	25
Figura 10.-Estructura química de ácidos fenólicos .	26
Figura 11.- Estructura química de estilbenoides.....	27
Figura 12.-Elaboracion de extractos hidroetanolicos.....	28
Figura 13.- Mantenimiento celular.....	32
Figura 14.- Elaboración de medio DMEM	36
Figura 15.- Ensayos moleculares.....	37
Figura 16.- Tinciones Hoechst y MTR.....	38
Figura 17.- Merge 100X DAPI y Texas red.....	40
Figura 18.- Merge 40X DAPI y Texas red	46
Figura 19.- Reacción de FeCl ₃	¡Error! Marcador no definido.7
Figura 20.- Reacción de Shinoda.....	¡Error! Marcador no definido.9
Figura 21.- Reacción del bergapteno.....	50
Figura 22.- Reacción de Borntragger.....	51
Figura 23.- Reducción del MTT.....	53



Resumen

A lo largo de la historia de la humanidad se han utilizado plantas como fuentes medicinales, utilizando las diferentes partes como hojas, raíces, semillas, frutos y flores se fueron encontrando diferentes principios bioactivos que podían tener un efecto en contra de una enfermedad.

El uso de plantas con principios bioactivos constituye, en la industria farmacológica, alternativas sostenibles de bajo costo para tratar múltiples enfermedades como el cáncer. Actualmente los diferentes tratamientos que se emplean para esta enfermedad son poco efectivos y altamente citotóxicos. La granada *Punica granatum* presenta una gran fuente de metabolitos secundarios que pueden tener un efecto anticancerígeno y que pueden funcionar como un posibles agentes quimioterapéuticos sin presentar efectos secundarios tóxicos.

En el presente trabajo se realizó el perfil fitoquímico de *P. granatum* y la evaluación de la actividad citotóxica, antiproliferativa y apoptótica del extracto acuoso en seis diferentes concentraciones, sobre la línea celular de carcinoma de cuello uterino SiHa, mediante los ensayos de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en dos diferentes tiempos 24 y 48 horas, cristal violeta en un tiempo de 48 horas y microscopia de fluorescencia utilizando las tinciones Hoechst y MTR. El análisis estadístico fue realizado mediante el programa GraphPad-Prism V 8.0 utilizando ANOVAS de medidas repetidas.

Los resultados del perfil fitoquímico muestran la presencia de: fenoles, flavonoides, quinonas y cumarinas. Los análisis estadísticos para los ensayos de citotoxicidad revelan que no hay diferencias significativas entre los ensayos de 24 horas ($P=0.89$) y 48 horas ($P=0.34$). La actividad anti proliferativa reveló que no existen diferencias significativas entre los 6 diferentes tratamientos y el tiempo de exposición al extracto de 48 horas ($P=0.85$). La tinción de Hoechst muestra daño en la estructura del núcleo y la tinción MTR muestra un cambio en la morfología de la red mitocondrial,

revelado por los fluorocromos DAPI y CMMRos. En los ensayos de citotoxicidad se puede concluir que no existe una relación de comportamiento dosis dependiente. Sin embargo, se puede mencionar que el factor tiempo de exposición al extracto puede ser fundamental en el efecto de éste. Ya que aparentemente existe un efecto anticancerígeno presente en este extracto, el cual es revelado por la microscopía de fluorescencia en donde se observa la fragmentación del núcleo y aparición de la disrupción de la membrana mitocondrial lo que podría indicar una muerte por vía apoptótica

Introducción

La humanidad desde hace miles de años ha tenido la necesidad de resolver los problemas que le aquejan, uno de los principales problemas a los que se enfrenta son las enfermedades, por lo que ha tenido que buscar métodos y alternativas para la generación de curas o alivios para enfrentar estos padecimientos. Unos de los principales recursos de estos paliativos han sido las plantas. Utilizando las diferentes partes del organismo vegetal como: hojas, raíces, cortezas, semillas, frutos y flores, se fueron encontrando diferentes principios bioactivos que podían tener un efecto en contra de un padecimiento en específico (Verde-Star *et al.*, 2016).

La medicina tradicional herbolaria surgió del conocimiento empírico, al establecerse una relación entre el principio activo de la planta y la taxonomía vegetal de esta, formando las primeras bases del conocimiento etnobotánico y herbolario de interés farmacológico, lo cual inició las primeras investigaciones para reconocer los principios activos presentes en las plantas más conocidas, esto dio origen a una rama de la ciencia llamada fitoquímica (Rivas *et al.*, 2016).

Una característica esencial que presentan las plantas y los hongos es la capacidad de producir sustancias que no les son esenciales para sobrevivir llamados metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios son compuestos los cuales se derivan del metabolismo primario, no obstante, son de limitada distribución en el reino de las plantas que se restringe a un grupo taxonómico particular, las plantas superiores (Anaya-Lang y Espinoza-García, 2006).

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular con diferente bio actividad, se producen en los organismos vegetales como una defensa química ante las heridas y ataques de microorganismos patógenos, durante la respuesta hipersensible, participando activamente matando al microorganismo patógeno o en algunos otros casos restringiendo la invasión al resto de la planta. (Sepúlveda *et al.*, 2004). Los análisis para la determinación de la presencia de estas sustancias en organismos vegetales son el objetivo de la fitoquímica (Sarker, Latif y Gray, 2005).

En los últimos años más del 25% de los medicamentos utilizados provienen de plantas y otro 25% son derivados de productos naturales que posteriormente son químicamente modificados (Amin., 2009). Existe un gran interés en la investigación y el uso de plantas como posibles tratamientos, ya que sólo se han realizado investigaciones de compuestos bioactivos solo en 5% al 15% de las 250,000 plantas de uso medicinal que se tienen registradas (Rivas Morales-*et al.*, 2016). Actualmente los medicamentos a base de compuestos naturales están presentes en el 25% de todas las recetas médicas (Pan *et al.*, 2013). En los últimos años, se ha ido incrementando la demanda de farmacéuticos que provengan de plantas, a partir de la obtención de sustancias bioactivas obtenidas y por los procesos de biosíntesis química, (Kinghorn *et al.*, 1998).

En la actualidad Estados Unidos de América cuenta con un registro de 175 medicamentos en contra del cáncer y de estos, el 75% son de origen natural (Newmann & Cragg., 2007).

Las plantas, como ya se ha mencionado son una opción para combatir padecimientos como infecciones microbianas, enfermedades neurodegenerativas y cáncer. En éste último se ha demostrado que tan sólo el consumo de organismos vegetales produce efectos en la proliferación celular, la angiogénesis y apoptosis de células cancerígenas (Ghali., 2014).

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, tan sólo en 2012 se le atribuyeron 8.2 millones de muertes. Un 70% de muertes se produjeron en África, Asia, América central y Sudamérica. Se pronostica que los casos anuales de cáncer aumentarán. Aproximadamente un 30% de las muertes que son causadas por el cáncer se deben a cinco factores de riesgo de índole alimentario y de comportamiento (índice de masa corporal elevado, falta de actividad física, consumo insuficiente de frutas y verduras, consumo de tabaco y alcohol) que pueden prevenirse (OMS., 2012).

Dentro de los distintos tipos de cáncer, el cervicouterino es uno de los más frecuentes en mujeres. En 2018 se han registrado 570,000 nuevos casos a nivel mundial. Datos anteriores reportan que en el año 2015 se presentaron 530, 232

casos nuevos, de los cuales el 86% pertenecen a países en vías de desarrollo. El cáncer cervicouterino es multicausal pues se debe a diferentes factores de riesgo, principalmente la infección por virus de papiloma humano (OMS, 2019).

En México y en otros países en vías de desarrollo, las tasas de mortalidad por cáncer cervicouterino han alcanzado poco más de 16.9 %. Datos de años anteriores indican que en México entre los años 1980-1995 murieron aproximadamente 62,000 mujeres por cáncer cervicouterino (Flores *et al.*, 2003).

Dadas las tendencias actuales, las industrias alimentaria y farmacéutica requieren fuentes de sustancias naturales para aplicarse en el desarrollo de productos en beneficio de la salud, ya que recientes trabajos revelan hallazgos los cuales indican que algunos frutos, dentro de ellos la granada (*Punica granatum*), son fuente de antioxidantes importantes (López *et al.*, 2010).

En este trabajo se utilizó el extracto acuoso vegetal de *Púnica granatum*, para inhibir la proliferación celular de la línea de cáncer cervicouterino SiHa, e inducir apoptosis a estas mismas, ya que este fruto es una fuente con propiedades antioxidantes, antimicrobianas y anticancerígenas (Khwairakpam., 2018).

Marco Teórico

Ciclo celular

El ciclo celular es la base principal para la reproducción de nuevas células, el cual se realiza de una forma coordinada y con una regulación estricta mediante la duplicación del contenido celular y su bipartición. El ciclo celular se puede definir como el conjunto de procesos que ocurren ordenadamente y que tienen como resultado la duplicación de una forma exacta la cantidad de DNA cromosómico para posteriormente distribuir las copias en células hijas, las cuales son genéticamente iguales. Dependiendo de cuál sea el tipo de célula, tendrá una significativa variación en el tiempo que este se desarrolle (Alberts *et al.*, 2011).

El ciclo celular típico consta de dos grandes fases, las cuales son: interfase que se divide en tres fases: G1, S y G2 y la mitosis que se divide en profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis (Figura 1). En la fase G1 es la primera fase del ciclo celular en donde existe un crecimiento celular con la síntesis de proteínas y ARN, esta fase dura de 6 a 12 horas, durante este tiempo la célula duplica su tamaño y masa, resultado de la continua síntesis de todos los componentes debido a la expresión de genes que codifican a las proteínas responsables de su fenotipo, esta fase es uno de los puntos importantes de revisión en el ciclo celular ya que si la célula presenta un DNA con daños, estas son arrestadas para evitar que se sintetice con el DNA dañado (Suarez *et al.*, 2007). Posterior a esto viene la fase S donde ocurre la replicación o síntesis del ADN nuclear, en donde se forman las cromátidas hermanas, esta fase transcurre de 10 a 12 horas ya que ocurre la duplicación del ADN, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y ADN que contiene al principio (Klermund y Luke., 2014). La fase G2 es la segunda fase de crecimiento del ciclo celular en donde continua la síntesis de proteínas y ARN, cuando esta etapa culmina ocurren cambios en la estructura celular, esta etapa tiene una duración de 3 a 4 horas y finaliza cuando la cromatina empieza a condensarse, para iniciar la etapa de mitosis (Campbell *et al.*, 2010). La Fase de mitosis ocurre la división celular, en la que la célula progenitora se divide en dos células idénticas, esta fase se subdivide en profase, metafase, anafase, telofase y

citocinesis, en esta etapa la cromatina se condensa para poder formar cromosomas, la membrana nuclear se rompe, el citoesqueleto se organiza para formar el huso mitótico y los cromosomas se mueven a los polos opuestos. La segregación cromosómica es seguida usualmente por la citocinesis. El final de la mitosis da cabida a un nuevo ciclo en G1 o a la entrada en la etapa G0, que corresponde a un estado de reposo el cual puede ser por días, meses o años que presentan ciertas células (Cooper, 1999).

Para que el ciclo celular se active es necesaria la presencia de estímulos, que da lugar a la transducción de señales, de forma que la célula es capaz de interpretar estímulos a través de sus receptores para poder activar la maquinaria de este ciclo, esto es mediado por complejos proteicos. El recorrido por estas cuatro fases del ciclo celular se encuentra dirigido por una red de interacciones de proteínas altamente compleja que se encuentra estrictamente regulada. Dentro de estas resaltan las cinasas dependientes de ciclinas (cdk), fosfatasa y proteínas inhibidoras (Quezada, 2007).

Este ciclo presenta una red compleja controlada por un sistema de señalización que determina las opciones disponibles de una célula como: apoptosis, diferenciación y proliferación celular. Dentro de este ciclo existen una serie de inhibidores CDK (familias Cip, Kip y p16) y otras moléculas que regulan o llevan a cabo procesos de complejo ligando receptor de los factores de crecimiento, como proteínas de la familia Rb, p107, p130, E2F, fosfatasa reguladora, componentes del centrosoma, huso y proteínas de separación de los cromosomas, Todos estos componentes se unen para controlar la progresión ordenada y regulada de eventos que constituyen el ciclo celular (Lagunas-cruz *Et al.*, 2014).

Una proteína importante para el correcto funcionamiento del ciclo celular es el supresor tumoral P53, el cual es un factor de transcripción que regula el metabolismo, señales de estrés, supervivencia celular, control del ciclo celular, estabilidad del genoma y vigilancia, que comprueba constantemente el rendimiento de todos los procesos del ciclo celular y particularmente los relacionados con la síntesis de ADN. Cuando una célula sufre un daño no grave, la detención del ciclo

celular es inducida por P53, que se produce mientras que se repara el daño, sin embargo cuando el daño es grave, la célula es dirigida hacia la senescencia o apoptosis que es inducida por P53, que interacciona directamente con la endonucleasa AP y la ADN polimerasa que se implican en la reparación por escisión. Esta proteína también induce ciertas proteínas como GADD45 que colabora para la reparación de ADN, cuando el daño se repara correctamente, P53 estimula la síntesis de Mdm2, activando su autodestrucción (Lagunas-cruz *Et al.*, 2014). La proteína retinoblastoma (pRB) localizado en el cromosoma 9p21 es diana molecular crítica en la progresión maligna, esta proteína cuando se encuentra en su estado hiperfosforilado se une al factor de transcripción E2F el cual se fosforila, lo cual lleva a la transcripción de genes críticos para la progresión de células de la fase G1 a la fase S del ciclo celular.

Los procesos que ocurren en el ciclo celular deben de ser regulados tales como la replicación del ADN, mitosis y citocinesis, los cuales se ponen en marcha mediante un sistema de control central del ciclo celular. Este es un dispositivo bioquímico el cual actúa cíclicamente, compuestos por un conjunto de proteínas de interactivas y dependientes entre sí, estas proteínas inducen y coordinan procesos subordinados básicos los cuales duplican y dividen el contenido de la célula (McCarthy., 2001).

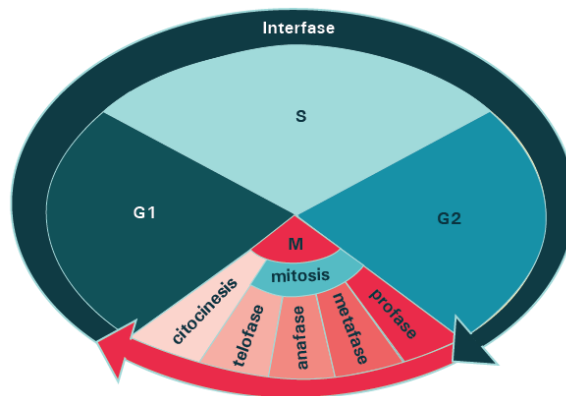


Figura 1.- Esquema Básico de las diferentes fases del ciclo celular.

La proliferación celular no controlada es la característica esencial de los tumores. El crecimiento que presentan las células sin un mecanismo de regulación es excesivo, esto se debe a que las células presentan un código genético alterado que las capacita y les permite evadir los puntos de control, los cuales son fundamentales para el mantenimiento de la estabilidad genética, ya que su activación es precisamente la alteración del ADN. Las modificaciones estructurales que impidan el funcionamiento de los puntos de control tienen como resultado la progresión de ciclos celulares alterados y por lo tanto la carcinogénesis (Rodríguez *et al.*, 2004).

La correlación entre el ciclo celular, la senescencia, la regulación de la apoptosis, el desarrollo de cáncer y las respuestas tumorales para el tratamiento del cáncer se ha convertido en un punto importante en la investigación acerca de los genes supresores de tumores, oncogenes, ciclo celular y genes reguladores de la apoptosis, los cuales son sumamente importantes para la detección de daños en el ADN que están ligadas a la proliferación, la detección del ciclo celular senescencia y apoptosis celular. Se han desarrollado diferentes agentes los cuales pueden causar detención de células cancerosas a través de varios mecanismos que involucran al ciclo celular, como: regulación de complejos CDK1 y las ciclinas A/B, inactivación de la actividad Cdc25C, interrupción de la polimerización de tubulina y el montaje del huso (Fumagalli *et al.* 2014).

Muerte celular

Las células de un organismo pluricelular son una comunidad organizada y regulada. El número de células que componen a un organismo está regulado por la división y muerte celular. La muerte celular en organismos multicelulares es un hecho normal y no produce alteración de las funciones, el número de células en los diferentes tejidos está determinado por un balance homeostático entre la proliferación de células nuevas y la muerte de células agotadas o seniles, generando un ritmo de relación entre la proliferación y muerte que varía de un tejido a otro (Adolfo., 2002). Existen dos tipos de muerte celular fundamentales, la apoptosis y la necrosis. Estos dos tipos de muerte celular presentan morfología y características distintas, lo que permite su identificación (Narvas-contino *et al.*, 2009).

La necrosis se caracteriza por presentar oncosis que es la ganancia de volumen celular, ruptura de la membrana plasmática y salida del material intracelular (Golstein., 2007). La necrosis ocurre de manera aguda por una forma no fisiológica la cual causa una lesión en una porción significativa del tejido, por ejemplo en el centro de un tejido infartado, en una zona de lesión por toxinas, en un área de isquemia. El proceso que se desarrolla en la necrosis es desencadenado por toxinas, hipoxia severa, agresión masiva, que tienen como resultado la caída de ATP, lo cual crea cambios en la organización de la célula, lisis del citoplasma, dilatación del retículo endoplasmático y mitocondrias, disolución de la cromatina y pérdida de la continuidad de la membrana citoplasmática. Finalmente el ADN es partido en fragmentos irregulares, esto producido por la pérdida de integridad de la membrana celular, el contenido celular es expuesto al espacio extracelular, atrayendo células inmunes para generar el proceso de inflamación (Elena. 2002). Morfológicamente se puede definir como el espectro de cambio post mortem de un tejido por una acción progresiva de enzimas autolítica o heterolítica (Vanlangenakker *et al.*, 2008).

Las células que ya no son necesarias o aptas para el organismo son eliminadas mediante un proceso llamado muerte celular programada (Martínez-Mata, 2013). Esta muerte celular presenta cambios nucleares los cuales se deben a la fragmentación inespecífica del ADN (Ramírez y Rojas., 2007). La apoptosis se puede dar en contextos generales como: durante el desarrollo cuando actúa como mecanismo homeostático, como mecanismo de defensa en las reacciones inmunitarias, cuando hay lesiones por enfermedad o agentes lesivos y en el envejecimiento (Itoh., 1995). La apoptosis es la muerte celular encargada de eliminar células que tengan un DNA dañado, tejidos infectados, regulación de células del sistema inmunitario para evitar autoataque, es parte del desarrollo de los tejidos, mantiene la homeostasis y regula la cantidad de células que componen un órgano o tejido, El proceso de apoptosis inicia por condiciones fisiológicas o patológicas que se generan evitando la pérdida de ATP, debido que este proceso requiere energía para que se realice. En la apoptosis se produce la activación de enzimas nucleasas las cuales fragmentan el ADN, estas enzimas se activan selectivamente y estrictamente en sitios inter-nucleosomales (Diez, 2010., Itoh, 1995). Existen dos vías principales de apoptosis que pueden llevar a la apoptosis inducción positiva o vía externa por un ligando unido a los receptores específicos de la membrana plasmática, y la inducción negativa o vía interna que ocurre por pérdida de la actividad supresora de mecanismos celulares, esta vía se puede, desencadenar a través de fármacos quimioterapéuticos y factores de crecimiento retirados; estos estímulos producen la permeabilización de la membrana mitocondrial, por lo que se libera el citocromo C regulado por la familia Bcl-2 que se unirá a la proteína Apaf-1 de dominios WD40 y presentará de igual manera dominios CARD, lo que le permitirá reclutar a la procaspasa-9 en presencia de dATP que la activará y será capaz de activar a caspasas efectoras. La vía apoptótica extrínseca, funciona mediante una cascada de señalización de caspasas, estas señales provienen de los receptores DR que dan como resultado la formación del complejo de señalización, mismo que induce la muerte celular (Larvik., 2013). Cuando en una célula ocurre apoptosis, las caspasas tienen dos grupos de proteínas como sustrato de actividad: proteínas reguladoras y proteínas

estructurales. El clivaje de proteínas reguladoras realiza un refuerzo a la actividad apoptótica, mientras que la ruptura de las proteínas estructurales da como resultado la desintegración celular. La viabilidad de muchas células es dependiente del constante o intermitente abastecimiento de citocinas o factores de crecimiento. Tanto la inducción de la apoptosis como la progresión de esta, puede ser inhibida por un grupo de proteínas, llamadas proteínas inhibidoras de la apoptosis, estas tienen una característica de poseer en su estructura un dominio con capacidad de unirse a caspasas, bloqueando la activación de proteasas inducidas por citocromo C y previniendo de esta manera la cascada de caspasas (Adolfo., 2002).

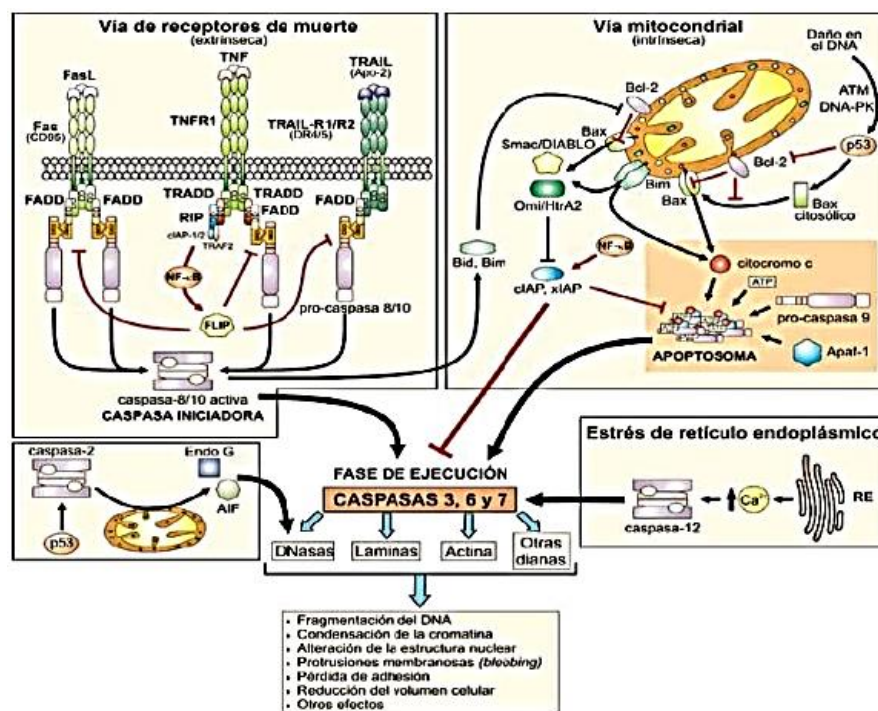


Figura 2. – Vías de señalización que conducen a la muerte por apoptosis (Iracheta, 2007). En la vía extrínseca ocurre por un ligando unido a receptores específicos de la membrana plasmática, la consigna de apoptosis la provee el ligando FasL, que se une al receptor de muerte Fas iniciando la señal intracelular, que se transmite por FADD a la caspasa 8, dando inicio a la activación de apoptosis. La vía intrínseca ocurre por pérdida de la actividad supresora de mecanismos intracelulares, la proteína Apaf-1 se une a la proteína mitocondrial citocromo c adquiriendo capacidad para activar las proteínas caspasas semejantes a ced-3

Cáncer

El cáncer es una enfermedad cuya existencia que se reconoce a lo largo de la historia de la humanidad, plasmado en códices y figuras prehistóricas que muestran la relación que tiene con el *homo sapiens* (Garza & Juárez., 2014). Esta enfermedad se caracteriza biológicamente por la autosuficiencia de factores de crecimiento, potencial de replicación ilimitado, insensibilidad a las señales de apoptosis, invasión de tejidos y metástasis. Cuando una célula pasa por estos cambios fisiológicos, adquiere nuevas capacidades que propician su desarrollo (Hanhan y Weinber., 2000). El cáncer se puede definir como una enfermedad provocada por un grupo de células que se multiplican sin control y de manera autónoma, invadiendo localmente y a distancia otros tejidos. El proceso por el cual se produce el cáncer es conocido como carcinogénesis que es causado por anomalías en el material genético de las células, estas anomalías surgen por diferentes agentes carcinogénicos como: Irradiaciones (ionizantes o ultravioletas), productos químicos

El cuerpo en condiciones normales tiene un equilibrio entre la proliferación celular y los mecanismos de apoptosis, sin embargo, existen mutaciones las cuales dan como resultado la activación de oncogenes, cuya función es codificar proteínas del ciclo celular que propician la proliferación celular, o la inactivación de genes supresores de tumores (genes que codifican proteínas para frenar o detener el ciclo celular), estas mutaciones afectan el equilibrio en la replicación celular y tiene como consecuencia la inmortalización de la célula (Burgues *et al.*, 2005). Otras anomalías genéticas que se han encontrado en células malignas incluyen: mutaciones, translocaciones, amplificaciones, deleciones y ganancia o pérdida de un cromosoma por completo. Estos genes que codifican los receptores de factores de crecimiento que mutan, y tienen como resultado que los receptores producidos estén permanentemente activados o que codifiquen a factores de crecimiento en exceso y sin un control regulatorio (Garza & Juárez., 2014).

Cáncer cervicouterino

A nivel mundial el cáncer cervicouterino (CaCu) ocupa el cuarto lugar de cáncer más frecuente en mujeres (Figura 3). En 2012 se reportaron 528,000 nuevos casos de esta enfermedad. Según la organización Mundial de la salud (OMS) en África y el sureste de Asia tienen los índices más altos de mortalidad (Figura 4). El cáncer cervicouterino es la neoplasia más frecuente en el tracto genital femenino en los países del tercer mundo. En países de primer mundo como Australia y Nueva Zelanda en donde tiene una detección y tratamientos tempranos, han tenido resultados positivos prolongados (Garza-Salazar., 2017).

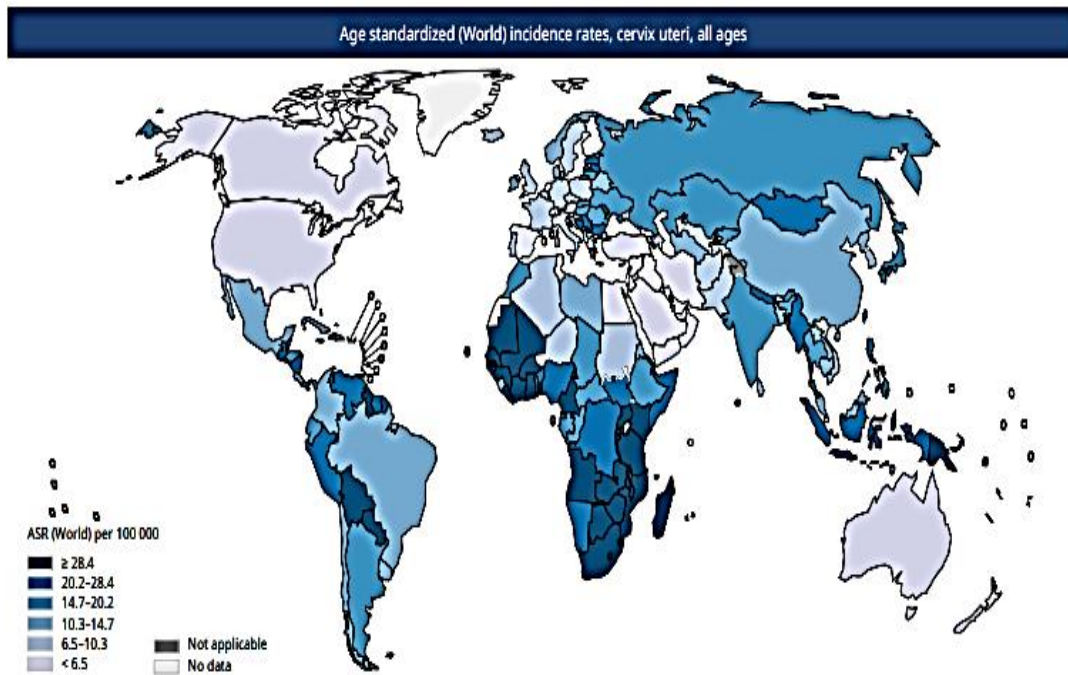


Figura 3.-Incidencia a nivel mundial del cáncer cervicouterino en 2012 (GIOBOCAN, 2018).

La mayoría de los casos de CaCu, aproximadamente el 85% de estos, se producen en regiones menos desarrolladas y representan el 12% de todos los casos registrados de cáncer en mujeres. Este tipo de cáncer afecta principalmente a mujeres de edad temprana durante su edad reproductiva con un bajo estatus socioeconómico (Almonte *et al.*, 2010).

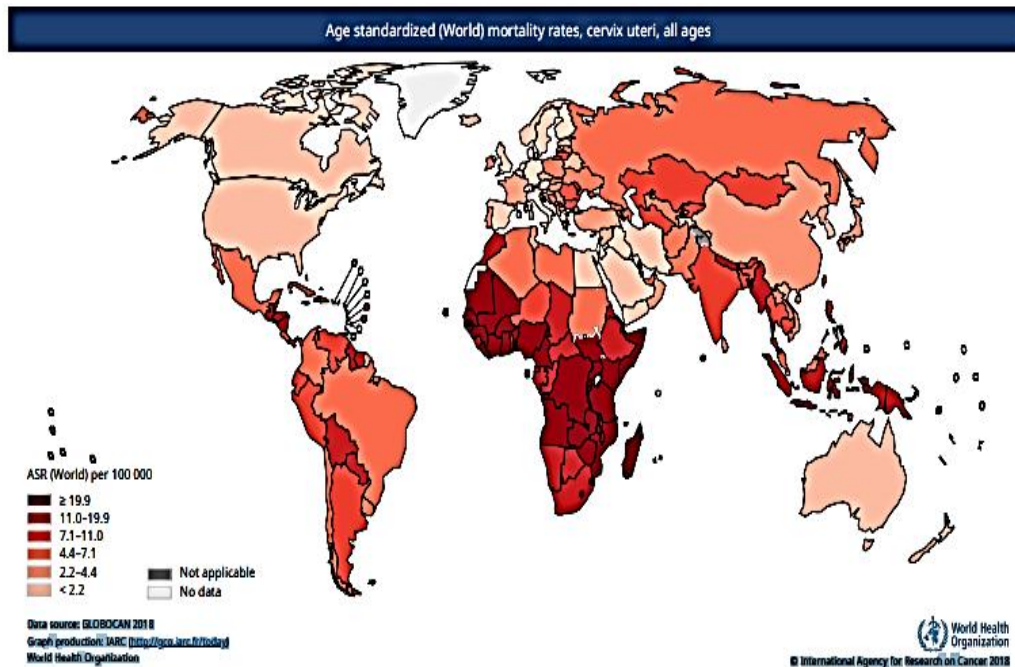


Figura 4.- Mortalidad a nivel mundial del cáncer cervicouterino en 2012 (GLOBOCAN, 2018).

Los datos que se tienen registrados de esta enfermedad para México demuestran que tanto la incidencia y mortalidad de esta neoplasia están correlacionadas con una transición demográfica, ya que existe una relación entre la edad de la población y la aparición de nuevos casos. Está considerado como un problema público ya que es la segunda causa más frecuente de tumores malignos en mujeres menores a 25 años. Este constituye el 9% de todos los casos de cáncer y el 8 % como el causante de muertes en mujeres en el año 2008 (Torres-Poveda et al., 2014).

El cáncer cervicouterino se puede definir como una alteración celular que tiene origen en el epitelio del cuello del útero (Camargo *et al.*, 2004), e inicialmente se puede manifestar por lesiones de lenta y progresiva evolución, este puede suceder en etapas de displasia leve, moderada y severa, que puede evolucionar a cáncer *in situ* (circunscrito a la superficie epitelial) (López y Lizano., 2006).

La clasificación vigente del VPH se basa en la caracterización del genoma; se considera que se trata de un nuevo tipo si la región L1 presenta una homología menos al 90% con otros tipos conocidos de VPH. Se considera un subtipo cuando su homología se sitúa en el rango de 90-98%, cuando la variante es mayor a 98% se considera que es una variante (Concha., 2007).

Uno de los principales factores de riesgo para contraer cáncer cervicouterino según revelan los estudios es el virus de papiloma humano (VPH) y algunos autores lo consideran como un factor necesario para el desarrollo de CaCu (Bosch *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2003). Este virus se transmite vía sexual afectando a 8 de cada 10 personas en un punto de su vida. Solamente una de cada 10 mujeres que presente este virus desarrollará cáncer cervicouterino (Secretaria de Salud., 2018).

En los últimos años se tiene un registro de que existen más de 120 tipos de VPH, al menos 25 afectan el tracto genital femenino. Su agrupación dependerá de su asociación con lesiones pre invasivas y cáncer, dicha agrupación consta de alto riesgo (serotipos 16, 18, 45, 56), riesgo moderado (tipos 31, 33, 35, 51, 52) y de bajo riesgo (serotipos 6,11, 40, 42, 43, 44). Es importante recalcar que el tipo 16 es el responsable del 50% de los cánceres cervicales, los serotipos de bajo riesgo están asociados con verrugas en el área de los genitales, mientras que los de alto riesgo están asociados a lesiones intraepiteliales y cáncer cervicouterino (Grillo *et al.*, 2008).El VPH es un virus perteneciente a la familia papilomaviridae, los miembros de esta familia tienen gran afinidad por tejidos mucosos y epitelios en los cuales pueden provocar una fuerte proliferación en el área infectada, de los 120 serotipos de VPH al menos 40 afectan a los genitales (Bernard *et al.*, 2010). La partícula del virus del papiloma humano porta una cápside que contiene 72 capsómeros los cuales están hechos de dos proteínas estructurales L1 y L2 (60 hexámeros y 12 pentámeros), con un diámetro de 55 nm el cual contiene el genoma viral. Este genoma consiste en una molécula de ADN circular de doble cadena que se divide en 3 regiones correspondiente a las proteínas tempranas (E1-E8), Proteínas tardías (L1-L2) (Figura 5). Este virus es medianamente estable pues no tiene envoltura (López y Lizano., 2006).

Es importante señalar cómo el ciclo celular se ve correlacionado con algunos factores de riesgo para desarrollar el CaCu. La introducción de los viriones en la célula es iniciada por la interacción de la proteína L1 con heparan-sulfato y sindecano 3 en la superficie celular. El desnudamiento del virión y la salida del genoma viral ocurren en el endosoma, para posteriormente migren la proteína L2 y el genoma al núcleo. Una vez dentro del núcleo, el genoma es transcrito en una serie de procesos los cuales dependen de múltiples promotores y patrones de modificaciones del ARNm. El ciclo replicativo de los papilomavirus se divide comúnmente en dos etapas, la temprana y la tardía, estas células estarán ligadas al estado de diferenciación de la célula por lo que en esta infección es necesario tener células con actividad mitótica, como las células de la capa basal de las células epiteliales, en donde el virus expresa proteínas E1 y E2 las cuales son de las primeras proteínas en expresarse, esto genera un control en el número de copias del genoma viral episomal generando de 20 a 100 copias por célula, ambas proteínas formaran un complejo para reclutar la maquinaria de polimerización celular teniendo como objetivo incrementar el número de células susceptibles para ser infectadas y por lo tanto tener una mayor producción viral. En las zonas donde se localizan las células más diferenciadas se expresan los genes E1, E2, E6 y E7, además de comenzar una sobreexpresión del gen E4 el cual tiene la función de amplificar la replicación del genoma viral, mientras que se activa la transcripción de genes tardíos como L1 y L2 involucrados en el ensamble salida de viriones.

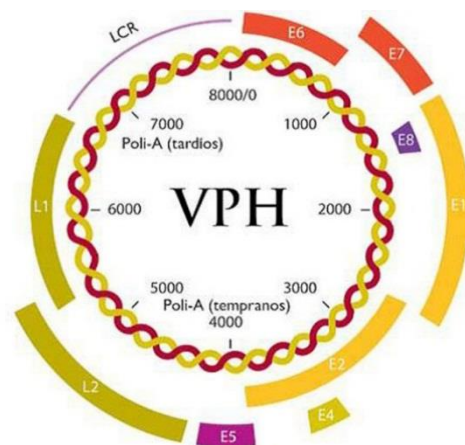


Figura 5.- Estructura circular del genoma del VPH, en donde se muestra la división de sus 3 regiones: LCR, E y L (Lopez y Lizano., 2006).

Tratamientos

Las opciones de tratamiento consisten en 3 tipos: cirugía, radioterapia, y quimioterapia, particularmente el tratamiento debe de ser seleccionado dependiendo de los factores beneficiosos que pueda tener el paciente, además de la etapa en la que se encuentre la enfermedad. Normalmente en los estadios tempranos de la enfermedad se usa cirugía o radioterapia. En los estadios más avanzados de la enfermedad se utiliza radioterapia combinada con quimioterapia (American Cancer Society., 2016).

La cirugía es la técnica más antigua para tratar esta enfermedad, la cual consiste en la extirpación del tumor. Esta puede ser: conservadora o mayor. La cirugía conservadora se utiliza en casos de lesiones premalignas de cuello uterino empleando criocirugías, la cual funciona colocando un metal con una temperatura extremadamente baja en la zona del cérvix, tiene como objetivo matar a las células anormales congelándolas.

La cirugía con rayo láser funciona dirigiendo un láser directamente a la zona que se desea tratar y remover una fracción de tejido para sus posteriores estudios. Y conización, técnica que consiste en la extracción de tejido en forma de cono utilizando un cuchillo quirúrgico (American Cancer Society., 2016). La cirugía mayor se utiliza cuando hay lesiones precancerosas, pero no hay interés de fertilidad, se recurre a la histerectomía la cual consiste en la extracción del útero y algunas veces tejidos vecinos de este (Cameron., 1995).

La terapia con radiación utiliza radiaciones ionizantes o partículas radioactivas que puedan matar a las células cancerígenas, este tratamiento se utiliza en casos en donde no se pueda operar y en estadios avanzados de la enfermedad. Esta terapia consiste en una teleterapia (radioterapia externa) la cual se complementa con braquiterapia (radioterapia interna) (Martinez-Mata, 2013). El mecanismo de acción de esta terapia se basa en el daño al ADN por radicales libres (Cameron., 1995).

En los diferentes estudios para el tratamiento del cáncer mediante radiación se ha observado que esta impide la proliferación de las células cancerígenas debido a la

inducción de daño en el ADN, lo cual puede activar los puntos de control del ciclo celular, las células cancerosas son normalmente afectadas en el punto de control G1 debido a las mutaciones o alteraciones con reguladores claves en este punto de control (Yan *et al.*, 2014).

La quimioterapia utiliza medicamentos anticancerígenos los cuales son inyectados vía intravenosa o de manera oral. Estos medicamentos entran en la corriente sanguínea y pueden llegar a todas las partes del organismo, el tratamiento de quimioterapia se da en ciclos con periodos de recuperación.

Existen algunas situaciones en donde la quimioterapia puede ser recomendada en los casos de cáncer cervicouterino. Este tratamiento se complementa con el de radioterapia y comúnmente se llama quimio radioterapia. En donde las sustancias químicas ayudan a la radiación tener un mejor efecto. (American cancer society., 2014).

Dentro de los agentes quimioterapéuticos encontramos diferentes tipos, éstos pueden agruparse de acuerdo a la forma en que funcionan, estructura química y las interacciones que estos puedan tener con otros medicamentos. Saber cómo funciona un medicamento es fundamental ya que se pueden predecir sus efectos secundarios, entre estos se encuentran los agentes alquilantes, antimetabolitos, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de la mitosis y corticoesteroides. Cada uno de estos metabolitos actuara de manera distinta en cada una de las etapas del ciclo celular (ACS., 2016). Agentes como la dioscoreanona se probó en líneas A549, en donde se indujo detención del ciclo celular en la fase G2/M, teniendo un porcentaje de apoptosis mediada por las proteínas Bax y Bcl-2 por medio de la permeabilización de la membrana mitocondrial, que conduce a la activación de la caspasa 3 (Hansakull *et al.*, 2014)

En la quimioterapia generalmente se utilizan antimetabolitos los cuales son inhibidores de la síntesis de deoxinucleotidos y los inhibidores de la topoisomerasa de ADN, agentes que interfieren con los microtúbulos, alquilantes (Miyashita y Reed, 1993). Este tratamiento ayuda a tratar diversos tipos de cáncer, y generalmente es usado cuando un cáncer que ya se ha eliminado regresa, entre las

drogas más utilizadas para tratar estadios avanzados del cáncer cervicouterino se encuentran: cisplatino, carboplatino, paclitaxel, topotecán y gemcitabina (American cancer society., 2014).

Metabolismo secundario de plantas

El metabolismo se puede definir como el conjunto de reacciones químicas, que tienen lugar en un organismo. Estas reacciones son esenciales para el funcionamiento de los organismos ya que le permiten sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples. Existen diferentes tipos de metabolitos, los primarios como aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos los cuales están presentes en todas las plantas, y los secundarios (Avalos y Pérez., 2009).

Los metabolitos secundarios específicamente los que producen en las plantas están restringidos a ciertos grupos del reino vegetal y son sintetizados generalmente en pequeñas cantidades, las plantas que los sintetizan destinan una gran cantidad del carbono que asimilan y de energía, para realizar síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas (Figura 6), las cuales no tienen una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos, o síntesis de proteínas carbohidratos y lípidos (Avalos y Pérez., 2009). Los metabolitos secundarios también denominados productos secundarios tienen una estructura similar en muchas ocasiones, esto puede ser explicado ya que las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario.

Algunos productos del metabolismo secundario tienen como función interacciones ecológicas específicas, que funcionan como atrayentes o repelentes de animales, otros tienen como función la pigmentación de estructuras, interviniendo en la reproducción atrayendo insectos polinizadores, o animales que utilizarán los frutos como fuente de alimento contribuyendo a la dispersión de semillas. Otras funciones de estos compuestos son la función protectora frente a depredadores, que actúan

como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, convirtiéndolas en indigestas o venenosas, además de actuar contra diferentes patógenos actuando como pesticidas naturales (Ávalos y Pérez., 2009).

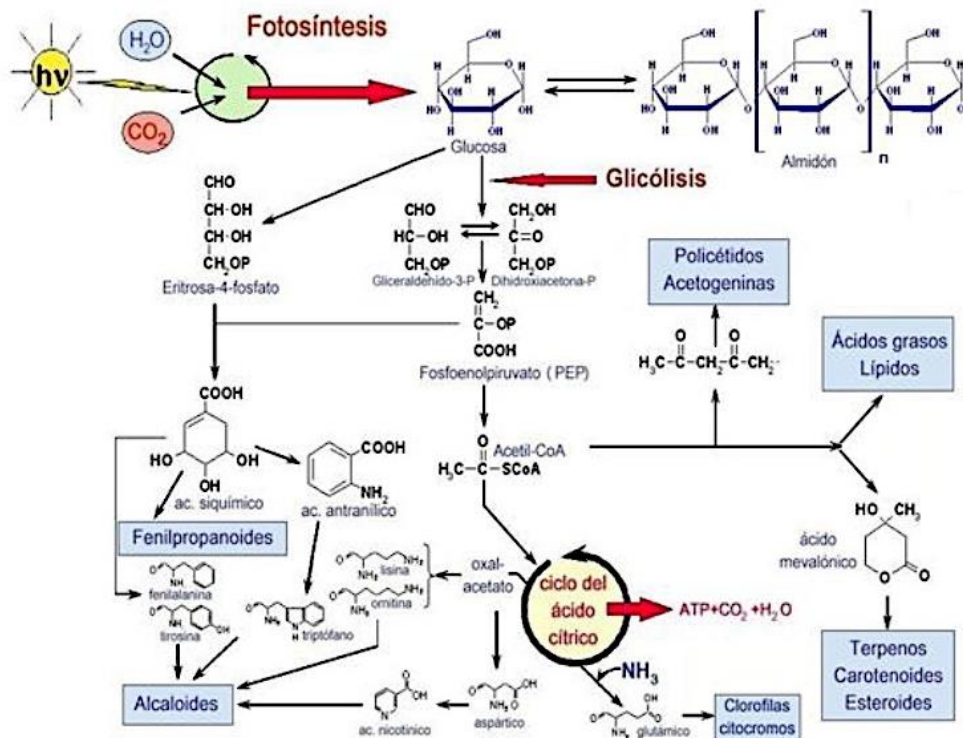


Figura 6.-Biosíntesis de algunos metabolitos secundarios dentro del metabolismo primario los, aminoácidos aromáticos se pueden dirigir tanto al metabolismo primario como al metabolismo secundario. Las plantas tienen la capacidad de sintetizar una gran variedad de compuestos que contienen un grupo fenol, estos compuestos reciben el nombre de compuestos fenólicos, que tienen como base un anillo aromático con un grupo hidroxilo. (Ávalos y Pérez., 2009).

La gran ventaja de compuestos derivados de metabolitos secundarios es su posible uso en la medicina moderna ya que se utilizan como agentes terapéuticos, materia prima para la elaboración de medicamentos, modelos para elaboración de drogas

sintéticas y marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (Rivas *et al.*, 2016).

Las plantas presentan una gran fuente de metabolitos secundarios los cuales son utilizados en diferentes industrias como farmacéutica, alimenticia y de cosméticos. Cada año se describen diferentes plantas superiores con un potencial bioactivo (Sajc *et al.*, 2000).

Etnobotánica

El uso de plantas medicinales ha existido a lo largo de la historia, de la humanidad. Los primeros registros de esta práctica datan en el periodo prehistórico, donde se encontraron restos de plantas de 8 especies posiblemente utilizadas para un uso médico. Particularmente en América se han encontrado indicios de esta práctica en los países de México y Perú (Schultes., 1981).

Desde hace aproximadamente 3,500 años se sabe que las plantas han sido útiles para tratamientos de enfermedades malignas según los trabajos de Jonathan Hartwell (Fabricant & Farnsworth., 2001; Hartwell., 1982).

La investigación y uso de plantas con principios bioactivos sigue siendo una parte muy importante en las investigaciones farmacológicas humana y animal, teniendo un desarrollo sostenible que proporcionan a su vez alternativas de bajo costo para tratar múltiples enfermedades (Weckesser, *et al.*, 2007).

El desarrollo de medicamentos a base de plantas se basa en dos estrategias fundamentales: la selección a través de compuestos con actividad biológica y los conocimientos médicos tradicionales, este último enfoque se basa en la herbolaria y el folckor, demostrando de manera empírica tener un efecto positivo para erradicar diferentes malestares (Pietter&Vlietink., 2006).

En México según Alonso Castro y sus colaboradores en 2011, se tienen registradas 300 especies de plantas pertenecientes a 90 familias botánicas utilizadas para tratamientos contra cáncer, en su trabajo concluye que tan sólo 88 extractos presentaron actividad citotóxica *in vitro* sobre líneas celulares.

Una fuente de polifenoles: la granada *Punica Granatum*, Puniceae

Origen y distribución

El origen del árbol de granada se presenta en el medio oriente precisamente en los Himalayas al norte de la India. Pertenece a la familia Punicaceae, su nombre en persa es "Anar" (Sheets *et al.*, 2009; Mohseni., 2009) y el término para su género *Punica* fue el nombre romano para Cartagena, lugar donde llegaban las mejores granadas a Italia (Morton., 1987).

Este árbol se ha cultivado y naturalizado desde hace siglos en las regiones mediterráneas de Asia, África y al norte de Europa. La introducción de este organismo en América se remonta al año de 1796, por los misioneros españoles durante la conquista, este logró adaptarse en regiones áridas y cálidas de Latinoamérica y California, desde entonces ha sido extensamente cultivado. Los productores más importantes de granada son: Egipto, China, Afganistán, Turquía, Siria, Pakistán, Bangladesh, Irán, Iraq, India, Myanmar e Arabia Saudita (Lim., 2013).

En México antes de 1990 se reporta que la principal zona productora de este fruto se localizaba en Tehuacán Puebla (Morton., 1987). Sin embargo, por obras de urbanización el gobierno de Puebla reporta que la producción ha disminuido drásticamente (Jiménez., 2007) No obstante el INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias), tiene un interés en este organismo vegetal por los recientes hallazgos científicos referentes a sus propiedades y su potencial uso en diversas industrias. Anteriormente el gobierno de Puebla lanzo iniciativas por recuperar el cultivo de granada, sin embargo, sólo los estados de Hidalgo y Guanajuato son los que tienen una producción comercial (Mondragón., 2010).

Botánica

La granada o el granado como comúnmente se denomina, es un árbol de follaje abundante, posee un tronco que puede alcanzar una altura de 1.5-6M, presenta ramas torcidas y un poco espinosas de un color gris oscuro. Sus otras estructuras como las hojas presentan un color verde con una superficie plana ligeramente ondulada, de dimensión alargada y forma elíptica. La estructura floral es acampanada conformada de 5-8 pétalos de color naranja brillante (Morton., 1987). Estas estructuras son bisexuales y presentan un tamaño de 4 cm de ancho y pueden estar de forma individual o agrupada en el vértice. El cáliz es campanulado con una coloración roja o púrpura, lóbulos persistentes, estambres numerosos multiseriados y estigma simple. El fruto se puede presentar globoso o subgloboso de 6-8cm de diámetro, la cáscara o corteza presenta colores como el: rojo, morado y marrón esta tiene la característica de ser gruesa y coriácea, por el interior del fruto se encuentra unas delicadas divisiones de sepia amarilla con compartimientos rellenos con sacos transparentes llamados arilos, en su interior contienen un jugo de color rosado y una semilla de formas angulares de color blanco con una dimensión que van desde los 10-13 mm de largo (Lim., 2013).

Agroecología

Este organismo crece en climas templados y subtropicales, no obstante, se puede adaptar a regiones de climas mediterráneos. Crece en áreas con una media anual de temperatura que va de los 20-24°C, esta temperatura es ideal para el crecimiento del organismo, si la temperatura desciende a -11°C el organismo podría sufrir daños irreparables. El granado prospera con una precipitación anual media de 500-100 mm y altitudes de 2000 msnm lo que permite al mismo tiempo hacerlo tolerante en épocas de sequía (Lim., 2013).

Uso

El fruto de la granada ha tenido múltiples usos a lo largo de la historia de la humanidad, fue presentada en la mitología y el arte egipcio, en ámbitos religiosos, se tiene registro de que también está presente en el antiguo testamento de la biblia y en el talmud de babilonia (Lim., 2013).

Sus aplicaciones en la medicina tradicional se ocupan en diversas partes del mundo incluyendo a los países de origen y de mayor producción, sus aplicaciones en la herbolaria tradicional incluyen el uso de la corteza del árbol, hojas, flores y frutos en este último se ocupa el jugo, las semillas y la cascara (Lopez-Mejia *et al.*, 2010)

Este fruto ha tenido importancia a nivel mundial ya que presenta una gran fuente de antioxidantes, lo que le con lleva a tener propiedades farmacológicas anticancerígenas, antitumorales, antimicrobianas y para un control de enfermedades renales (Lopez-Mejia *et al.* 2010; Lansky y Newman, 2007).

El granado es una gran fuente de polifenoles lo que incluye: flavonoides, taninos y taninos hidrolizables, su jugo contiene en mayoría taninos, antocianinas y derivados del ácido elágico (Gil *et al.*, 2000; Seeram *et al.*, 2005). Este fruto también presenta un complejo rico en galotaninos y elagitaninos (Madrigal-Carballo *et al.*, 2009). Cabe mencionar que Pande y Akoh en 2009 encontraron que el ácido orgánico predominante en este fruto fue el ácido cítrico seguido del ácido málico. La aplicación del extracto acuoso de la parte de cáscara de granada contiene Flavonoides y taninos como antioxidantes más importantes (Vidal *et al.*, 2003). Entre otros compuestos que esta parte del fruto presenta son ácido ursólico, tocoferol, entre otros, la coloración se debe principalmente a la presencia de antraquinonas y antocianinas (Hernández *et al.*, 1999). Entre otras características el departamento de agricultura de Estados Unidos (USDA., 2009), reporta su contenido de azúcares y fibra, así como los minerales más esenciales para el organismo como el fósforo y potasio. Su composición en vitaminas es una fuente mediana de folatos y vitamina K (Lopez-Mejia *et al.*, 2010.)

Polifenoles

Los polifenoles son compuestos fitoquímicos poli hidroxilados tienen estructuras comunes (Figura 7). Los compuestos polifenólicos son el grupo más extenso de metabolitos secundarios que están presentes en las plantas (Mignolet., 2018). Estos compuestos como anteriormente se mencionó se encuentran en plantas y en los últimos años han llamado la atención por las propiedades que estos tienen, en distintas áreas industriales (Hu., 2007). Estos compuestos se utilizan para la producción tintes, papel, cosméticos, aditivos alimenticios y fármacos. Cabe mencionar que la composición de polifenoles en los alimentos puede verse afectada por distintos factores (temperatura, luz, respuesta a patógenos, procesamiento y maduración de la cosecha) (Granado., 2010). Antiguamente los polifenoles se consideraban como anti-nutrientes por su capacidad de unir y precipitar macromoléculas (proteínas, carbohidratos e incluso enzimas digestivas), reduciendo la digestibilidad de alimentos, no obstante múltiples investigaciones han atribuido efectos beneficiosos frente al desarrollo de diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo como enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Granado., 2010).

Figura 7.- Estructura química básica de las principales clases de polifenoles (Lizárraga *et al.*, 2018).

Los polifenoles comprenden una extensa variedad de moléculas las cuales incluyen desde compuestos altamente polimerizados hasta moléculas simples con un solo

anillo fenólico en su estructura como por ejemplo los alcoholes y ácidos fenólicos (Hertog et al., 1992). Dentro de los polifenoles existen tres subclases: flavonoides, ácidos fenólicos y estilbenoides. Los flavonoides son los compuestos que mayormente se han aislado, éstos se caracterizan por tener dos o más anillos aromáticos con un grupo hidroxilo conectados por un puente de carbono, lo que les otorga propiedades hidrosolubles (Lotito & Frei., 2006., Beecher., 2003).

Se han descrito más de 8000 polifenoles distintos los cuales pueden clasificarse en distintos grupos dependiendo de su función en el numero de anillos fenolicos que contienen y el tipo de sustituyente unido a estos anillos (Granado ., 2010).

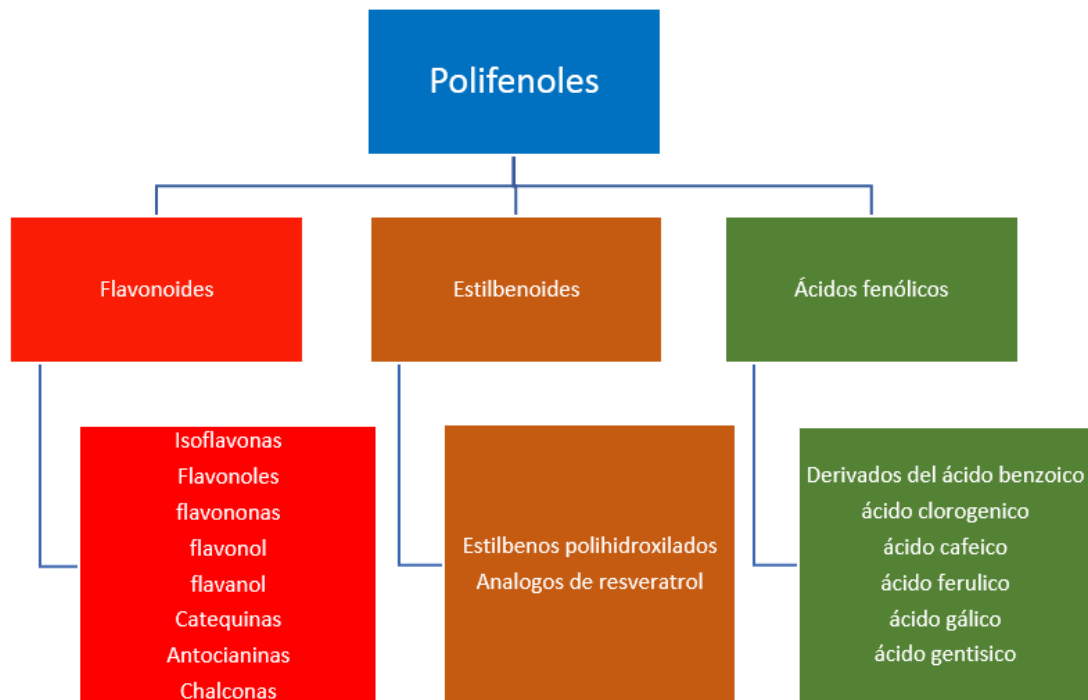


Figura 8.- Subclases de Polifenoles, dentro de las cuales encontramos, Flavonoides, estilbenoides y ácidos fenólicos con sus compuestos aislados más representativos (Enzo Life sciences., 2008).

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular, esta subclase comparte un esqueleto común de difenil piranos, compuesto por dos anillos de pirano heterocíclicos (figura 9). Su actividad depende de las propiedades redox de los grupos hidroxifenólicos que tengan presentes y de la relación estructural entre las diferentes estructuras químicas, que permiten patrones de sustitución y variaciones del anillo C (Bors *et al.*, 1990). Estos metabolitos secundarios son pigmentos naturales los cuales tienen un potencial antioxidante por lo que protegen al organismo de rayos UV, la polución ambiental y sustancias químicas presentes en el ambiente (Martínez-Flores., 2002). Los flavonoides pueden dividirse a su vez en diferentes subclases esto dependiendo de la función del estado de oxidación de la cadena de átomos de carbono. Estos compuestos pueden encontrarse asociados a diferentes carbohidratos o ácidos orgánicos y ocasionalmente pueden encontrarse en forma de aglicona en las plantas (Cartaya., 2001).

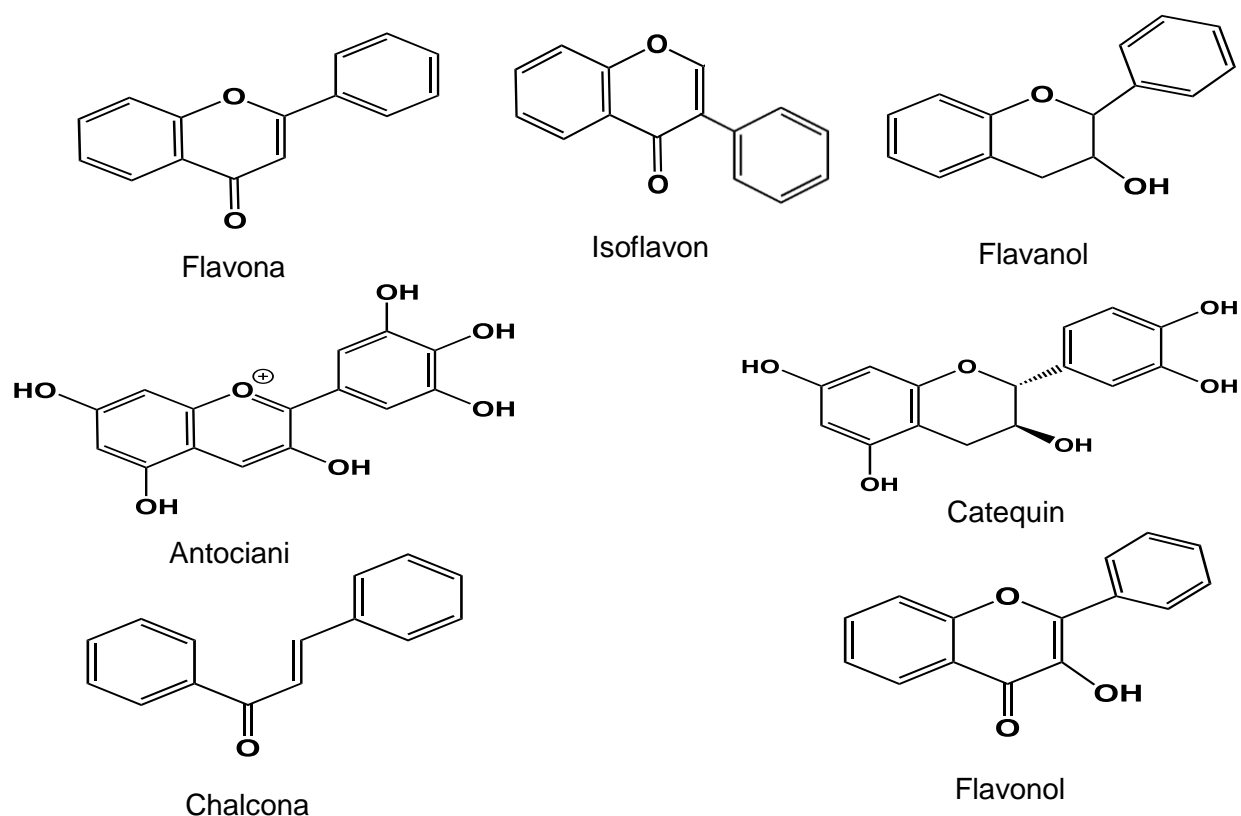


Figura 9.- Estructuras básicas de ácidos fenólicos.

Otra subclase de los polifenoles son los ácidos fenólicos (figura 10) los cuales se dividen generalmente en dos grandes grupos; Los ácidos benzoicos contienen 7 átomos de carbono, y los ácidos cinámicos los cuales en su estructura presentan 9 átomos de carbono, estos compuestos también presentan hidroxilación, estos compuestos forman parte de estructuras complejas como los taninos hidrolizables.

Figura 10.- Estructuras básicas de ácidos fenólicos

La tercera subclase y la más pequeña de los polifenoles son los estilbenoides (figura 11), son compuestos poli hidroxilados, siendo el resveratrol el más común de estos, en la dieta humana, los estilbenos se encuentran en baja cantidad siendo el resveratrol el más representativo (Fresco *et al.*, 2006).

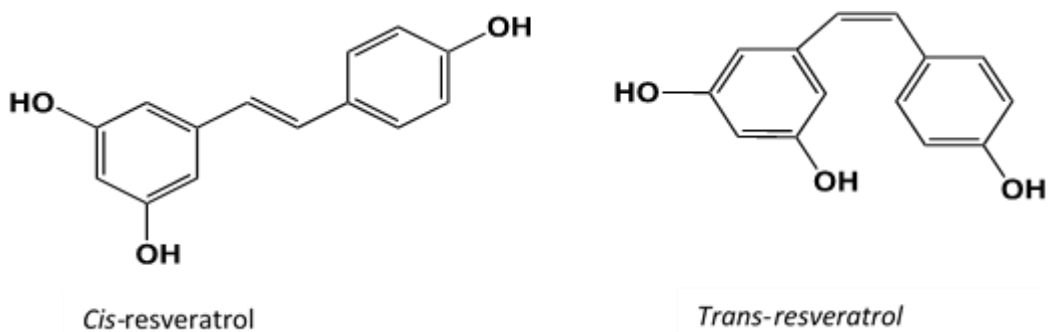


Figura 11.- Estructuras básicas de estilbenoides, como ejemplo se muestran isomerías del resveratrol.

Justificación

Los diferentes tratamientos que se presentan para el cáncer como la radioterapia y quimioterapia pueden ser poco efectivos y altamente citotóxicos, de esto ha surgido la necesidad de buscar terapias alternativas. Una de esas alternativas son los compuestos de origen vegetal, ya que presentan una gran fuente de sustancias bioactivas con actividad antitumoral. Dentro de estos compuestos los más representativos son las saponinas, alcaloides y polifenoles (Martínez-Mata., 2014).

La granada es una rica fuente de estos metabolitos secundarios, principalmente en polifenoles. Que pueden aplicarse con fines terapéuticos debido a que estos metabolitos secundarios regulan las vías de señalización y podrían inducir efectos apoptóticos en células cancerígenas. , por lo que podría funcionar como un apoyo terapéutico que pueda ser eficaz sin presentar efectos secundarios tóxicos. (Khwairakpam *et al.*, 2018).

Hipótesis

Las células de carcinoma de cuello uterino SiHa tratadas con el extracto de granada (nombre científico) presentarán un efecto citotóxico observándose una disminución en la proliferación y viabilidad celular, así como una inducción de apoptosis debido a la amplia gama de compuestos bioactivos que contiene el extracto.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad citotóxica del extracto acuoso de granada (*Punica granatum*) en la línea celular SiHa.

Objetivos particulares

Analizar cualitativamente por ensayos biodirigidos los principales grupos químicos que están presentes en la cáscara de granada.

Evaluar mediante ensayos colorimétricos el efecto del extracto acuoso de granada sobre la proliferación y viabilidad de la línea celular SiHa.

Examinar el efecto en la morfología de la línea celular SiHa tratada con el extracto de granada, mediante microscopia de fluorescencia.

Material y métodos

Elaboración de extractos hidroetanolicos

Para la elaboración de los extractos se utilizó el método de maceración, para la extracción de los metabolitos secundarios (Figura 12), se cortó la cáscara de granada que presentaba pigmentación de coloración roja, posteriormente se pesaron 40 g del material vegetal para realizar lavados con agua potable. Después se dejó reposar por 15 minutos en una solución al 5% de hipoclorito de sodio, terminado el tiempo de reposo se llevó el material vegetal a la campana de flujo laminar donde se dejó secar con ayuda de sanitas estériles, una vez seca la materia vegetal se procedió a macerarla, al mismo tiempo que se realizaba el procedimiento de maceración, se agregó una solución hidroetanólica 45:45. Finalizado el proceso de maceración, se agregó el contenido a un frasco ámbar y se dejó reposar durante 3 días a una temperatura de 4°C. Posteriormente se procedió a filtrar el extracto, se eliminó la parte etanólica del extracto con ayuda de un rotavapor (Witeg rotary evaporator model greaseless 2610000), con los parámetros de 60 °C y 45 RPM, eliminado el etanol se volvió a filtrar el extracto dentro de una campana flujo laminar, finalmente el extracto acuoso se almacenó a una temperatura de 4°C hasta su uso



Figura 12.- Metodología para la elaboración de extractos hidroetanolicos mediante la técnica de maceración.

Pruebas fitoquímicas

Para determinar la composición del extracto, se realizaron las siguientes pruebas químicas colorimétricas. Los compuestos se sometieron a pruebas fitoquímicas para elucidar su estructura (Lewis, Bernstein, Duncan & Sleigh, 2005; Schroeder & Gronquist, 2006; Urban & Separovic, s. f.; Wolfender, Ndjoko & Hostettmann, 2003). Todas las pruebas se realizaron dentro de una campana de extracción.

Esteroles y triterpenos

Prueba de Liebermann-Burchard. Se elaboró el revelador de esteroides y triterpenos el cual consistía en 10:1:25 (ml), anhídrido acético, ácido sulfúrico y cloroformo. Se pesaron 0.2 gr de cáscara de granada y se añadió a un tubo de ensaye, contando con 3 repeticiones. Teniendo los 0.2 gr en los tubos de ensaye se añadió la solución reveladora (3ml), se agitó y esperó el cambio de coloración, en dado caso que la prueba resultara positiva. La aparición de un color azul o morado es positiva para esteroides y la aparición de un color rojizo o verde es positiva para triterpenos.

Saponinas

Se pesaron 0.2 gr de cáscara de granada, el contenido se colocó en un tubo de ensaye contando con 3 repeticiones. Se calentó agua a una temperatura de 90°C. Se agregó 1 ml de agua a cada uno de los tubos de ensaye y se agitó vigorosamente por 1 minuto. La prueba es positiva si se forma una espuma abundante y que esta persista por 15 minutos.

Cumarinas

Se preparó una solución de hidróxido de sodio al 5%, se pesaron 0.2 g de cáscara de granada y se vaciaron en un tubo de ensaye contando con 3 repeticiones. Se agregaron 5 ml de la solución de hidróxido de sodio y se agitó vigorosamente, posteriormente se aciduló con HCl 12 N. La prueba es positiva si existe una coloración amarilla la cual desaparece al acidular.

Flavonoides

Prueba de Shinoda. Se pesaron 0.2 gr de cáscara de granada y se vaciaron a un tubo de ensaye, contando con 3 repeticiones. Se agregó 1 ml de etanol absoluto y 1 ml de ácido acético al tubo de ensaye, se agitó fuertemente y se agregaron virutas de magnesio. Se esperó a que terminara la reacción. La prueba se toma como positiva si aparece un color rojo intenso, otros colores como el naranja, verde o azul indican la presencia de flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas.

Fenoles

Prueba de cloruro férrico. Para esta prueba se ocupó el extracto acuoso de granada, se tomó 1ml del extracto acuoso y se le añadió 1ml de metanol absoluto, se agitó fuertemente para posteriormente agregar unas gotas de cloruro férrico. La aparición de un color azul en la solución indica la presencia de fenoles.

Quinonas

Se pesó el material vegetal seco de la cáscara de granada y se colocó en los tubos de ensaye, contando con 3 repeticiones. Se agregó H_2O_2 al 6% para posteriormente hacer un proceso de filtración con la ayuda de un embudo y papel filtro. Se agregó benceno (4ml) y se agitó vigorosamente. Finalmente se añadieron 4 ml de NaOH 5N. La prueba se considera positiva si la fase alcalina se colorea.

Alcaloides

Se pesaron 0.2 g de cáscara de granada y se colocaron en un tubo de ensaye, contando con 3 repeticiones, posterior a esto se le añade el reactivo de Marquis y se agita vigorosamente. La prueba se considera positiva cuando existe una coloración roja o violeta.

Esteroides

Se trituro la muestra de cáscara de granada con ayuda de un mortero, se pesaron 0.2gr y se vacio a los tubos de ensaye contando con 3 repeticiones, posterior a esto se le agrego ácido acético (1.5 ml), se agito vigorosamente, con ayuda de una pipeta se agregaron 3 gotas de ácido sulfúrico. Si se presenta una coloración negra o morada la prueba se considera como positiva.

Cultivo de línea celular SiHa

Todos los procedimientos que se realizaron para el cultivo de la línea celular se realizaron dentro de una campana de bioseguridad clase II tipo B, ocupando material estéril el cual fue sometido a esterilización por calor húmedo y radiación UV.

Las células de neoplasia intraepitelial cervical de grado 2 (SiHa) fueron proporcionadas por el Centro de investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR) para posteriormente mantenerlas y cultivarlas, en las instalaciones de los laboratorios de cultivo de tejidos ubicado en el edificio multi aulas 6 (EMA 6) perteneciente a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla(Figura 13).

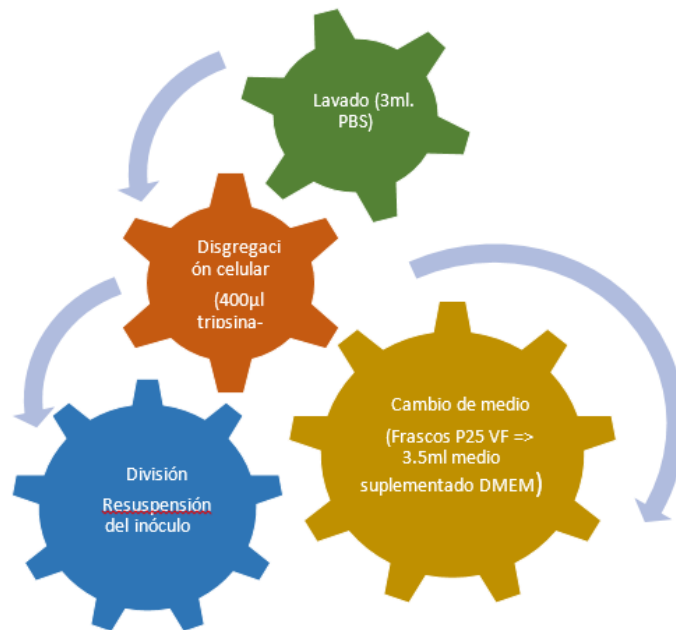


Figura 13.- Procedimiento de mantenimiento de la línea celular continúa SiHa por el método de disgregación enzimático, utilizando tripsina EDTA, buffer fosfato salino y medio DMEM suplementado alto en glucosa.

El cultivo de células se realizó utilizando medio DMEM suplementado con 500 μ l de penicilina-estreptomicina, 500 μ l de anfotericina B, 50 μ l de gentamicina y un 5% de suero fetal bovino (Figura 14). Las células se mantuvieron en incubación a una temperatura de 37 °C y a un 5% de CO₂ (CRUMA, model CO₂ incubator).

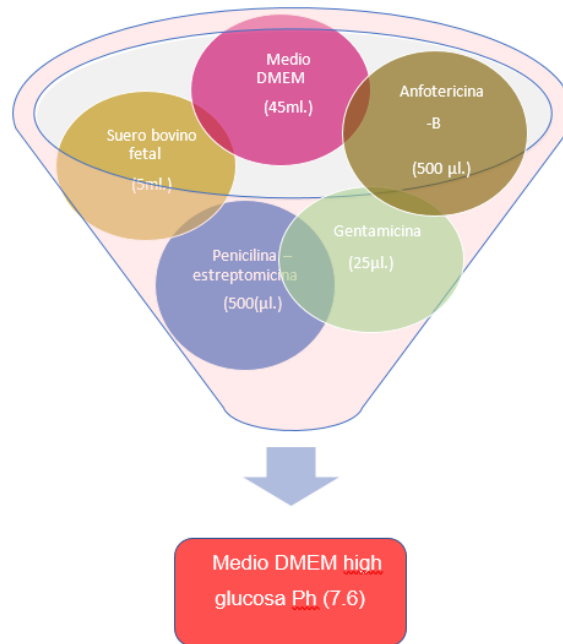


Figura 14.- Esquema que ilustra la preparación del medio DMEM alto en glucosa suplementado.

Los ensayos para determinar la viabilidad celular fueron realizados siguiendo la metodología del ensayo MTT y la cuantificación del número total de células para medir la proliferación, fue realizada siguiendo la metodología de tinción de cristal violeta (Figura 15).

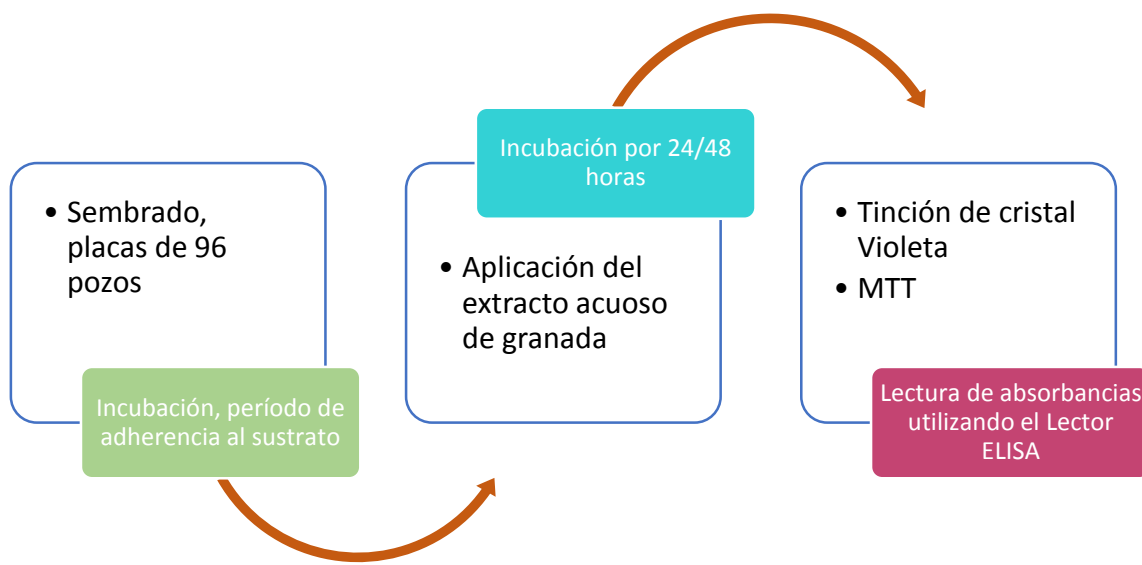


Figura 15.- Procedimiento del ensayo de cuantificación celular por método de tinción de cristal violeta y viabilidad celular por el ensayo MTT.

Ensayos para cuantificar la proliferación celular

Se elaboró el ensayo de cuantificación celular por método de cristal violeta. Se realizó el cultivo de la línea celular SiHa en placas de 96 pozos de fondo plano. El experimento consistió en sembrar 40 mil células por pozo con medio DMEM suplementado, contando con 3 repeticiones por cada concentración del extracto a tratar. Una vez terminado el sembrado, se incubaron las células por 90 minutos en la incubadora de CO₂ a una temperatura de 37 °C y un 5% de CO₂, este tiempo de incubación fue para dejar que las células se adhirieran a la superficie de los pozos. Finalizando este tiempo de incubación se prosiguió a aplicar el, teniendo las siguientes condiciones: control absoluto (células sin tratamiento), blanco (pozo únicamente con medio DMEM suplementado) y curva de las 6 concentraciones de extracto. Acabando de aplicar el tratamiento se dejaron incubando las células por 24 y 48 horas en la incubadora de CO₂ con los parámetros anteriormente descritos. Concluyendo el tiempo de incubación se prosiguió a realizar la tinción de cristal violeta. Se retiró todo el contenido de los pozos y se realizaron 2 lavados con buffer PBS (200 µl), posterior a esto se fijaron las células con ayuda de metanol (200 µl)

al 96% y se dejaron reposando por 15 minutos. Se retiró el metanol, se realizaron otros 3 lavados con buffer PBS (200 μ l), y se adicionaron 200 μ l de cristal violeta al 0.1%; se dejó la placa en agitación por 30 minutos a 45 RPM. Terminado este tiempo se retiró el cristal violeta de los pozos y se eliminó el exceso utilizando una piseta con agua tridestilada, se dejó secar la placa y añadieron 200 μ l de tritón al X%. La placa se dejó en agitación por 12 horas y se almacenó a una temperatura de 4°C para su posterior lectura de absorbancia.

Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Este ensayo se realizó en placas de 96 pozos de fondo plano, El sembrado de células consistió en sembrar 40 mil células por pozo con medio DMEM suplementado, contando con 3 repeticiones por cada concentración del extracto a tratar. Se esperaron 90 minutos para que las células se adhirieran a la superficie de los pozos y posterior a esto se trataron las células con las siguientes condiciones: control absoluto (células sin tratamiento) blanco (pozo únicamente con medio DMEM suplementado) y curva de las 6 concentraciones de extracto. Una vez aplicado el tratamiento se dejaron incubando las células por 24 y 48 horas a una temperatura de 37 °C y a un 5% de CO₂. Terminando el tiempo de incubación de los dos diferentes tiempos, se retiró todo el contenido del pozo y se realizó un lavado utilizando buffer PBS (200 μ l), terminado el lavado se agregaron 100 μ l de medio DMEM suplementado y 50 μ l de MTT, terminando de agregar el MTT se incubaron durante 4 horas en la incubadora de CO₂. Con los parámetros anteriormente descritos. Terminado el tiempo de incubación se retiró todo el contenido de los pozos y se agregaron 100 μ l de isopropanol grado biología molecular, las placas se almacenaron en una temperatura de 4°C para su posterior lectura de absorbancia.

Tinción de fluorescencia

Se realizó la tinción de Hoechst (Figura 16) se retiró todo el medio de las cajas Petri donde se cultivaron las células, retirado el medio DMEM se adicionó 1 ml de medio DMEM con MTR (10 μ M), se incubaron las células durante 45 minutos en la

incubadora de CO₂ a una temperatura de 37°C al 5% de CO₂. Transcurridos los 45 minutos se retiró nuevamente el medio, y se lavó con Medio DMEM suplementado sin suero, terminado el lavado se agregaron 500 µl de medio DMEM suplementado con suero bovino fetal, se incubaron una segunda vez con un tiempo de 5 minutos, transcurrido el tiempo de incubación se retiró el medio y se realizaron 2 lavados con PBS, concluidos los lavados se fijaron las células utilizando paraformaldehído (1ml), asimismo se volvieron a incubar las células por 15 minutos en la incubadora de co₂. Terminando el tiempo de incubación se lavó nuevamente utilizando PBS (2 lavados), concluyendo los lavados se agregó la solución Hoechst (100 µl) en cada uno de los cubreobjetos, se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se finalizó realizando 2 lavados más con PBS.

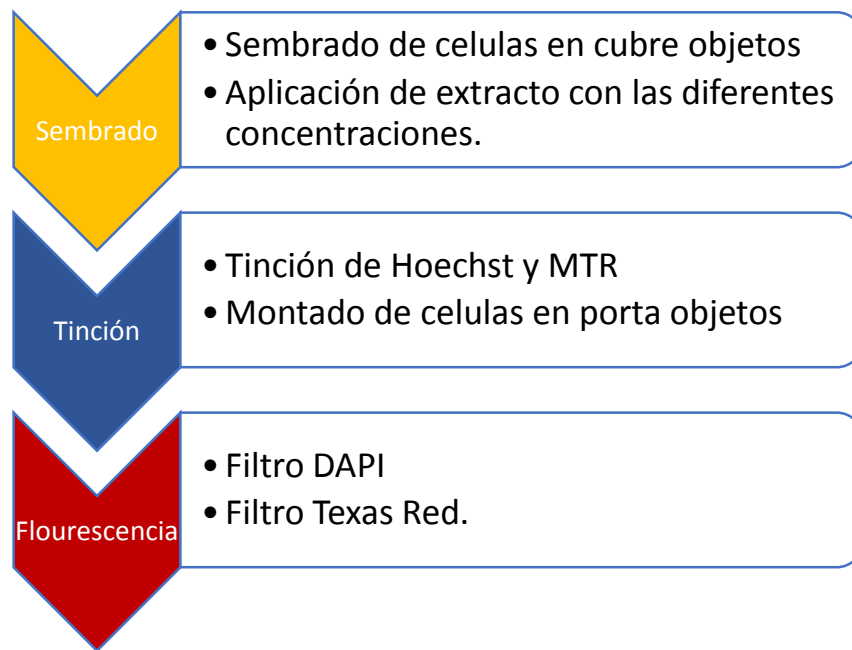


Figura 16.- Metodología de tinción de Hoechst y MTR en líneas celulares continuas.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado usando ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, además de realizar graficas de barras de los promedios de las absorbancias obtenidas en los diferentes experimentos, esto se realizó utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows.

Resultados

Análisis fitoquímico

Los análisis de los compuestos revelados mediante las pruebas de identificación química se exponen en la siguiente tabla la cual revela la presencia o ausencia del metabolito secundario analizado.

Tabla 1.- Resultados de análisis fitoquímico.

Metabolito	Positivo	Negativo
Alcaloides		-
Quinonas	++	
Cumarinas	+++	
Esteroides		-
Fenoles	+++	
Flavonoides	+++	
Saponinas		-
Triterpenos		-

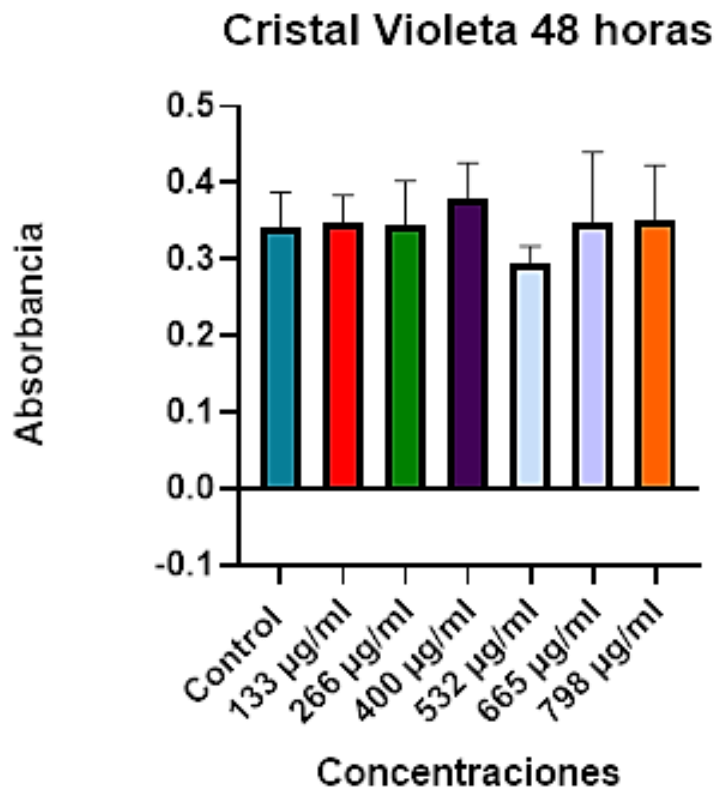
Tabla 1.- +Presencia escasa, ++Presencia medianamente abundante, +++ Presencia abundante, - No detectado.

El tamizaje fitoquímico demuestra la presencia abundante de fenoles, flavonoides y cumarinas, además de presentar un contenido medianamente de quinonas presentes en la cáscara de granada.

Actividad antiproliferativa

Para observar el posible efecto antiproliferativo en la línea celular SiHa se utilizaron 6 diferentes concentraciones del extracto acuoso de granada en un tiempo de acción de 48 horas. El número celular fue evaluado por medio de la técnica de *Cristal Violet dye elution* (CVDE) mejor conocido como cristal violeta.

Gráfica 1.- Grafica de barras comparando los promedios de absorbancias registradas y una ANOVA de comparaciones múltiples para el ensayo de cristal violeta.



Gráfica 1.- Actividad del extracto acuoso de granada sobre la proliferación de la línea celular SiHa (P=0.469).

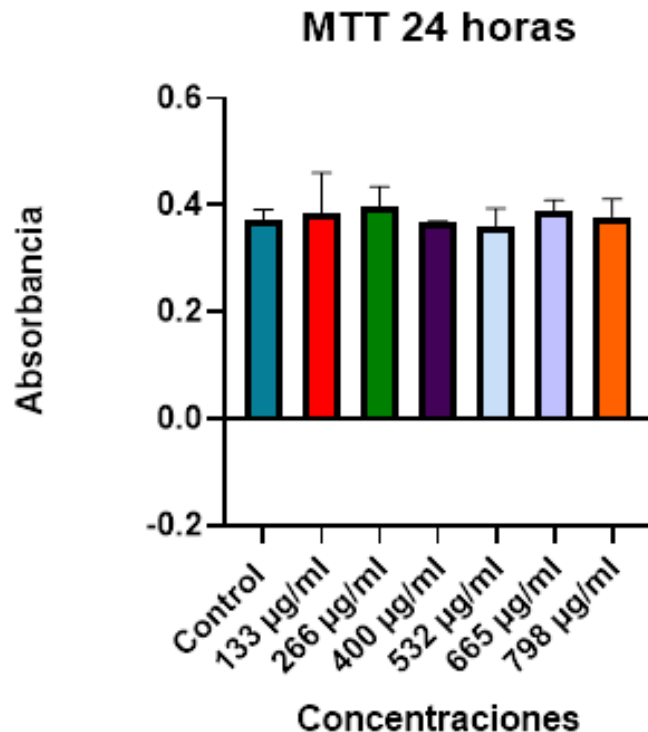
Los resultados demuestran el potencial proliferativo de la línea celular SiHa en donde se observa que no hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

Método para el estudio de actividad citotóxica in vitro

Para este ensayo se utilizaron las 6 diversas concentraciones del extracto acuoso de granada en un tiempo de acción de 24 y 48 horas. Para determinar la viabilidad celular se utilizó el ensayo MTT. Este ensayo radica en la formación de sales de formazán, es una técnica colorimétrica la cual se basa en la reducción metabólica del bromuro 3(4,5-demetiltiazol-2-ilo)-2,5difeniltetrazol), el cual es reducido por deshidrogenasas mitocondriales (succinato deshidrogenasas) a su forma insoluble el formazán.

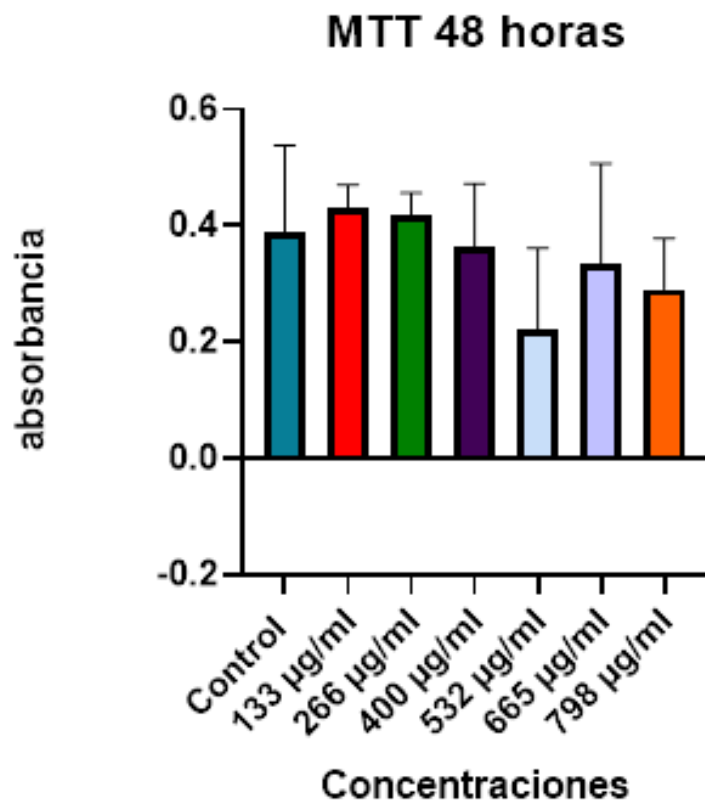
En las siguientes gráficas se muestran las absorbancias registradas por el lector de placas ELISA a una absorbancia de 490 nm con el protocolo establecido para el ensayo MTT.

Grafica 2.- Grafica de barras comparando los promedios de absorbancias registradas y una ANOVA de comparaciones múltiples del ensayo MTT



Grafica 2.- Absorbancias obtenidas de los ensayos de MTT de 24 horas registrando un valor de $P=0.89$

Grafica 3.-Grafica de barras comparando los promedios de absorbancias registradas y una ANOVA de comparaciones múltiples del ensayo MTT



Grafica 3.- Absorbancias obtenidas de los ensayos de MTT de 48 horas registrando un valor de $P=0.34$

Las absorbancias registradas en los dos experimentos nos indican que la viabilidad celular no depende de la dosis administrada, ya que estas se mantienen en un margen constante establecido por el control, sin embargo, se ve una disminución en el valor de P en una comparación de los dos tiempos en los que se realizó el ensayo.

Determinación de condensación nuclear por tinción de Hoechst

Las microfotografías realizadas para los diferentes tratamientos se muestran en la figura 15. En donde se utilizaron dos diferentes tinciones: MTR y Hoechst 6024, utilizando filtros DAPI y Texas Red en un aumento de 100X comparando el efecto del extracto en sus 6 diferentes concentraciones (figura 17).

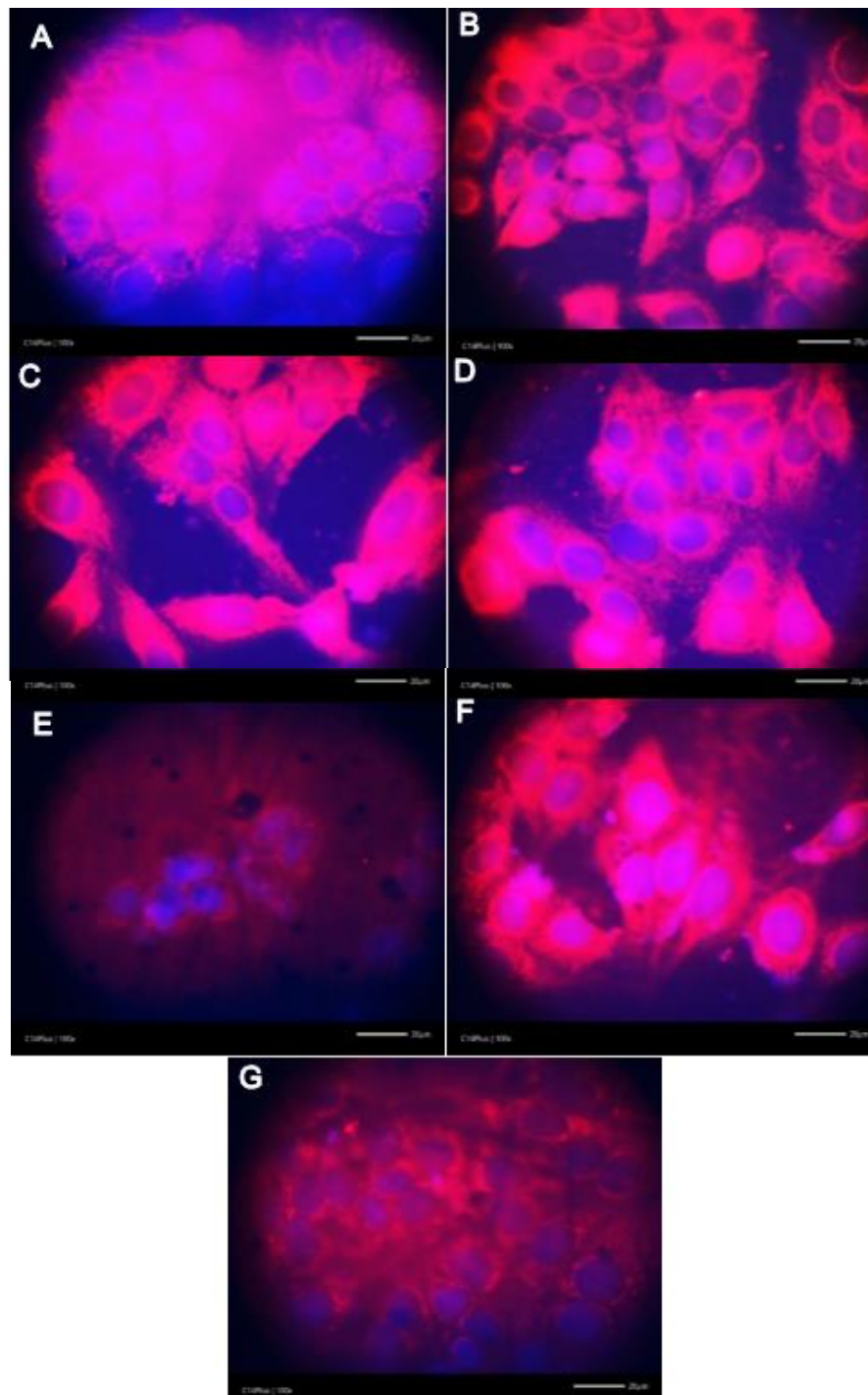


Figura 17.- Se muestra un merge de imágenes entre los filtros DAPI y Texas red a un aumento de 100x, de los diferentes tratamientos utilizados en la tinción de Hoechst (A) Grupo control, (B) 133 $\mu\text{g}/ 0.2 \mu\text{l}$, (C), 266 $\mu\text{g}/ 0.4 \mu\text{l}$, (D) 400 $\mu\text{g}/ 0.6 \mu\text{l}$, (E) 532 $\mu\text{g}/ 0.8 \mu\text{l}$, (F) 665 $\mu\text{g}/ 1.0 \mu\text{l}$, (G) 798 $\mu\text{g}/ 1.0$

En las imágenes se puede observar un aumento de tamaño en los núcleos y la condensación de este, los cuales fueron teñidos con el flourocromo Hoechst H-6024 ya que este se utiliza para visualizar moléculas como ADN, estructuras celulares y proteínas específicas, también se puede apreciar el alargamiento de la red mitocondrial producida posiblemente por procesos de fisión, el cual se aprecia mejor en la siguiente imagen a un aumento de 40X (figura 18) en el cual se comparan el control con el tratamiento 665 $\mu\text{g}/ 1.0 \mu\text{l}$ en el cual se observan cuerpos apoptoticos y en algunas partes se conserva la integridad de la membrana.

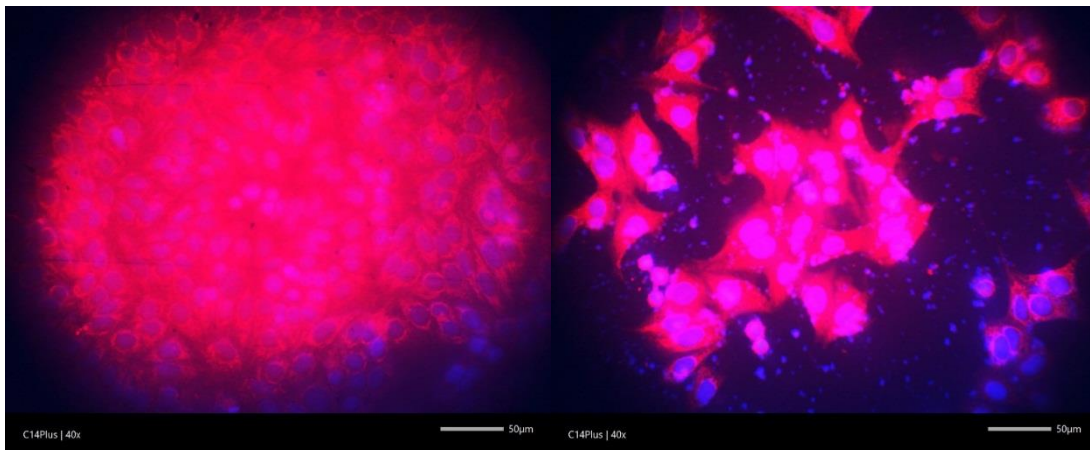


Figura 18.- Merge de imágenes con tinciones Hoescht H-6024 y Mtr puestas en los filtros DAPI y Texas red, en un aumento de 40X comparando el grupo control con el grupo 665 $\mu\text{g}/ 1.0 \mu\text{l}$ de concentración del extracto hidroetanolico de granada en donde se puede observar un efecto apoptotico.

Discusión

La mayoría de los agentes quimioterapéuticos son derivados de plantas, estos tienen el potencial para suprimir la proliferación celular, y en algunas ocasiones inducen la apoptosis, es por esto por lo que los compuestos activos de origen natural, tienen un gran interés debido a que muchos agentes anticancerígenos disponibles en la actualidad presentan efectos secundarios e incluso afecta a células normales (Anajwala., 2010)

La extracción de componentes bioactivos en plantas es la técnica de separación de compuestos más utilizada. Esta consiste en que a partir de una matriz sólida o líquida se aprovechan las diferentes solubilidades que contenga una muestra, utilizando los solventes adecuados para la separación de estos y su identificación (Tobón., 2015). El tamizaje fitoquímico revela la presencia de fenoles, flavonoides, cumarinas y quinonas, estos dos últimos metabolitos no fueron caracterizados partiendo del extracto acuoso de granada, si no que fueron tomados directamente de la materia vegetal con la cual se elaboró el extracto, en donde se utilizaron diferentes solventes para su análisis.

El análisis fitoquímico para la prueba de fenoles fue realizado partiendo de extractos hidroetanólicos de *Punica granatum*. Este sistema de solventes se utilizó ya que tradicionalmente es empleado para la elaboración de extractos, de acuerdo con Xavier y colaboradores. 2015 este solvente se utiliza por su baja toxicidad, considerándose un proceso de extracción seguro y eficiente. Por otra parte, este sistema se seleccionó por la gran afinidad que tiene a diversos metabolitos secundarios como los polifenoles, los cuales su estructura fundamental los caracteriza por mínimo un núcleo bencénico y contienen al menos un grupo hidroxilo libre, o formando otro grupo funcional como un éter o éster, por lo tanto son solubles en disolventes orgánicos polares como agua y etanol, esto con el fin de una separación a compuestos lipófilos y evitar una esterificación parcial de ácidos

fenólicos, coincidiendo con Bruneton el cual reporta la estructura y solubilidad para estas moléculas.

La prueba de cloruro Férrico dio positivo ya que presentaba una coloración azul. Esta coloración se puede explicar por el ion hierro (III) este oxidante tiene una actividad moderada y posee la capacidad de inducir la conversión de un pirogalol a una ortoquinona hidroxilada (molécula que proporciona la coloración azul). La reacción del FeCl_3 con grupos fenólicos, que presentan grupos hidroxilo (Figura 19), actúan como activadores del anillo bencénico, tiene como resultado que la aromaticidad del anillo se debilite y adquiera más la de un polieno conjugado (Bruneton., 2001).

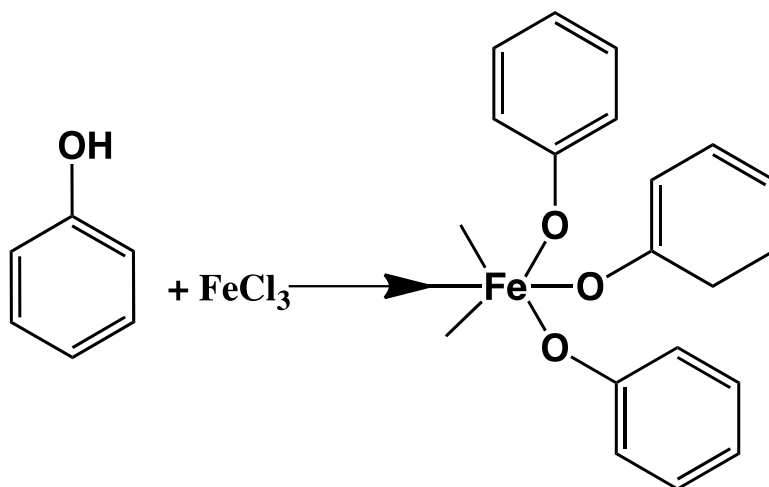


Figura 19.- Reacción de fenoles con cloruro férrico, en donde el cloruro ataca al hidrogeno del grupo hidroxilo rompiendo el enlace -OH, quedando el ion fenóxido libre.

En las pruebas fitoquímicas realizadas dos de las tres repeticiones presentaron una coloración azul, lo que podría indicar la presencia de pirogalol, mientras que el tubo restante tenía una coloración negra teniendo la posibilidad de tener la presencia de catecol, Coincidiendo con Rengifo (2008).

La prueba de flavonoides basado en la reacción de Shinoda (Figura 20) fue positiva ya que presentaba la coloración correspondiente. El mecanismo de la

reacción de Shinoda inicia cuando las virutas de magnesio son oxidadas por el HCl, esta reacción da como resultado productos como H₂, los cuales son eliminados en forma de gas quedando MgCl₂ el cual forma complejos con flavonoides otorgando la coloración característica.

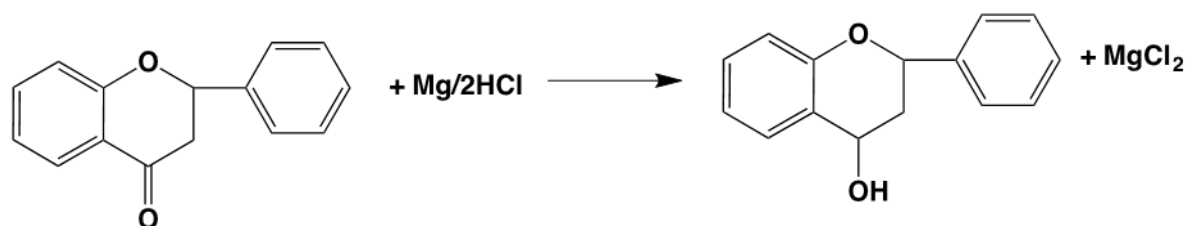


Figura 20.- Mecanismo Básico de la reacción de shinoda (Fajardo *et al.*, 2016).

Los análisis realizados también revelan la presencia de cumarinas, esto coincide con lo dicho por Bruneton en 2001, ya que en la prueba se realizó una extracción de estos metabolitos, por lo que se ocuparon las propiedades específicas de las lactonas, se usó un medio alcalino como NaOH para la apertura y solubilización de las cumarinas, Finalmente se utilizó HCL para el cierre de estas (figura 21), esto tiene como resultado la desaparición de color en la fase alcalina. Las cumarinas se clasifican como miembros de la familia de las benzopironas, estas pueden ser simples, furanocumarinas, piranocumarinas y diversas. Su estructura principalmente consta de un anillo aromático unido a un anillo pirano. Entre las diversas estructuras que se tienen de estos metabolitos secundarios se encuentran las inmunocumarinas, las cuales son un análogo de las cumarinas. Esta familia de cumarinas es valiosa en tratamientos de enfermedades que involucran el exceso de proliferación celular (Vidal y Climent., 2012).

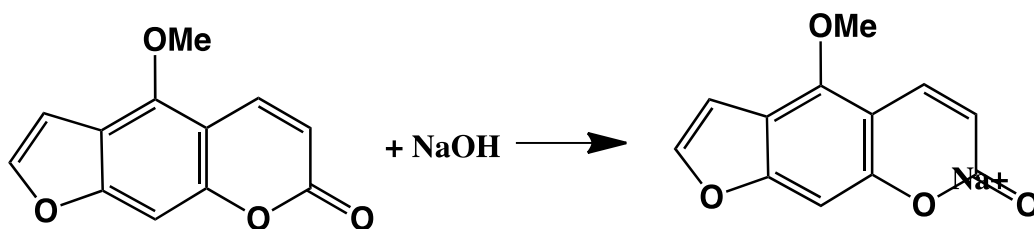


Figura 21.- Reacción del Bergapteno (furanocumarina) con hidróxido de sodio.

Las antraquinonas son el grupo más amplio de las quinonas naturales y tienen la función p-quinoides en un núcleo antracénico (Bustamante *et al.*, 2010). Su estructura presenta dos grupos ceto generalmente en las posiciones 9,10. Y puede ser sustituida de varias formas lo que resalta su gran diversidad estructural (Ramawat., 2007). La prueba consistió en la oxidación del antraceno a través de H_2O_2 formando antraquinonas (Figura 22), las cuales fueron liberadas utilizando un solvente apolar como el benceno, estos metabolitos al ser liberados y agregar un medio alcalino (NaOH), da como inicio la reacción de Bornträger la cual consiste en la coloración de la fase alcalina, no obstante la coloración en esta prueba no fue la esperada, el color que las caracteriza es el rojo pertenecientes a 1,2-naftoquinonas, Esto se puede justificar ya que la cáscara podría tener la presencia de antranas o antranoles los cuales tienen una coloración amarilla, concordando con Carla delporte (2010) y Maria Star (2016) quienes reportan esta variación en la metodología para la identificación de quinonas.

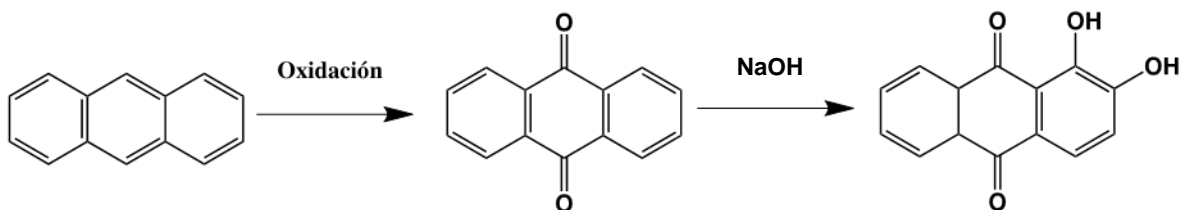


Figura 22.- Oxidación del antraceno para obtención de antraquinonas (Marcano & Hasegawa., 2002).

Este estudio fitoquímico revela la presencia de estos 4 metabolitos secundarios coincidiendo con los trabajos realizados con Peña Núñez y colaboradores (2008). Los cuales encontraron también la presencia de estos metabolitos. Otro punto en el que se coincide fue en la ausencia de alcaloides los cuales le podrían dar al extracto un potencial tóxico más elevado.

La identificación de metabolitos secundarios como fenoles y flavonoides presentes en el extracto acuoso, nos indica que el extracto contenía los componentes activos

deseados para los ensayos *in vitro* frente a la línea celular SiHa. La mayoría de las investigaciones acerca de quimioterapéuticos de origen natural se centran en aspectos de síntesis y caracterización química, Sin embargo, muchos de estos compuestos son difíciles de separar, es por esto por lo que el uso de extractos en diferentes análisis se emplea, ya que estos contienen una gran riqueza de compuestos activos.

La aplicación del extracto de granada en la línea celular SiHa nos da información sobre el efecto de metabolitos secundarios como fenoles y subclases de estos, los flavonoides, para analizar su efecto en distintas cuestiones como características antiproliferativas, citotóxicas y apoptóticas que estas células puedan presentar.

La actividad antiproliferativa del extracto se evaluó mediante el ensayo de cristal violeta. Este colorante se ocupó ya que contiene triarilmetano el cual tiene la propiedad de unirse a moléculas tipo ribosa como el ADN en los núcleos de células viables, la cantidad de tinción será directamente proporcional a la biomasa celular. Este método nos ayudó a detectar la viabilidad celular bajo diversos estímulos de agentes quimioterapéuticos que puedan estar en el extracto, es por esta razón por la cual se pueden detectar diferencias en la proliferación tras la estimulación de los componentes del extracto acuoso de granada. Sin embargo, no tuvo diferencias significativas en las diferentes concentraciones que se ocuparon respecto al control, esto puede deberse a que nuestro tratamiento estaba en solución acuosa, y por la naturaleza de la membrana plasmática de las células, el extracto puede que tuviera problemas para traspasar las membranas, recordemos que las sustancias lipofílicas la atraviesan con mayor facilidad y evitan la repulsión con las cadenas de hidrocarbonos de los fosfolípidos. No obstante, numerosos estudios demuestran el efecto protector de los polifenoles en contra del cáncer (Kampa et al., 2000).

Uno de estos estudios fue realizado por Matito y colaboradores (2003) los cuales analizaron la capacidad antioxidante de 3 fracciones de polifenoles en líneas celulares de hepatoma de ratón (Hepa-1c1c7). Sus resultados mostraron una capacidad antioxidante similar con un efecto anti proliferativo en una de sus fracciones de polifenoles, esto puede deberse a su sistema de solventes y su

posterior liofilización de estos, teniendo como ventaja una mayor conservación de sus propiedades, esta técnica se basa en el hecho de que el agua en estado de congelación contiene presión de vapor y por ende se puede separar de un sistema por sublimación (Carrión y García., 2010).

Otro cambio que puede incidir en los resultados fue su tiempo de acción de 72 horas. Otros autores como Kuangye y colaboradores en 2018, reportan que la especie *Rubus chingii* planta rica en contenido de fenoles, flavonoides, taninos y ácidos fenólicos los cuales se extrajeron mediante ultrasonido, este método de extracción perteneciente a las técnicas no convencionales de extracción tiene como ventaja un mezclado más eficaz, la energía es más rápida en la transferencia de masa, se reducen los gradientes térmicos y la extracción es más selectiva (Tobón., 2015). Es por este motivo por el cual puede inhibir la proliferación celular de la línea de cáncer de vejiga T24 y posiblemente su apoptosis después de 36 horas, ya que los compuestos de su extracto poseen potentes actividades antioxidantes.

Respecto a los análisis de citotoxicidad, se realizaron por el ensayo MTT el cual nos brinda valorar la capacidad de las células para reducir el MTT a formazán (Figura 23). Después de la aplicación del extracto acuoso de granada para obtener información de la toxicidad de este, ya que la reducción de este compuesto a formazán nos indica la integridad de las mitocondrias de la célula y su actividad funcional se interpreta como una medida de viabilidad celular.

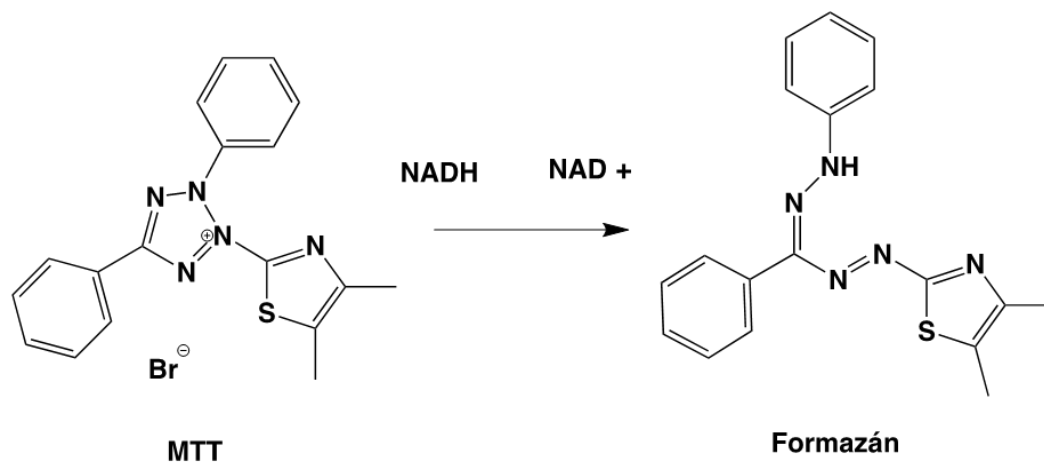


Figura 23.- Estructura del MTT y su reducción metabólica.

Los valores de P en los dos diferentes tiempos de tratamiento (24 y 48 horas) nos indica que las diferentes concentraciones respecto al control no tienen una diferencia que pueda ser significativa, sin embargo, si se pueden visualizar cambios en los valores de P en los dos diferentes tiempos, esto se podría explicar debido a que el tiempo de exposición fue mayor, y que el tiempo pueda ser un factor determinante en el efecto de este.

Trabajos como el de Yang y colaboradores en 2017 reportan el efecto del epifridelinol el cual afecta significativamente la apoptosis a través de la inducción en la fragmentación del DNA por oligonucleosomas en las líneas celulares HeLa y C-33A en donde observa que entre más tiempo transcurra el efecto será mayor.

En otro trabajo realizado por Rolim y colaboradores en 2018 describen la actividad antioxidante de la cascara y semillas de melón las cuales son una gran fuente de compuestos fenólicos, este trabajo muestra que el extracto acuoso de la semilla y el extracto hidroetanólico de la cascara presentan una inhibición dependiente de la dosis en la línea celular SiHa.

La microscopia de fluorescencia es el proceso el cual un espécimen absorbe e irradia luz en un intervalo de tiempo (este intervalo de tiempo se da entre la absorción de la luz de excitación y la emisión de luz fluorescente). Esta herramienta nos permite estudiar materiales no fluorescentes y fluorescentes ya que puede alcanzar altos niveles de sensibilidad y resolución microscópica. Dentro de los marcadores fluorescentes se encuentran los marcadores de Hoechst, estos pertenecen a una familia de colorantes fluorescentes que se utilizan principalmente para teñir El ADN, la composición química de estos colorantes es de bisbenzimidias, estas moléculas tienen la propiedad de unirse a regiones con alta cantidad de A-T en él lo que puede disminuir su densidad (Martínez. *et al.*, 2016)

La microscopia de fluorescencia ocupa el alto grado de sensibilidad, la habilidad de marcar componentes estructurales y procesos dinámicos en células fijadas químicamente. Las sondas fluorescentes están constituidas a partir de compuestos

aromáticos sintéticas que han sido diseñadas para que ligen a una macromolécula biológica. Existen otro tipo de sondas las cuales se ocupan para el estudio y monitoreo de procesos dinámicos, uno de estos es el flouorforo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) el cual se une a regiones ricas en A-T, además puede pasar a través de la membrana celular por lo que se usa para marcar ADN (Martínez *et al.*, 2016).

Se sabe que las células cuando son inducidas a una muerte apoptótica estas presentan cambios en su morfología, uno de estos puede ser condensación o fragmentación de la cromatina, lo que da como resultado la generación de cuerpos apoptóticos y la inducción de la expresión de caspasas efectoras como la caspasa 3 activa. En este trabajo se muestra un cambio en la morfología celular después de la aplicación del extracto acuoso de granada en donde se aprecian núcleos grandes, formación de cuerpos apoptóticos, condensación de la cromatina, además concordando con Martínez y su equipo de trabajo (2013) el cual reporta estos mismos cambios morfológicos en la línea celular HeLa aplicado diosgenina-3-glu.

Otro aspecto a destacar es el cambio producido en las mitocondrias, las mitocondrias son organelos dinámicos, los cuales tienen la capacidad de intercambiar su morfología presentando un sistema elongado e interconectado, también se pueden presentar con una estructura de distribución más fragmentada y desconectada (westman., 2002). La morfología y actividad de las mitocondrias está regulado por procesos de fisión y fusión. En el proceso de fisión en donde ocurre la división de dos mitocondrias, esta separación permite a la célula distribuir y reorganizar su compleja red de mitocondrias para adaptarla a las necesidades requeridas (Knott *et al.*, 2008). La morfología de la mitocondria depende del balance de estos procesos, una alteración en este balance como una baja del potencial hídrico, incremento de ROS generado por un defecto en el sistema OXPPOS da como resultado cambios en la morfología de la red mitocondrial lo que podría generar un aumento en la fisión presentando una forma alargado y por ultimo un incremento en la apoptosis (koopman *et al.*, 2005). Esta morfología alargada de red mitocondrial se produce en las células SiHa expuestas al extracto acuoso de

granada del presente trabajo, para detectar estos cambios en la morfología de la mitocondria se utilizó el colorante fluorescente MitoTracker Red CMXRos (MTR) perteneciente a la familia de moléculas rosamina las cuales poseen la ventaja de ser retenidas por la fijación celular del formaldehido, estas tienen una alta sensibilidad a los cambios en los valores del potencial hídrico, los cuales se registran de una manera cualitativa ya que la emisión de fluorescencia estará dada por los cambios en el valor del potencial hídrico. La mayoría de los tintes fluorescentes convencionales tienden a ser eliminados fácilmente de las células una vez perdido el potencial de membrana, sin embargo, los MitoTracker se desarrollaron para superar esta limitante, ya que son permeables a las células y se difunden pasivamente a través de la membrana plasmática que se acumulan en las mitocondrias activas, conteniendo tiol clorometil siendo este el responsable de mantener el colorante asociado con las mitocondrias (Cottet *et al.*, 2011).

Conclusiones

Se reporta que la granada (*Punica granatum*) contiene metabolitos secundarios en su cascara como: fenoles, flavonoides, cumarinas y quinonas.

El extracto acuoso de granada puede provocar daños en el metabolismo celular de la línea celular de carcinoma de cuello uterino (SiHa)

El extracto de granada puede provocar apoptosis en la línea celular de carcinoma de cuello uterino (SiHa).

Bibliografía

Adolfo, E.G. (2002). Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis. *Revista Argentina de Anestesiología*. 60, 6: 391-401.

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K. Jhonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2011). *Introducción a la Biología Celular*. Editorial medica Panamericana. tercera edición: pp. 900.

Almonte, M., Murillo, R., Sánchez, G., Jeronimo, J., Salmeron, J., Ferreccio C. Lazcano, P. E., Herrero. R. (2010). New paragims and challenges in cervical cancer prevention and control in Latin America. *Salud Pública*. 52:544-559.

Alonso, C.A.J., Carranza, A.C., Maldonado, M.J.J., Jacobo, S.M., Quezada, R.D.A., Lorenzo, M.H. (2011). Zootherapeutic practices in Aquismón, San Luis Potosí, Mexico. *Journal of Ethnopharmacolog*. 133-902-6.

American Cancer Society. (2016). *Treating Cervical Cancer*. Información tomada de: <https://www.cancer.org/>.

Amin, A.,Gali, M, H., Ocker, M., & Scheneider, R. (2009). Overview of major classes of plant derived anticancer drugs. *International journal of biomedical science*: 5(1), 1-11.

Anajwala, C.C., Patel, R.M., Dakhara, S.L & Jariwala, J.K. (2010). In vitro cytotoxicity study of agave americana, strychnos nuxvomica and areca catechus extracts using mcf-7 cell line. (2), 245-252.

Anaya, A, L. & Espinosa-G, F. (2006). La química que entreteje a los seres vivos. *Ciencias*. PP 11.

Avalos, G.A. & Pérez,.U.C.E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca serie fisiología vegetal*. 2 (3) 119-145.

Beecher, G.R. (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, ocurrence and intake. *The Journal of Nutrition*. 133.

Bernanrd, H.U., Burk, R.D., Chen, Z., Doorslaer, V.K., Hausen, Zur. & Villiers, E.M. (2010). Classification of papilomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 401.70-9.

Bors, W., Heller, W & Christa M. (1990). Flavonoids as antioxidant: determination of radical scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*.186:343-355.

Bosch. F.X., Lörincz, A., Muñoz, N., Meijer, C.J. & Shah, K.V. (2002). The causal relation between human papilomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 55.244-65.

Bruneto, J. (2001). *Pharmacognosie Phytochimie. Plantes medicinales*. Francia. Lavoisier.

Burgues, C.J.P., Moreno, P.J.L., Vera, D.C.C., Jimenez, C.J.F & Ozonas M.M. (2005). Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cancer superficial de vejiga. *Actas Urologicas españolas*. Ed. 29 no.9

Camargo, M., Wiesner, C., Diaz, C., Tovar, L., (2004). El cáncer: Aspectos básicos sobre su biología, clínica, prevención, diagnóstico, y tratamientos. Instituto Nacional de Cancerología. República de Colombia.

Cameron, R. (1995). *Oncología práctica*. Editorial Médica Panamericana, 769pp.

Campbell, N.A., Urry, L., Reece, J.B. (2010). *Biología*. Editorial Médica Panamericana. Madrid España. Septima edición. Pp 221.

Carrion, J.A.V., Candida, R.G.G. & Wilches, A.I. (2010). Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia metódica. Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias Químicas. Universidad de Cuenca.

Cartaya, O., Reynaldo, I. (2001). Flavonoides características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*. 22, 2. 5-14.

Cooper, G.M. (1999). *The cell, a molecular approach*. Washington ASM Dress and Sinauer Associated. 1191-205.

Cottet, R. C., Ronot, X., Leverage, X. & Francois, M, J. (2011). Cytometric Assessment of mitochondria using fluorescent probes. *International Society for Advancement of Cytometry*. 79^a: 405-425.

Diez, J. (2000). Apoptosis en enfermedades cardiovasculares. *Revista Española de Cardiología*. España: 53(2): 267-74.

Enzo Life science. (2008). Polyphenols: Flavonoids-Stilbenoids-Phenolic Acids. [Figura]. Recuperado de http://www.biolinks.co.jp/pdf/catalog_polyphenol_np_final%5B1%5D.pdf

Fabricant, D.S & Farnsworth. The value of plants used in traditional medicine for drug Discovery. *Environmental health perspectives*. Ed. 109 (1).

Fajardo, R. A., Arroyo, R.A. & Ramírez, N.J.S. (2016). Extracción de flavonoides totales de la envoltura externa de cebolla roja (*Allium cepa*). *UGCiencia*. 22, 119-126.

Flores, Y., Bishadi, D., Lazcano, E., Shah, K. Lorincz, A., Hernandez, M. & Salmerón, J. (2003). Improving cervical cancer in Mexico: results from the Morelos HPV study. *Salud Publica de México*. 45. 388-98.

Fresco, P. (2006). New Insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medical Research Reviews*. 26. 747.

Fumagalli, M., Rosiello, F., Mondello, C. Fagagna. C.D.F. (2014). Stable Cellular Senescence Is Associated with Persistent DDR Activation. *Plus one* 9 (10).

Garza, S.J.G, Juarez, S, P. (2014). El cáncer. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Garza, S.J.G., Morales, V.F. & Meneses, G.A. (2017). Cervical Cancer. United States. Springer Cham. PP: 286.

Gil M.I., Barberan, T.F.A., Pierce, H.B., Holcroft, D.M & Kader, A.A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate Juice and its relationship whit phenolic

composition and processing. *Journal of Agriculture Food Chemistry*.48(10): 4581-4589.

Ghali, W., Vaudry, D., Jouenne, T. & Marzouki, M.N. (2014). Extracts from medicinal plants inhibit cancer cell proliferation, induce apoptosis in ovary, lung and neuronal cancer cell lines. *Cancer & metabolism*. 21. 2. (1).

GLOBOCAN. (2018). Cervix Uteri [Figura].Recuperado de <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/23-Cervix-uteri-fact-sheet.pdf>

Golsteins, P. & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical science*. 32. 37-43.

GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows. GraphPad Software, San diego, California, EE. UU., Wwww. Graphpad.com

Grillo, C., Martínez, M. & Morales, B. (2008). Virus del papiloma humano: Aspectos moleculares y de cáncer de cérvix. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología*. 59(4).310-315.

Hansakul, P., Aree, K., Tanochit, S. & Itharat, A. (2014). Growth arrest and apoptosis via caspase activation of dioscoreanone in human non-small-cell lung cancer A549 cells. *Biomedical central complementary and alternative medicine*. 14(1):413.

Hartwell, J.L. (1982). *Plants Used Against Cancer*. Quarterman Pub. 710 pp.

Hu, M. (2007). Bioavailabilityof flavonoids and polyphenols: call to arms. *Molecular Pharmaceutics*. 4 pp. 803.

Iracheta, A. (2007) El suicidio y la muerte celular. [Figura]. Recuperado de <http://www.rac.es/ficheros/doc/00553.pdf>

Itoh, G., Tamura, J. Suzuki, M. Suzuki, Y. Ikeda, H. & Kokike, M. (1995). DNA Fragmentation of human infarcted myocardical cells demonstrated by the Nick end labeling method and DNA agarose gel electroforeses. 146. 1325-1331.

Jiménez, M. 2007. Cadenas productivas agropecuarias y acuícolas del estado de Puebla. *Gobierno del estado de Puebla*. Ed. 1: Puebla México.

Khwairakpam, A., Bordoloi, D., Thakur, K., Javadi, M., Arfuso, F., Sethi, Gautam, M., Mishra, S., Alan, K., & Kunnumakkara, A. (2018). Possible use of púnica granatum (pomegranate) in cancer therapy. *Pharmacological Research*.

Kinghorn, A.D., Fong, H, H, S., Farnsworth, N,R., Mehta, R,G., Moon, R.C., Moriarty, R,M, & Pezzuto, J.M (1998). Cancer chemopreventive agents discovered by activity guided fractionation: Current organic chemistry. 597-612.

Klermund, B.K., Luke, B. (2014) High Nutrient Levels and TORC1 Activity Reduce Cell Viability Following Prolonged Telomere Dysfunction and Cell Cycle Arrest. *Cell reports* 9(1) : 324-35.

Kuangyu, L.I., Zeng, M., Qlaoling, L & Benhong, Z. (2019). Identification of polyphenolic composition in the fruits of rubus chingii Hu and its antioxidant and antiproliferative activity on human bladder cancer T24 cells. *Springer Cham*, 13 (1). 51-60.

Lansky, E. P. y Newman, R. A. 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*. 109:177-206.

Larvik, N.I. (2013). *Systems Biology of Apoptosis*. Springer. New York. pp 211.

Lim, T.K. (2013). *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. Canberra: Springer, Cham.

Lizarraga, C., Aguilar. G. & Heredia. José. (2018). Propiedades Antioxidantes e inmunoestimulantes de polifenoles en peces carnívoros de cultivo. [Figura]. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=441955208010>

López, S. y Lizano, S. (2006). Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina, *Cancerología*. 1(1):31-55.

López, S. y Lizano, S. (2006). Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina [Figura]. Recuperado de <http://incan-mexico.org/revistainvestiga/elementos/documentosPortada/1172193073.pdf>

Lopez. M.O.A., Lopez. M.A & Palou. E (2010). Granada (*Punica granatum* L): una fuente de antioxidantes de interés actúa. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*. Ed. 4. Pp: 64-73.

Lotito, S.B & Frei, B. (2006). Consumption of flavonoid rich foods and increased plasma antioxidant capacity in human: cause consequence or epiphenomenon? *Free Radical Biology and Medicine*. 41. 1727.

McCarthy, N., (2001). Apoptotic proteins p53 and c-myc related pathways. *Cardiology clinic*; 19:75-89.

Madrigal, C.S., Rodriguez,G., Krueguer, C.G.,Dreher, M & Reed, J.D. (2009). Pomegranate (*Punica granatum*) supplements: authenticity, antioxidant and polyphenol composition. *Journal Functional foods*. 1(3):324-329.

Majno, G. & Jorris I. (1995). Apoptosis and necrosis. *The American Journal of Pathology*.146. 3-15.

Marcano, D. & Hasegawa. (2002). Fitoquímica orgánica. Editorial Torino. Ed. (2). Pp; 551.

Matito, C., Mastorakou, F., Centelles, J.J., Torres, J.L & Cascante, M. (2003). Antiproliferative effect of antioxidant polyphenols from grape in murine Hepa-1c1c7. *Springer charm*. 42(1). 43-49.

Martinez,M & Sanchez, S.L. (2013). Efecto antitumoral del fitoesteroide Diosgenina-3-glu en líneas celulares de cáncer cervicouterino: HeLa, Caski y ViBo. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores. Universidad Autónoma de México.

Mignolet, A., Wood, B.R & Goormaghtigh, E. (2017). Intracellular investigation on the differential effects of 4 polyphenols on MCF-7 breast cancer cells by Raman imaging. *Analyst*.

Miyashita, T. & Reed J. (1993). Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood*. 81. 151-157.

Mondragón, J. C. (2010). Comunicación personal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Programa Nopal y Frutales. Campo Experimental. Guanajuato México.

Morton, J. (1987). Pomegranate, Morton, J.P. D. *Fruits of warm climates*. Miami, FL. pp. 352-355.

Narvas, C.M., Alfonso, A.E.L., Guerra, R.I. (2009). Apoptosis muerte celular programada. Aspectos generales y su relación con las enfermedades cardiovasculares. *CorSalud*. España: 1 (2).

Nayar, R. & Wilbur. D.C. (2015). *The Bethesda System for reporting cervical cytology*. New York: Ed 3. Springer.

Newman, J, D., Cragg, M, G. (2007). Natural products as source of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*, 70, 461-477.

Pan, S, Y., Zhou, S, F., Gao, S.H., Yu, Z.L., Zhang, S.F., Thang, M.K. (2013). New perspectives on how discover drugs from herbal medicines: CAMS outstanding contribution to modern therapeutics. *Evidence based complementary and alternative medicine*. PP 25.

Pande, G. & Akoh, C.C. (2009). Antioxidant capacity and lipid characterization of six Georgia-Grown pomegranate cultivars. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 57(20):9427-9436.

Peña, N.B.R., Morejón, R.Z., García, H. I.A. & Morón, R.F. (2008). Estandarización y tamizaje fitoquímico de extractos de frutos de *Punica granatum* L. *Revista cubana de plantas medicinales*. 13(4).

Peralta, Z.O., Bahena, R.M., Diaz, B.C.E. & Madrid, V.M. (1997). Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer perspectivas terapéuticas. *Salud Publica de México*. Ed. 39: 5. Pp: 451-462.

Ramírez, A.E.M. & Rojas, L.M. (2010). La necrosis un mecanismo regulado de muerte celular. *Revista IATERIA*. 23(2). 166-177.

Ramawat, K.G. (2007). Secondary metabolites in nature. *Science Publishers*, Enfield CT. pp. 21.

Rengifo, P.R.A. (2013). Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propelos. *Pharmaciencia* . 1 (2).

Rolim, P.M., Fidelis, G.P., Padilha, C.E.A., Santos, E.S., Rocha, H.A.O & Macedo, G.R. (2018). Phenolic profile and antioxidant activity from peles and seeds of melon (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus*) and their antiproliferative effect in cancer cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 51(4).

Sajc, L., Grubisic, D. & Vunjak, Novakovic, G. (2000). Biorreactors for plant engineering: an Outlook for further research, *Biochemical Engineering Journal*. 4, 89-99.

Sarker, S.D., Latif, Z., & Gray, A.I (2005). *Natural products Isolation*. United States: Humana press.

Schultes, R. (1981). El legado de la medicina popular. Blume, Madrid. 249 p.

Sepúlveda, J, Porta, D, H & Rocha, S, M Participación de los metabolitos secundarios en la defensa de plantas. *Revista Mexicana de fitopatología*. Ed 21. pp 355-363.

Sheets, M. D., Du Bois, M.L y Williamson, J.G. (2009). La granada en florida. Departamento de ciencias hortícolas, Univeristy of florida.

Suárez, N. Gil, C.G., Marco, A.M., Trinidad, P. (2007) Tratado de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello. Madrid España. Editorial Médica panamericana; pp. 247.

Tobón, A.C.N., Vargas, O.R & Garcés. GF.L. (2015). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) variedad

castillo. Facultad de ingenierías. Corporación universitaria Lasallista. Tesis de Magister en innovación alimentaria y nutrición.

Torres, P.K.J., Cruz, V.A. y Madrid, M.V. (2014). Epidemiología del Cáncer Cervicouterino. *Gaceta Mexicana de Oncología*. (Sociedad Mexicana de Oncología). 13. Ed.4: 4-17.

Verde-S, M, J, García G, S, & Rivas-M. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. Omniascience. Nuevo León México. 450 pp.

Vlietinck, A.J., Vanden, B.D. & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro "proof of concept". *Journal of Ethnopharmacology*. 106. 290-302.

Weckesser, S & Engel, K & Simon-Haarhaus, B & Wittmer, A & Pelz, Klaus & Schempp, C. M. S. (2007). Screening of plant extract for antimicrobial activity against bacteria and yeast with dermatological relevance. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 14.

Vanlangenakker. N., Berghe, T.V., Krysko. D.V., Festejens, N. & Vandenabeele. P. (2008). Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Current Molecular Medicine*. 8. 207-220.

Vidal, C.D.J. & Climent, O.J. (2012). Organocatalizadores bifuncionales basados en líquidos iónicos para la síntesis de heterocíclon en reacciones compatibles con la química verde. Instituto de Tecnología Química. Universitat Politècnica de València. Tesis de maestría.

World Health organization. (2012). Cáncer facts. Información tomada de <https://www.who.int/cancer/about/facts/es/> .

World Health organization. (2019). Cancer facts. Información tomada de <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/cervical-cancer/en/>.

Xavier, L., Freire, M.S., Vidal, T.I., Gonzales, A.J. (2015). Application of aqueous two phases systems based on polyethylene glycol and sodium citrate for the recovery

of phenolic compounds from *Eucalyptus* Wood. *Maderas ciencia y Tecnología*. 17(2): 345-354.

Yang, J., Jing, F. & Bingxing, L. (2017). Apoptosis induction of epifriedelinol on human cervical cancer cell line. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines: AJTCAM*. 14(4). 80-86.

Yan, Y., Hein, A.L., Etekpo, A., Burchett, K.M., Lin, C., Enke, C.A., Bastra, S.K., Cowan, K.H. & Ouellette M.M. (2014). Inhibition of RAC1 GTPase sensitizes pancreatic cancer cells to g-irradiation. *Oncotarget*.

