



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA**  
**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**MAESTRIA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE *Calendula officinalis* SOBRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE MARCADORES TUMORALES EN CÁNCER DE PULMÓN”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR**

**PRESENTA:**

**IBT. MIGUEL ESPINOZA LAPARRA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dra. Paula Ma. Figueroa Arredondo  
Dra. Irene Mendoza Lujambio**



**México, D.F. 2011**



**Asesores:**

**Dra. Laurence Annie Marchat Marchau**

**M. en C. Ana Laura Luna Torres**

**Dr. Cesar A. Sandino Reyes López**

**E**sta tesis se realizó en el laboratorio de Microbiología Molecular, de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Paula Ma. Figueroa Arredondo y la Dra. Irene Mendoza Lujambio.

Durante el desarrollo de este proyecto se contó con la beca de maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) registro 335676, con la beca del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del I.P.N., como parte de los proyectos con clave: SIP- 20091416, SIP-20101632, SIP-20101157 y SIP-20111231. Y dentro del marco del Megaproyecto de Cáncer.

# ***Agradecimientos***

- ❖ Agradezco a dios por estar en cada momento de mi vida y por la culminación de esta meta.
- ❖ A la Dra. Paula Figueroa Arredondo por su apoyo incondicional en todo momento, por darme entusiasmo y conocimiento, por ser un pilar importante en el desarrollo de mi proyecto, por la confianza y por la amistad incondicional. Gracias!
- ❖ A la Dra. Irene Mendoza Lujambio por su apoyo en el desarrollo de este proyecto, por la confianza y amistad incondicional. Gracias!
- ❖ A mi querida maestra Ana Laura Luna Torres por brindarme su conocimiento, apoyo y enseñarme a mirar las cosas de una forma bonita. Gracias!
- ❖ A los Doctores que forman parte de mi comité: La Dra. Laurence A. Marchat Marchau, el Dr. Cesar Augusto Sandino Reyes gracias por haberme brindado un poco de su tiempo, entusiasmo y conocimiento.
- ❖ A mis amigos de Generación: Denis, Ana Laura, Rita, Ivan y Raul, gracias por su amistad y apoyo incondicional.
- ❖ A la Dra. Luz María Barajar por apoyarme en el inicio de este proyecto y por su amistad. Gracias
- ❖ Y a todas personas que día a día me demostraban su amistad y cariño, a todos ellos mil Gracias.

# ***Dedicatoria***

Dedico esta tesis a mi familia:

- ❖ A mi mamá que siempre está en todo momento que la necesito.
- ❖ A mi papá que siempre me orienta con sus consejos sabios
- ❖ A mis tíos y prima que siempre han estado en todo momento. Gracias
- ❖ A mi bella princesa Daniela que cada día me inspira a seguir adelante
- ❖ A mis queridas hermanas que son parte importante en mi vida.
- ❖ A mis sobrino por alegrarme todas las tardes y a mi querido primo Jorge por su apoyo incondicional, Gracias

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>II</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>III</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>V</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1    Cáncer	1
1.1.1    Epidemiología del Cáncer	3
1.1.2    Epidemiología del Cáncer a nivel mundial	3
1.1.3    Epidemiología del Cáncer a nivel nacional	5
1.2    Cáncer de pulmón	7
1.2.1    Marcadores tumorales de cáncer de pulmón	10
1.3    Tratamientos para el cáncer de pulmón	10
1.3.1    Cirugía	11

1.3.2	Radioterapia	11
1.3.3	Quimioterapia	11
1.3.4	Medicina tradicional	13
1.3.1	Uso de marcadores tumorales	14
1.3.2	Canales iónicos como marcadores moleculares de cáncer	
<b>2.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>15</b>
2.1	Antitumorales de origen natural	16
2.2	<i>Calendula officinalis</i>	17
2.3	Canal KCNMA1 como marcador tumoral	20
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>23</b>
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>24</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
5.1.	Objetivo general	24
5.2.	Objetivo específico	24
<b>6.</b>	<b>ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL</b>	<b>25</b>

<b>7.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
7.1.	Recolección de la planta	26
7.2.	Preparación del extracto hidroalcohólico a partir de pétalos de <i>Calendula officinalis</i>	26
7.3	Cultivo celular	26
7.4	Ensayos de viabilidad	27
7.4.1	Procedimiento de la técnica de MTT	27
7.5.0	Detección de la apoptosis por Anexina V-FITC	28
7.5.1	Procedimiento	28
7.6.0	Determinación de la proliferación celular por Inmunocitoquímica de PCNA	29
7.6.1	Procedimiento	29
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>31</b>
8.1.	Recolección y elaboración del extracto hidroalcohólico de <i>Calendula officinalis</i>	31
8.2	Ensayos biológicos	32
8.3	Estandarización de la técnica de MTT	32
8.4	Evaluar el efecto del extracto hidroalcohólico de <i>Calendula officinalis</i> sobre la viabilidad celular de la línea celular A549 de adenocarcinoma de pulmón	34

8.5.	Efecto del extracto hidroalcohólico de <i>Calendula officinalis</i> sobre la proliferación celular de la línea celular A549 de adenocarcinoma de pulmón	38
8.6	Evaluar el efecto del extracto hidroalcohólico de <i>Calendula officinalis</i> sobre la muerte celular programada en la línea A549.	39
8.7	Evaluar el efecto del extracto hidroalcohólico de <i>Calendula officinalis</i> frente al reto con Taxol en la línea celular A549.	40
8.8	Evaluar el efecto de un inhibidor específico del canal KCNMA1 sobre la viabilidad celular en la línea A549 de adenocarcinoma de pulmón	46
9.	<b>DISCUSIÓN</b>	49
10.	<b>CONCLUSIONES</b>	58
11.0	<b>PERSPECTIVAS</b>	59
12.0	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	60

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>		<b>Página</b>
Figura 1.-	Capacidades adquiridas del cáncer	3
Figura 2.-	Distribución de las cinco causas principales de mortalidad	4
Figura 3.-	Tipos de Cáncer con Mayor Incidencia en Ambos Sexos	5
Figura 4.-	Porcentaje de defunciones generales y por sexo causadas por tumores malignos entre los años 1998-2008	6
Figura 5.-	Distribución porcentual de las principales causas de defunción por tumores maligno según sexo. 2007	7
Figura 6.-	Anatomía y característica de los pulmones	8
Figura 7.-	Cáncer de pulmón	9
Figura 8.-	<i>Calendula officinalis</i>	17
Figura 9.-	Compuestos químicos del extracto hidroalcohólico de <i>Calendula officinalis</i>	18
Figura 10.-	Localización del gen <i>KCNMA1</i>	21
Figura 11.-	Diagrama General de la metodología a seguir	25
Figura 12.-	Extracto hidroalcohólico de <i>Calendula officinalis</i> liofilizado	31
Figura 13.-	Línea celular A549 (ATCC: CCL-185) y la Línea MRC-5 (ATCC: CCL-171)	32
Figura 14.-	Determinación del número de células óptimo para la realización de los ensayos de viabilidad	33
Figura 15.-	Efecto del extracto hidroalcohólico de <i>Calendula officinalis</i> sobre la viabilidad celular de la línea A549.	35
Figura 16.-	Efecto del extracto hidroalcohólico de <i>Calendula officinalis</i> sobre la viabilidad celular de la línea MRC-5.	37
Figura 17.-	Efecto del extracto hidroalcohólico de <i>Calendula officinalis</i> sobre la proteína PCNA.	38
Figura 18.-	Ensayos con Anexina V para determinar inducción de apoptosis	39
Figura 19.-	Ensayos con Anexina V.FITC para determinar inducción de la apoptosis en la línea A549.	40
Figura 20.-	Efecto de la combinación del extracto hidroalcohólico de <i>Calendula officinalis</i> más Taxol (50 nM) sobre la viabilidad celular de la línea A549	42

<b>Figura 21.-</b>	<b>Efecto de la combinación del extracto hidroalcohólico de Calendula officinalis más Taxol (50 nM) sobre la viabilidad celular de la línea A549</b>	<b>43</b>
<b>Figura 22.-</b>	<b>Ensayos con Anexina V para determinar inducción de apoptosis</b>	<b>44</b>
<b>Figura 23.-</b>	<b>Efecto de la combinación del extracto hidroalcohólico de Calendula officinalis más Taxol (50 nM) sobre la viabilidad celular de la línea MRC-5</b>	<b>46</b>
<b>Figura 24.-</b>	<b>Efecto de un inhibidor específico del canal KCNMA1 sobre la viabilidad celular de la línea A549.</b>	<b>47</b>
<b>Figura 25.-</b>	<b>Efecto de un inhibidor específico del canal KCNMA1 sobre la viabilidad celular de la línea MRC-5.</b>	<b>48</b>

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>		<b>Página</b>
<b>Tabla 1.-</b>	<b>Fármacos antitumorales utilizados en el tratamiento del Cáncer y su mecanismo de acción</b>	<b>13</b>

## ABREVIATURAS

<b><i>C. officinalis</i></b>	<i>Calendula officinalis</i>
<b>DMEM</b>	Dubelco´s Modified Eagle Medium, Gibco
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfoxido
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
<b>MTT</b>	3-(4-5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5 difeniltetrazolio
<b>NSCLC</b>	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OPS</b>	Organización Panamericana de Salud
<b>PCNA</b>	Antígeno Nuclear de Células en Proliferación
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>SCLC</b>	Cáncer de pulmón de células pequeñas
<b>UNAM</b>	Universidad Nacional Autónoma de México

## Resumen

El Cáncer es una enfermedad que se caracteriza por una proliferación celular descontrolada con altos índices de mortalidad y es un problema importante de salud a nivel mundial. En México fue la segunda causa de muerte en el 2010. Debido a la importancia de la enfermedad, actualmente existen quimioterapias enfocadas a la eliminación de células tumorales. Nuestro grupo de investigación ha realizado la búsqueda sistemática de agentes antitumorales de origen natural, que presenten actividad citotóxica con mayor eficacia en líneas celulares de origen tumoral y probablemente con menores efectos secundarios. Derivado del conocimiento de que plantas como *Calendula officinalis* han sido utilizadas de manera tradicional para el tratamiento de algunos padecimientos, entre ellos se considera su posible efecto antitumoral. En búsqueda de nuevos principios activos antitumorales se decidió evaluar un probable efecto inhibidor de la proliferación en el extracto hidroalcohólico de *Caléndula* sobre dos líneas celulares: la línea celular A549 de adenocarcinoma de pulmón y la línea MRC-5 de pulmón normal inmortalizado. Para determinar cambios en la viabilidad se realizaron ensayos de MTT en ambas líneas, los resultados indican que el extracto de *Caléndula* por sí solo, induce un incremento de la viabilidad del 40% sobre la línea A549 y la viabilidad no cambia en la línea MRC-5. En los ensayos de proliferación mediante la identificación de un marcador nuclear que se sintetiza en la fase de G1 y S del ciclo celular, la proteína PCNA, los resultados mostraron que en la línea A549 el extracto induce proliferación celular. Así mismo se realizó la técnica de Anexina V, se observó que el extracto por sí solo no induce apoptosis. Consecutivamente se realizaron experimentos para observar si el efecto del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* coopera o interfiere con el efecto de un fármaco antitumoral de elección en cáncer de pulmón, como lo es Taxol. Los resultados mostraron que al realizar los experimentos empleando la mezcla del extracto de *Caléndula* + Taxol al mismo tiempo, los efectos citotóxicos son más eficientes que al usar el Taxol por sí solo y los resultados pueden observarse a tiempos más cortos (3-6 h). Además el tratamiento es capaz de inducir apoptosis en las células A549 de origen tumoral, pero no en la línea MRC-5. En conclusión mientras el extracto de *Caléndula* por sí solo, induce un incremento en la proliferación celular, combinado con el antitumoral Taxol sorprendentemente induce citotoxicidad y se potencia el efecto de inducción de la apoptosis. La presencia de flavonoides con actividad antioxidante y pro-oxidante, contenidos en el extracto hidroalcohólico puede ser el principio que explique este resultado. Por otra parte al evaluar una probable alteración de la proliferación usando inhibidores del canal *KCNMA1* se observó que los ensayos de viabilidad realizados en ambas líneas celulares, en presencia del inhibidor específico del canal *KCNMA1* (Caribdotoxina), no mostraron cambios significativos que sugieran una modulación de la viabilidad atribuible al canal.

## ABSTRACT

Cancer is a disease characterized by uncontrolled cellular growth with high mortality rates and it is an important health problem around the world. In Mexico is considered the second cause of death. Therefore, currently there are several strategies based in chemotherapy, aimed to eliminating the tumor cells. Our research group has conducted a systematic discovery search for anticancer agents of natural origin showing cytotoxic activity on tumor cells, and probably they would be more effective diminishing side effects. Previous knowledge stating that plants such as *Calendula officinalis* have been used traditionally for the treatment of several diseases, we found that *Calendula* is considered to have antitumor effects. In search for innovative antitumor activities, we decided to search for a probable growth inhibition of *Calendula* hydroalcoholic extract on two cell lines: A549 from small cells lung adenocarcinoma and MRC-5 a non tumoral but immortalized pulmonary cell line. In order to determine changes in viability, MTT assays were performed, our results indicate that the *Calendula* extract alone, induces an increase of 40% viability on the A549 cells and does not induce changes in viability assays using MRC-5 cells. Proliferation assays were performed through the identification of a nuclear marker the protein PCNA, synthesized during cell cycle stages from G1 to S. PCNA detection results showed that the extract induces cell proliferation on A549. Also, Annexin V assays were performed and hydroalcoholic extract *Calendula* alone did not induce apoptosis. Besides, *Calendula* and Taxol were tested together in order to determine whether the combined treatment would cooperate or interfere with the basal cytotoxic effect of this antitumor drug (of choice in lung cancer). Results from combined treatments showed that the cytotoxic effect turns out to be more efficient than when using Taxol alone and cell changes are observed sooner (after 3-6 h of treatment). In addition, combined treatment induces apoptosis in A549 cells derived from cancer, while in the immortalized but non transformed lung cell line MRC-5, not any effect was observed. The above experimental work allows us to conclude that while the extract of *Calendula* alone induced cell proliferation and not apoptosis, the combined treatment with Taxol, surprisingly induces cytotoxic and apoptotic effect, differentially in A549 cells from tumor origin. Perhaps the *Calendula* hydroalcoholic extract's content of flavonoids with antioxidant and pro-oxidant activity have something to do with the enhancement of cytotoxicity and apoptosis observed in our experiments. In the other hand the viability assays performed in both cell lines, using the channel-specific inhibitor KCNMA1 (charybdotoxin) showed no significant changes, suggesting that there is no modulation of cell proliferation after treatments using the *KCNMA1* channel inhibitor.

# 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad nuestro país está enfrentando numerosos retos, uno de ellos la salud, debido a las diversas enfermedades que aquejan a la población, como lo es el cáncer el cual está causando un incremento en la tasa de mortalidad no solo en nuestro país sino a nivel mundial, por ello existe la necesidad de encontrar nuevas alternativas para su tratamiento.

## 1.1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad crónico-degenerativa que tras la exposición prolongada a factores de riesgo tanto químicos, físicos, ambientales o genéticos, conlleva a la proliferación celular descontrolada, evasión de la apoptosis, aumento de células indiferenciadas y a la invasión o metástasis a tejidos u órganos vecinos (Pearce *et al.*, 1992, Colotta *et al.*, 2009).

Las células cancerosas tienen defectos en los circuitos reguladores que gobiernan la proliferación celular normal y la homeostasis. Hay más de 100 distintos tipos de cáncer y subtipos de tumor que se pueden encontrar dentro de órganos específicos. El vasto catálogo de los genotipos de las células cancerosas es una manifestación de siete alteraciones esenciales en la fisiología celular, que en conjunto determinan el crecimiento maligno o contribuyen a su proliferación; como son la autosuficiencia en las señales de crecimiento, la insensibilidad a señales contra el crecimiento, la evasión de la muerte celular programada (apoptosis), el potencial de replicación ilimitada, la angiogénesis sostenida, la invasión tisular y la metástasis, así como la existencia de un microambiente inflamatorio (Fig. 1). Se ha planteado que la mayoría de las neoplasias adquieren el mismo grupo de capacidades funcionales durante el proceso carcinogénico (Douglas *et al.*, 2000; Collota *et al.*, 2009).

En el cáncer, el organismo produce un exceso de células malignas (conocidas como cancerígenas o cancerosas), con crecimiento y división más allá de los

límites normales, (invasión del tejido circundante y a veces metástasis). La metástasis es la propagación a distancia, se puede dar por vía fundamentalmente linfática o sanguínea, de las células originarias del cáncer, y el crecimiento de nuevos tumores en los lugares de destino de dicha metástasis. Además, las células cancerígenas adquieren displasias leves, moderadas y graves, hasta llegar a un carcinoma invasivo (Douglas *et al* 2000, Johnson *et al* 1991).

El oxígeno y los nutrientes suministrados por el sistema vascular son cruciales para el funcionamiento celular y la supervivencia, obligando a prácticamente todas las células de un tejido a residir a menos de 100 ml de sangre, las células neoplásicas crean su propio mecanismo de nutrición formando factores de angiogénesis. Éste es un proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes, para tener una mayor capacidad de expansión, con el fin de proliferar (Bouck *et al.*, 1996, Folkman *et al.*, 1971 y 2004, Douglas *et al.*, 1996 y Hou *et al.*, 2004).

Existen varios tipos de cáncer, los cuales adoptan su nombre del tejido en el cual se desarrollan, por ejemplo los sarcomas, son neoplasias malignas que aparecen tanto en tejido mesenquimatoso como en derivados de éstos, los carcinomas son cánceres de origen epitelial y los epitelios que hay en el organismo proceden de las 3 capas germinales. Existen además las neoplasias compuestas por el tejido conjuntivo como los fibromas, fibrosarcomas, lipomas y condrosomas, entre otros, y las derivadas del endotelio como los hemangiomas y angiosarcomas. (Ramzi *et al.*, 2000).

La detección clínica de un tumor ocurre, por lo general, en fases avanzadas y según las estadísticas a nivel mundial es incontrolable y fatal en la mayoría de los casos que se presentan. (Moolgavkar *et al.*, 1978, Pearce *et al.*, 1992).



**Figura 1.-Capacidades adquiridas del cáncer.** Se sugiere que la mayoría de las neoplasias adquieren el mismo grupo de capacidades funcionales durante su desarrollo (Modificación de Colotta *et al.* 2009).

### 1.1.1 Epidemiología del Cáncer

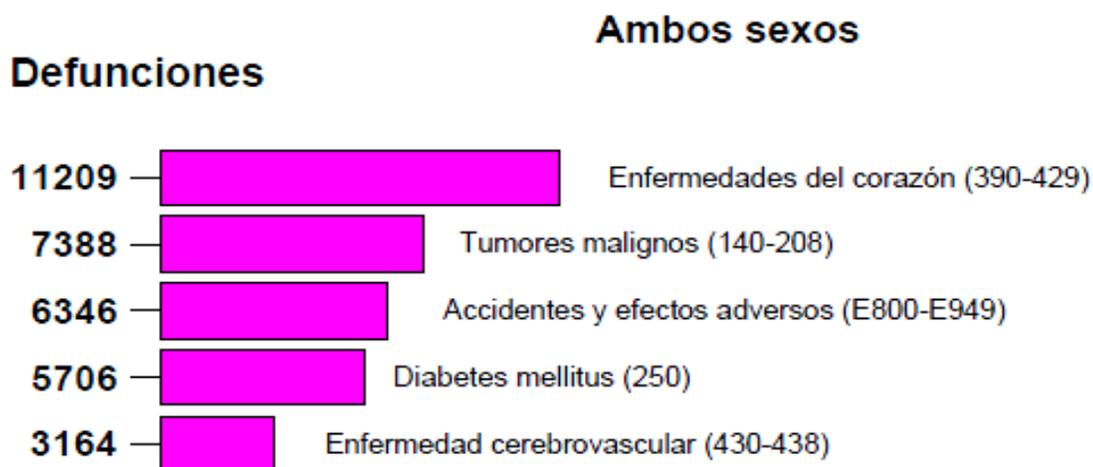
### 1.1.2. Epidemiología del Cáncer a nivel mundial

En la mayor parte de los países desarrollados, el cáncer es la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares, y los datos epidemiológicos muestran el comienzo de esta tendencia en el mundo menos desarrollado, en particular en los países «en transición» y países de ingresos medianos, como América del Sur y Asia (OMS, 2010).

El cáncer es uno de los principales problemas de salud y el número total de casos está aumentando en todo el mundo. Se prevee que, a nivel mundial, la mortalidad por cáncer aumentará un 45% entre 2007 y 2030 (pasará de 7,9 millones a 11,5 millones de defunciones), debido en parte al crecimiento demográfico y al envejecimiento de la población. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que durante el mismo periodo el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11,3 millones en 2007 a 15,5 millones en 2030 (OMS, 2010).

Cada año mueren en el mundo 4, 000, 000 de personas por cáncer, si la tendencia actual continúa, pronto esta enfermedad será la primera causa de muerte (Chávez

*et al.*, 1997). En la Figura 2 se observa la mortalidad proporcional para las cinco principales causas de muerte por causas definidas en la región de la frontera de México y los Estados Unidos (OMS, 2000). En la gráfica se puede observar que las neoplasias malignas constituyen la segunda causa de fallecimiento. Dentro de las neoplasias de mayor incidencia se encuentra el cáncer de pulmón como la primera causa de muerte a nivel mundial.



**Figura 2.- Distribución de las cinco causas principales de mortalidad. 2000-2005.** Los tumores malignos son la segunda causa de muerte principal a nivel mundial después de las enfermedades del corazón.

El cáncer de pulmón es uno de los mayores retos médicos con casi 1.5 millones de nuevos casos en todo el mundo en desarrollo (Spiro *et al.*, 2010). Es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo con un estimado de 160.390 muertes en los Estados Unidos, tan sólo en 2007 (Jemal *et al.*, 2007). La enfermedad es en gran parte prevenible, debido a que la mayoría de los casos se deben al tabaquismo. Sin embargo, las estadísticas mundiales estiman que el 25% de los casos de cáncer de pulmón en hombres y mujeres no son atribuibles al tabaquismo. Si se considera una categoría separada, el cáncer de pulmón en no fumadores es la séptima causa más común de muertes por cáncer en el mundo, antes del cáncer de cérvix, páncreas y próstata (Sun *et al.*, 2007). Asimismo en las estadísticas del 2010, la Sociedad Americana del Cáncer señala que el cáncer de pulmón es la principal causa de muertes en hombres y mujeres: en hombres,

ocupa el 28% de incidencia, seguido por el cáncer de próstata y cáncer de colon/recto. En Mujeres, el cáncer de pulmón representa el 26% seguido del cáncer de mama con el 14%, estudios basados en las estadísticas de 1999 y 2005 (Jemal *et al.*, 2009) (Fig. 3).

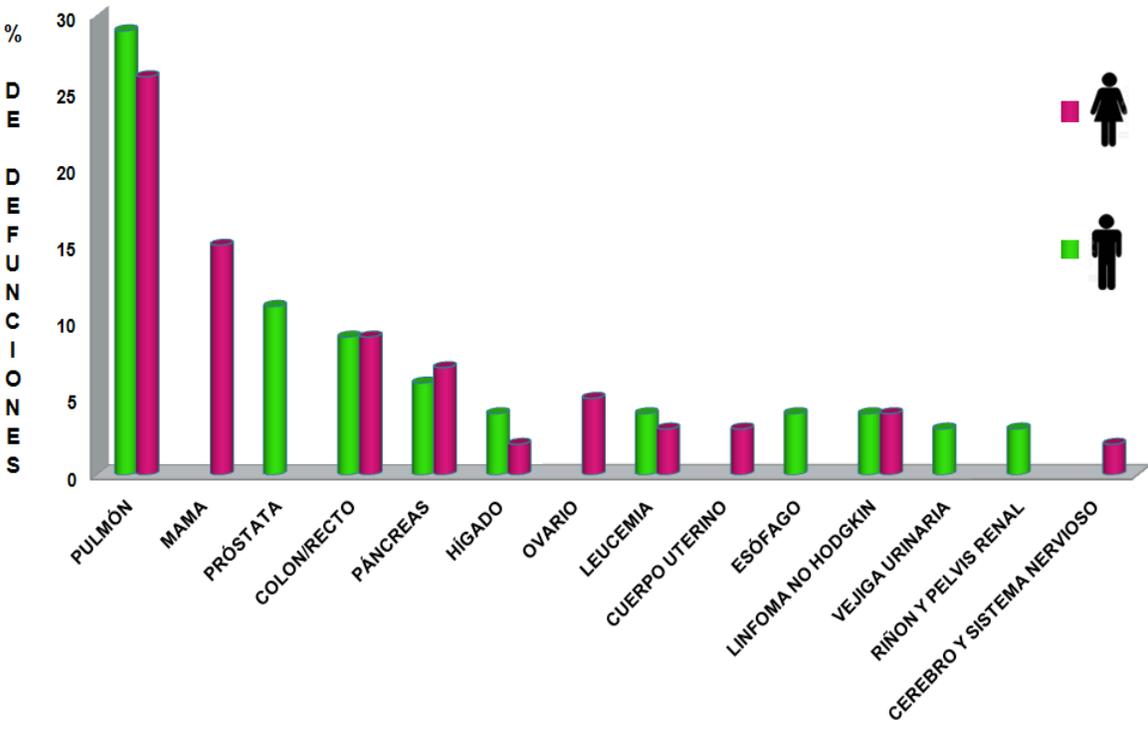
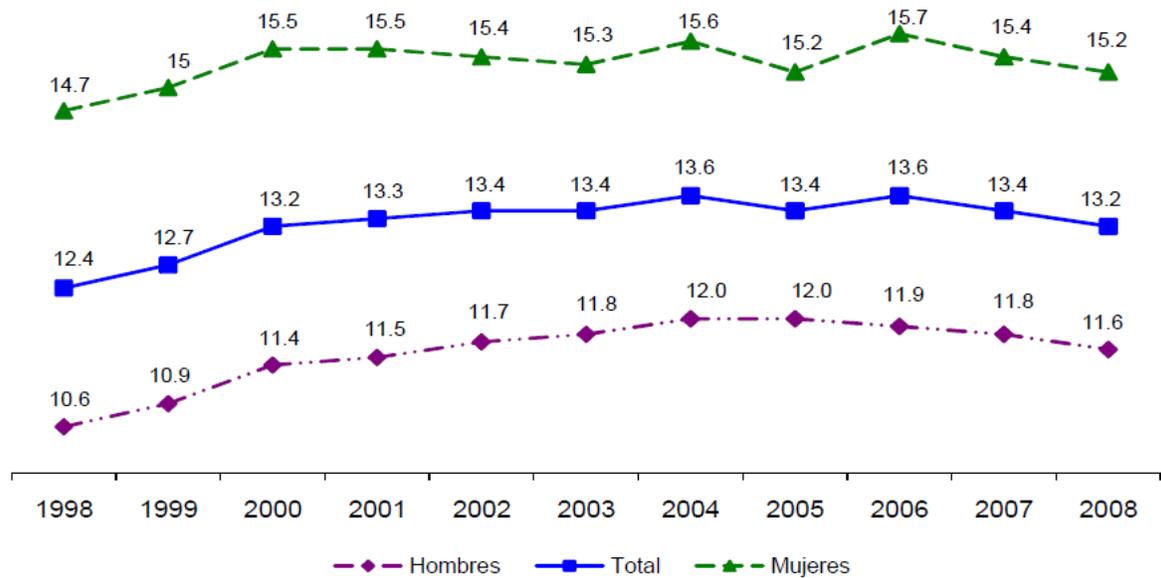


Figura 3.- Tipos de Cáncer con Mayor Incidencia en Ambos Sexos a nivel mundial. El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte en los dos géneros. (Modificado de Jemal *et*

**1.1.3. Epidemiología del Cáncer a nivel nacional**

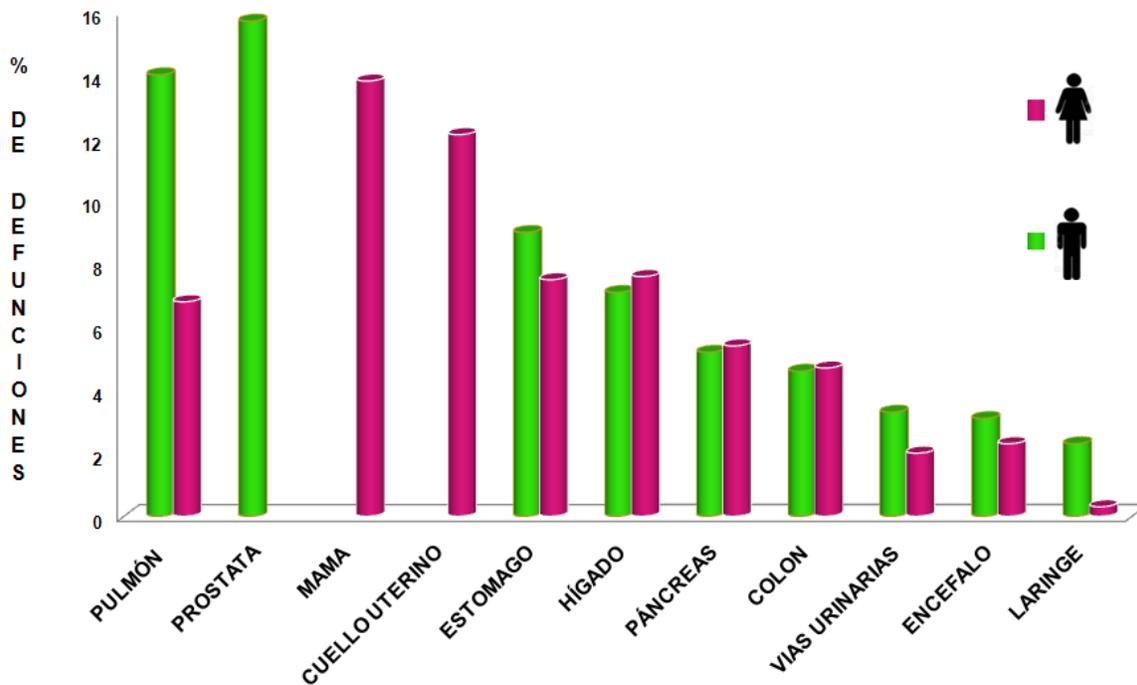
Datos reportados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en el 2010 señalan que los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte en nuestro país, registrándose 539 mil 530 defunciones, 13 de cada 100 tuvieron como causa principal de muerte algún tipo de cáncer (71 mil 074 casos). La figura 4 muestra el porcentaje de defunciones caudas por tumores malignos para varios años, total y por sexo.

**Porcentaje de defunciones por tumores malignos y sexo según año de ocurrencia 1998-2008**



**Figura 4.- Porcentaje de defunciones generales y por sexo causadas por tumores malignos entre los años 1998-2008. INEGI 2010.**

Datos reportados en el INEGI indican que en los varones, las tres principales causas de muerte por tumores malignos en el año 2005 corresponden a: cáncer de próstata (15.7%), cáncer de tráquea, bronquios y pulmón (14%), y estómago (9.0%), En las mujeres, el primer lugar de las defunciones por cáncer maligno corresponde al cáncer de mama con 13.8%, mientras que el cáncer de pulmón ocupa el quinto lugar con 6.8%. Por todo lo anterior sin diferenciar por género, el cáncer de pulmón es el cáncer con mayor mortalidad en nuestro país con 20.8% (INEGI 2007) (Fig. 5).



**Figura 5.- Distribución porcentual de las principales causas de defunción por tumores maligno según sexo. 2007.** El cáncer de pulmón en hombres ocupa el 14% de incidencia y el 6.8% en Mujeres (INEGI, 2007).

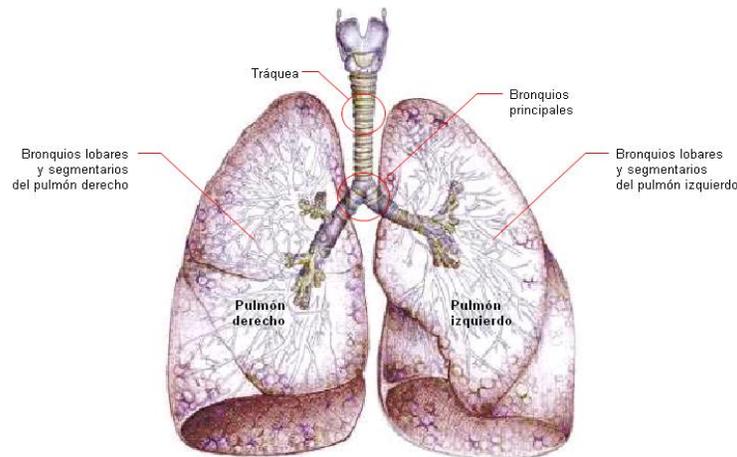
Los estudios nacionales e internacionales coinciden en que el cáncer de pulmón es la neoplasia que presenta la mayor mortalidad (OPS 1998, López-Abente *et al.*, 1992, Miller *et al.*, 1996 y Hanks *et al.*, 1993).

Dada la importancia en este tipo de cáncer que a nivel mundial se ha acrecentado, las investigaciones moleculares de este tipo de cáncer reportan que las células cancerosas ignoran los controles normales de proliferación y en general crecen respondiendo a vías de señalización activadas por ellas mismas para incrementar la proliferación celular, así modificando la actividad normal del ciclo celular (Orozco *et al.*, 2000).

## 1.2. Cáncer de Pulmón

Los pulmones están situados dentro de la caja torácica, protegidos por las costillas y a ambos lados del corazón. Son huecos y están cubiertos por una doble

membrana lubricada (serosa) llamada pleura. Están separados el uno del otro por el mediastino, además de presentar bronquios lobares y segmentados (en pulmón izquierdo y derecho) (Fig. 6) (Rouviere *et al.*, 1996).



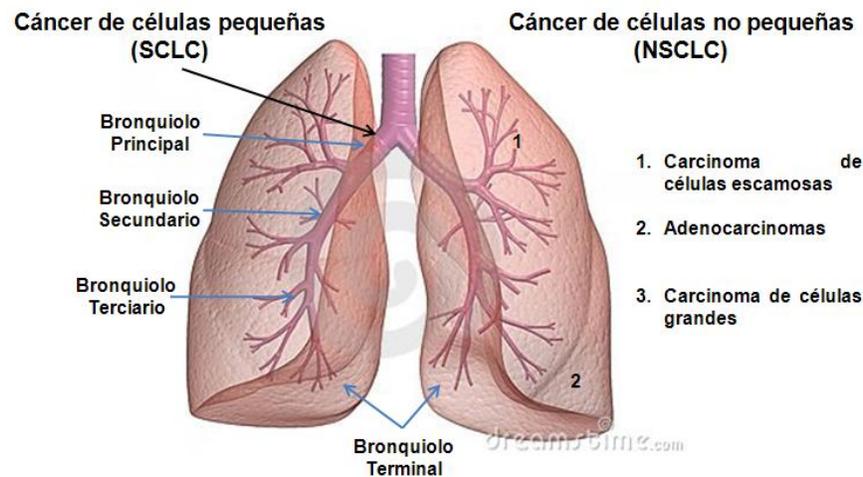
**Figura 6.-Anatomía y característica de los pulmones.** Este órgano tan importante en la respiración está integrado de bronquiolos principales, lobares y segmentados. El pulmón derecho está integrado por tres lóbulos; superior, medio e inferior. El pulmón izquierdo presenta 2 lóbulos; superior e inferior. (Modificada de Rouviere *et al* 1996).

El cáncer de pulmón es la enfermedad resultante del crecimiento anormal de células en el tejido pulmonar. La enfermedad se produce habitualmente en las paredes internas de los bronquios, y al crecer puede obstruir el paso del aire y alterar la respiración. Por este motivo, produce generalmente falta de aire, ahogo y fatiga, este crecimiento generalmente maligno, puede derivar en metástasis e infiltración a otros tejidos del cuerpo (Kumar *et al.*, 2000, Jaclyn., *et al* 2009).

El cáncer de pulmón es el causante de la mayor mortalidad de personas en relación a cualquier otro tipo de cáncer, y se prevee un aumento de esta tendencia hasta el 2030 (OMS, 2010). Es el tumor más importante en cuanto a mortalidad en el mundo occidental, debido a que es el resultado final de la acción de múltiples factores que de forma aislada, aditiva o sinérgica, lesionan irreversiblemente el epitelio bronquial (Carretero *et al.*, 2005, Pearce *et al.*, 1992).

Existen dos tipos principales de cáncer de pulmón: el cáncer de células pequeñas (SCLC) o microcítico y el cáncer de células no pequeñas (no microcítico o broncogénico, NSCLC) (Fig. 7).

El cáncer de células pequeñas representa el 20% del total de casos de cáncer de pulmón. Recibe este nombre por el tamaño de las células vistas al microscopio. Las células se multiplican rápidamente y se pueden formar grandes tumores, además su capacidad de extenderse a otros órganos es mayor. Siendo un tumor muy agresivo, las metástasis suelen afectar a los siguientes órganos: ganglios linfáticos, huesos, cerebro, glándulas suprarrenales e hígado. El tumor primario generalmente se origina cerca de los bronquios y se expande hacia el centro de los pulmones.



**Figura 7.-Cáncer de pulmón.** Presenta los dos tipos principales de cáncer de pulmón y las zonas de localización. Modificado de Sun *et al* 2007.

El cáncer de pulmón de células no pequeñas (no microcítico, (NSCLC)) representa el 80% restante de los casos de cáncer de pulmón primario. NSCLC tiene tres subtipos principales: el carcinoma de células escamosas, el adenocarcinoma y el carcinoma de células grandes, se extiende más lentamente que el de células pequeñas y, ocasionalmente, puede aparecer en personas que no fuman (Jaclyn *et al.*, 2009).

**Carcinoma de células escamosas:** Alrededor del 25% al 30% de todos los casos de cáncer de pulmón son de este tipo. Están relacionados con el tabaquismo y tienden a encontrarse en medio de los pulmones, cerca de un bronquio.

**Adenocarcinoma:** Este tipo representa alrededor del 40% de los casos de cáncer de pulmón. Se encuentra generalmente en la parte externa del pulmón.

**Carcinoma de células grandes (no diferenciadas):** Cerca del 10% al 15% de los casos de cáncer de pulmón son de este tipo. Puede comenzar en cualquier parte del pulmón. Tiende a crecer y propagarse rápidamente, haciéndolo más difícil de tratar (Kumar *et al.*, 2000, Frances *et al.*, 2009).

### **1.2.1 Marcadores tumorales en el Cáncer de pulmón**

En el cáncer de pulmón se han identificado marcadores tumorales (MT) que se van expresando o inactivando en el proceso carcinogénico, Dentro de estos marcadores se puede observar proteínas que se inactivan como p53, Rb, sobreexpresión del factor de crecimiento E2F1, mutaciones en K-ras, EGFR, PIK3CA y C-Myc, sobreexpresión de la ciclina D1 y Cinasas dependientes de ciclinas, también la sobreexpresión proteínas importantes en el potencial de membrana de la célula, como son los canales de Sodio, cloro y principalmente canales de potasio. Dichos marcadores se identifican en las diferentes etapas del cancer de pulmón que son de interés clínico para dar un diagnóstico clínico al paciente (Kitamura *et al.*, 2008 y Chittajallu *et al.*, 2002).

### **1.3 Tratamientos para el cáncer**

Actualmente, los principales métodos utilizados son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, estas formas de tratamiento frecuente se aplican juntas. La quimioterapia puede disminuir los síntomas, prolongar la vida y promover la cura de esta enfermedad. Hoy en día se dispone 100 fármacos comerciales que se emplean en el tratamiento del cáncer, los cuales actúan bajo distintos mecanismos

para tratar de evitar que las células cancerosas se dupliquen. Sin embargo, existen otros tratamientos en los cuales la medicina tradicional hace uso de plantas medicinales para el tratamiento del cáncer (De Vita *et al.*, 2001, Weiss *et al.*, 1997, Lazcano *et al.*, 2000)

### **1.3.1 Cirugía**

La cirugía es el método más empleado para tumores pequeños y localizados en un lugar concreto. Para que sea completamente eficaz se debe extirpar parte del tejido que rodea el tumor para asegurar así que todas las células cancerosas hayan sido eliminadas. Si el cáncer se ha extendido a otras zonas, a través de la sangre o de la linfa, habrá que realizar otros tratamientos, bien sean añadidos a la cirugía o únicos y distintos de ella (De Vita *et al.*, 2001, Lazcano *et al.*, 2000).

### **1.3.3 Radioterapia**

Es una forma de tratamiento basado en el empleo de radiaciones ionizantes (rayos X o radioterapia, la que incluye los rayos gamma y las partículas alfa) para eliminar las células tumorales (Cancerígenas), en la parte del organismo donde se apliquen. La radioterapia actúa sobre el tumor, destruyendo las células malignas y así impide que crezcan y se reproduzcan. La radioterapia sigue siendo junto con la cirugía y la quimioterapia, uno de los tres pilares del tratamiento del cáncer, se estima que más del 50 % de los pacientes con cáncer tienen un tratamiento con radioterapia para el control tumoral o con terapia paliativa en algún momento de su evolución (De Vita *et al.*, 2001, Lazcano *et al.*, 2000 y Macdonlad *et al.*, 2004).

### **1.2.5. Quimioterapia**

La quimioterapia incluye el uso de fármacos empleados en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas que tienen como función el impedir la reproducción de las células cancerosas. El mecanismo de acción es provocar una alteración celular ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos, división celular o síntesis de proteínas.

Hoy en día se utilizan más de 100 medicamentos para quimioterapia en varias combinaciones, aun cuando puede utilizarse un solo medicamento para el tratamiento del cáncer. Por lo general los medicamentos son más eficaces si se utilizan combinados (quimioterapia combinada). Este tipo de tratamiento permite que los medicamentos con diferente tipo de acción trabajen juntos para destruir un mayor número de células cancerosas y reducir la posibilidad de que se vuelvan resistentes a un medicamento de quimioterapia en partículas cáncer (De Vita *et al.*, 2001, Weiss *et al.*, 1997).

Los fármacos antitumorales actúan sobre las células con alta tasa de división mediante la inhibición del crecimiento y la proliferación. Cabe mencionar que no solo actúan sobre las células tumorales sino que también sobre las células normales y su efecto es aun más notorio en células con alta tasa de inhibición (por ejemplo: células del folículo piloso, médula ósea, tracto gastrointestinal y sistema reproductor) lo que provoca efectos secundarios y puede comprometer aún más la salud del paciente. Estos efectos van desde la náusea, el vómito y la diarrea leve hasta daño al riñón y corazón, descenso en el número de leucocitos y problemas de fertilidad, dependiendo del fármaco utilizado.

En la Tabla 1 se muestran algunos fármacos antitumorales utilizados en diferentes neoplasias, por ejemplo el Taxol, es el fármaco más utilizado en el tratamiento del cancer de pulmón de células no pequeñas ya que presenta un efecto inmediato en el proceso carcinogénico debido a su capacidad de inhibir la multiplicación de las células tumorales. Durante la interfase, los microtúbulos forman una red desde el centro por todo el citoplasma, pero al comenzar la mitosis, los microtúbulos se disgregan para poder formar el huso mitótico. En este momento, los microfilamentos se encuentran en un estado rápido de ensamblaje y desensamblaje, lo cual explica la extrema sensibilidad del huso a distintos compuestos que se unen a la tubulina, Siendo esta proteína el blanco del Taxol, el cual al unirse estabiliza a los microtúbulo e impide su desensamblaje (Centelles *et al.*, 2010)

**Tabla 1.- Fármacos antitumorales utilizados en el tratamiento del Cáncer y su mecanismo de acción**

<b>Compuesto</b>	<b>Tipo</b>	<b>Actividad</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
Cisplatino	Compuesto de coordinación	Alquilante	Daño al DNA, generación de radicales libres, con activación de p53, síntesis de Bax y activación del sistema receptor/ligando CD95.
Carboplatino	Compuesto de coordinación	Alquilante	Daño al DNA y unión a proteínas plasmáticas, con mecanismo similar al cisplatino
Oxalplatino	Compuesto de coordinación	Alquilante	Daño al DNA y unión a proteínas plasmáticas, con mecanismo similar al cisplatino
Paclitaxel	Taxano	Alquilante	Inhibidor mitótico, previene despolimerización microtubular
Ciclofosfamida	Mostaza nitrogenada	Alquilante, por mecanismos hidroxilados	Citotóxico por daño al DNA

### **1.3.4 Medicina Tradicional**

La medicina tradicional se ha utilizado durante miles de años con grandes contribuciones hechas por los profesionales de la salud humana, especialmente en lo que los proveedores de salud primaria a nivel comunitario. Se define como la total de conocimientos, habilidades y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias de los indígenas de diferentes culturas, las cuales usan para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, diagnóstico, mejora o tratamiento de las enfermedades físicas y mentales. Un instrumento muy importante de la medicina tradicional son las plantas medicinales (OMS, 2011).

Las plantas medicinales son aquellas especies vegetales que contienen en toda o alguna de sus partes constitutivas, principios activos útiles para combatir enfermedades (OMS, 2005-2010)

Las plantas tienen una larga historia de uso en el tratamiento del cáncer, y juegan un papel muy importante en el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Se ha descrito que en la medicina tradicional de muchos países, más de 3000 mil especies de plantas se utilizan con este propósito. Así más del 60 % de los agentes anticancerígenos actualmente en uso, deriva de una u otra forma de fuentes naturales que incluyen plantas, organismos marinos y microorganismos (Linares *et al.*, 1999).

México es un país con una gran biodiversidad y una amplia tradición en el uso de la medicina herbolaria, con plantas nativas, de otros países y continentes, que se han cultivado en nuestro país y han servido para el tratamiento del cáncer. Por ello para comprobar estos conocimientos empíricos se necesita realizar investigaciones científicas enfocadas en el cáncer (Laza *et al.*, 2003).

### **1.3.1 Uso de marcadores moleculares**

Otra alternativa viable para el tratamiento del cáncer de pulmón que ha sobresalido con el uso de la electrofisiología, es la identificación de los canales de potasio dependientes de calcio. Dichos canales están involucrados en diferentes vías de señalización en la célula normal e importante mente en el incremento del potencial de membrana de la célula, por otro lado este canal se encuentra sobreexpresado en células tumorigénicas (Wonderlin *et al.*, 1996).

Se ha sugerido que los canales de potasio están involucrados en la proliferación celular y control del ciclo celular, sugiriéndose que los canales hiperpolarizan la membrana para que la célula pueda pasar de la fase de G1/S de manera normal en la célula, sin embargo en una célula tumorigénica los canales se encuentran sobreexpresados, manteniendo siempre el potencial de membrana y permitiendo con ello la proliferación celular (Kiefer *et al.*, 1980, Chittajallu *et al.*, 2002).

### **1.3.2 Canales iónicos como marcadores moleculares de cáncer**

Un canal iónico es una proteína integral de membrana o la unión de varias proteínas homologas que se unen para formar un poro, las unidades principales que forman el poro se llaman  $\alpha$ , las unidades auxiliares se llaman  $\beta$  y así consecutivamente. En algunos canales el paso a través del poro está gobernado por alguna compuerta que se abre o se cierra por medio de señales químicas o eléctricas, temperatura o fuerza mecánica. Los canales iónicos median la transducción sensorial de propagación a larga distancia y la transmisión sináptica (Hille *et al.*, 1992).

Diferentes grupos de investigación han demostrado que la expresión de ciertos oncogenes afecta directamente la función de algunos canales como  $\text{Na}^+$  (Caffrey *et al.*, 1987, Flamm *et al.*, 1990 y Hemmick *et al.*, 1992),  $\text{K}^+$  (Hemmick *et al.*, 1992, Huang *et al.*, 1993 y 1999, Repp *et al.*, 1993 y Teulon *et al.*, 1992), y  $\text{Ca}^{2+}$  (Colin *et al.*, 1990). Por ejemplo, se sabe que el oncogén *ras* está involucrado en la metástasis, y la expresión de los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles al voltaje, además de intervenir en la adhesión celular, motilidad e interacción con la matriz extracelular. Por otra parte, algunos genes que codifican para canales iónicos se han catalogado como supresores de tumores. Ivanov *et al.*, 2003, reporta un nuevo gen humano, *KCNRG*, que codifica para una proteína de un canal de potasio, como un gen represor de tumor en leucemia y cáncer de próstata.

## **2.0. ANTECEDENTES**

### **2.1 Antitumorales de origen natural**

A finales de 1950, se inició una intensiva búsqueda de metabolitos secundarios con la finalidad de encontrar nuevas moléculas antitumorales, las moléculas antitumorales aisladas suelen ser productos naturales nuevos que se extienden en un amplio margen de tipos estructurales y se definen como aquellas moléculas capaces de interferir en el proceso de desarrollo de ciertos tumores malignos

(cáncer) y por lo tanto presentan la posibilidad de ser administrados para combatirlo (Kuklinsk *et al.*, 2000).

Se han reportado hasta ahora varias plantas que han mostrado efecto antitumoral por ejemplo: *Catharanthus roseus*, *Podophyllum peltatum*, *Podophyllum emodii*, *Taxus brevifolia*, *Ocrosia elliptica*, *Ampototheca acuminata* que han tenido un uso en el tratamiento de estados avanzados de varias neoplasias malignas en la clínica (Park *et al.*, 1999, Huang *et al.*, 1993). Por otro lado *Calendula officinalis* es una planta que en los últimos años ha mostrado tener efecto en el tratamiento y prevención de ciertas enfermedades por sus potentes fotoquímicos con diferentes propiedades farmacológicas y han dado respuestas en la prevención o el tratamiento de diferentes tumores, por ejemplo, flavonas, flavonoles, isoflavonas, catequinas y los taxanos (Demeule *et al.*, 2002, Dorai *et al.*, 2004, Gherzi *et al.*, 2005, Lopez *et al.*, 2002, Surh *et al.*, 2003)

Dentro de este amplio catálogo de plantas estudiadas, trabajos recientes sugieren que *Calendula officinalis* posee una variedad de propiedades medicinales, antiinflamatorias, antiespasmódicas, emenagogas, colagogas, sedativas, sudoríficas, vulnerarias, bactericidas (contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus fecalis*) (Águila *et al.*, 2000) y finalmente su actividad antitumoral citotóxica, reportada por Rocaud en 1988, en extractos ricos en saponinas triterpenoides. En el 2006, se reportó que las flores de *Calendula officinalis* contienen glucósidos de flavonoles, glucósidos triterpenos tipo oleanano, saponinas y un glucósido sesquiterpénico que le confieren la actividad antitumoral (Ukiya *et al.*, 2006 y Yoshikawa *et al.*, 2001)

Las investigación en plantas han dado invaluable aportes en el tratamiento y prevención de tumores malignos a través del tiempo y sigue siendo una base fuerte en la actualidad (Barbara *et al.*, 2001).

## 2.2. *Calendula officinalis*

*Calendula officinalis* es una especie descrita por el botánico sueco Carl Von Linné, la cual responde al binomio *Calendula officinalis* L. Sólo se conoce la existencia de un sinónimo, *Caltha officinalis* Moench, y algunos nombres más comunes Capetuda, Flor de muerto, Mercadela y Flamenquilla. Sistemáticamente, *Calendula* pertenece a la familia de las Asteraceas (compuestas), subfamilia Tubiflora, orden Asterales, clase Magnoliopsida. (Wulf *et al.*, 1969). Esta planta es originaria de Europa Meridional (Volák *et al.*, 1983) en el transcurso de los años se ha extendido a numerosos países, tanto del Viejo Mundo como de América.

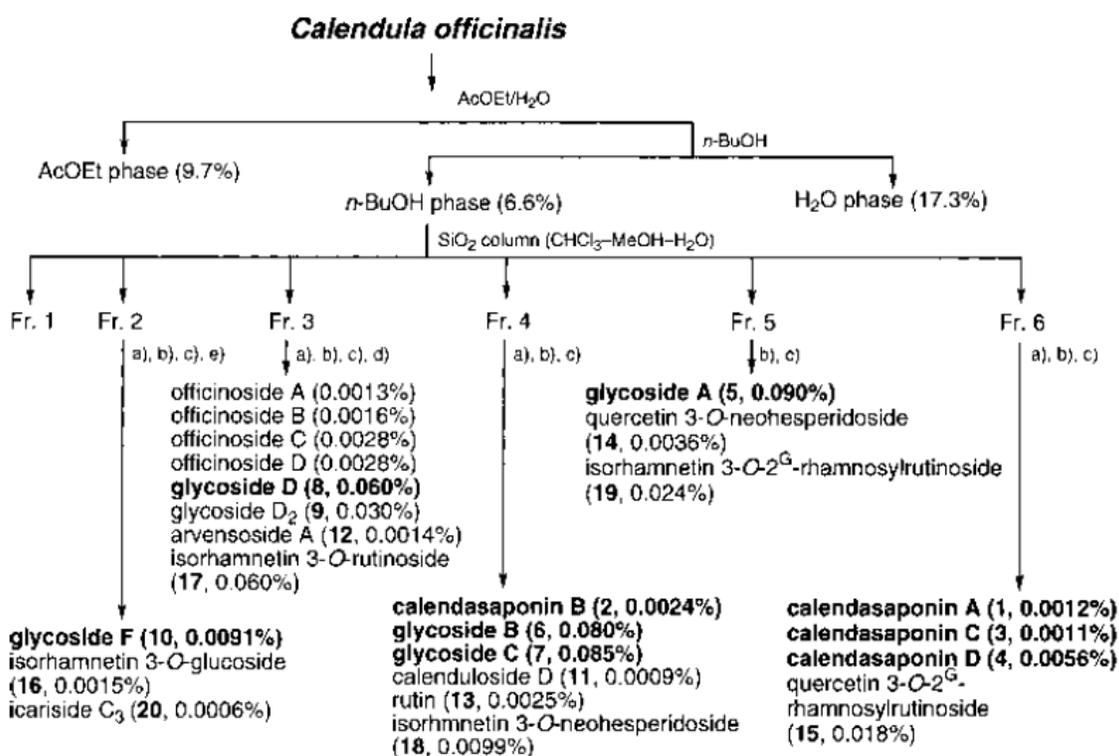
*C. officinalis* es una hierba anual, de 30 a 60 cm de altura; con hojas simples, alternas, algo gruesas, de oblongas a obovado-oblongas, enteras o diminutas y remotamente denticuladas; cabezuelas solitarias en pedúnculos robustos, vistosos de 3,75 a 5 cm de diámetro; los radios planos, extendidos de color amarillo blanquecino hasta anaranjado (Lastra *et al.*, 1999) (Fig. 8).



**Figura 8.-*Calendula officinalis*.** *Calendula officinalis* es una hierba anual más o menos pelosa, de 30 a 60 cm de altura; hojas simples, alternas, algo gruesas, de oblongas a obovado-oblongas, enteras o diminutas y remotamente denticuladas.

Las diversas actividades biológicas encontradas en las flores de *C. officinalis* han sido estudiadas a nivel mundial en modelos tanto *in vivo* como *in vitro* entre estas actividades se encuentra el efecto protector que tiene frente a efectos genotóxicos y su actividad antitumoral. Sin embargo, el mecanismo antitumoral aún está siendo estudiado.

*Calendula officinalis* es una planta que ha sido estudiada por los efectos que presenta en los diferentes extractos que se han preparado a partir de los pétalos, como son extractos acuoso, hidroalcohólico, a base de etanol, metanol, etc. En el 2001 se reportaron los compuestos químicos del Extracto hidroalcohólico utilizando cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés High Performance Liquid Chromatography). El análisis de estos resultados reportaron que el extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* posee los siguientes compuestos químicos principales: Glucósidos B, C, D y F; calendasaponinas A, B, C y D; flavonoides o bioflavonoides como la Quercetina, Isorhamnetina y Rutina, siendo señalados como metabolitos secundarios con actividad anti-tumoral (Yoshikawa *et al.*, 2001) (Fig. 9).



**Figura 9.- Compuestos químicos del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis*.**  
Modificada de Yoshikawa *et al.*, 2001

En el 2004, el grupo del Doctor Pommnier propuso comparar la efectividad de *Calendula officinalis* contra la trolamina (crema con corticosteroides) para prevenir

la dermatitis aguda durante la quimioterapia post-operación del cáncer de mama, donde se tomó en cuenta la desaparición de la dermatitis alta o grado 2, y como segundo punto la disminución del dolor por la quimioterapia, la cantidad del agente tópico y la satisfacción del paciente. Los resultados encontrados demostraron que con el uso de *Calendula* disminuyó la dermatitis en mayor proporción que con el uso de la trolamina, además de que el dolor por la radioterapia se redujo, logrando así el bienestar del paciente.

En el 2006, Ukiya observó el efecto del extracto acuoso de *Calendula officinalis* sobre las líneas celulares de cáncer de colon, leucemia y melanomas presentando un potente efecto citotóxico y disminución de la proliferación (Ukiya *et al.*, 2006).

En este mismo año se reportó que el extracto acuoso activado por láser de *Calendula officinalis* presenta efectos antitumorales al evaluar el efecto del extracto de *Calendula officinalis* sobre algunas líneas celulares. Se evaluó *in vivo* la actividad inmunomoduladora y antitumoral en ratas con hepatocarcinoma, e *in vitro* el efecto antitumoral del extracto acuoso de *Calendula* en líneas celulares de leucemias, melanomas, fibrosarcomas, cáncer de mama, próstata, pulmón, páncreas, cervical y colorrectal, midiéndose los efectos del extracto en la proliferación celular y apoptosis. El extracto de *Calendula* presentó una potente inhibición en la proliferación tumoral, interrumpiéndose el ciclo celular en el paso de G0/G1, induciendo la apoptosis por la vía de la caspasa 3 identificada por western blot (Medina *et al.*, 2006).

Por otro lado en el 2002 se reportó la elaboración de un extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* el cual fue evaluado sobre un cultivo primario de hepatocitos murino, el tiempo de exposición del extracto fue de 12 horas, encontrando un efecto interesante en el incremento de la proliferación celular a partir de concentraciones altas de 3.7 a 100 µg/ml de *Calendula officinalis* (Pérez – Carreón *et al.*, 2002).

Posteriormente en el 2004 se reportó el efecto dual y opuesto del extracto hidroalcohólico de la flor de *C. officinalis* en un modelo de hepatocarcinoma de rata, en el cual se descubrió que el efecto protector iniciaba cuando se usaban concentraciones entre 0.1 mg/Kg y 5 mg/Kg, observándose disminución en el área dañada del hepatocarcinoma. Sin embargo cuando la dosis se aumentaba de 10 a 20 mg/Kg el incremento del área dañada era visible; presentándose así una actividad opuesta, a dosis bajas de *Calendula officinalis* se observa un efecto protector y a dosis altas el efecto opuesto (Barajas *et al.*, 2004).

Posteriormente en el 2007 Menéndez evaluó el efecto de una crema elaborada a base de los componentes de *Calendula officinalis* sobre la cicatrización de heridas abiertas en piel de ratas, presentando un potente efecto sobre la cicatrización la cual pudiese deberse a la presencia de las saponinas triterpénicas y a los flavonoides, constituyentes propios de la *C. officinalis*, las cuales pudiesen ser capaces de impedir la acción de las enzimas proteolíticas, formando sobre las heridas una capa de coagulación y actuando como posibles agentes antiinflamatorios. Se pudo observar que a partir del tercer día la velocidad de reducción del tamaño de las heridas, tanto para los animales tratados con la crema así como con el Hebermín (control positivo de cicatrización), esto se pudo deber a un potente efecto sobre el incremento de la proliferación celular (Menéndez *et al.*, 2007).

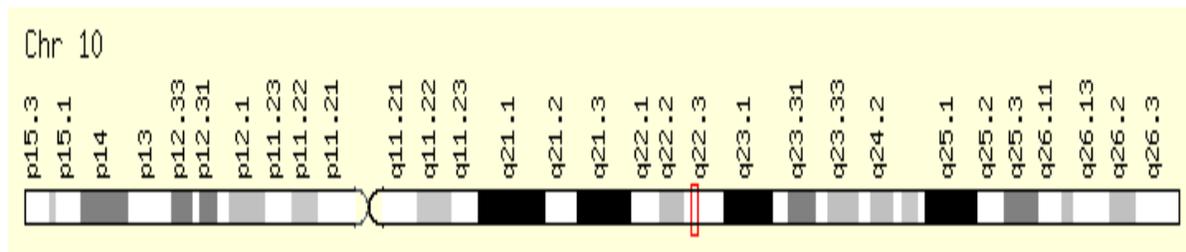
Hasta ahora no se ha evaluado el efecto del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* en la línea A549 tumorigénica de pulmón por lo que es interesante llevar a cabo esta investigación.

### **2.3 Canal KCNMA1 como marcador tumoral**

Durante los últimos años una considerable fuente de información ha sido obtenida sobre los canales de K<sup>+</sup>. En diferentes áreas han contribuido en este campo, hasta la fecha se conocen 70 tipos de canales de K<sup>+</sup> pero solo algunos han sido implicados en la proliferación y crecimiento tumoral, los mejores estudiados son

Kv1.3 (KCNA3), IKCa1 (K<sub>Ca</sub>3.1, KCNN4), TASK-3 (K<sub>2P</sub>9.1, KCNK9), HERG (Kv11.1, KCNH2), EAG1 (KV10.1, TRPM8 y KCNH1) y recientemente en cáncer de mama KCNMA1 (Stu"hmer *et al*, 2006 y Coiret *et al* 2005).

El Canal KCNMA1 es un canal de K<sup>+</sup> y el gen que codifica para este canal está localizado en el cromosoma 10q22.3. (Fig. 10). Este canal consiste en dos subunidades similares, α y β, la subunidad α es un miembro del gen *slo* y forma le poro para la conducción del ión. La subunidad β es única estructuralmente, es una proteína de la membrana de expansión que contribuye al canal de vaciado y la farmacología (Breitwieser *et al*, 1996). Los canales de conductancia grande (BK, KCa1.1) presentan una conductancia de 250 pS y son activados de una manera altamente sinérgica por Ca<sup>2+</sup> y por depolarización de la membrana. (Butler *et al* 1993, Meera *et al* 1997).



**Figura 10.- Localización del gen KCNMA1.** El gen KCNMA1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 10 en la región 23.1 (GENE CARD, 2010).

Se ha reportado que el canal KCNMA1 se expresa en varias líneas celulares tumorales como son AT-2 (Cáncer de próstata de rata), IGR1 (Melanoma Humano) y MCF-7 (Cáncer de Mama). Además mencionar que la proliferación de estas líneas celulares se ve afectada cuando se inhibe el canal con inhibidores específicos de la función del canal (Caribdotoxina, apamina e iberotóxina), también se ve afectado el potencial de membrana significativamente (Fraser *et al.*, 2000, Coiret *et al.*, 2007, Cambien *et al.*, 2008, Su *et al.*, 2009 y Nobuyoshi *et al.*, 2007)

En el 2002, se reportó la clonación de una isoforma del gen del canal BKCa (KCNMA1 o MaxiK) (GENE CARD, 2010), la cual se encontraba sobreexpresada en células de glioma humano en comparación con tejidos no malignos. Aún más, los grados de malignidad de los tumores se correlacionaron positivamente con la expresión de BKCa, sugiriendo un papel importante del canal BKCa en el desarrollo de los gliomas (Liu *et al.*, 2002). Así mismo, se ha reportado la sobreexpresión de este gen en otros tipos de cáncer como cáncer de próstata, astrocitomas, cáncer pancreático, cáncer de mama y arterias pulmonares (Basrai *et al.*, 2002, Weaver *et al.*, 2004, Peinado *et al.*, 2008).

En el 2009 el grupo del Dr. Divya determinó la presencia del canal KCNMA1 por medio del mRNA en células de cancer de mama metastásico. Se demostró que el canal KCNMA1 se encuentra sobreexpresado, llevando a una mayor invasión y migración transendotelial, con el bloqueo de este canal usando iberotóxina, se puede minimizar la metástasis de las células cancerosas. Con estos datos se sugiere que el gen del canal KCNMA1 es involucrado en procesos metastásicos, y también sería un excelente blanco terapéutico frente a enfermedades metastásicas.

Hasta ahora no hay reportes donde se sugiera la sobreexpresión del canal KCNMA1 en la línea tumorigénica A549 por lo cual es interesante observar su expresión en dicha línea como se sugiere en esta tesis.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un problema de salud a nivel mundial. Especialmente, en nuestro país los tumores malignos fueron la segunda causa de muerte en el 2010 y dentro de esta patología el cáncer de pulmón ocupa el primer lugar. En la actualidad este padecimiento es tratado principalmente aplicando quimioterapia, radioterapia, cirugía y combinaciones de éstas, todas encaminadas hacia la eliminación de los tumores para alargar el tiempo de vida de los pacientes, por otro lado estos tratamientos presentan efectos secundarios que afectan la calidad de vida del paciente.

En los últimos años han surgido evidencias clínicas de las propiedades antitumorales de un gran número de productos obtenidos a partir de plantas, de las cuales se han aislado principios activos como el paclitaxel.

Por lo anterior, en la actualidad se realizan investigaciones enfocadas hacia la identificación de nuevos agentes naturales con propiedades antitumorales que aumenten la calidad de vida del paciente.

Asimismo, existen reportes de las funciones antitumorales de los extractos de *Calendula officinalis*, presentado un efecto inhibitor de la proliferación e inducción de apoptosis en líneas de células tumorales.

Por otro lado se han identificado marcadores moleculares en el cáncer de pulmón, que se sobreexpresan en la progresión del cancer, como es el canal KCNMA1 que tiene importante participación en el proceso carcinogénico de dicha línea.

Hasta ahora no hay ningún reporte sobre el efecto del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* sobre la línea celular A549 y tampoco se ha evaluado la participación del canal KCNMA1 en el cáncer de pulmón así como el efecto que pudiera tener *Calendula* sobre el canal, por lo que consideramos importante evaluarlo el efecto.

#### **4.0 HIPÓTESIS**

Si el extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* interfiere con la proliferación celular o resulta citotóxico en la línea A549 de cáncer de pulmón y por otra parte si los inhibidores del canal de potasio *KCNMA1* disminuyen *in vitro* la proliferación, *ambos principios* se podrían proponer como probables tratamientos anti-tumorales.

#### **5.0 OBJETIVOS**

##### **5.1. Objetivo general**

- ❖ Determinar el efecto de *Calendula officinalis* y la participación del canal *KCNMA1* sobre la proliferación celular de la línea A549

##### **5.2. Objetivos específicos**

- ❖ Determinar el efecto del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* sobre la proliferación celular en la línea A549 de adenocarcinoma de pulmón
- ❖ Determinar el efecto del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* sobre la muerte celular programada en la línea A549
- ❖ Determinar el efecto del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* combinado con Taxol en la línea celular A549.
- ❖ Determinar el efecto de un inhibidor específico del canal *KCNMA1* sobre la viabilidad celular, en la línea A549 de adenocarcinoma de pulmón.

## 6.0. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

A continuación se muestra la estrategia experimental que seguimos para alcanzar los objetivos de este trabajo (fig. 11).

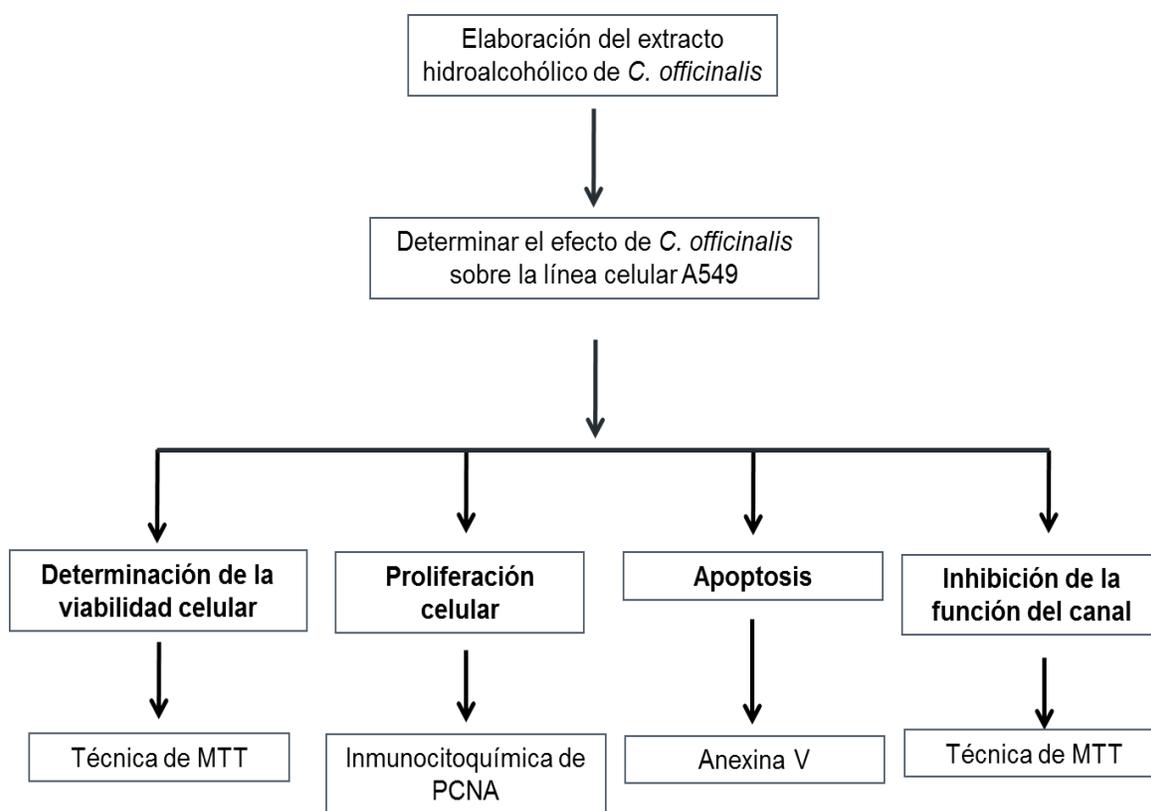


Figura 11.- Diseño experimental y diagrama general de la metodología a seguir.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Recolección de la planta**

*Calendula officinalis* fue cultivada en los campos de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), durante los meses de mayo-agosto del 2009, los pétalos de las flores fueron colectados, lavados con agua y deshidratados a 60 °C en un cuarto oscuro.

### **7.2 Preparación del extracto hidroalcohólico a partir de pétalos de *Calendula officinalis***

Para obtener el extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* se utilizó la siguiente estrategia:

Se utilizaron 5 gramos de flores secas, se agregó a 500 ml de etanol al 96%, en agitación constante por 24 horas; en un cuarto oscuro a temperatura ambiente, posteriormente se agregó 500 ml de agua desionizada y se mantuvo en agitación por 72 horas. Después se filtró para remover el material insoluble, posteriormente se evaporó el extracto, para obtener un volumen final de 400 ml. Luego el extracto se esterilizó utilizando una membrana para filtrar con un tamaño de poro de 0.22 µm, posteriormente se liofilizó (Pérez-Carreón *et al*, 2002).se obtuvo una concentración sólida de 0.5 mg/litro.

### **7.3 Cultivo Celular**

Se utilizó la línea celular de cáncer de pulmón A549 (ATCC: CCL-185) de adenocarcinoma de pulmón y la línea celular de pulmón sano inmortalizada MRC-5 (ATCC: CCL-171).

El manejo de las líneas celulares se realizó en condiciones de esterilidad, en campana de flujo laminar, usando material y soluciones estériles. Las líneas A549 y MRC-5 se cultivaron en medio para cultivo celular DMEM (Dubelco's Modified

Eagle Medium, Gibco) suplementado con suero fetal bovino (del inglés Fetal Bovine Serum, Gibco) y antibiótico (Estreptomina-penicilina, invitrogen). La incubación se realizó en una incubadora a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%.

#### **7.4 Ensayos de Viabilidad**

La viabilidad celular se determinó por el método de MTT, el cual es un método que determina funcionalidad mitocondrial, es sensible y cuantitativo. El fundamento de esta técnica se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, compuesto de color amarillo) realizado por la enzima succinato-deshidrogenasa en un compuesto denominado formazán, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. El anillo de tetrazolio es reducido en la mitocondria activa. Por lo que la reacción solo ocurre en células vivas ya que las células muertas no son capaces de reducir el MTT (Loyola y Vázquez *et al.*, 2006, Mosmann *et al.*, 1983).

La cantidad de los cristales de formazán obtenido puede ser determinada espectrofotométricamente una vez que el formazán ha sido disuelto. El formazán se disuelve completamente en DMSO (Dimethyl sulfoxide). El compuesto colorimétrico absorbe luz a una longitud de onda de 595 nm. La cantidad de células viables es proporcional a la absorbancia obtenida (Mosmann *et al.*, 1983).

##### **7.4.1 Procedimiento de la técnica de MTT**

En este ensayo se evaluó el efecto del extracto hidroalcohólico en las líneas celulares A549 y MRC-5.

Las células se cultivaron en medio fresco y se realizó la cuenta por exclusión de azul de tripano para sembrar 20000 células por pozo en placa de 24 pozos y se incubaron toda la noche. Posteriormente las células fueron tratadas con el extracto hidroalcohólico de *Calendula*. Como control negativo se sembraron las

células sin tratamiento y como control positivo se utilizó el Taxol a una concentración de 50 nM o 42.69 ng/ml. se utilizaron diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico (8, 16, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 y 1000 µg/ml) a diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72 horas).

Al término de este tiempo se les adicionó el MTT (5 mg/ml, Sigma), se dejó incubar por 3 horas. Una vez terminado el tiempo de incubación se retiró el sobrenadante. Posteriormente se agregó el DMSO (100 µl) y se realizó la lectura en un lector de ELISA (Multiskan Ascent V1.25) a 595 nm, consecutivamente se calculó el % de viabilidad. Utilizando la siguiente formula:

$\% \text{ viabilidad} = \text{D.O. problema} / \text{D.O. del testigo} \times 100.$

Posteriormente se obtuvo el análisis estadístico utilizando el programa Sigma Stat y las desviaciones estándar utilizando el programa Excel 2010 (office Microsoft)

## **7.5 Detección de la apoptosis por Anexina V-FITC**

Este ensayo está basado en la identificación de la fosfatidilserina (PS), es un fosfolípido que se encuentra en una célula normal hacia la cara interna de la membrana plasmática y que posteriormente es translocado hacia la cara externa de la membrana plasmática cuando hay un estímulo de inducción de apoptosis. Localizada en la cara externa de la membrana plasmática la fosfatidilserina puede ser detectada por la Anexina V. La detección puede realizarse mediante la técnica de citometría de flujo o por microscopia de fluorescencia (Assay Protocol BioVision).

### **7.5.1 Procedimiento**

Se sembraron las células a una densidad de  $5 \times 10^5$  en placas de 6 pozos, durante 18 horas, posteriormente las células fueron tratadas con las concentraciones del extracto seleccionados. Se utilizó un control sin tratamiento y un control positivo con Taxol a una concentración de 50 nM o 42.69 ng/ml. Se utilizaron

concentraciones del extracto hidroalcohólico de 125 y 250 µg/ml por un tiempo de 18 horas. Posteriormente las células se colectaron y resuspendieron en 150 µl de amortiguador de unión (Buffer binding) y se adicionaron 5 µl de Anexina V- FITC y 5 µl de Yoduro de Propidio dejando a temperatura 5 min. Para ello se utilizó el kit de Anexina V-FITC Apoptosis Detection Kit (BioVision). Posteriormente los resultados se analizaron por citometría de flujo (Assay Protocol BioVision). Con esta metodología se realizó también la combinación de *Calendula* y Taxol (42.69 ng/ml)

#### **7.6.0 Determinación de la proliferación celular por Inmunocitoquímica de PCNA**

Esta técnica se basa en la identificación de PCNA. Esta proteína es un marcador nuclear que se sintetiza principalmente en las células que se encuentran entre la fase G1 y S del ciclo celular, se le denomina antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA, del inglés *Proliferating cell Nuclear Antigen*). Su función es favorecer la síntesis del DNA, ya que es un cofactor de la DNA polimerasa  $\delta$  (delta). Actúa como un homotrímero y ayuda a incrementar la procesividad de la síntesis de la cadena continua durante la replicación (Maga *et al.*, 2003).

##### **7.6.1. Procedimiento**

Las células se sembraron en placas de cultivo p60 conteniendo en el interior un portaobjetos cargado electronegativamente para que las células se puedan adherir, se siembran con una confluencia del 70-80%. Como control negativo se usaron células sin tratamiento, como control positivo se utilizó el Taxol a una concentración de 50 nM y como problema se probaron las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* (62.5, 125 y 250 µg/ml) por un periodo de incubación de 48 horas. Posteriormente las células se fijaron con paraformaldehído al 4%, se lavó con PBS y posteriormente se

incubó 5 minutos con etanol al 70%. Consecutivamente se lavó con PBS, se realizó la recuperación con buffer de citratos, se incubó con una solución de peroxidasas, se lava con PBS, se agregó la solución bloqueadora. Se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario (Mouse anti-PCNA, Invitrogen), se lavó con PBS y se agregó el anticuerpo secundario (Mouse/Rabbit PolyDetector HRP/DAB, Bio SB). Nuevamente se lavó con PBS, se agregó diaminobencidina por 10 min, después se agregó hematoxilina como tinción de contraste (30 segundos), a continuación se lavó y se dejó secar la preparación. Se agrega la solución Premount y se le colocó un cubreobjetos, se dejó secar por una hora. La identificación de la proteína se realiza mediante microscopía óptica a 20X y 40X, que permite visualizar la señal que el anticuerpo secundario.

## 8.0 RESULTADOS

### 8.1 Recolección y elaboración del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis*

La recolección de la planta se realizó en el mes de agosto, fue cultivada en campos experimentales de la UNAM durante los meses de mayo y agosto. Las flores fueron colectadas, lavadas con agua y deshidratadas en un cuarto oscuro a 60 °C.

Para la obtención del extracto hidroalcohólico se siguió el protocolo de Pérez-Carreón mencionado en los materiales y métodos. Posteriormente se llevó a liofilizar obteniendo 500 mg del liofilizado a partir de 2 litros del extracto hidroalcohólico (fig. 12)



**Figura 12.- Extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* liofilizado.** Se obtuvieron 500 mg del liofilizado a partir de 1 litros del extracto hidroalcohólico.

## 8.2. Ensayos Biológicos

El sistema biológico utilizado para llevar a cabo las diferentes pruebas *in vitro* en el cual se evaluó el efecto del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* sobre diversos procesos antitumorales fue la línea A549 (adenocarcinoma de pulmón) y la línea MRC-5 (línea normal inmortalizada) se empleó como control externo, ambas se propagaron en medio DMEM al 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB) a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> (Fig. 13).

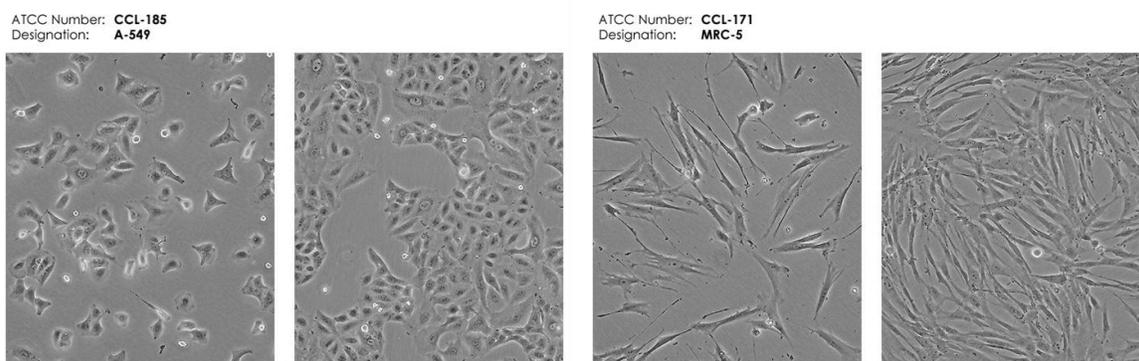


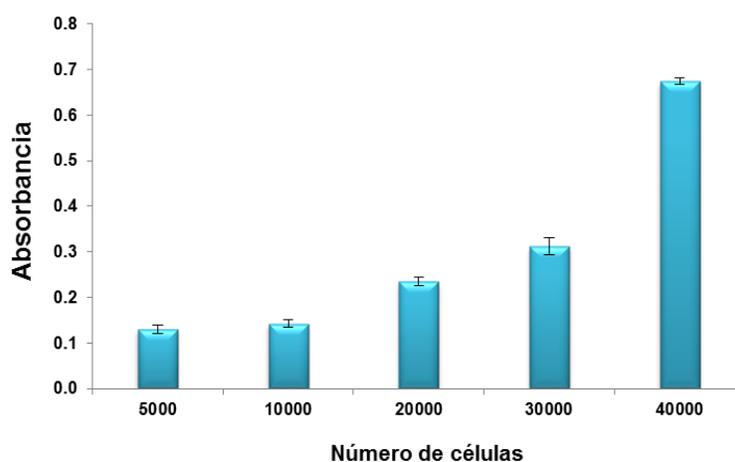
Figura 13.- Línea celular A549 a la derecha (ATCC: CCL-185) cuya morfología es triangular y a la izquierda la Línea MRC-5 que normalmente sus células son alargadas (ATCC: CCL-171).

## 8.3 Estandarización de la técnica de MTT

Para evaluar el efecto del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* sobre la viabilidad de la línea A549 y MRC-5, lo primero que se llevó a cabo fue la estandarización de la técnica en donde realizó una curva patrón basada en número creciente de células.

Para ello, se sembraron en placas de 96 pozos, distintos número de células que fueron desde 5000, 10000, 20000, 30000 y 40000 cél/pozo, se dejaron incubar por 12 horas (over night), pasado el tiempo se adicionó 20 µl de MTT, se incubó la placa por tres horas, se retiró el sobrenadante del pozo y posteriormente se agregó el DMSO (Dimetil sulfoxido) (Protocolo de Mossmann *et al.*, 1983).

En la figura 14 se observan los resultados obtenidos de la estandarización de la técnica de MTT, en donde aparece una relación directamente proporcional entre el número de células y la absorbancia en el ensayo, ya que conforme aumentó el número de células incrementó la absorbancia.



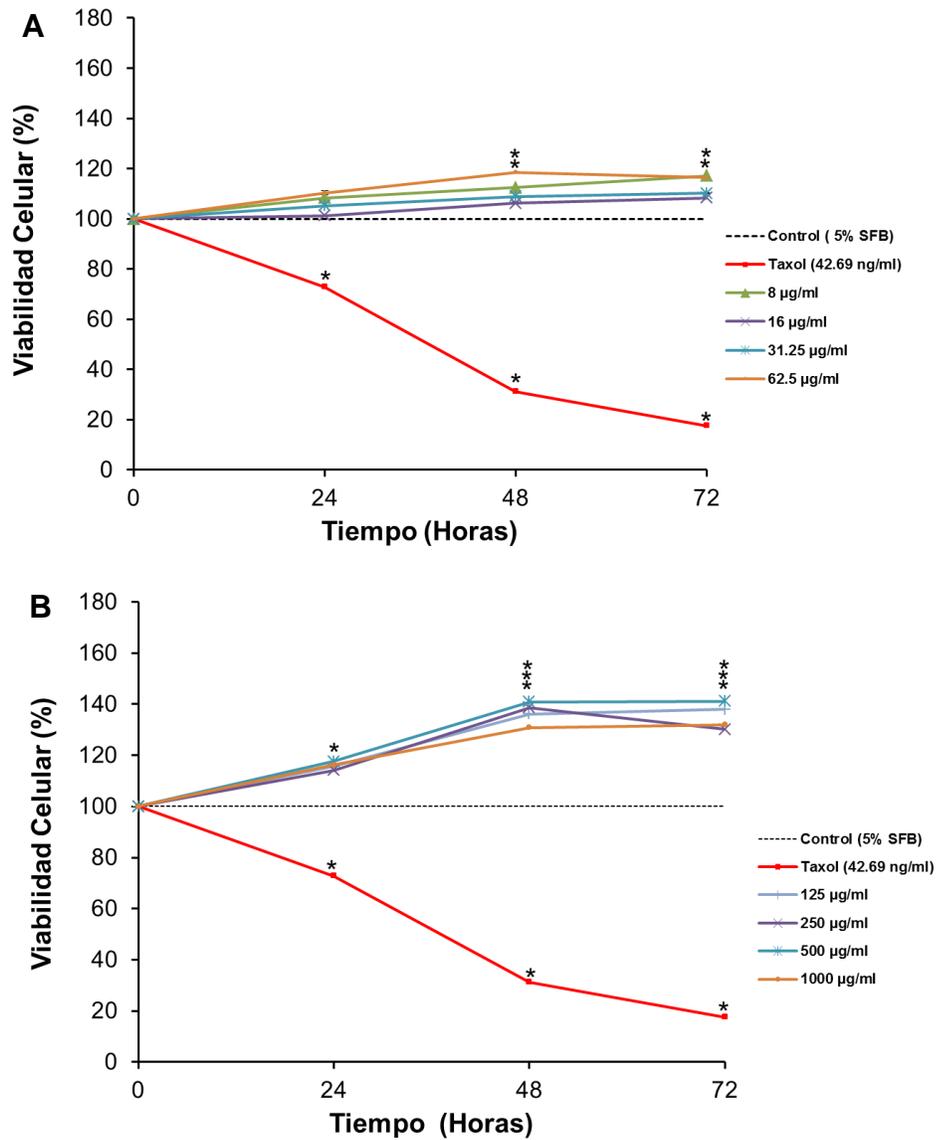
**Figura 14.- Determinación del número de células óptimo para la realización de los ensayos de viabilidad**

En base a los resultados y observaciones en el microscopio invertido se seleccionó trabajar con 20000 células/pozo, como un número determinados para los experimentos a una absorbancia de 595 nm y 100  $\mu$ l de DMSO. Así mismo es importante sembrar un número adecuado de células de acuerdo al diámetro del pozo, debido a que las células pueden incrementar su tasa de proliferación y no tener el espacio suficiente para crecer, por ellos se debe de sembrar un número adecuado de células para observar el efecto del extracto a utilizar.

#### **8.4 Evaluación de la cinética del efecto del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* a concentraciones crecientes sobre la viabilidad celular de la línea A549**

Las células A549 de adenocarcinoma de pulmón, se sembraron en placas de 96 pozos y durante el ensayo se mantuvieron con un 5% de suero. Se usaron 20000 células de la línea A549 por pozo con medio DMEM al 10% de SFB, se incubaron por 12 horas, después se retiró el medio y se colocó el extracto hidroalcohólico a las siguientes concentraciones: 8, 16, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 y 1000 µg/ml con medio DMEM al 5% de SFB. Se construyeron graficas de la cinética de viabilidad con cada una de las diferentes concentraciones. Como controles de los ensayos se utilizaron células sin tratar, solo con medio DMEM al 5% de SFB (control Negativo) y Taxol [50 nM] (control positivo) posteriormente las placas se incubaron durante 0, 24, 48 y 72 horas. Transcurridos los tiempos se les adicionó el MTT (5mg/ml) y con él se incubaron por 3 horas a 37°C. Se eliminó el MTT y se adicionaron 100 µl de DMSO para disolver los cristales de formazán que se forman al llevarse a cabo la reacción y las placas fueron inmediatamente procesadas por un lector de ELISA (Multiskan Ascent V1.25) para obtener datos de absorbancia a 595 nm. Con las absorbancias obtenidas se calculó el porcentaje de viabilidad, normalizando contra el control negativo (células sin tratamiento) como el 100%. Cada condición se probó por duplicado y los experimentos se replicaron 3 veces.

Los resultados obtenidos sobre el efecto dosis respuesta del extracto hidroalcohólico total de *Calendula officinalis* sobre la viabilidad celular de las A549 se muestran en la figura 15, en donde se puede observar un incremento de la viabilidad celular de manera dosis dependiente y que en la cinética la actividad de cada concentración del extracto se incrementa con el tiempo en las células incubadas con el extracto a partir de 24, 48 y 72 horas, en las concentraciones 31.25, 62.5, 125, 250, 500 y 1000 µg/ml.



**Figura 15.- Efecto del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* sobre la viabilidad celular de la línea A549. A) Concentraciones bajas del extracto y B) concentraciones altas (\* $p \leq 0.005$  vs media  $\pm$  SD,  $n=3$  por triplicado; Anova una vía. Pos hoc Holm Sidak)**

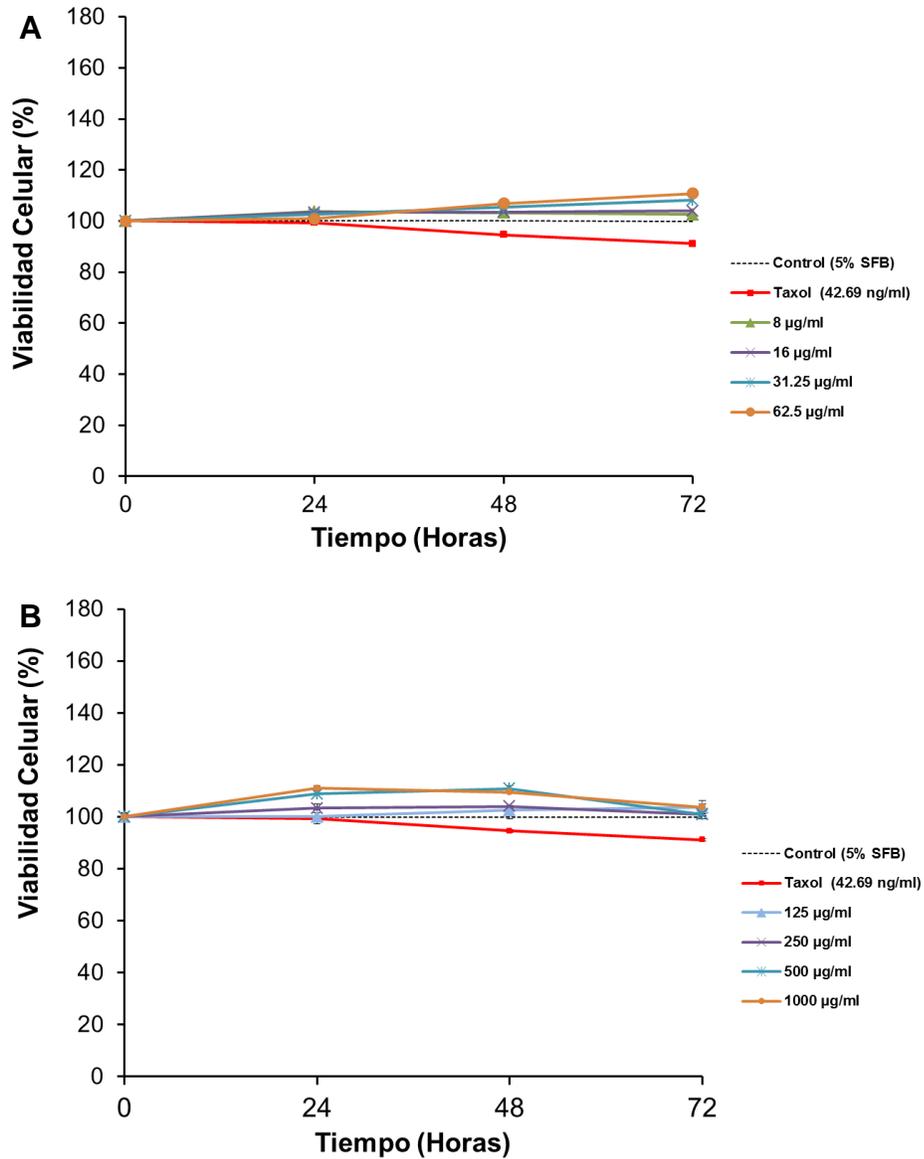
Estos resultados sugieren fuertemente que el extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* induce un incremento en la viabilidad celular y de manera indirecta se puede concluir que se induce proliferación en la línea A549, sin generar efecto citotóxico a las concentraciones probadas.

Asimismo se observa que el control positivo de citotoxicidad del experimento, en el que se utilizó Taxol, presenta disminución de la viabilidad celular dependiente del tiempo del tratamiento.

Posteriormente, con la finalidad de demostrar que el extracto de *Calendula officinalis* específicamente producía un efecto en la línea tumoral A549 y no a las células normales, se realizaron ensayos de viabilidad celular utilizando a la línea MRC-5 (pulmón normal-inmortalizado). En este caso también se probaron las mismas concentraciones del extracto hidroalcohólico a los mismos tiempos de exposición (Fig. 16)

En la línea celular MRC-5, los resultados obtenidos mostraron que el extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* no tuvo efecto significativo en la viabilidad celular. También se observa que el control de citotoxicidad (Taxol 50 nM) no tuvo efecto en la viabilidad a ninguno de los tiempos programados.

Por lo anterior, los datos de cinética de viabilidad de estos experimentos sugieren que el extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* no ejerce ningún efecto sobre la línea MRC-5 pero si induce un incremento de la viabilidad celular en la línea de cáncer de pulmón A549. Esto indica que el efecto de *Calendula* es diferencial sobre la línea tumoral y no afecta a células no tumorales. Por lo que no se obtuvo el efecto antitumoral esperado.

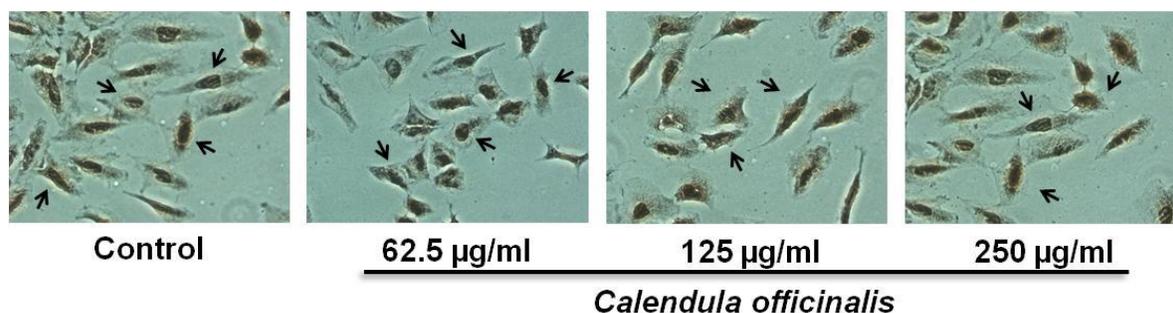


**Figura 16.- Efecto del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* sobre la viabilidad celular de la línea MRC-5. A) Concentraciones bajas del extracto y B) concentraciones altas (\* $p \leq 0.005$  vs media  $\pm$  SD,  $n=3$  por triplicado; Anova una vía. Pos hoc Holm Sidak)**

### 8.5 Efecto del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* sobre la proliferación celular de la línea celular A549 de adenocarcinoma de pulmón

Se evaluó el efecto del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* sobre la proteína PCNA (Antígeno nuclear de células en proliferación), debido a que esta proteína es un indicador para distinguir células en proliferación celular. Esta proteína se encuentra altamente expresada cuando las células se encuentran en las fases de G1 y S del ciclo celular y sirve como un cofactor de la DNA polimerasa  $\delta$ , el cual apoya la síntesis de la cadena continua en la replicación del DNA (Maga *et al.*, 2003)

En la figura 17 se muestran los resultados del ensayo de Inmunocitoquímica en donde la detección de la proteína PCNA se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón Anti-PCNA (Santa Cruz) y un anticuerpo secundario de conejo contra ratón Anti-Mouse (Santa Cruz). Observándose la presencia de la señal en color café, en el núcleo de las células (Flechas negras) como se observa en la figura 16. Este ensayo es cualitativo.



**Figura 17.- Efecto del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* sobre la proteína PCNA.** Se utilizaron 3 concentraciones del extracto hidroalcohólico (62.5, 125 y 250 µg/ml), en un tiempo de 48 horas.

Los resultados de la figura 17 sugieren que el extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* en la línea A549 hace que la célula prolifere, debido a que la proteína PCNA se encuentra expresada tanto en el control sin tratamiento como en los tratamientos a las concentraciones utilizadas. La determinación de PCNA es una prueba cualitativa y se observa que su señal no depende de los tratamientos.

## 8.6 Evaluación del efecto del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* sobre la muerte celular programada en la línea A549.

Posteriormente se realizó el ensayo de Anexina V para validar los ensayos de viabilidad celular y proliferación para justificar que las células en presencia del extracto hidroalcohólico están proliferando y que no hay ningún estímulo por parte del extracto que este induciendo un mecanismo de muerte celular (apoptosis o necrosis), para ello las células fueron expuestas a 2 diferentes concentraciones del extracto por un periodo de 48 horas, como se observa en la figura 18.

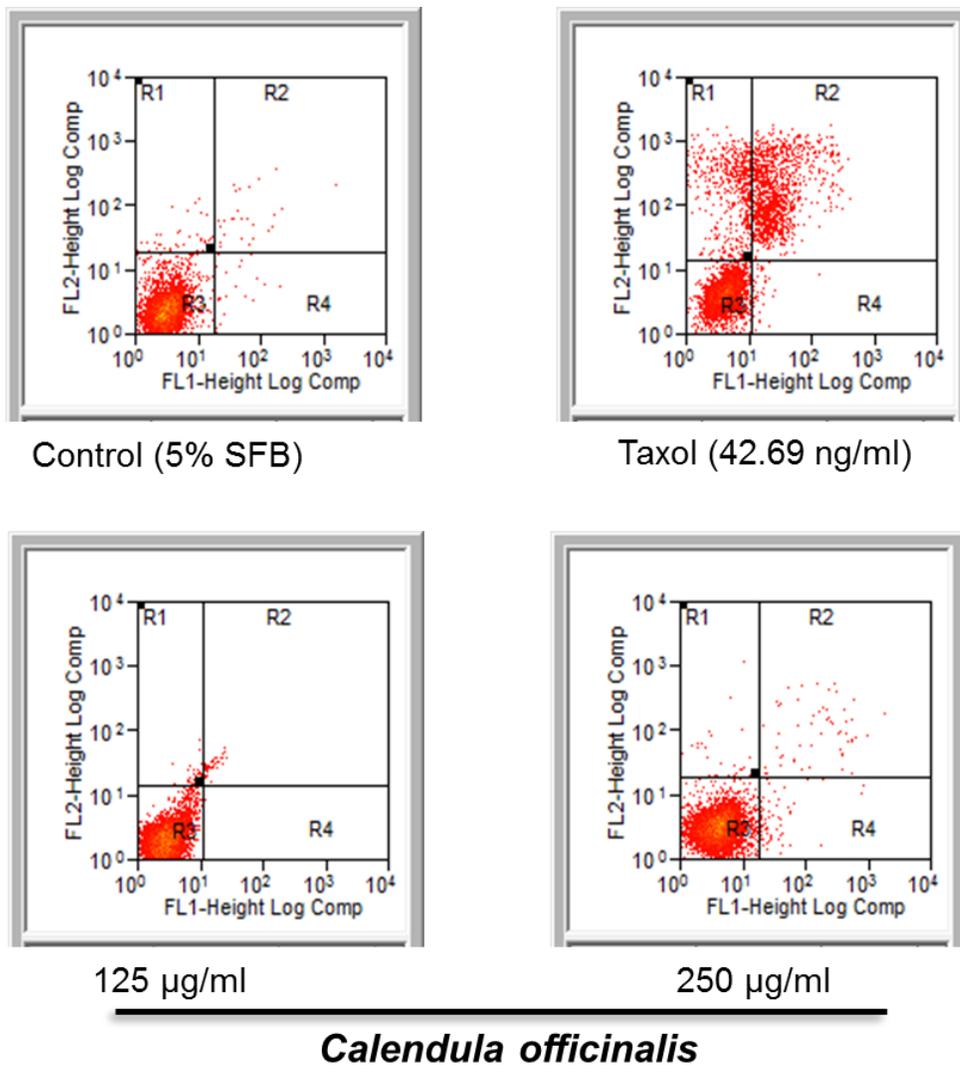


Figura 18.- Ensayos con Anexina V para determinar inducción de apoptosis. A) Células sin tratamiento, B) Taxol (50 nM), C) 125 µg/ml y D) 250 µg/ml del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis*. Tiempo: 48 horas, n=2

Los resultados mostrados en la figura 18 de la técnica de Anexina V, sugieren que en la línea celular A549 tratada con *Calendula* a las concentraciones del extracto utilizadas (125 y 250 µg/ml) no se induce apoptosis. El control positivo con Taxol indujo un 46.28 % de apoptosis solamente hasta las 48 horas (Figura 19)

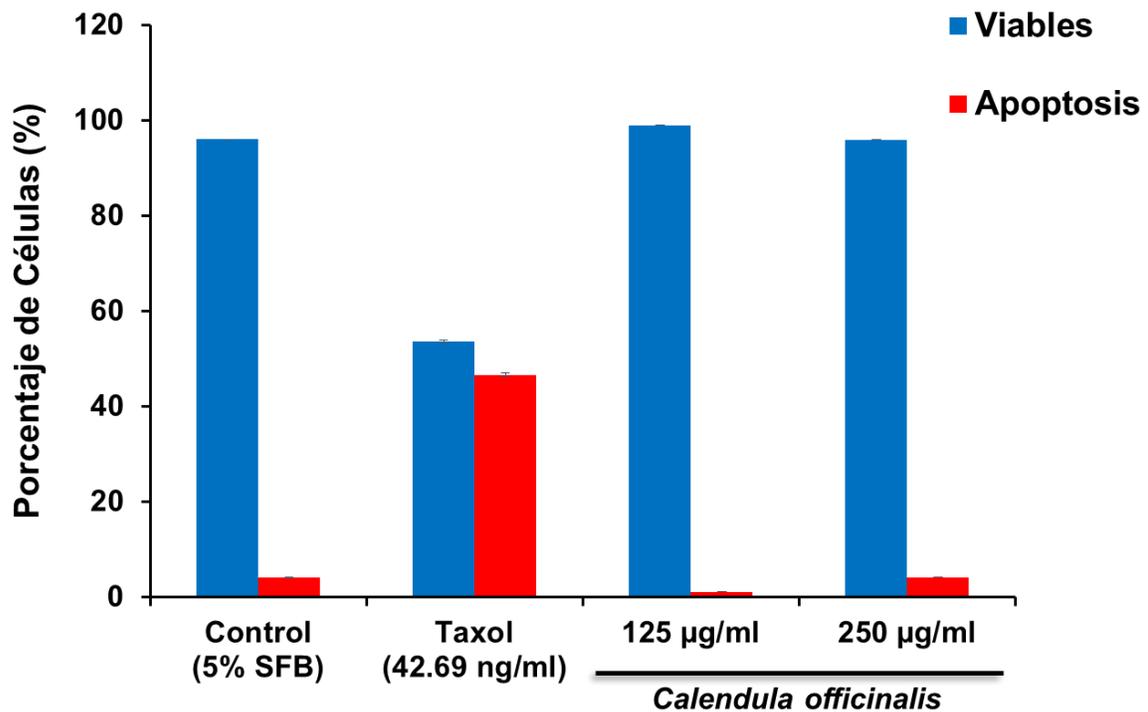


Figura 19.- Ensayos con Anexina V-FITC para determinar inducción de la apoptosis en la línea A549. Control negativo sin tratamiento, control positivo con Taxol y dos concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis*. Tiempo final del ensayo 48 horas

### 8.7 Evaluación del efecto de la combinación del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* más Taxol en la línea celular A549.

Con los experimentos realizados de viabilidad celular, inmunocitoquímica de PCNA y Apoptosis por Anexina V, se concluyó que el extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* presentó efecto significativo en el incremento de la viabilidad

celular e indirectamente esto se interpretaría como una inducción de la proliferación celular en la línea A549. Sin embargo sin embargo en la línea MRC-5 no se observa ningún cambio significativo en la viabilidad de la célula.

Con los resultados obtenidos no se comprueba la hipótesis anteriormente planteada, sin embargo surge la duda de que pasara si se combina el Extracto hidroalcohólico mas el Taxol, un antitumoral conocido en el tratamiento del cáncer de pulmón. En la literatura se ha sugerido que es posible potenciar el efecto de un tratamiento antitumoral, mediante su combinación con otro compuesto antitumoral ya que algunas combinaciones presentan un efecto sinérgico, como por ejemplo el cisplatino y el Taxol.

Por lo cual con estos antecedentes previos de efecto sinérgico, nos preguntamos si el efecto sería sinérgico o antagónico al combinar el extracto con el Taxol, teniendo en cuenta que el extracto induce proliferación en la línea A549.

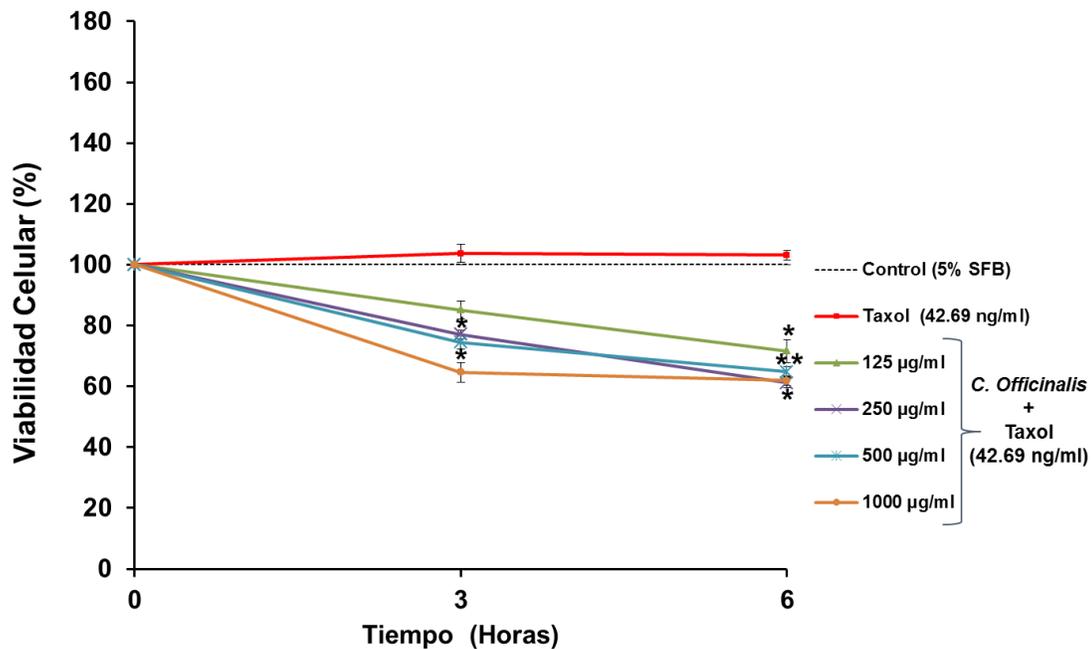
En el entendido de que el extracto de *Calendula* tiene efecto de estimulación de la proliferación, aparentemente selectivo contra las A549 bajo nuestras condiciones experimentales, se procedió a probar la probable potencialización del uso de Taxol a una concentración baja (50 nM) en combinación con cada una de las 4 concentraciones altas (125, 250, 500 y 1000 µg/ml) del extracto de *Calendula officinalis*, que antes estimularon su proliferación.

Se determinó la viabilidad celular como se describió antes y se obtuvieron los siguientes resultados que se ilustran en la figura 20.

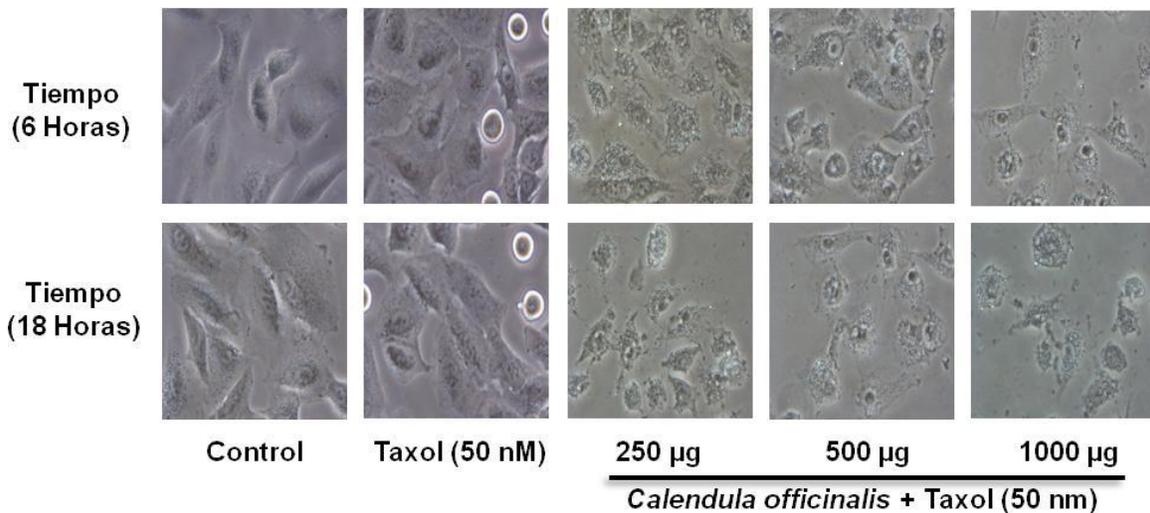
Los resultados obtenidos en la figura 20, muestran el efecto del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* más el Taxol sobre la viabilidad celular, éstos resultados muestran una disminución significativa de la viabilidad celular de manera dosis y tiempo dependientes en las células incubadas con el extracto a partir 3 y 6 horas, en las concentraciones 125, 250, 500 y 1000 µg/ml. Asimismo se observa que el control positivo (Taxol) no presenta ningún cambio en la viabilidad de la célula a tiempos cortos. Por lo cual cuando se realizó el análisis estadístico de las 4 concentraciones del extracto hidroalcohólico mas Taxol contra

el control positivo y el control negativo se obtuvieron diferencias significas las cuales indican que la combinación de *Calendula* mas el Taxol presentan un efecto sinérgico potenciando la disminución de la viabilidad significativamente.

Por otro lado se tomaron fotos de los experimentos a los diferentes tiempos (figura 21) y se observó en el transcurso de las 6 y 18 horas un cambio en la morfología de la célula, es decir las células se observaban deformadas, sin contacto entre célula y célula, no son homogéneas en tanto a su morfología, se observan vesículas en el interior de las células y se observan detritus celular.



**Figura 20.- Efecto de la combinación del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* más Taxol (50 nM) sobre la viabilidad celular de la línea A549.** Se utilizaron concentraciones altas del extracto de Calendula y una concentración constante del Taxol. (\* $p \leq 0.005$  vs media  $\pm$  SD, n=3 por triplicado; Anova una vía. Pos hoc Holm Sidak)

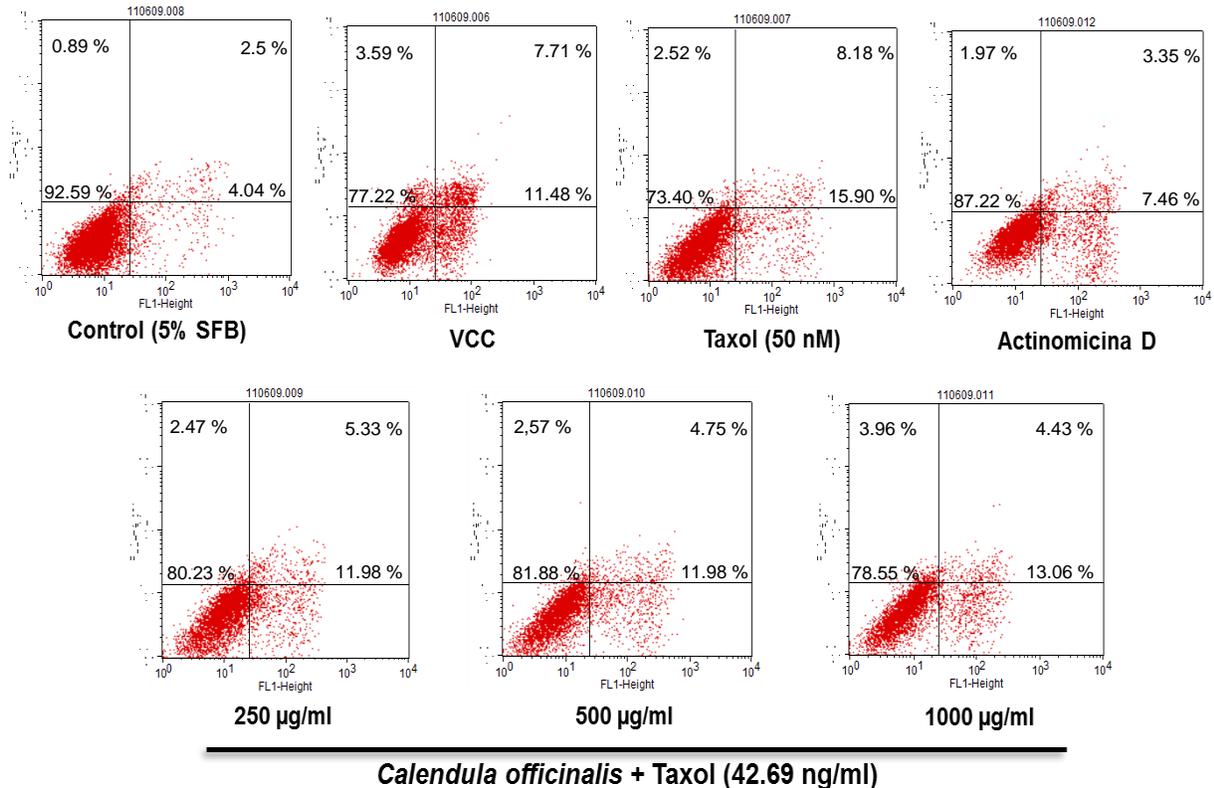


**Figura 21.- Efecto de la combinación del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* más Taxol (50 nM) sobre la viabilidad celular de la línea A549.** Se utilizaron concentraciones de 250, 500 y 1000 µg/ml del extracto de Calendula mas Taxol a 50 nM. Objetivo 40X.

Los datos obtenidos de la viabilidad celular y las imágenes de microscopía óptica de la figura 21, se puede interpretar que los tratamientos basados en el extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* combinados con Taxol (50 nM), presentan un efecto sinérgico de disminución de la viabilidad celular y tendiente a la citotoxicidad en la línea a A549.

Posteriormente para evaluar la muerte celular en los cultivos con tratamientos simultáneos de *Calendula* y Taxol en la línea A549 se realizó la técnica de Anexina V-FITC. Para montar la prueba se utilizaron 4 controles positivos de inducción a apoptosis (toxina VCC de *Vibrio cholerae*, Actinomicina D 20 mg/ml, y Taxol a 50 nM equivalente a 42.69 ng/ml). También se utilizó un control negativo sin tratamiento.

Se evaluaron tres concentraciones del extracto hidroalcohólico de 250, 500 y 1000 µg/ml combinado con Taxol (50 nM o 42.69 ng/ml) como se observa en los citogramas obtenidos del citometro de flujo (Figura 22).



**Figura 22.- Ensayos con Anexina V para determinar inducción de apoptosis.** A) Células sin tratamiento, B) VCC, C) Taxol (50 nM o 42.69 ng/ml), D) Actinomicina D, E) 250 µg/ml y F) 500 µg/ml y G) 1000 µg/ml del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* combinado con el Taxol. Tiempo: 18 horas

El análisis de los resultados con respecto a los controles utilizados reportó que en tratamiento con Actinomicina presentó un 25 % de inducción de apoptosis. La toxina (VCC) presentó un 20% de apoptosis, el Taxol por sí solo un 8% y el control sin tratamiento solo presentó un 2% de inducción.

Las pruebas realizadas con los tratamientos combinados de *Calendula*-Taxol, presentaron porcentajes de apoptosis consistentemente crecientes con el aumento de la concentración del extracto de *Calendula*.

A mayor concentración del extracto de *Calendula* con una concentración constante de Taxol, mayor inducción de la apoptosis por arriba del 15%, el cual se encuentra en el promedio de los controles usados. Finalmente y con base en todos los experimentos realizados se sugiere que el tratamiento combinado usando el extracto hidroalcohólico de *Calendula* combinado con Taxol, presenta un efecto sinérgico en la inducción tanto de citotoxicidad como de apoptosis en células derivadas de cáncer de pulmón de células pequeñas, a tiempos cortos.

Posteriormente se procedió a realizar el mismo procedimiento usando la línea MRC-5, se probaron las mismas concentraciones del tratamiento combinado y dado que en este caso no se observó ningún cambio significativo a tiempos cortos como los que se observaron con la línea A549, se incubó a tiempos largos de 0, 24 y 48 horas (figura 23).

Los datos obtenidos sugieren un incremento significativo de la viabilidad celular con respecto al Taxol, a concentraciones de 125, 500 y 1000  $\mu\text{g/ml}$  a las 24 horas, mismas que posteriormente a las 48 horas no presento ningún efecto en la viabilidad de la célula.

Con estos resultados obtenido de ensayo de viabilidad en la línea A549 se sugiere que el la combinación de *Calendula* mas el Taxol presentan un efecto citotóxico en la células y que en cambio en la línea MRC-5 se induce un incremento en la viabilidad celular.

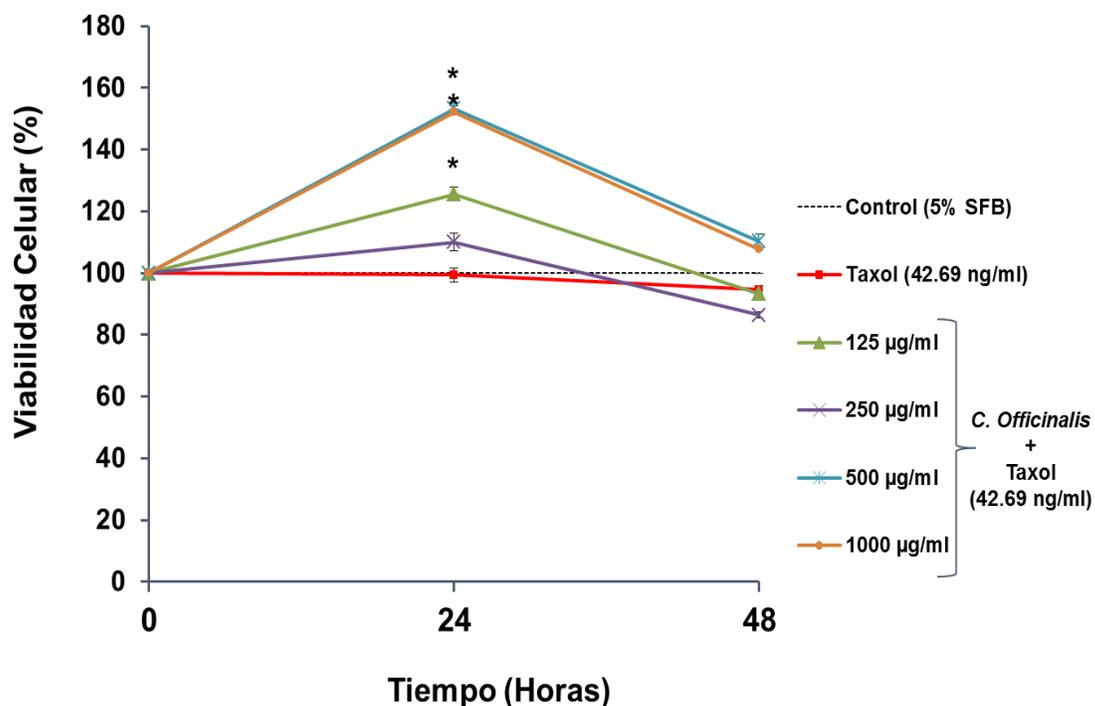


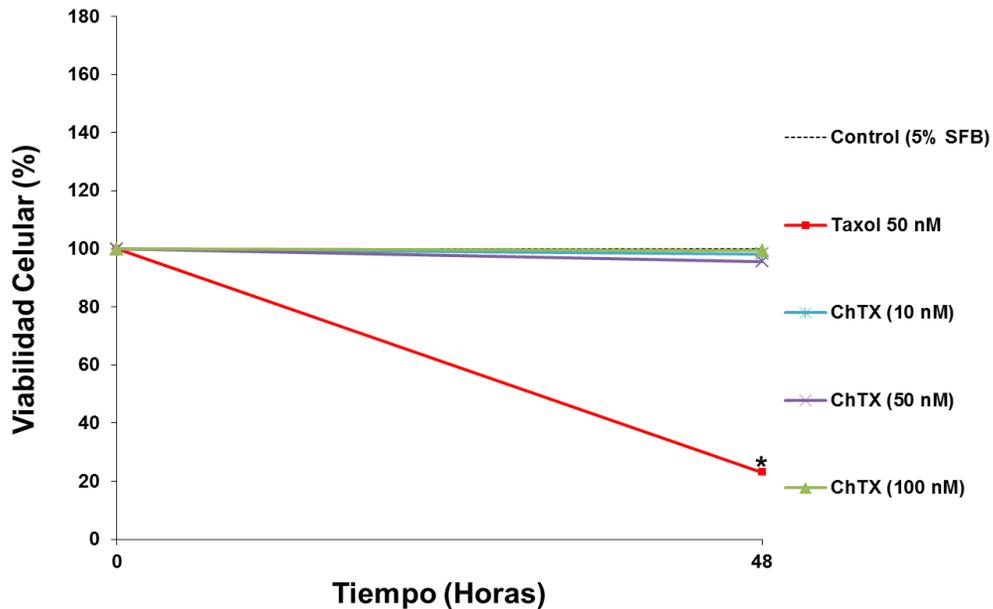
Figura 23.- Efecto de la combinación del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* más Taxol (50 nM) sobre la viabilidad celular de la línea MRC-5. Se utilizaron concentraciones altas del extracto de Calendula y una concentración constante del Taxol. (\* $p \leq 0.005$  vs media  $\pm$  SD,  $n=3$  por triplicado; Anova una vía. Pos hoc Holm Sidak)

### 8.8 Evaluación del efecto de un inhibidor específico del canal KCNMA1 sobre la viabilidad celular en la línea A549 de adenocarcinoma de pulmón

Posteriormente se realizaron ensayos de viabilidad celular para determinar la presencia del canal KCNMA1 y su efecto utilizando un inhibidor específico del canal (Caribdotoxina) en la viabilidad celular de la línea A549. La presencia del canal se ha descrito en otras líneas celulares de cáncer de próstata y mama, que la inhibir la función del canal se ve afectada la proliferación de las líneas celulares.

Para este ensayo se utilizaron concentraciones del inhibidor específico de la función del canal como lo es la Caribdotoxina en donde se utilizaron concentraciones reportadas de 10, 50 y 100 nM y se incubaron por 48 horas, el

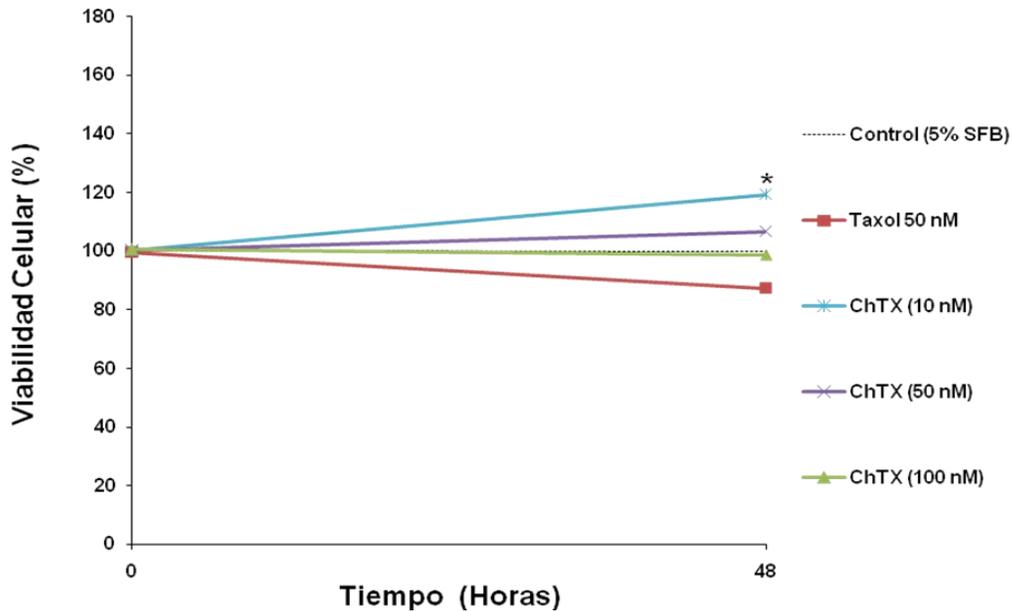
control positivo fue el Taxol a una concentración de 50 nM y un control negativo (células sin tratamiento).



**Figura 24.- Efecto de un inhibidor específico del canal KCNMA1 sobre la viabilidad celular de la línea A549.** Se utilizaron 3 concentraciones del inhibidor Caribdotoxina (ChTX) 10, 50 y 100 nM (\* $p \leq 0.005$  vs media  $\pm$  SD,  $n=3$  por triplicado; Anova una vía. Pos hoc Holm Sidak).

Los resultados obtenidos del ensayo de viabilidad celular de la Figura 24 en la línea A549, sugieren que la inhibición de la función del canal KCNMA1 en las tres concentraciones utilizadas no presento ningún efecto significativo en la viabilidad células de la línea A549.

Por otro lado también se evaluaron las mismas concentraciones del inhibidor del canal KCNMA1 en la línea MRC-5 y los resultados obtenidos del ensayo se observan en la figura 25, indicando que el inhibidor específico de la función del canal induce un incremento significativo de la viabilidad celular a la concentración de 10 nM a las 48 horas.



**Figura 25.- Efecto de un inhibidor específico del canal KCNMA1 sobre la viabilidad celular de la línea MRC-5.** Se utilizaron 3 concentraciones del inhibidor Caribdotoxina (ChTX) 10, 50 y 100 nM (\* $p \leq 0.005$  vs media  $\pm$  SD,  $n=3$  por triplicado; Anova una vía. Pos hoc Holm Sidak).

En base a los resultados obtenidos en la viabilidad de la línea A549 se sugiere que al inhibirse la función de éste canal de potasio, aparentemente no se ve afectada la viabilidad celular, lo que sugiere que el canal no es importante en la viabilidad de la línea A549, por ende tampoco lo es en la proliferación en esta línea celular. En la línea MRC-5 hubo un incremento significativo de la viabilidad respecto al control negativo, lo cual es indicativo de que la función que se está inhibiendo en estas células no compromete, sino que aún podría estimular la proliferación celular. En estos experimentos se observa que el control positivo con Taxol disminuyó significativamente la viabilidad.

## 8.0. Discusión

Dentro de los tumores malignos el cáncer de pulmón ocupa el primer lugar en mortalidad a nivel mundial y en nuestro país, se clasifica en dos tipos: cáncer de células pequeñas y no pequeñas (Jemal *et al.*, 2010). El cáncer de células no pequeñas es el más agresivo entre estos dos tipos. Los tratamientos convencionales contra el cáncer pulmonar son actualmente la cirugía, seguida de quimioterapia y/o radioterapia. Aunque las quimioterapias han mejorado sin cesar durante las últimas décadas, sigue siendo necesaria la búsqueda de estrategias terapéuticas farmacológicas suplementarias y complementarias para aumentar la supervivencia de los pacientes y de ser posible evitar o disminuir al máximo los efectos secundarios que deterioran su calidad de vida (Medina *et al.*, 2006A).

En este contexto de búsqueda de nuevos métodos terapéuticos oncológicos situamos al extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis*, el cual es un producto obtenido de una planta común en el mundo, su proceso de extracción es sencillo, reproducible y de bajo costo (Yoshikawa *et al.*, 2001 y Pérez-Carreón *et al.*, 2004).

Se reporta en la literatura que a diferentes tipos de extractos de *Calendula officinalis* les han sido atribuidas una amplia variedad de actividades biológicas: inmunoestimulantes (Amirghofran *et al.*, 2000), antitumoral (Boucad-Maitre *et al.*, 1998), antiinflamatoria (Akihisa *et al.*, 1996), analgésica (Sarrell *et al.*, 2001 y 2003), antibacteriana, antioxidante y antiviral (Córdova *et al.*, 2002) e incluso propiedades antígenotóxicas (Pérez-Carreón *et al.*, 2002). Con el objetivo de buscar nuevos agentes antitumorales, nos hemos centrado concretamente en la actividad citotóxica o antiproliferativa sobre la línea celular A549, para realizar el presente estudio de un extracto de *Calendula officinalis*.

Por lo anterior en este proyecto se utilizó un extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* preparado desde la propia planta, siguiendo el protocolo de Yoshikawa *et al.*, 2001, en el cual se ha reportado que los componentes que éste extracto posee, le confieren propiedades anti-tumorales.

Una vez elaborado el extracto hidroalcohólico se procedió a realizar los experimentos de viabilidad celular utilizando dos líneas celulares, la línea tumorigénica A549 y la línea MRC-5 no tumorigénica, en las cuales se probaron diferentes concentraciones del extracto en ensayos *in vitro* dosis respuesta (8-1000 µg/ml).

Se evaluó primeramente la viabilidad de la línea A549 para concluir indirectamente sobre su proliferación, comparando con controles experimentales adecuados (Figura 14).

Los ensayos de los extractos de *Calendula officinalis* en esta línea presentaron un incremento estadísticamente significativo de la viabilidad a concentraciones del extracto de *Calendula* de 62.5 y 1000 µg/ml incubando 24, 48 y 72 horas. El resultado fue un efecto proliferativo, muy contrario al mostrado por el control con Taxol. El Taxol es un potente inductor del arresto mitótico, por lo que disminuye la proliferación celular, es citotóxico e induce apoptosis (Carmichael *et al.*, 1985).

El mismo tipo de experimento se realizó en la línea MRC-5 observándose que los tratamientos con el extracto de *Calendula* no mostraron incremento o disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular, presentando un efecto parecido al control sin tratamiento. Lo que sugiere que no existe efecto de *Calendula* en la línea MRC-5.

Estos datos sugieren fuertemente que el extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* incrementa la viabilidad de la línea A549 y por ende se concluye que existe un efecto inductor en la proliferación, intrínseco del extracto usado.

Dado que los resultados de viabilidad, permiten hacer aproximaciones acerca de que había una inducción de la proliferación, esta hipótesis se corroboró mediante un ensayo cualitativo que determina si las células se encuentran proliferando. En dicho ensayo se identifica a la proteína PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación), ya que se expresa en el inicio de la fase de G1 y S del ciclo celular, además de favorecer la síntesis del DNA ya que es cofactor de la DNA polimerasa  $\delta$  (Maga *et al.*, 2003).

Para el ensayo de PCNA se utilizaron concentraciones de 62.5, 125 y 250 µg/ml. Como se puede observar en el control sin tratamiento, donde las células proliferan normalmente, se observa la señal nuclear en color café intenso, que indica que el anticuerpo específico contra la proteína PCNA, reconoció a su blanco nuclear, indicando que las células se encuentran en el inicio de la fase de G1 a la S del ciclo celular, es decir se encuentran proliferando.

Este resultado resultó positivo en los experimentos realizados con tratamientos usando concentraciones altas del extracto de *Calendula* y por lo tanto se sugiere que las células tratadas con extractos de *Calendula officinalis* se encuentran proliferando activamente.

Para cumplir con el siguiente objetivo que implicaba comprobar que los tratamientos con los extractos de *Calendula officinalis* no inducen muerte celular, se realizó el ensayo de Anexina V-FITC. En estos ensayos no se obtuvo inducción de la apoptosis, por lo tanto las células estaban viables, con sus características normales de granularidad y validan los ensayos de viabilidad celular e inmunocitoquímica de PCNA.

Estos experimentos apoyan la conclusión de que el extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* induce a la proliferación celular en la línea A549 y lo hace de manera diferencial, ya que la línea MRC-5 no muestran cambio con los tratamientos, las células se encuentran proliferando como lo indica la prueba de PCNA y no induce apoptosis ni necrosis en las células de origen tumoral de pulmón, A549.

Nuestros resultados obtenidos son consistentes con otros reportes de la literatura. Yoshikawa en el 2001 reportó la elaboración de un extracto hidroalcohólico a base de pétalos de *Calendula* del cual reportó sus compuestos químicos, especialmente presenta flavonoides del tipo quercetina, rutina e isorhamnetina con efecto antitumoral. En este artículo, los resultados obtenidos del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* son consistentes con la inducción de la proliferación.

Los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza. Estas sustancias demostraron múltiples efectos positivos (Martínez-Flórez *et al.*, 2002) sugiriendo que son potentes antioxidantes y protectores de las membranas celulares, neutralizan especies reactivas del oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos y normalizan la permeabilidad de la membrana celular y el metabolismo de los endoperóxidos (Pieta *et al.*, 1992, Asad *et al.*, 1998 y Pérez –Carreón *et al.*, 2002) por lo tanto los resultados obtenidos en la literatura sugieren que presenta un efecto inductor de la proliferación debido especialmente a la acción de los flavonoides.

Resultados semejantes se encontraron en ensayos de proliferación de hepatocitos con un tiempo de exposición de 4 horas frente al extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* a concentraciones de 3.7-100 µg/ml se indujo incremento de la proliferación celular determinada por ensayos de timidina tritiada, esto puede deberse a la acción de las saponinas y flavonoides que contiene.

Por otro lado algunas referencias relacionan a *Calendula officinalis* con efectos anti-tumorales *in vitro*, muestran que un extracto acuoso de esta planta activado por láser, presentaron un 72-100% de inhibición en la proliferación celular en 4 líneas celulares: cáncer gástrico, próstata, Cérvico-uterino y pancreático (Amirghofran *et al.*, 2000 y Jiménez-Medina *et al.*, 2006).

Una vez caracterizado el efecto inductor de la proliferación de *Calendula* sobre la línea celular A549, procedimos a probar la posibilidad de que este extracto pudiera actuar en combinación con el antitumoral de elección en cáncer pulmonar: el Taxol.

Surgió la pregunta de cómo podría actuar una combinación conteniendo Taxol a una concentración fija de 50 nM (42.69 ng/ml) Al mismo tiempo que diferentes concentraciones (250, 500 y 1000 µg/ml) del extracto hidroalcohólico de *Calendula*.

En los ensayos de efecto citotóxico, se observó sorprendentemente que la viabilidad de las A549 disminuye de manera estadísticamente significativa usando el rango de concentraciones altas de *Calendula* a tiempos cortos de incubación (3 a 6 horas). Además este efecto se potencia a las 18 horas, al observarse un cambio en la morfología celular perdiendo las células su granularidad, aparecen redondeadas con respecto al control, sugiriendo que se está llevando a cabo un efecto citotóxico en la célula que recibe el tratamiento combinado de Taxol-*Calendula*.

A continuación se realizaron ensayos de Anexina V-FITC para determinar si existía una inducción de apoptosis en la línea celular A549 probando las tres concentraciones del extracto (250, 500 y 1000 µg/ml) y misma concentración del Taxol.

Los resultados sugieren fuertemente que el extracto combinado con el Taxol muestra un efecto citotóxico y apoptótico sinérgico, sugiriendo que pueden actuar estimulando la muerte celular y deteniendo la proliferación de los cultivos y además lo hacen a tiempos cortos; lo que no ocurre con el Taxol por sí solo a la concentración de nuestros ensayos. Es decir el Taxol por sí solo, a la concentración de 50 nM tiene un efecto citotóxico tardío que se manifiesta bien hasta las 24 horas de incubación. Sin embargo el tratamiento combinado resulta en un efecto citotóxico a tiempos sorprendentemente cortos.

En la Línea MRC-5 no tumorigénica se observó un incremento de la viabilidad a las 24 horas de incubación que posteriormente se mantuvo parecida a los controles.

La aparente respuesta diferencial de los tratamientos combinados permite sugerir que su efecto sinérgico podría ser diferencial, actuando más bien sobre células tumorales y no tanto en las células normales. Esta cierta actividad diferencial ciertamente permitiría usar el tratamiento combinado para potenciar su efecto, en pacientes que presentan resistencia ante el mono-tratamiento con Taxol. Probablemente la potenciación con *Calendula* sería una buena opción para

disminuir los efectos secundarios de los tratamientos convencionales altamente tóxicos para las células de toda la economía del organismo.

Por otra parte, el uso de tratamientos combinados se ha abordado en la literatura, pero no la actividad sinérgica de un tratamiento de origen vegetal con antitumorales, esa es una contribución de este trabajo. En lo que respecta a los tratamientos antitumorales combinados, algo completamente diferente se ha reportado: el uso de dos medicamentos antitumorales ya establecidos, por ejemplo el cisplatino en combinación con el Taxol. Este tratamiento en particular, se ha reportado que es capaz de potenciar su efecto y esto puede ser evidenciado mediante un aumento en la inducción de apoptosis.

El efecto sinérgico del Taxol más el extracto de *Calendula* podría deberse principalmente al doble estímulo al que se ve sometida la célula. El Taxol genera un alto estrés en la célula, al inducir arresto mitótico que induce apoptosis a partir de las 24 horas (Centelles *et al.*, 2010). Al mismo tiempo el extracto de *Calendula* podría estar generando mayor estrés en la célula, con su alto contenido de flavonoides con actividad prooxidante que llevan a cabo la formación de peróxido de hidrógeno, radicales de hidroxilo y radicales superóxidos, escisión de las cadenas de DNA. Dicha actividad prooxidante puede ir resultando en degradación del DNA, peroxidación lipídica e inhibición de la glutatión-S transferasa (Sahu *et al.*, 1981; Crebelli *et al.*, 1987; Caria *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 2000), lo que aunado al arresto de mitosis producido por el Taxol, probablemente conducen a la célula al colapso y muerte celular.

Entre los flavonoides que están probablemente potenciando el efecto del Taxol, cabe destacar a la quercetina y la rutina, que son flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico de *Calendula*. Estas son moléculas bioactivas que inducen arresto del ciclo celular y además puede inducir apoptosis por medio de la activación de p53 en células tumorigénicas a tiempos cortos de exposición.

En 1998 Fulu evaluaron el efecto de la Quercetina en la línea A549, observando arresto del ciclo celular en la fase de G1 y la expresión del inhibidor de las

cinastas dependientes de ciclinas (p21/WAF1) y Pao *et al.*, 2004 observo efecto citotóxico y además inducción de la apoptosis por la quercetina en la línea celular A549 a las 24 horas.

Teniendo en cuenta que con el mono-tratamiento con Taxol a concentraciones bajas, siempre se observa mejor su efecto apoptótico y citotóxico a tiempos largos como consecuencia de la inducción del arresto mitótico y la apoptosis.

Podríamos hipotetizar que en nuestras condiciones experimentales, al adicionar una concentración establecida de Taxol, mas concentraciones altas del extracto de *Calendula* (250, 500 y 1000 µg/ml) probablemente permite que las células tumorales, en constante división, sean más sensibles a los flavonoides. Probablemente la concentración de flavonoides se incrementa paulatinamente en la célula y por lo tanto los estímulos de estrés del Taxol-*Calendula*, tienden a potenciar su efecto produciendo en la célula citotoxicidad y muerte celular que justifican los cambios morfológicos de redondeo y desprendimiento que se observan en los cultivos. La disminución de la viabilidad celular (indirecta estimación de la proliferación celular) e inducción de la apoptosis, son graduales pero inician a tiempos cortos.

Hasta aquí, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren fuertemente la probable utilidad sinérgica del extracto de *Calendula* en presencia de una concentración de 50 nM de Taxol.

Otra de las opciones a estudiar en esta tesis es la probable acción antitumoral de la Caribdotoxina, debido a que actúa inhibiendo la actividad del canal de potasio KCNMA1.

Se ha reportado que en el proceso carcinogénico pulmonar, se activa la transcripción de genes importantes en la proliferación celular, dentro de estos genes activados, se ha sugerido que los canales de potasio presentan un papel importante en el evento de carcinogénesis pulmonar. Dentro de este grupo de genes, se encuentra el canal KCNMA1, un canal de potasio dependiente de  $Ca^{2+}$ ,

el cual se ha reportado expresado en la línea tumoral A549 (Sofija *et al.*, 2003, Deng *et al.*, 2006 y GeneCards 2011).

Basados en el antecedente anterior, se realizó la inhibición del canal en las líneas A549 y MRC-5 usando las tres concentraciones reportadas en la literatura. En la línea A549 no se observó ningún cambio significativo de incremento o disminución de la viabilidad celular, sin embargo en la línea MRC-5 se observó un incremento la viabilidad a las 48 horas.

Con este ensayo de viabilidad celular de las líneas A549 y MRC-5 se sugiere que la función del canal pudiera no ser importante en estas líneas celulares, debido a que no hubo ningún cambio significativo que indicara inhibición de la proliferación o muerte celular.

En la literatura reportan que el canal KCNMA1 se expresa en las líneas celulares AT-2 (cáncer de próstata de rata), IGR1 (melanoma humano) y MCF-7 (cáncer de mama) disminuyendo significativamente la proliferación celular y el potencial de membrana (Fraser *et al.*, 2000, Coiret *et al.*, 2006 y Nobuyoshi *et al.*, 2007), no obstante bajo nuestras condiciones experimentales no pudo observarse algo similar.

Con estos antecedentes y con los resultados obtenidos de nuestros experimentos sugerimos que el canal KCNMA1 no presenta efecto sobre la proliferación celular mencionado anteriormente ya que no se obtuvo ningún dato estadísticamente significativo de disminución de la viabilidad celular en estas líneas celulares a las concentraciones del inhibidor Caribdotoxina utilizadas.

Finalmente, en conjunto los resultados obtenido del presente trabajo ofrecen evidencia de que el extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* por sí solo, induce la proliferación celular en la línea A549 pero no presenta efecto sobre la línea MRC-5. Sin embargo al ensayar un tratamiento combinado, el extracto hidroalcohólico de *Calendula* más el Taxol, el efecto de citotoxicidad del Taxol se potencia, lo cual es comprobado por los ensayos de Anexina V que muestran inducción de apoptosis.

Es necesario realizar más trabajo experimental, para identificar el o los principios activos presentes en este extracto de *Calendula* y establecer cuál o cuáles de ellos generan esta actividad antitumoral en presencia de Taxol.

Además se debería probar otras líneas celulares de origen tumoral, para saber si es posible extender la efectividad de este tratamiento combinado, hacia otros tipos de cáncer. Por otra parte es necesario obtener evidencias moleculares, que permitan establecer el fundamento que apoye el desarrollo de éste nuevo tratamiento combinado, con acción anti-tumoral.

## 9.0. CONCLUSIONES

El extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* induce un incremento en la viabilidad y en la proliferación celular de la línea de origen tumoral A549, sin embargo no induce ningún cambio significativo en la viabilidad de la línea transformada pero no malignizada MRC-5. Esto indica una aparente actividad selectiva del extracto de *Caléndula* en células de origen tumoral.

En presencia de Taxol, el extracto de *Calendula officinalis* presenta un efecto citotóxico con apoptosis, que hace más eficiente el tratamiento *in vitro* con el antitumoral, ya que por sí solo no es capaz de mostrar efecto a tiempos cortos. Este tratamiento combinado permite inducir a la célula de origen tumoral a apoptosis, aparentemente de manera selectiva, ya que en la línea MRC-5, no se observa ningún efecto en la disminución de la viabilidad celular.

Por otro lado la inhibición específica del canal KCNMA1 no presenta ningún efecto visible relacionado con toxicidad o algún aumento o disminución de la viabilidad celular, como los reportados en otras líneas celulares. Lo anterior a pesar de haber sido reportado que esta molécula se encuentra presente en esta línea celular.

## 10.0 PERPESPECTIVAS

**Para la realización de un trabajo que continúe esta línea de investigación se sugiere:**

- Realizar ensayos de cromatografía en capa fina para identificar los compuestos químicos que posee el extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* con el que se está trabajando.
- Realizar la técnica de timidina tritiada para determinar la proliferación celular directa, en las líneas celulares utilizadas.
- Determinación de apoptosis por Anexina V de tratamientos con la línea celular MRC5.
- Evaluar la actividad del extracto hidroalcohólico sobre un modelo murino de cáncer de pulmón para evaluar la vía de administración del extracto para evidenciar si ocurre el efecto antitumoral reportado *in vitro* en este trabajo.

## 11.0.- BIBLIOGRAFÍA

- Águila** HB, Menéndez CR, Gonzales RC, Fernández FD. (2000). Extracto acuoso de *Calendula officinalis*. Estudio preliminar de sus propiedades. Rev. Cubana, PLANT MED; 5 (1):30-1.
- Amirghofran** Z, Azadbacht H, Karimi M (2000). Evaluation of the immunomodulatory effects of live herbal plants. Journal of Ethnopharmacology, 72: 167-172.
- Akihisa** T, Yasukawa K, Oinuma H (1996). Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. Phitochemistry, 43: 1225-1260.
- Barajas** Farias L. M., Pérez Carreón J, Popoca A. (2004). A dual Effect of *Calendula officinalis* flower extract: Chemoprotector and Promoter in a Rat Hepatocarcinogenesis Model. Planta 10-0051.
- Barbara** AN, Laurence M, Christian Z, Arnt S, Monje F, Pardo AL, Stühmer W. (2001). Ion Channels in Health and disease. B.I.F. FUTURA Vol 16. 7: 568-563.
- Basrai** D, Kraft R, Bollensdorff C, Liebmann L, Benndorf K, Patt S. (2002). BK channel blockers inhibit potassium-induced proliferation of human astrocytoma cells. Neuroreport 13(4):403-7.
- Bouck** N., Stellmach V. and Hsu SC. (1996). How tumors become, angiogenic. Adv. Cancer Res. 69, 135–174.
- Boucad-Maitre** Y, Algernon O, Raynaud J. (1998). Cytotoxic and antitumoral activity of *Calendula officinalis* extract. Pharmazie, 43: 220-221.
- Breitwieser** G.E. (1996). Mechanisms of K<sup>+</sup> channel regulation. J Membr Biol 152:1–11.
- Butler** A, Tsunoda S, McCobb D.P, Wei A, Salkoff L. (1993). mSlo, a complex mouse gene encoding “maxi” calcium-activated potassium channels. *Science*, 261, 221–224.
- Caffrey** JM, Brown A. M, Schneider MD. (1987). Mitogens and oncogenes can block the induction of specific voltage-gated ion channels. *Science* 236: 570–573, 1987.

- Cambien B.**, Rezzonico R, Vitale S. Rouzaire-Dubois y Dubois J. (2008). Silencing of hSlo potassium channels in human osteosarcoma cells promotes tumorigenesis, *Int. J. Cancer*: 123, 365-371.
- Caria, H.**, Chaveca, T., Lares, A., Rueff, J. (1995). Genotoxicity of quercetin in the micronucleus assay in mouse bone-marrow erythrocytes, human-lymphocytes, V79 cell-line and identification of kinetochore-containing (crest staining) micronuclei in human lymphocytes. *Mutation Research* 343, 85–94.
- Carretero J.** Carcinógenos Y Origen Del Cáncer De Pulmón, Centro Nacional De Investigaciones Oncológicas (Cnio) Madrid. *Cancer De Pulmón, Curso De La Eso En Español*, 17 y 18 De Febrero Del 2005, Coordinadores: M. Sánchez-Céspedes, Es - R. Rosell, Es. Auditorio Centro Nacional De Investigación Oncológicas (Cnio). Madrid. Disponible en [Www.Cnio.Es](http://www.Cnio.Es).
- Centelles J.J.** (2010). Paclitaxel. *Fitoterapia*. Vol 29. Número 4. (Julio- Agosto).
- Chávez Martínez FJ**, Romero PT, González MS, Lence Anta JJ, Santos MT.(1997). Riesgo de morir por cáncer en Cuba. *Rev Cubana Oncol* 13(1):5-11.
- Chittajallu R**, Chen Y, Wang H, Yuan X, Ghiani CA, Heckman T, McBain CJ y Gallo V. (2002). Regulation of Kv1 subunit expression in oligodendrocyte progenitor cells and their role in G1/S phase progression of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 2350–2355.
- Coiret G**, Matifat F, Hague F, Ouadid-Ahidouch H. (2005). 17- $\beta$ -Estradiol activates maxi-K channels through a non-genomic pathway in human breast cancer cells. *FEBS Lett* 579:2995–3000.
- Coiret** Guillaume, Anne-Sophie Borowiec, Pascal Mariot, Halima Ouadid-hidouch, and Fabrice Matifat. (2007). The Antiestrogen Tamoxifen Activates BK Channels and Stimulates Proliferation of MCF-7 Breast Cancer Cells. *Molecular Pharmacology* Vol. 71, No. 3
- Colin C**, Papageorge AG, Lowy DR, Alkon DL. (1990). Early enhancement of calcium currents by H-ras oncoproteins injected into Hermisenda neurons. *Science* 250: 1743–1745.
- Colotta F**, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* vol.30 no.7 pp.1073–1081.

- Cordova C.A**, Siqueira I.R, Netto CA. (2002). Protective properties of butanolic extract of *Calendula officinalis* L. (marigold) against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger. *Redox Rep*, 7(2):95-102.
- Crebelli**, R., Aquilla, E., Falcone, A., Carere, A. (1987). Urinary and faecal mutagenicity in Sprague–Dawley rats dosed with the food mutagens quercetin and rutin. *Food and Chemical Toxicology* 25, 9–15.
- De Vita**, V., S. Hellman y S. A. Rosenberg. (2001). *Cáncer, principios y prácticas de oncología*. Volumen 1. 5 Edición. Ed. Médica Panamericana. Madrid, España. 1540 pp.
- Demeule M**, Michaud-Levesque J, Annabi B, Gingras D, Boivin D, Jodoin J, Lamy S, Bertrand Y, Beliveau R. (2002). Green tea catechins as novel antitumor and antiangiogenic compounds. *Curr Med Chem Anti-Cancer Agents*. 2:441-463.
- Deng C**, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. (2006). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82: 675–684.
- Divya K**, Umesh T.S, Babette W, Edward A.M. (2009). Role of KCNMA1 gene in breast cancer invasion and metastasis to brain. *BMC. Cancer* 9:258.
- Dorai T**, Aggarwal B.B. (2004). Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett*. 215:129-140.
- Douglas H**, Folkman J. (1996). Patterns and Emerging Mechanisms Review of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* 86 353–364.
- Douglas H.**, Robert AW. (2000). The Hallmarks of Cancer, *Cell*, Vol. 100, 57–70.
- Flamm R.E**, Birnberg N.C, Kaczmarek L.K. (1990). Transfection of activated ras into an excitable cell line (AtT-20) alters tetrodotoxin sensitivity of voltage-dependent sodium current. *Pflügers Arch*. 416: 120–125, 1990.
- Folkman J**. (1971). Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182–1186.
- Fulu Bai**, Takayoshi Matsui, Naoko Ohtani-Fujita, Yoshizumi Matsukawa, Yi Ding, Toshiyuki Sakai. (1998). Promoter activation and following induction of the p21/WAF1 gene by flavone is involved in G1 phase arrest in A549 lung adenocarcinoma cells. *FEBS Letters* 437 (1998) 61-64

- Frances AS, Dancy J, Ramlau R, Mattson K, Gralla R, O'Rourke M. (2000),** Prospective Randomized Trial of Docetaxel Versus Best Supportive Care in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Previously Treated With Platinum-Based Chemotherapy, *Journal of Clinical Oncology*, Vol 18, Issue 10: 2095-2103.
- Fraser SP, Grimes JA, Djamgoz M.B. (2000)** Effects of voltage-gated ion channel modulators on rat prostatic cancer cell proliferation: comparison of strongly and weakly metastatic cell lines, *Prostate*. Jun 15; 44 (1):61-76.
- Gene Card. (2010).** Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member, Disponible en: <http://www-bimas.cit.nih.gov/cgi-bin/cards/carddisp.pl?gene=KCNMA1&search=KCNMA1>.
- Gherzi D, Wilcken N, Simes RJ. (2005).** A systematic review of taxane-containing regimens for metastatic breast cancer. *Br J Cancer*. 93:293-301.
- Hanks G.E, Myers E.C, Scandino P.T. (1993).** Cancer of the prostate. En: Devita VJ, Hellman FD, Rosenberg SA. *Cancer: principles and practice of oncology*. 4 ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1993 .p. 1073-1109.
- Hemmick LM, Perney TM, Flamm RE, Kaczmarek LK, Birnberg NC. (1997)** Expression of the H-ras oncogene induces potassium conductance and neuron-specific potassium channel mRNAs in the AtT20 cell line. *J. Neurosci*. 12:92-100.
- Hille B. (1992).** Axons, Ions and Dons. *Science*. 258 (5079):144-5.
- Hou J, Tian L, Wei Y. (2004).** Cancer Immunotherapy of Targeting Angiogenesis. *The Chinese Society of Immunology*. Volume 1:161-166.
- Huang KC. (1999).** *The Pharmacology of Chinese Herbs.* ( 2nd edition). CRC Press, Boca Raton. 457-483.
- Huang Y, Rane SG. (1993).** Single channel study of a Ca<sup>2+</sup>- activated K<sup>+</sup> current associated with ras-induced cell transformation. *J. Physiol. (Lond.)* 461: 601-618.
- INEGI (Instituto Nacional De Estadística, Geografía E Informática). (2007).** *Cáncer*. México, D.F., A 4 De Febrero. [Www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)
- Ivanov D.V, Tyazhelovaa T.V, Lemonnierc L, Kononenkoc L, Pestovaa A.A, Nikitind E.A. (2003).** A new human gene KCNRG encoding potassium channel regulating protein is a cancer suppressor gene candidate located in 13q14.3, *FEBS Letters* 539 (2003) 156-160.

- Jaclyn YH.** (2009), *Cancer Stem Cells: Lung Cancer*, Humana Press, Págs. 177-184.
- Jemal A, Rebecca S, Elizabeth W, Yongping H, Jiaquan X, Michael J.T.** (2009) *Cancer Statistics. CA Cancer J CLIN.* 59:225-249.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ.** (2007). *Cancer statistics. CA Cancer J Clin.* 57:43–66.
- Johnson J.P.** (1991). Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and Cancer Metastasis. *Rev.* 14, 263–277.
- Kitamura H., Takuya Y., Koji o.** (2008). Molecular and Genetic Pathogenesis of Lung Cancer: Differences Between Small-Cell and Non-Small-Cell Carcinomas. *The open Pathology Journal*, 2008, 2, 106-114.
- Kuklinsk C.** (2000). *Farmacognosia.* (Ed. Omega). Barcelona, España. 371-379.
- Kumar V.** (2000). *Patología Estructural y Funcional de Robbins, el pulmón.* (6ta. Edición).Págs. 728-788.
- Lastra VH, Piquet GR.** (1999). *Calendula Officinalis.* *Rev Cuba farm;* 33 (3): 188-94.
- Laza, L. D., L. I. Rodríguez y C. G. Sardiña.** (2003). Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. *Rev. Cubana Plant. Med* 8 (3):98-103
- Lazcano, A. H.** (2000). *Cáncer Cervico uterino. Prevención diagnóstico y control.* (Ed Médica Panamericana). 254pp
- Linares, D., R. Bye y B. Flores.** (1999). *Plantas medicinales de México, usos, remedios y tradiciones.* Instituto de Biología. UNAM. México. 155 pp
- Liu X, Chang Y, Reinhart PH, Sontheimer H, Chang Y.** (2002). Cloning and characterization of glioma BK, a novel BK channel isoform highly expressed in human glioma cells. *J Neurosci* 22(5):1840-9
- Lopez L.M.** (2002). Flavonoids as anticancer agents: structureactivity relationship study. *Curr Med Chem Anti-Cancer Agents* 2002, 2:691-714.
- López-Abente O.G, Pollán S.M, Ruiz T.M, Jiménez R.M y Vázquez V.F.** (1992). *La mortalidad por cáncer en España 1952-1986: efecto de la edad de la cohorte de nacimiento y del período de muerte.* Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.

- Loyola**, V. y F. Vazqu ez. (2006). *Methods in molecular Biology: Plant Cell Culture Protocols*. (2<sup>nd</sup> Edici n. Ed. Human Press). Inc. E.U.A. vol. 318.
- Macdonlad**, F., C. H. Ford y A. G. Casson. (2004). *Molecular Biology of cancer*. (2<sup>nd</sup> Edition Bios Scientific publishers). E. U. A. Vol. 318.
- Maga**, G. and H. hubscher. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) a dancer with many parthers. *J. Cell Sci.*2003 116(15):3051-3060.
- Mart nez-Fl res** S., Gonzalez-Gallego, J., Culebras y Ma. J. Tu n. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* XVII (6) 271-278
- Medina** J.E, Lora G.A, Paco L, Algarra I, Collado A, Garrido F. (2006). A new extract of the plant *calendula officinalis* produces a dual *in vitro* Effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC. Cancer.* 6:119.
- Meera** P, Wallner M, Song M, Toro L. (1997). Large conductance voltage- and calcium-dependent K<sup>+</sup> channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 14066–14071.
- Men ndez** Bellma, Alicia Lagarto Parra, Viviana Bueno Pav n, Carmen Carrillo Dom nguez, Odalys Vald s Mart nez, Isbel Guerra Sardi as y Addis Adriana Mu oz. (2007). Actividad Cicatrizante Y Ensayos De Irritaci n De La Crema De *Calendula Officinalis* Al 1%. *Lat. Am. J. Pharm.* 26 (6): 811-7.
- Miller** Y. (1996). Neoplasias pulmonares. En: Bennett JC, Plum F. Cecil. Tratado de Medicina Interna. 20 ed. M xico, DF: Mc Graw-Hill; Interamericana. P gs. 496-502.
- Moolgavkar** S. (1978). The multistage theory of carcinogenesis and the age distribution of cancer in man. *J Natl Cancer Inst* 61:49-52.
- Mosmann** T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65:55–63.
- Nobuyoshi** Tajima, Kristina Sch nherr, Susanna Niedling, Martin Kaatz, Hiroshi Kanno, Roland Sch nherr<sup>1</sup> and Stefan H. Heinemann. (2007). Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human melanoma cells are up-regulated by hypoxia involving hypoxia-inducible factor-1  and the von Hippel-Lindau protein. *J Physiol* 571.2 (2006) pp 349–359.

- OPS.** (1998). Cuba. En: LA salud en las Américas. Vol. 2. Washington, DC. P. 211.25. Publicación científica: No. 569. Disponible en [http://www.paho.org/spanish/sha/hia\\_1998ed.htm](http://www.paho.org/spanish/sha/hia_1998ed.htm)
- OMS** (Organización mundial de la salud). (2000). Actualización sobre las causas principales de mortalidad en la frontera de México y los Estados Unidos: 1995-1997, *Boletín Epidemiológico*, Vol. 21 No. 3.
- OMS** (Organización Mundial de la Salud). 2010. Cáncer [documento de internet]. Disponible en <http://www.who.int/topics/cancer/es/>.
- Orozco E, Gariglio P.** (2000). *Genética y Biomedicina Molecular*. (Limusa Noriega Editores). México. 1ª Edición.
- Park EJ, Pezzuto J.M.** (2002). Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev* 2002, 21:231-255.
- Pao-Chen Kuo, Huei-Fang Liu, and Jui-I Chao.** (2004). Survivin and p53 Modulate Quercetin-induced Cell Growth Inhibition and Apoptosis in Human Lung Carcinoma Cells, *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 53, Issue of December 31, pp. 55875–55885
- Pearce N, Boffetta P, Kogevinas P.** (1992). Cáncer, *Enciclopedia De Salud Y Seguridad En El Trabajo, Sumario. El Cuerpo Humano*. Disponible en <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo1/2.pdf>.
- Peinado V.I, Paris R, Ramirez J, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Barbera J.A.** (2008). Expression of BK(Ca) channels in human pulmonary arteries: relationship with remodeling and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Vascul-Pharmacol.* 49 (4-6): 178-84.
- Pérez-Carreón J., Cruz-Jiménez Licea-Vega A.,** (2002). Genotoxic and anti.genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell culture treated with diethylnitrosamine. *Toxicology invitro* 16: 253-258.
- Ramzi SC, Kumar V, Collins T.**(2000). *Patología estructural y funcional*. Sexta edición. (Editorial Mc Graw Hill Interamericana). España. *pag.s*277:287.
- Repp H, Draheim H, Ruland J, Seidel G, Beise J, Presek P, Dreyer F.** (1993). Profound differences in potassium current properties of normal and Rous sarcoma virus-transformed chicken embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3403–3407.
- Rocaud M.A.** (1988). Citotoxic and antitumoral activity of *C. officinalis* extracts. *Pharmazie.* 43(3): 220-1.

- Rouviere** H, Delmas A. 1996. Anatomía Humana. Barcelona: Masson, (9ª Ed.)  
Págs: 40-50.
- Sahu**, R.K., Basu, R., Sharma, A. (1981). Genetic toxicological testing of some plant flavonoids by the micronucleus test. *Mutation Research*. 89, 69–74.
- Sarrell** E, Cohen HA, Kahan E. (2003). Naturopathic treatment for ear pain in children. *Pediatrics*, 111: 574-579.
- Sarrell** E, Mandelberg A, Cohen H.A. (2001). Efficacy of naturopathic extracts in the management of ear pain associated with acute otitis media. *Arch Pediatr. Adolesc. Med*, 155: 796-799.
- Silva** J. Herrmannb, V. Heusera, W. Peresc, N. Possa Marronid, J. Gonza´lez-Gallego, B. Erdtmanna (2000) Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology* 40: 941–947
- Spiro** SG, Tanner NT, Silvestri GA, Janes SM, Lim E, Vansteenkiste JF. (2010). Lung Cancer: Progress In Diagnosis, Staging And Therapy. *Respirology* Jan; 15(1):44-50.
- Sofija** Jovanovic´, Russell M. Crawford, Harri J. Ranki, and Aleksandar Jovanovic. (2003). Large Conductance Ca<sub>2+</sub>-Activated K<sub>+</sub> Channels Sense Acute Changes in Oxygen Tension in Alveolar Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* Vol. 28, pp. 363–372.
- Su** Q, Hong Y, Hui L, Zhijian C, Yingliang W, Wenxin L. (2009). Molecular Information of Charybdotoxin Blockade in the Large Conductance Calcium-activated Potassium Channel. *J. Chem. Inf. Model.*, 49 (7), pp 1831–1838.
- Surh** YJ. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* 2003, 3:768-780.
- Teulon** J, Ronco PM, Geniteau-Legendre M, Baudouin B, Estrade S, Cassingena R, Vandewalle A. (1992). Transformation of renal tubule epithelial cells by simian virus-40 is associated with emergence of Ca<sup>2+</sup>-insensitive K<sup>+</sup> channels and altered mitogenic sensitivity to K<sup>+</sup> channel blockers. *J. Cell. Physiol.* 151: 113–125.
- Ukiya** M, Akihisa T, Yasukawa K. (2006). Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of pot marigold (*Calendula officinalis*) flowers. *J Nat Prod.* 69:1692-1696.

- Volák J, Stodola J.** (1983). Plantas medicinales. Praga, Artia, 319.
- Weaver AK, Liu X, Sontheimer H.** (2004). Role for calcium-activated potassium channels (BK) in growth control of human malignant glioma cells. *J Neurosci Res* 78(2):224-34.
- Weiss G. R.** (1997). Oncología Clínica. (Ed. El Manual Moderno), S. A. de C. V. México, D. F. 542pp
- Wonderlin J.S. Strobl.** (1996). Potassium channels, proliferation and G1 progression, Department of pharmacology & toxicology, *J. Membrane Biol.* 154, 91–107.
- Wulf EW, Maleeva OF.** (1969). The world resources of the useful plants. Moscú: Nauka, Pp563.
- Yoshikawa M, Murakami T, Kishi A.** (2001). Medicinal flowers.III. Marigold. hypoglycemic, gastric emptying inhibitory, and gastroprotective principles and new oleanane-type triterpene oligoglycosides, calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. *Chem Pharm Bull.* 49:863-70.