



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



**ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE P-GP EN LA LÍNEA
CELULAR HEP3B RESISTENTES A PACLITAXEL
(HEP3B/PTX) Y HEP3BPARENTALES DE
CARCINOMA HEPATOCELULAR VALIDANDO EL
FENOTIPO DE RESISTENCIA**

T E S I S

QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

LICENCIADA EN FARMACIA

PRESENTA:

LESLIE MONTSERRAT SOLANO PÉREZ

CODIRECTORES DE TESIS

DRA. LETICIA GONZÁLEZ MAYA

DRA. JESSICA NAYELLI SÁNCHEZ CARRANZA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA
SECRETARIA DE DOCENCIA
JEFATURA DE LA LICENCIATURA

Fecha: 27 de Julio de 2021
Asunto: VOTOS APROBATORIOS
Medio de Notificación: Electrónica
Folio: FF/D/SD/JLF/0083/2021

DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES
U.A.E.M
PRESENTE

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo de tesis **“Análisis de los niveles de P-gp en la línea celular Hep3B resistentes a Paclitaxel (Hep3B/PTX) y Hep3Bparentales de carcinoma hepatocelular validando el fenotipo de resistencia.”** presentada por la pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. Leslie Montserrat Solano Pérez, (20161012915)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

Jurado

Firma

Dra. Verónica Rodríguez López

Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez

Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

Dra. Laura Patricia Álvarez Berber

Dr. Erick Ayala Calvillo



ATENTAMENTE
“POR UNA HUMANIDAD CULTA”

M.P.D. Reyna América Serrano López
Secretaria de Docencia

Cp Archivo
Cp. Bdm

Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.
C.P. 62210 Tel. 777 329 7000 Ext. 3365



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ | Fecha:2021-07-27 16:03:23 | Firmante

HGxkEbYaOFxb/Kj2v778Q0EYaN9LgDnbvJqeI4mC7GNSH03tUscZkfZOA0P0rBSS+DanmeD11Kan/t8ZxwCRQgqV9n2Jwn0qEIWC8ZI5BDCdqLoWRUxEcgLGgSTqI9OaDpLGqh+FkRpC5ah/ctu6saA4oBICOb0ncEU0W4Kf2ycME4z7dNgPI8lIdqwY5nTAAIPhczdcUVrsRFmXTYaspV8BNTVnBmOUfkqIgfco6V32Xtx/GBgflUZeAUxmnNhIk0wLzpPeyl++KrmwGE9Kxmoh3sslRHhzcZtAN449+Ktx2fSuqKg9RTtU3botwtDSHvRKRwLahEbdgbKQPzYxwA==

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



PRznJa

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/vcdKzEGa2lOwKX5nK460eLMXeyb8Viga>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

JUAN GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ | Fecha:2021-08-30 18:36:36 | Firmante

C1XjBnkoWmbBdZJ55qCyJleG+VkkczN9c2XcHy7e763R+oSoCduSU7BjO68g0aMaSiklI8fGw5gqH6HHns0WFIW3SP07+GGfZn66xSa5ho8vSAYEWLLgpyYa8uLrFV3TM9E/2I7oG8ZAJrGkNa2JTzxl7XM2JBMXQXiNt2zv2ltj3QFYu5EoulBmNVvOWrCeO1yaxjIAY0pQ1rEvyKUrPU+Bosz33evbU4HjXg6Du1rA8gyXc2/vq0zXumRvlc9PTxKZwSGiEMfAZTE9ynciQemxRsjkhGWEiaBYyChnblsNFmT4FBx3R14nXyVE1+yyVeMEKQ3dfGWTWDxtFSGQ==

MARIA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMIREZ | Fecha:2021-08-30 19:46:58 | Firmante

Q/JXZm+SdkfN4egJijYFQGIYDmCnqx+1Vw4KKWI+6TIVhU2Wr8Dkja5S7Jzj2wb10yzoh3nKgzmYfMqchbgZ6pkNpfeI7Ug0+FYVIRXBuYTiIHZej8zchn5BIOlb8pq327N1BLQHumAK/f11EP2IS6Fdca8qho7wNxe4bqSGi+A4cllf6N/OZO/zKO40RXCC+mzxvZ5xqZmN2W+M1y8rNqwxSVWenXUSfb4ea9iTUQyzmhkOyirMtO9ljF5vAHVL+YJcESLzjb6dADZrKf94f5PLTWmSJO9JqoQdhTANODuVZl9jjBIYCFBb45aBWZf9ufdk99USq5uPQ==

VERONICA RODRIGUEZ LOPEZ | Fecha:2021-09-01 07:22:35 | Firmante

Xbn1eBQd/l6e4r403uHOUSLHK5yS995CwawRxxgnoELw3eUV1t4fSXc818t3wcuv76PLWrQFHLjX+ky8pCk6kntESxPEorYisfh19h4+aEH/PZSZrPx3+vKHSnbnl0xe+IGftOkefvT1fBefLjEGfX+5VG9Rm50xi5KTPA/VR9eFNyA0F3EkrUG2vJDrBepb9WHF0MkVfD7OzU/r0MGbY4sn/MY+ju7xaaAkj/6HgUxcdeZRqgQg6dtCbBscD4Z4PTPALzcczTTVzmdBtQupQxM7MzfOlh1Up40+HrRabEvGX2JSmoM41JsGB8zmDuNPmmyxanLD/YYiQHTO9tA==

LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER | Fecha:2021-09-01 10:21:25 | Firmante

ZAX+O5i5fREV9g/l/iGkx8OVHF9Qyypoi+z5jU6qT7/Q4/DFYNGBL1nEOpQ/7qpiRkvVKWAc/OxLxkvk6tEYOrjRcLCKEYbdn9pVlyeSwP6nN5Ms3q0FFFs3nI4M/lgpjGIsMYQ/TVUebIHspnavWjVRzT3/PsQoJiPsZTuaPMOIoI2vZQ7LYswOd2ukD33U+Swc2bgnuKNCWM8gwViWForQM9kldpiL69/oPiz5dOhRID3leuXp4evTfhNPhKWJx9H5mixXsekc3TRtGQxjODA/nXtB62w22Bi4ZTcvjCZR9Bfox9PKyHSF73+zx22DgZ3LEMcmwDd2nKMYCdQ==

ERICK AYALA CALVILLO | Fecha:2021-09-03 12:54:40 | Firmante

RHzC75GnjNEiIQ9+QxqsNCc+r+ZUQZoXH/w5pJbOuryWtG8qz7RHwVgONLE+dSNx+ucvMI3jogDaynOHzwFhIBZr5WRdSGOULteYyyM3chEdizfhaN3LqJRu12AREgN2LQg0G42JkEGfQp05hNFPZfcgpn5+YNwvdsG34AdUM4XBqEUQoBKrSdomDnbAKITSHaxRWmUA++gt9hQlua2+eWWH6KIT+PJIMVntE+8HtpLLUNTU439lPY5wxqasqST8QpOPWZxRySxuu3TR3Vyaetgw55/kPialSziJlk3uTKgRMzeok2br0tryNkeV74h4dVvJ5L5J5pji7t2bKjg==

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



zXdHBh

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/tCIN3RI5hNKQ5JjqcjdF3QGSbK1yrzN>



A mi familia...

A Laura, Cristian y Fernando.

Les dedico este gran proyecto que es mi tesis, porque sin ustedes no lo habría logrado. Gracias por su amor y apoyo incondicional. Por estar presente no solo en esta etapa de mi vida, sino en todo momento e ir de la mano conmigo en este gran reto. Con mucho cariño y agradecimiento esto es para ustedes.

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”.

-Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la vida y permitirme estar en donde estoy, por bendecir mi vida con la oportunidad de realizar estos estudios y por darme la dicha de estar con las personas que más amo. Sin ti nada.

A la Dra. Leticia González Maya, por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo y poder desarrollar este proyecto, así como por su constante apoyo, asesoría y consejos.

A la Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza, por su completo apoyo, por cada una de sus palabras y por cada consejo que me dio para guiarme en este proyecto.

A Fernando, por siempre motivarme a seguir adelante, por su amor y su apoyo incondicional.

A mis compañeras de laboratorio, Debora y Vivi, por su apoyo, sus consejos y la buena compañía que me brindaban durante la realización de mi tesis.

A la Facultad de Farmacia de la UAEM, por la ayuda de mis maestros y mis compañeros, y a la Universidad en general por los conocimientos que me ha otorgado.

Gracias a la vida por este triunfo y a todas las personas que apoyaron y creyeron en este proyecto.

Contenido

DEDICATORIA	0
AGRADECIMIENTOS.....	3
Contenido	4
Lista de figuras	6
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. CANCER	9
1.2 Incidencia y mortalidad.....	13
1.2.1. Carcinoma Hepatocelular	15
1.3. Tratamiento.....	17
1.3.1. Cirugía.....	17
1.3.2. Radioterapia	18
1.3.3. Quimioterapia.....	18
1.4. Paclitaxel	24
2. Resistencia a múltiples fármacos	24
2.2. Transportadores ABC.....	25
2.3. P-gp.....	27
2.4. Nuevas alternativas	28
3. ANTECEDENTES	30
4. JUSTIFICACIÓN.....	36
5. HIPÓTESIS	36
6. OBJETIVO GENERAL	37
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
8. METODOLOGÍA.....	37
8.1. Cultivo celular	37

8.1.1. Subcultivo de células Hep3B/PTX en cajas T de 25 cm ² y reactivación con Paclitaxel.....	38
8.1.2 Montaje de células Hep3B/PTX en placa (96 pozos) para calculo FR.	39
8.1.2.1 Viabilidad celular y determinación de IR	42
8.1.3. Montaje de células Hep3B/PTX en placa Corning Costar (24 pozos).	43
8.1.3.1 Inmunofluorescencia P-gp.....	45
9. RESULTADOS	46
9.1. Reactivación de células Hep3B/PTX	46
9.2. Análisis de la localización y expresión de P-gp en células Hep3B/PTX.....	47
10. Discusión de resultados.....	50
CONCLUSIONES	54
Conclusiones particulares.....	54
Conclusión general.....	55
PERSPECTIVAS.....	55
REFERENCIAS	56

Lista de figuras

Figura	Pagina
Figura 1. Vista de las células cancerosas en comparación con las células normales.	9
Figura 2. Incidencia y mortalidad de cáncer a nivel mundial.	15
Figura 3. Fases del ciclo celular.	21
Figura 4. Estructuras de los transportadores ABC.	26
Figura 5. Efecto de PTX sobre inhibición de la proliferación de las células Hep3B/PTX de CHC.	47
Figura 6. Análisis de la expresión y localización de P-gp en células resistentes Hep3B/PTX y células Hep3B parentales de CHC	49

RESUMEN

El cáncer, es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial, siendo el cáncer de hígado el sexto tipo de cáncer más frecuente, presentando tasas de incidencia y mortalidad casi del mismo nivel, debido a que en la actualidad no existe un tratamiento eficaz para este tipo de cáncer.

Uno de los tratamientos más usados para tratar esta enfermedad, es la quimioterapia, sin embargo, el uso de estos antineoplásicos, como el Paclitaxel están asociados con la resistencia a múltiples fármacos (MDR). La sobreexpresión de la glicoproteína P (P-gp) asociada a este fenotipo de resistencia. Promueve la eliminación del fármaco al nivel extracelular, impidiendo que la concentración adecuada del fármaco alcance niveles intracelulares para cumplir su efecto esperado que es la de inducir a muerte celular programada (apoptosis).

El objetivo del siguiente trabajo fue validar el fenotipo de MDR en células resistentes a Paclitaxel previamente obtenidas (células HEP3B/PTX).

Las células Hep3B parentales y Hep3B/PTX resistentes a Paclitaxel fueron cultivadas en medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino a condiciones estándar de 37°C y 5% de CO₂. Las células resistentes Hep3B/PTX después de estar en condiciones de -80°C por un periodo de 6 meses fueron descongeladas y reactivadas con tratamientos de Paclitaxel. Se determinó la concentración inhibitoria media (CI₅₀) tanto de células parentales como

resistentes para posteriormente determinar índice de resistencia. El análisis de expresión de P-gp se realizó por microscopia de inmunofluorescencia y finalmente se realizó el análisis de datos.

Los resultados mostraron que las células Hep3B/PTX presentan el fenotipo de resistencia. El análisis por inmunofluorescencia sobre la expresión de P-gp en las células Hep3B/PTX mostró una sobreexpresión de esta proteína en estas células resistentes comparándolas con el control negativos de células Hep3B parentales. Estos resultados son similares a los obtenidos por Sánchez et al., 2019 para la validación de estas células como un modelo de células resistentes y pueda utilizarse en la búsqueda de compuestos que puedan revertir el MDR.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CANCER

El cáncer se puede definir como un conjunto de enfermedades que tienen en común el crecimiento tisular producido por la proliferación continua y descontrolada de células anormales con capacidad de invadir y destruir otros tejidos (National Cancer Institute) **Figura 1.**

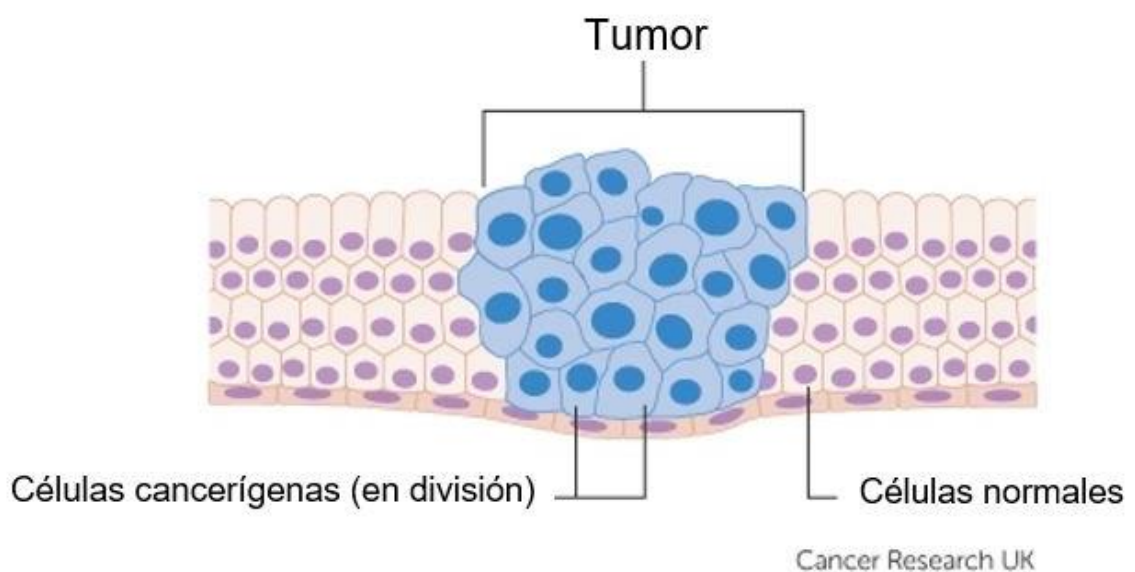


Figura 1. Vista de las células cancerosas en comparación con las células normales (Tomado de Cancer Reserch UK, 2014).

En condiciones normales las células crecen de una manera controlada, recibiendo señales para dividirse, diferenciarse o morir para esta división controlada existen puntos de control que evitan y repararán daños detectados impidiendo que continúe un crecimiento defectuoso; sin embargo si hay una evasión de dichas señales se promueve una proliferación descontrolada y anormal, de manera que, al no tener un control, estas crecen sin interrupción, y sin tener una óptima funcionalidad promoviendo la carcinogénesis (Anderson MW *et al.*, 1992).

Dentro de las alteraciones que sufren las células para evadir estos mecanismos de control, se asocian alteraciones genéticas y epigenéticas (Chen QW *et al.*, 2014). Dentro las alteraciones genéticas se asocian mutaciones que afectan la funcionalidad de ciertas proteínas que intervienen como controles del ciclo celular, logrando que las células continúen dividiéndose sin interrupción, formando cúmulos de células conocidos como tumores, que en cierto avance pueden lograr invadir y propagarse en otros órganos o tejidos, iniciando el proceso conocido como metástasis (Alberts *et al.*, 2010).

Por su parte las alteraciones epigenéticas se asocian a cambios en la expresión de genes, por ejemplo, genes implicados en regular mecanismos de proliferación celular ya no se expresan por consiguiente existen una desregulación en estos mecanismos promoviendo la proliferación fuera de control (Chen QW *et al.*, 2014).

Si bien el origen del cáncer es multifactorial, se sabe que el cáncer se origina debido a un conjunto de mutaciones y cambios en la expresión de genes ocasionados por interacciones entre factores genéticos y ambientales, estos últimos consisten en agentes externos conocidos como carcinógenos, los cuales se pueden clasificar de la siguiente manera:

- **Carcinógenos físicos**, como las radiaciones ultravioletas e ionizantes;
- **Carcinógenos químicos**, como los asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas o el arsénico;

- **Carcinógenos biológicos**, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos (Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer, la OMS).

Puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal, no es una enfermedad única, sino un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y de la célula de origen.

De acuerdo al Instituto Nacional de Salud (NIH) por sus siglas en inglés y el Instituto Nacional del Cáncer (National Cancer Institute, 2019), los tipos de cáncer del tejido, puede ser clasificado en seis categorías importantes:

1. Carcinoma

Se origina de la capa epitelial de las células y es el tipo de cáncer más común en humanos, además que este tipo de células frecuentemente se encuentran expuestas a agentes físicos o químicos, lo que podría favorecer el desarrollo del cáncer. Entre los más característicos se encuentran el carcinoma de pecho, los pulmones, el diafragma, el colon, la próstata, entre otros.

2. Sarcoma

Se da en tejidos conectivos y de apoyo, en donde se encuentran los músculos, los huesos, el cartílago y la grasa.

3. Mieloma

Éstos originan en las células de plasma de la médula. Las células de plasma son capaces de producir los diversos anticuerpos en respuesta a infecciones. El mieloma es un tipo de cáncer de sangre.

4. Leucemia

Afectan a la médula que es el sitio para la producción del glóbulo. Cuando es cancerígena, la médula comienza a producir a los glóbulos blancos no maduros excesivos que no pueden realizar sus acciones usuales y el paciente es a menudo infección propensa.

5. Linfoma

Cáncer del sistema linfático. Se origina en células del sistema inmune dentro del sistema linfático. Afectan a ganglios linfáticos en los sitios específicos como el estómago, el cerebro, los intestinos etc.

El cáncer es una enfermedad compleja debido a las causas que lo originan, es decir, Se han identificado que distintos tipos de cáncer tienen en común alteraciones en genes particulares; por lo general estos juegan un papel fundamental en la regulación del crecimiento celular. Entre los genes que frecuentemente se asocian con alteraciones se pueden clasificar los siguientes dos grupos:

Proto-oncogenes: Actúan transmitiendo señales, resultando como factores de crecimiento promoviendo la proliferación celular. Las alteraciones de estos genes como mutaciones puntuales, translocación cromosómica promueve su función amplificada, alcanzando un estado permanente activo, estimulando la proliferación celular de manera excesiva, sin control y permanente. Un protooncogén normalmente funciona de una manera muy parecida a un pedal de acelerador. Ayuda a que la célula crezca y se divida. Un oncogén podría compararse con un acelerador atascado, lo que hace que la célula se divida sin control (Kontomanolis *et al.*, 2020).

Genes supresores de tumores: Actúan regulando la proliferación celular, suprimiendo o

bloqueando la división celular, reparando daños del ADN o induciendo muerte celular cuando sea requerido. Cuando estos genes sufren alteraciones su función es inhibida (a diferencia de los oncogenes que requieren ser activados), de tal manera que su función de inhibir la proliferación no puede ser cumplida, promoviendo que las células continúen proliferando de manera descontrolada. Una diferencia importante entre los oncogenes y los genes supresores de tumores es que los oncogenes son el resultado de la activación (encendido) de proto-oncogenes, pero los genes supresores de tumores causan cáncer cuando se inactivan (desactivan). Se han encontrado anomalías hereditarias de los genes supresores de tumores en algunos síndromes familiares de cáncer. Causan que ciertos tipos de cáncer sean hereditarios. Pero la mayoría de las mutaciones del gen supresor de tumores se adquieren, no se heredan. Por ejemplo, se han encontrado anomalías del gen TP53 (que codifica la proteína p53) en más de la mitad de los cánceres humanos. Las mutaciones adquiridas de este gen aparecen en una amplia gama de cánceres (Kontomanolis *et al.*, 2020).

1.2 Incidencia y mortalidad

El cáncer es una de las causas principales de muerte en el mundo. Datos de Globocan 2020 indican que en 2018, hubo 18.1 millones de casos nuevos y 9.5 millones de muertes por cáncer en el mundo.

Se anticipa que en 2040 el número de casos nuevos de cáncer por año aumentará a 29.5 millones y el número de muertes por cáncer a 16.4 millones.

En general, las tasas más altas de cáncer se encuentran en los países con poblaciones que tienen el nivel más alto de esperanza de vida, de

educación y de estándar de vida. Pero para algunos tipos de cáncer, como el cáncer de cuello uterino, se observa lo contrario. La tasa de incidencia más alta para este cáncer se encuentra en países cuya población tiene niveles bajos de estas mediciones (Wild, *et al.*, 2020).

El informe, que recoge los datos **GLOBOCAN 2020** de 185 países y 36 tipos de cáncer, apunta a que una de cada 5 personas en todo el mundo desarrolla cáncer a lo largo de su vida, y que uno de cada 8 hombres y una de cada 11 mujeres fallecen a causa de la enfermedad.

El cáncer de mama en mujeres sigue siendo el tumor más común en todo el mundo (11.7% del total de casos nuevos), seguido del cáncer de pulmón (11.4%), el colorrectal (10.0%), el de próstata (7.3%) y el de estómago (5.6%).

Pero el más mortal no es el cáncer de mama, tumor en el que en los últimos años se ha avanzado mucho en cuanto a su prevención, diagnóstico y tratamiento, sino que ese lugar ahora lo tiene el cáncer de pulmón, responsable del 18% muertes por cáncer. Los otros cánceres más mortales son el cáncer colorrectal (9.4%), el de hígado (8.3%), el de estómago (7.7%) y el cáncer de mama en mujeres (6.9%).

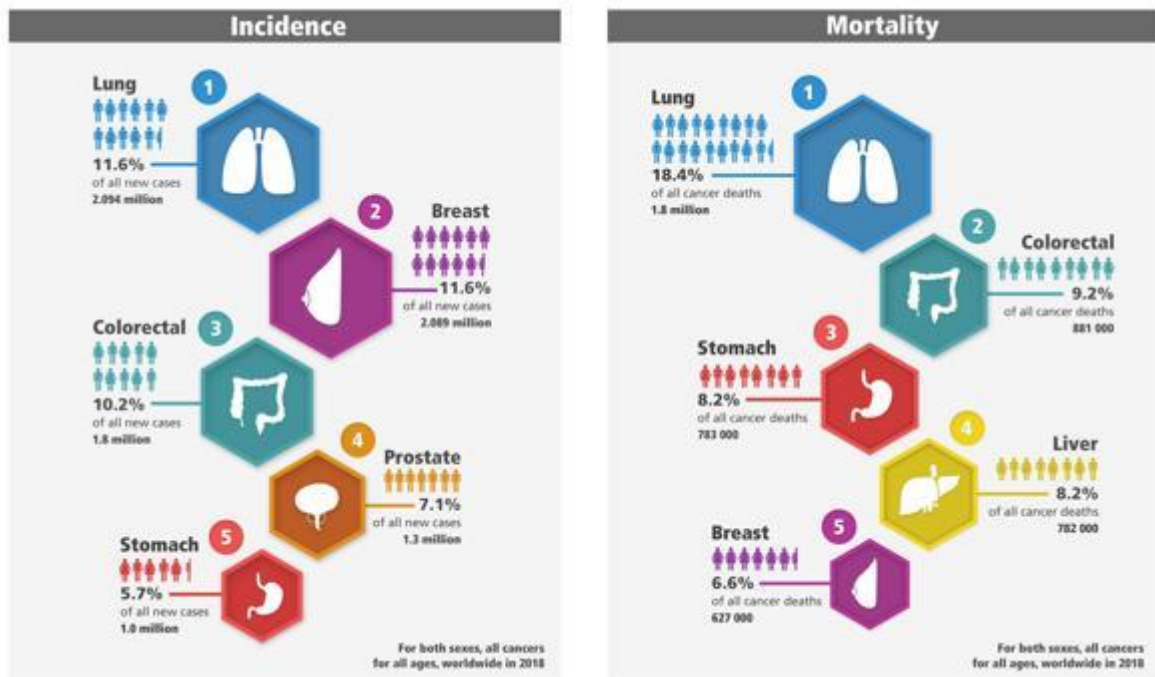


Figura 2. Incidencia y mortalidad de cáncer a nivel mundial. Fuente: GLOBOCAN 2020.

Por sexos, el cáncer de pulmón sigue siendo el más frecuente en los varones, y también principal causa de muerte por cáncer, seguido del de próstata y el colorrectal. El cáncer de hígado y cáncer colorrectal son los más letales.

1.2.1. Carcinoma Hepatocelular

De acuerdo a la International Agency for Research on Cancer (IARC), actualmente el Carcinoma Hepatocelular (CHC) constituye la sexta neoplasia más frecuente en el mundo y la tercera causa de muerte por cáncer. Su distribución mundial es muy heterogénea y está estrechamente relacionada con la prevalencia variable de los diferentes factores de riesgo asociados al desarrollo de esta enfermedad. (IARC, 2020).

En México el CHC es el octavo más frecuente, sin embargo, representa la 3ra causa de muerte por tumores, su prevalencia en cinco años se considera que es de 6.21% por 100000 habitantes (Globocan 2020)

En la mayoría de los casos, el CHC se desarrolla con cirrosis subyacente e inflamación hepática crónica^{17,18}. Los principales factores de riesgo de CHC son la infección por VHB / VHC, el consumo excesivo de alcohol, la ingestión de aflatoxina B1, el tabaquismo y la enfermedad del hígado graso no alcohólico causada por la obesidad y la resistencia a la insulina (Llovet *et al.*, 2016). Aunque la contribución de las diferentes etiologías a las muertes por cáncer de hígado varía según la región, el VHB es la principal causa de incidencia y muerte por cáncer de hígado en todo el mundo (272.000 y 265.000 casos, respectivamente) (Ghouri *et al.*, 2017).

Como muestran los datos estadísticos, el CHC es una enfermedad con una elevada mortalidad respecto a los casos de incidencia, esto muestra la deficiencia del diagnóstico y tratamiento. Como se mencionó anteriormente, en la mayoría de los casos, el CHC se desarrolla dentro de un antecedente de enfermedad hepática crónica, y una de las principales problemáticas del cáncer hepático es que su diagnóstico se realiza cuando la enfermedad está avanzada y el tratamiento ya no tendrá la misma eficacia, es por esto la importancia de obtener un diagnóstico temprano, por esta razón, la detección temprana de la enfermedad mediante la vigilancia y el uso de métodos diagnósticos precisos son fundamentales para el manejo del CHC.

La detección de CHC en una etapa temprana mejora la supervivencia y permite el uso de tratamientos potencialmente curativos (Tang *et al.*, 2017).

Una vez diagnosticado el CHC, se enfrenta otro reto en la terapia, en parte debido a la mala quimiosensibilidad (causada por la expresión de genes de resistencia a los fármacos) y la disfunción hepática que impide la administración de estos fármacos. Además, la cirrosis tendrá un impacto en los volúmenes de distribución de fármacos. (Cidon, 2017; Galun *et al.*, 2017).

1.3. Tratamiento

El cáncer es una enfermedad multifactorial lo cual hace que su diagnóstico y su tratamiento sean complejos, una vez detectada la enfermedad se elige la estrategia de tratamiento, que dependerá de donde está localizado y el avance que tiene. Entre los tratamientos se encuentran: la cirugía, la radiación, quimioterapia, inmunoterapia, terapia hormonal, trasplante de células madre que logran dar un tratamiento dirigido a las células cancerosas, tomando en cuenta las modificaciones genéticas por las que se desarrolló el cáncer (Tiptiri-Kourpeti *et al.*, 2016). Sin embargo, actualmente los principales tratamientos son la cirugía, la radiación y la quimioterapia (Lasley *et al.*, 2011).

1.3.1. Cirugía

La cirugía a menudo es el primer tratamiento cuando el cáncer es detectado en una etapa temprana, este tratamiento del cáncer con cirugía funciona mejor si tiene un tumor sólido en un área. A menudo, no puede

tratar el cáncer que se ha diseminado o el cáncer que se encuentra en la sangre, como la leucemia. El cirujano hace un corte en su piel con un bisturí u otra herramienta afilada y extrae la mayor cantidad posible de tumor. También pueden extraer ganglios linfáticos y otros tejidos para analizarlos, a esto se le llama cirugía abierta (Lasley, 2011; Price y Sikora, 2014).

1.3.2. Radioterapia

Radiación de haz externo: Este tratamiento ataca las células cancerosas con partículas de alta energía (terapia de protones) u ondas (rayos X), actúa dañando el DNA evitando la replicación. Sin embargo, también mata algunas células normales. Sin embargo es dirigido ya que daña las células en un área específica en lugar de en todo el cuerpo. El tipo más común proviene de una máquina fuera de su cuerpo (Lasley, 2011; Price y Sikora, 2014).

Radiación interna: En este tipo de radiación también conocida como braquiterapia se colocarán implantes radiactivos del tamaño de un grano de arroz dentro de su cuerpo donde está el tumor. La radiación destruye las células cancerosas. Este tratamiento lo vuelve radiactivo durante un tiempo, por lo que es posible que deba evitar que el paciente interactúe con otras personas hasta que termine (Lasley *et al.*, 2011).

1.3.3. Quimioterapia

Uno de los principales tratamientos del cáncer es la quimioterapia, esta consiste en el uso de agentes químicos, que tienen la capacidad de

ocasionar daño en el DNA o interferir en el ciclo celular. El propósito del tratamiento con agentes quimioterapéuticos evita que las células cancerosas se multipliquen, invadan y hagan metástasis (Price y Sikora, 2014).

Puede causar efectos secundarios porque destruye las células de su cuerpo que crecen rápidamente, incluidas las de la sangre, la boca, el sistema digestivo y los folículos pilosos. Hay más de 100 tipos de medicamentos de quimioterapia que se seleccionara de acuerdo al tipo de cáncer. Puede tomarse administrarse en forma de píldora o cápsula, o recibirlo en forma de inyección o intravenosa en su casa o en el hospital.

Para entender cómo actúa la quimioterapia es importante conocer cómo se da el crecimiento y división celular, es decir el ciclo celular. El ciclo celular es proceso mediante el cual el material genético se duplica para luego ser distribuido en células idénticas, se divide en cuatro fases (**Figura 3**) (Watson, 2006).

- En la **fase G1**, las moléculas y estructuras citoplasmáticas aumentan en número, y algunas orgánulos se duplican. Es un período de crecimiento general.
- En la **fase S** (de síntesis), los cromosomas se duplican;
- En la **fase G2**, comienza la condensación de los cromosomas y el ensamblado de las estructuras especiales requeridas para la mitosis (división nuclear) y la citocinesis (división citoplasmática).

- Después de la fase G₂ ocurre la **mitosis**, que usualmente es seguida de inmediato por la **citocinesis** (aunque ésta última puede no ocurrir). Por medio del proceso de **mitosis**, los cromosomas se distribuyen de manera que cada nueva célula hija recibe un juego completo de cromosomas y es genéticamente idéntica a la célula progenitora. Si la división que ocurre es meiótica, existen varias diferencias; entre ellas que se reparte una sola copia de cada cromosoma (células haploides) y aproximadamente la mitad del citoplasma (con mitocondrias, ribosomas y otros orgánulos) a cada una de las dos células hijas.

Entre estas fases existen puntos de control que verifican que el proceso de cierta fase se haya realizado adecuadamente, uno de ellos se encuentra en G₁, justo antes de entrar en fase S y el otro en G₂ antes de la mitosis. Esto evitará que el ciclo continúe con ADN dañado, y de ser necesario se activaran los mecanismos de reparación. También existe la posibilidad de que se dé la fase G₀, esta se da cuando célula permanecen en reposo, debido a que la célula no tiene la capacidad o ya no se requiere continuar con el ciclo (Watson, 2006).

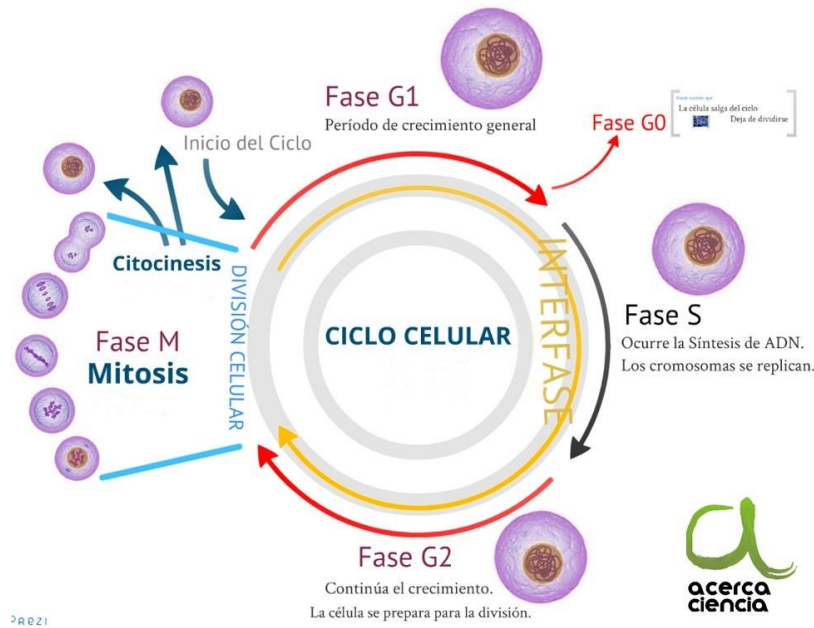


Figura 3. Fases del ciclo celular.

Tomado de <https://www.acercaciencia.com/amp/2012/10/15/ciclo-celular/>

Los antineoplásicos pueden actuar sobre una o varias fases del ciclo celular, o bien sobre los mecanismos de control del ciclo. Los antineoplásicos se clasifican de la siguiente manera:

- **Agentes alquilantes:** estos fármacos, los más utilizados en quimioterapia antineoplásica, lesionan el ADN e interfieren en la replicación celular. Provocan su acción citotóxica mediante la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y diversas moléculas nucleófilas presentes en las células, especialmente las bases nitrogenadas del ADN. De este modo, bloquean la replicación del ADN celular y la transcripción del ARN y, por tanto, la mitosis y la síntesis de proteínas. Ejercen su acción durante todo el ciclo celular, pero son más activos sobre las células en rápida división.

- Los **fármacos** de este grupo tienen en común la toxicidad aguda ocasionada en la médula ósea en forma de mielosupresión e inmunosupresión.
- Los **agentes alquilantes** se pueden dividir en tres grupos: alquilantes clásicos (ciclofosfamida, clorambucilo, ifosfamida, melfalán, trofosfamida), nitrosoureas (carmustina, estramustina, fotemustina) y tetrazinas (dacarbacina, temozolomida).
- **Antimetabolitos:** son análogos estructurales de metabolitos naturales por lo compiten con ellos por el sitio catalítico o regulador de una enzima clave, o los sustituyen, produciendo alteración en la síntesis del ADN y RNA. Debido a este mecanismo de acción, son más activos cuando las células están en la fase S. Análogos de pirimidinas. Constituyen un grupo farmacológico muy importante en el tratamiento antineoplásico, con actividad de amplio espectro.
- **Antibióticos antitumorales:** son sustancias naturales que tienen la capacidad de alterar el crecimiento de las células, entre ellas se encuentran las antraciclinas, producidos por el hongo *Streptomyces*, principalmente actúa intercalándose en el DNA e inhibiendo de las topoisomerasas I y II del ADN, su efecto máximo se da sobre la fase S.
- **Productos naturales:** Se ha aislado una gran variedad de compuestos que poseen actividad antitumoral a partir de sustancias naturales, tales como plantas, hongos y bacterias. Se dividen en cuatro grupos

de acuerdo a su origen: a) alcaloides de la vinca, b) taxanos, c) camptotecinas, d) epipodofilotoxinas.

- a) **Alcaloides de vinca:** se derivan de la planta *Vinca rosea*, se unen a la tubulina, bloqueando la polimerización de los microtúbulos impidiendo la mitosis.
- b) **Taxanos:** en este grupo se encuentra el paclitaxel derivado del árbol *Taxus* (Tejo) y su derivado semisintético docetaxel. Actúan uniéndose a los microtúbulos estabilizándolos impidiendo así la despolimerización finalmente con esta acción se evita que realice la mitosis.
- c) **Camptotecinas:** son alcaloides derivados de *Camptotheca acuminata*, estos interaccionan con la topoisomerasa I evitando la fase de alargamiento de la replicación del ADN.
- d) **Epipodofilotoxinas:** son derivados de *Podofilino*, su principio activo es la podofilotoxina, inhibe la actividad de la topoisomerasa II estabilizando el complejo ADN-topoisomerasa II; evitando la síntesis del ADN, y la célula se detiene en la fase G₁.

Tras provocar el daño sobre los distintos puntos, la progresión del ciclo celular se detiene, y si el daño de ADN es irreparable, se desencadena el proceso de apoptosis y la célula finalmente muere (Fernández, 2008; García-Conde, 2000).

1.4. Paclitaxel

El Paclitaxel (PTX) perteneciente al grupo de taxanos, fue aislado de la corteza del tejo (*Taxus brevifolia*) en 1971. El paclitaxel es un compuesto diterpenoide que contiene un complejo de ocho segmentos con un anillo taxano como núcleo. (Brunton, 2012).

El Paclitaxel se utiliza para tratar cánceres de pulmón de células no pequeñas, cánceres de ovario, próstata, cabeza y cuello, vejiga, esófago, tumores de próstata, carcinoma gástrico, carcinoma adrenocortical, leucemia, glioma humano y carcinoma hepatocelular (Meena *et al.*, 2013). Actúa promoviendo la polimerización de la tubulina y estabiliza los microtúbulos impidiendo que se dé la despolimerización, de tal manera que inhibe la formación del huso mitótico en la división celular, evitando la mitosis (Meena *et al.*, 2013).

2. Resistencia a múltiples fármacos

La resistencia a múltiples fármacos (MDR) es uno de los principales obstáculos que enfrenta el tratamiento del cáncer, ocurre en un corto período de tiempo durante/después del tratamiento, y puede resultar en resistencia cruzada a muchos otros quimioterapéuticos estructural y mecánicamente diferentes. La MDR puede deberse a diferentes mecanismos, incluidos transportadores de casete de unión de ATP (ATP Binding Cassete) que bombean quimioterapéuticos, la mutación de

oncogenes que se vuelven resistentes a tratamientos anteriores, MDR impide que el fármaco llegue a niveles intracelulares ocasionando que no se cumpla con el efecto terapéutico (Fletcher *et al.*, 2016, Zhang *et al.*, 2015).

2.2. Transportadores ABC

La superfamilia de transportadores ABC se caracteriza por la presencia simultánea de los motivos A y B, implicados en la unión e hidrólisis de ATP. Los transportadores ABC juegan un papel importante tanto en eucariotas como en procariontes, especialmente en patologías como enfermedades parasitarias, micosis, fibrosis quística, resistencia de células cancerosas a fármacos quimioterapéuticos, así como resistencia bacteriana a antibióticos. Se han identificado más de cien transportadores ABC (Hollenstein *et al.*, 2017).

Se clasifican en siete subfamilias, ABCA a ABCG, que se localizan en la membrana celular y tienen diversas funciones. Los transportadores ABC tienen dos dominios de unión a nucleótidos (NBD) que se unen e hidrolizan ATP, y dos dominios de unión transmembranal (TM) que llevan sus sustratos fuera de la célula **Figura 4**. Al unirse la proteína de unión cargada con el sustrato al dominio TM, el ATP se asocia al dominio ABC y el dímero se cierra. El dominio TM adopta la orientación hacia afuera para recibir el sustrato. Tras la hidrólisis del ATP, el dímero ABC se abre y el sustrato pasa al citoplasma. Al liberarse el ADP y fosfato el transportador adopta de nuevo la configuración inicial de reposo. Al usar ATP, los transportadores ABC trabajan para transportar sus sustratos a través de la membrana celular, y los sustratos

incluyen componentes básicos/nutrientes como aminoácidos, azúcares, lípidos, vitaminas, péptidos y ciertas proteínas, etc. Es importante destacar que pueden proteger las células contra los xenobióticos, incluidos algunos medicamentos contra el cáncer (Hollenstein *et al.*, 2017).

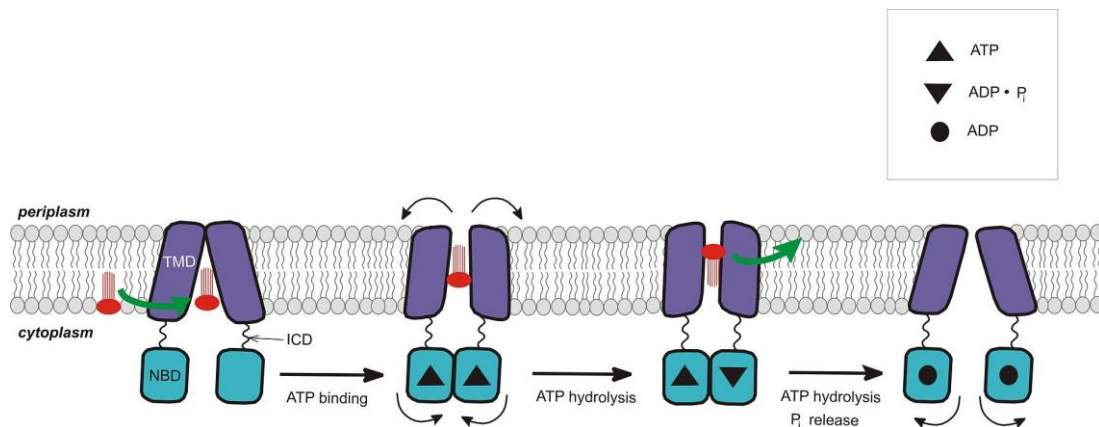


Figura 4. Estructuras de los transportadores ABC. Tomado de Hollenstein 2017

Expresiones más altas de estos transportadores, como ABCB1 (también conocido como P-glicoproteína, P-gp), ABCG2 (también conocido como proteína resistente al cáncer de mama, BCRP) y ABCC1 (también conocido como proteína 1 asociada a resistencia a múltiples fármacos, MRP1), han participado de cerca en MDR como lo confirman los estudios tanto del laboratorio como de la clínica. La sobreexpresión de transportadores ABC puede conducir a la resistencia de quimioterapéuticos convencionales, como doxorrubicina, PTX, colchicina, etc., y radioterapia (Hollenstein *et al.*, 2017).

2.3. P-gp

La P-gp es el más conocido de los transportadores ABC y fue el primero en ser identificado en humanos, en el cual juega un papel crítico en la resistencia a los medicamentos en el tratamiento de cánceres. Numerosas investigaciones con muchos fármacos han demostrado que la P-gp tiene un papel importante en la determinación de los perfiles de concentración de sustratos de P-gp en las diferentes partes del cuerpo. Este transportador también está involucrado en el transporte de ciertas citocinas. La P-gp puede incluso jugar un papel en el rechazo de aloinjertos y en la inhibición de la apoptosis (Chen *et al.*, 2016; Fletcher *et al.*, 2016).

La función de la P-gp es proteger de los compuestos tóxicos, impidiéndoles ingresar al citosol y expulsándolos al exterior, también mejora la secreción de metabolitos y xenobióticos en la bilis, la orina y la luz de tracto gastrointestinal. P-gp tiene una expresión similar en tejidos humanos y de ratón, con una expresión particularmente prominente en la membrana apical de las células epiteliales en las barreras fisiológicas y en los tejidos excretores, que incluyen la barrera hematoencefálica, el tracto gastrointestinal, el riñón y el hígado, el colon, la glándula suprarrenal, el intestino, la placenta, las células precursoras hematopoyéticas y las células endoteliales a nivel sanguíneo y la barrera testicular. P-gp tiene un espectro de sustrato muy amplio que media la exportación de una variedad de fármacos de diferentes clases de fármacos. Estos sustratos incluyen medicamentos quimioterapéuticos, agentes inmunosupresores,

antiarrítmicos, bloqueadores del canal de calcio, analgésicos, antihistamínicos, antibióticos, productos naturales, colorantes fluorescentes y pesticidas, entre muchos otros (Leslie *et al.*, 2005; Vasiliou *et al.*, 2009; Sharom, 2011).

El nivel de expresión basal de estos genes en algunos casos es suficiente para que se de resistencia a fármacos, mientras que en otros se han identificado una sobreexpresión de estos.

Aunque muchos factores pueden contribuir al desarrollo del fenotipo MDR, el aumento de la expresión y/o la actividad funcional de P-gp que facilita el transporte de salida de fármaco activo a través de la membrana celular se ha reconocido como el principal. En cáncer de mama, sarcoma y ciertas leucemias, se observó una mayor expresión de P-gp en la enfermedad recurrente o recidivante, en comparación con la expresión en el momento del diagnóstico en leucemia mielógena aguda, aproximadamente el 50% de las muestras clínicas muestran expresión de P-gp con niveles crecientes en células de leucemia recurrentes, y la expresión se ha relacionado repetidamente con un resultado deficiente (Tamaki *et al.*, 2011).

2.4. Nuevas alternativas

A través de la historia el uso de plantas como una opción curativa ha sido uno de los principales tratamientos de enfermedades, inspirando diversos proyectos de investigación permitiendo la identificación actividades

terapéuticas como: antiinflamatorias, citotóxicas, antioxidantes, entre otras, y es a partir de ellas que se han obtenido una gran parte de los medicamentos utilizados hoy en día (Patwardhan *et al.*, 2005). En la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento del cáncer, se ha recurrido a la investigación a partir de extractos de plantas; tal es el caso de los compuestos de origen natural entre los que se encuentran compuestos fenólicos. La mayoría de estos se encuentran principalmente en las frutas, verduras y tienen un gran potencial antioxidantes, son capaces de eliminar los radicales superóxido libres, reducir el riesgo de cáncer y proteger los sistemas biológicos contra los efectos nocivos de los procesos oxidativos sobre macromoléculas, como carbohidratos, proteínas, lípidos y ADN. Se encontró que, además de su actividad antioxidante primaria, este grupo de compuestos presenta una amplia variedad de funciones biológicas que están relacionadas principalmente con la modulación de la carcinogénesis. Además, la prevención del cáncer es una de las propiedades biológicas más documentadas de los polifenoles. Los efectos de los polifenoles en las líneas celulares de cáncer humano son la protección y la reducción del número de tumores o su crecimiento. Se han considerado los mecanismos de los efectos anticancerígenos de los polifenoles, que se encuentran en frutas, verduras y especias que representan partes de la nutrición diaria. Estos compuestos pueden ser la base para el desarrollo de preparaciones para prevenir el cáncer. Varios estudios en extractos o polifenoles aislados de diferentes alimentos vegetales han mostrado efecto citotóxico en varias líneas de células cancerosas que incluyen diferentes etapas evolutivas del cáncer,

particularmente estudios muestran la inhibición de proliferación celular, regulación de vías de señalización, inducción de apoptosis y reversión de mecanismos de MDR, esta representa uno de los principales problemas en la farmacoterapia de enfermedades. Por tanto, se ha prestado una gran atención a la búsqueda de inhibidores de la P-gp como agentes terapéuticos para revertir la MDR mediada por la P-gp. Dado que los compuestos químicos identificados durante las últimas tres décadas como inhibidores potenciales de la P-gp no han mostrado propiedades farmacológicas adecuadas. El interés de estos compuestos como inhibidores de la P-gp está aumentando debido a sus posibles características favorables, incluida la selectividad y los efectos no citotóxicos (Patwardhan *et al.*, 2005).

3. ANTECEDENTES

La búsqueda de una prevención eficaz contra el cáncer se ha convertido en una prioridad para la ciencia básica y clínica. Se han propuesto compuestos de tipo fenólicos como terapia alternativa y se ha demostrado que son eficaces en el tratamiento del cáncer, especialmente cuando se consumen en mezclas sinérgicas ha mostrado efecto quimiosensibilizante. Ya se ha demostrado que compuestos fenólicos incluidos flavonoides, ácidos fenólicos, flavonoides y polifenoles pueden ejercer efectos diferenciales sobre las células tumorales. Su acción se puede atribuir no solo a su capacidad para actuar como antioxidantes, sino también a su capacidad para interactuar con los mecanismos celulares básicos. Se ha demostrado que los polifenoles, como resveratrol, EGCG, curcumina y quercetina,

promueven la inducción de apoptosis extrínseca e intrínseca en diferentes tipos de cánceres (p. Ej., Colon, pulmón, próstata, mama, melanoma o leucemia). Otros estudios realizados en animales informaron que los componentes fenólicos pueden prevenir y/o retrasar la aparición y progresión de diferentes tipos de cánceres, como los de próstata, hígado, colon, leucemia, etc. Los polifenoles también pueden actuar como agentes supresores e inhibir la formación y el crecimiento de tumores de células iniciadas; inhiben la proliferación celular *in vitro* (Ye *et al.*, 2019).

Recientemente los componentes naturales, como los compuestos fenólicos, han ganado un gran interés como inhibidores seguros de la P-gp, dentro de este tipo de compuestos fenólicos los flavonoides integran la categoría no farmacéutica de tercera generación de inhibidores de la P-gp, y algunos de ellos mostraron efectos comparables a los de los inhibidores clásicos de la P-gp. De hecho, algunos de estos flavonoides que se encuentran en alimentos y bebidas de origen herbal parecen ser bastante prometedores para inhibir la salida del fármaco mediada por P-gp, lo que indica su valor potencial para mejorar la biodisponibilidad sistémica/celular de los sustratos del fármaco P-gp cuando se administran conjuntamente (Kathawala *et al.*, 2015; Caetano-Pinto *et al.*, 2017).

Los flavonoides abundan en plantas, alimentos como frutas y verduras, así como en hierbas tradicionales. Es importante destacar que se han aplicado muchos flavonoides en humanos para el suministro de nutrientes y para el tratamiento de ciertas enfermedades, lo que indica sus propiedades de

seguridad. Estructuralmente, los flavonoides se clasifican en tres categorías: flavonoides; iso-flavonoides; neoflavonoides. Específicamente, los flavonoides tienen una columna vertebral de 2-fenil-1,4-benzopirona, los iso-flavonoides tienen una columna vertebral de 3-fenil-1,4-benzopirona y los esqueletos de 4-fenil-1,2-benzopirona. Hasta la fecha, se han identificado ~ 5,000 flavonoides diversos (Ye Q et al., 2019).

Un número creciente de estudios ha sugerido que a través de la administración única o combinada, los flavonoides y los iso-flavonoides pueden actuar como agentes sensibilizantes. Actualmente, estudios como los discutidos anteriormente indican que estos flavonoides ejercen su eficacia contra el cáncer a través de múltiples mecanismos y múltiples dianas, y está bastante claro que ciertos flavonoides pueden superar la MDR al regular varios aspectos que contribuyen a la MDR.

Los flavonoides tienden a dirigirse a las bicapas lipídicas y modifican las propiedades fisicoquímicas de la membrana para ejercer sus bioactividades. Como se demostró en el estudio de Ingólfsson et al., Los fitoquímicos de diferentes estructuras (polifenoles, incluido el flavonoide) podrían alterar las propiedades de la bicapa lipídica a medida que se localizan en la interfaz bicapa / solución. Mediante una acción similar, también regularon las funciones biológicas de diversas proteínas de membrana, lo que sugiere que sus acciones pueden deberse al mecanismo común mediado por la bicapa de la membrana. Por tanto, se sugiere que los flavonoides actúan como

agentes multifuncionales que regulan negativamente los factores clave que contribuyen a la MDR, así como a otras enfermedades (Ye *et al.*, 2019).

Para revertir la MDR, estos flavonoides pueden regular muchos blancos, primero, los flavonoides pueden regular los transportadores ABC, como ABCB1, ABCG2, ABCC1, etc. No solo inhiben los efectos de salida de estos transportadores a muchos quimioterápicos convencionales, sino que también inhiben las expresiones. Los estudios de acoplamiento indican que pueden unirse a los NBD de ABCB1 (Saeed M *et al.*, 2015). Hasta la fecha, la FDA no ha aprobado ningún regulador de transportadores ABC debido a efectos adversos graves. Los productos naturales prometen ser agentes menos tóxicos, dado que muchos de los reguladores de flavonoides ya sirven como suplementos dietéticos.

En segundo lugar, como compuestos polifenólicos, muchos flavonoides pueden funcionar como moduladores de ROS ya que afectan el estado del nivel de ROS en las células cancerosas. En diferentes dosis, pueden funcionar como captadores de ROS o como inductores. Para superar la MDR, preferiblemente funcionan como inductores que inducen una mayor producción de ROS que pueden alcanzar el umbral tóxico para activar la apoptosis. Los principales actores en el mantenimiento de ROS equilibrados en las células incluyen Mrf2, GSH, los cuales pueden ser inhibidos por ciertos flavonoides para ejercer sus efectos reensibilizantes (Cui Q *et al.*, 2018).

En tercer lugar, también pueden regular HIF, ciclo celular, CSC, autofagia y enzimas críticas como STAT3, p53 y NF- κ B, lo que confirma su propiedad multifuncional.

Los productos naturales de tipo fenolicos representan estrategias de tratamiento novedosas para superar la MDR en el cáncer, y las modificaciones estructurales de estos compuestos deberían ser de interés para los químicos médicos. De hecho, se han desarrollado muchos derivados de flavonoides para suprimir las células cancerosas resistentes, como los derivados del acilo de crisina contra las células cancerosas humanas resistentes a los fármacos (MES-SA / DX5, LoVo / DX), derivados de nitrogenisteína modificados por grupos nitro contra cisplatino células A2780 de cáncer de ovario humano resistentes (Bai et al., 2018J), conjugado de quercetina-ácido glutámico (Kim et al., 2017) y dímeros flavonoides a base de apigenina (Chan et al., 2006) contra células cancerosas que sobreexpresan P-gp. Derivados de crisina y quercetina que contienen selenio contra células cancerosas resistentes a cisplatino (Martins et al., 2015), quercetina-3-metil éter contra células de cáncer de mama resistentes a lapatinib (Li J et al., 2013), etc.

Estos estudios experimentales proporcionan información crucial para el descubrimiento de nuevos fármacos, así también muestran la necesidad de más estudios para comprender los mecanismos exactos de las acciones que aún no se comprenden completamente.

En nuestro grupo de trabajo en los últimos años se ha focalizado la investigación en la búsqueda de compuestos con capacidad para modular MDR, por ejemplo, Sánchez et al 2018, mostro que ácido gálico compuesto fenólico sensibiliza las células de carcinoma de ovario resistentes a PTX (A2780AD) mediante la inactivación de ERK mediada por ROS, y sugieren que acido gálico podría representar un coadyuvante útil de PTX en el tratamiento del carcinoma de ovario.

Posteriormente Sánchez et al., 2019 genero células HEPB/PTX resistentes a PTX, para lo cual la línea celular parental Hep3B fue sometida a tratamientos sucesivos y crecientes de PTX por un periodo de tiempo alrededor de 7 meses. Las células Hep3B/PTX generada alcanzo una CI_{50} de PTX de 352nM, alrededor de 14 veces más respecto a la línea parental que su IC_{50} es de 25nM.

Por lo que contar con modelos experimentales que integren el fenotipo de resistencia es crucial para la evaluación de compuestos y análisis de mecanismos de la actividad de compuestos sobre la MDR, por lo que la caracterización del fenotipo de resistencia de las células Hep3B/PTX previamente obtenidas seria importantes para su validación como un modelo experimental para MDR.

4. JUSTIFICACIÓN

El CHC representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial su tasa de incidencia es semejante a la mortalidad, por lo que es uno de los tumores más difíciles de tratar.

El uso de agentes quimioterapéuticos blancos de tubulina, son una alternativa al tratamiento, sin embargo la MDR generada después de su exposición de algunos de estos fármacos, incluidos PTX, ha sido un obstáculo en el tratamiento. La habilidad de modular MDR ha sido complicada por el hecho de que muchos tumores exhiben simultáneamente múltiples mecanismos, sin embargo, se ha asociado la sobreexpresión de P-gp en el fenotipo de MDR, que resulta en reducción intracelular de la concentración de agentes quimioterapéuticos.

Por lo que el análisis de la sobreexpresión de P-gp de las células resistentes Hep3B/PTX sería muy importante para la validación del fenotipo de resistencia convirtiéndola en un interesante modelo de estudio para la búsqueda de moléculas que pudieran actuar revirtiendo la MDR.

5. HIPÓTESIS

La sobreexpresión de P-gp en las células HEP3B/PTX valida el fenotipo de MDR de la línea celular de CHC

6. OBJETIVO GENERAL

Analizar el nivel de expresión de P-gp en células HEP3B/PTX resistentes y HEP3B parentales.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar y reactivar células HEP3B/PTX a través de tratamientos crecientes de paclitaxel.
- Determinar el Índice de resistencia de las células HEP3B/PTX
- Comparar los niveles de P-gp de la línea celular HEP3B/PTX respecto a la línea celular parental HEP3B.

7. METODOLOGÍA

7.1. Cultivo celular

Para realizar este proyecto se utilizaron la líneas celulares de carcinoma hepatocelular Hep3B parentales y Hep3B/PTX resistentes a PTX que se generó por Sánchez-Carranza et al., 2019 a partir de células Hep3B parentales que fueron obtenidas de ATCC (*American Type Culture Collection USA*).

Las células Hep3B/PTX fueron cultivadas en Minimum Essential Medium (MEM) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB, Invitrogen) y glutamina 2 mM. Estas fueron mantenidas en frascos T (Corning® Flask de 25 cm²) con un volumen de 5 mL de medio MEM al 10% de SFB. Cuando había una confluencia mayor del 90% se realizan los subcultivos, utilizando tripsina

(0.25% tripsina-EDTA) para despegar las células del sustrato. Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.

7.1.1. Subcultivo de células Hep3B/PTX en cajas T de 25 cm² y reactivación con Paclitaxel.

- a) Encender la campana de flujo laminar y limpiarla correctamente con agua destilada y alcohol al 70%.
- b) Cerrar la ventanilla y encender la luz UV en un lapso de tiempo de 15-20 minutos para obtener condiciones estériles.
- c) Acabado el tiempo, meter el material necesario de trabajo en la campana limpiándolo previamente con etanol al 70%.
- d) Posteriormente, sacar los frascos T25 cm² de la incubadora para su manejo.
- e) Al frasco T25 cm² el cual contiene células en adherencia, retirar el medio agotado (5 mL) al frasco de desechos.
- f) Lavar las células con 2 mL de PBS 1x estéril de 2 a 3 veces y desecharlo.
- g) Agregar 0.5 mL de 0.25% tripsina-EDTA estéril e incubar durante 3-5 minutos para el desprendimiento de las células.
- h) Acabado el tiempo de incubación, sin quitar la tripsina agregar al frasco 2 mL de medio suplementado con SFB para destripsinizar y detener la reacción.
- i) Resuspender adecuadamente hasta homogeneizar el cultivo y colocar en un tubo de 15 mL estéril para centrifugar a 900 rpm durante 5 minutos.

- j) Acabado el tiempo de centrifugación, desechar el sobrenadante para obtener el pellet celular y agregar medio MEM al 10% de SFB fresco.
- k) Resuspender adecuadamente y colocar una alicuota de células en la caja T25, completando con medio nuevo a un volumen total de 5 mL.
- l) Almacenar en cajas T25 de nuevo en la incubadora y una vez que las células alcanzaban una confluencia entre 50 y 70% se procedió a reactivar las células resistentes adicionando una concentración de 10 nM de Paclitaxel, dejándose por 48 horas el tratamiento. Las células sobrevivientes fueron subcultivadas como se mencionó anteriormente, posteriormente se realizó el mismo procedimiento incrementando los tratamientos de paclitaxel por semana hasta llegar a una concentración de 100nM, las células resistentes a este tratamiento fueron subcultivadas conforme se describió anteriormente realizando el mismo procedimiento de preferencia cada tercer día o conforme se alcanzaba la confluencia.

7.1.2 Montaje de células Hep3B/PTX en placa (96 pozos) para calculo IR.

- a) Encender la campana de flujo laminar y limpiarla cuidadosamente con agua destilada y alcohol al 70%.
- b) Cerrar la ventanilla y encender la luz UV durante 15-20 minutos.
- c) Acabado el tiempo, meter el material de trabajo necesario en la campana; limpiándolo correctamente con alcohol al 70%.

d) Posteriormente, realizar el subcultivo normal de las células Hep3B/PTX en adherencia descrito previamente hasta la obtención del pellet celular.

e) Al pellet resultante, agregar 3 mL de medio MEM al 10% SFB.

f) Resuspender cuidadosamente el pellet celular hasta homogeneizar la solución. Posteriormente, tomar una alícuota de células para realizar el conteo celular. Esta técnica se considera de las más simples para la determinación de la concentración celular en un volumen dado, permitiéndonos estimar el número de células por recuento directo, así como el % de viabilidad celular. Para llevar a cabo esto, la suspensión celular se analiza en el dispositivo y bajo el microscopio óptico se diferencian las células viables de las muertas presentes en la muestra. Esta diferencia se rige por la técnica de exclusión con la ayuda de colorantes como el azul de tripano; donde las células viables se caracterizan por excluir el colorante dado a que su membrana se encuentra intacta, por lo tanto, no se tiñen observándose brillantes y sin coloración. En cambio, las células muertas son muy específicas; ya que permiten la entrada del colorante debido a que su membrana se encuentra dañada tiñéndose de color azul. La metodología llevada a cabo fue la siguiente: con la ayuda de la cámara de Neubauer como a continuación se describe el procedimiento:

- Colocar la cámara de Neubauer sobre un papel absorbente y en una superficie plana.

- Lavar adecuadamente la cámara y cubreobjetos con agua destilada y alcohol al 70%.
- En un tubo Eppendorf colocar la cantidad necesaria de azul de tripano y suspensión celular de acuerdo a la dilución requerida, (utilizamos una dilución 1:4).
- Mezclar correctamente la solución anterior, evitando la generación de burbujas.
- Colocar con punta y micropipeta 10 μ L de la solución en cada lado del cubreobjetos de la cámara de Neubauer, llenándose por capilaridad.
- Posteriormente, colocar la cámara de Neubauer en el microscopio óptico (Micro Axiostar) y enfocar a 10x hasta observar los cuadrantes requeridos para el conteo.
- Contar las células viables y muertas de los cuadrantes extremos y central de la cámara de Neubauer (10 campos).
- Realizar el conteo celular por triplicado para determinar ***No. de células totales/mL*** (De acuerdo a las siguientes formulas).

**Fórmulas utilizadas para determinar *No. de células viables/mL*,
No. de células totales/mL y % viabilidad celular:**

$$\text{No. de células totales/mL: } \left(\frac{\text{No. de células totales}}{\text{No. de cuadrantes}} \times 1 \times 10^4 \right) \times \text{Factor de dilución}$$

(1)

$$\text{No. de células viables/mL: } \left(\frac{\text{No. de células viables}}{\text{No. de cuadrantes}} \times 1 \times 10^4 \right) \times \text{Factor de dilución}$$

(2)

$$\% \text{ Viabilidad celular: } \left(\frac{\text{No. de células viables/mL}}{\text{No. de células totales/mL}} \right) \times 100$$

(3)

g) Acabado el conteo, realizar los cálculos adecuados poder colocar a cada pozo una densidad de 5000 células/pozo, en un volumen final de 100µL. La placa se deja a condiciones de 37°C y 5% CO₂ durante toda la noche, para posteriormente determinar la CI₅₀ y el IR.

7.1.2.1 Viabilidad celular y determinación de IR

Se determinó la viabilidad celular de las células Hep3B/PTX usando el ensayo MTS, para el cual se sembraron 5000 células/pocillo en una placa de cultivo celular de 96 pozos como previamente se indicó en la metodología. Las células se trataron durante 48 h con concentraciones crecientes de PTX desde 10nM hasta 400nM. Para determinar el número de células viables en proliferación utilizamos el kit de ensayo de proliferación celular CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega, Madison, WI, EE. UU.), Siguiendo las instrucciones del fabricante. La viabilidad celular se determinó mediante absorbancia a 450 nm usando un lector ELISA automático (Promega, Madison, WI, EE. UU.). Los experimentos se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes. Los datos se analizaron en el programa

estadístico Prism 5.0 (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, EE. UU.) Y la CI_{50} se determinó mediante análisis de regresión.

Para calcular el IR se dividió la CI_{50} obtenida de las células resistentes Hep3B/PTX entre la CI_{50} Hep3B parentales

7.1.3. Montaje de células Hep3B/PTX en placa Corning Costar (24 pozos).

- h) Encender la campana de flujo laminar y limpiarla cuidadosamente con agua destilada y alcohol al 70%.
- i) Cerrar la ventanilla y encender la luz UV durante 15-20 minutos.
- j) Acabado el tiempo, meter el material de trabajo necesario en la campana; limpiándolo correctamente con alcohol al 70%.
- k) Posteriormente, realizar el subcultivo normal de las células Hep3B/PTX en adherencia descrito previamente hasta la obtención del pellet celular.
- l) Al pellet resultante, agregar 3 mL de medio fresco MEM al 10% SFB.
- m) Resuspender cuidadosamente el pellet celular hasta homogeneizar la solución. Posteriormente, tomar una alícuota de células para realizar el conteo celular. Esta técnica se considera de las más simples para la determinación de la concentración celular en un volumen dado, permitiéndonos estimar el número de células por recuento directo, así como el % de viabilidad celular. Para llevar a cabo esto, la suspensión celular se analiza en el dispositivo y bajo el microscopio óptico se diferencian las células viables de las muertas presentes en la muestra.

Esta diferencia se rige por la técnica de exclusión con la ayuda de colorantes como el azul de tripano; donde las células viables se caracterizan por excluir el colorante dado a que su membrana se encuentra intacta, por lo tanto, no se tiñen observándose brillantes y sin coloración. En cambio, las células muertas son muy específicas; ya que permiten la entrada del colorante debido a que su membrana se encuentra dañada tiñéndose de color azul. La metodología llevada a cabo fue la siguiente: con la ayuda de la cámara de Neubauer como a continuación se describe el procedimiento:

- Colocar la cámara de Neubauer sobre un papel absorbente y en una superficie plana.
- Lavar adecuadamente la cámara y cubreobjetos con agua destilada y alcohol al 70%.
- En un tubo Eppendorf colocar la cantidad necesaria de azul de tripano y suspensión celular de acuerdo a la dilución requerida, (utilizamos una dilución 1:4).
- Mezclar correctamente la solución anterior, evitando la generación de burbujas.
- Colocar con punta y micropipeta 10 μ L de la solución en cada lado del cubreobjetos de la cámara de Neubauer, llenándose por capilaridad.

- Posteriormente, colocar la cámara de Neubauer en el microscopio óptico (Micro Axiostar) y enfocar a 10x hasta observar los cuadrantes requeridos para el conteo.
- Contar las células viables y muertas de los cuadrantes extremos y central de la cámara de Neubauer (10 campos).
- Realizar el conteo celular por triplicado para determinar **No. de células totales/mL** de acuerdo a las formulas 1,2 y 3 previamente descritas.

n) Acabado el conteo, realizar los cálculos adecuados poder colocar a cada pozo previamente con cubreobjetos redondos de vidrio en su interior una densidad de 20,000 células/pozo, para un volumen final de 500µL. La placa se deja a condiciones de 37°C y 5% CO₂ durante toda la noche, para posteriormente realizar la inmunofluorescencia.

7.1.3.1 Inmunofluorescencia P-gp

Para el análisis de localización y expresión de P-gp, se sembraron como previamente se describió 2.0×10^4 células Hep3B/PTX en placas de cultivo de 24 pozos que contenían cubreobjetos redondos de vidrio, se dejaron a condiciones de 37°C y 5% CO₂.

Luego, las células Hep3B/PTX se fijaron con paraformaldehído al 4% en tampón PEM (PIPES 100 mM pH 6.9, EGTA 5 mM, MgCl₂ 2 mM) durante 15 min seguido de paraformaldehído al 4% en NaHCO₃ durante 45 min. Las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% (Sigma Aldrich) en PBS 1X durante

10 min y luego se incubaron con el anticuerpo primario de ratón anti-P-gp (1:100, sc-55510 Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EE. UU.) Durante la noche a 4°C. Se añadió el anticuerpo secundario (anti-ratón Alexa 647 1:1000, A-21235, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE.UU.) y se incubó durante dos horas a 37°C. Las células se tiñeron con Hoechst 33258 (1:4000, H1398, Molecular Probes) durante una hora, se montaron y se obtuvieron imágenes mediante microscopía confocal. Los experimentos se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes.

8. RESULTADOS

8.1. Reactivación de células Hep3B/PTX

Las líneas celulares desarrolladas como modelos de resistencia, particularmente a través de la administración de un determinado fármaco quimioterapéutico que se usa comúnmente en la práctica clínica, se utilizan para estudiar y comprender la MDR para desarrollar estrategias para superarla. Por lo tanto, es necesario desarrollar líneas celulares quimiorresistentes bien caracterizadas, preferiblemente que se originen a partir de una línea celular parental sensible común (Shi *et al.*, 2007; Okamura *et al.*, 2013).

En el presente trabajo se pretende validar el fenotipo de resistencia de las células Hep3B/PTX resistentes a PTX previamente obtenidas por Sánchez *et al.*, 2019, después de haber estado almacenadas por un periodo de 6 meses a -80°C.

Para verificar fenotipo de resistencia se procedió a determinar la CI_{50} de PTX la cual fue de 340 nM **Figura 5**. Este valor fue cercano a la CI_{50} determinada por Sánchez *et al.*, 2019 que fue de 352 nM, haciendo una comparación entre el valor obtenido de las células resistentes y el de las células Hep3B parentales previamente reportado de 25nM, podemos indicar que hay IR alrededor de 13.6 muy cercano al reportado por Sánchez *et al.*, 2019 que fue de 14.08.

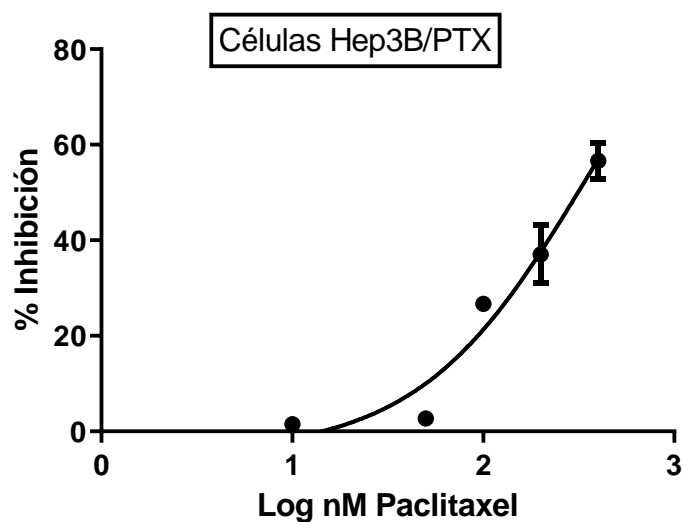


Figura 5. Efecto de PTX sobre inhibición de la proliferación de las células Hep3B/PTX de CHC

8.2. Análisis de la localización y expresión de P-gp en células Hep3B/PTX

Si bien como se ha mencionado el fenotipo de resistencia se asocia la sobreexpresión de transportadores de tipo ABC y entre los que destaca la proteína P-gp por lo que fue de nuestro interés analizar mediante la técnica de inmunofluorescencia la expresión y localización de esta proteína P-gp

tanto en las células Hep3B parentales y Hep3B/PTX resistentes a PTX y realizar una comparación entre los niveles de expresión de P-gp.

Como observamos en la **Figura 6** muestra los resultados de la inmunofluorescencia. En la columna 1 se observa el campo claro donde se pueden visualizar las células presentes, columna 2 observamos Hoechst el cual es un colorante que tiñe los núcleos mostrándose de color azul, en la columna 3 observamos la fluorescencia asociada a P-gp observándose de color verde y en la última columna se observa el merge que es el empalme de Hoechst y P-gp.

Observamos que en la primera fila correspondiente a las células Hep3B parentales no se observa fluorescencia asociada a P-gp lo que indica que en estas células la expresión de P-gp no está presente.

Sin embargo, en la fila 2 correspondiente a las células Hep3B/PTX observamos fluorescencia color verde asociada a P-gp lo cual es indicativo que en esta línea celular la expresión de P-gp esta incrementada comparada con las células parentales. También observamos que la localización de P-gp se encuentra particularmente en membrana, citoplasma y núcleo.

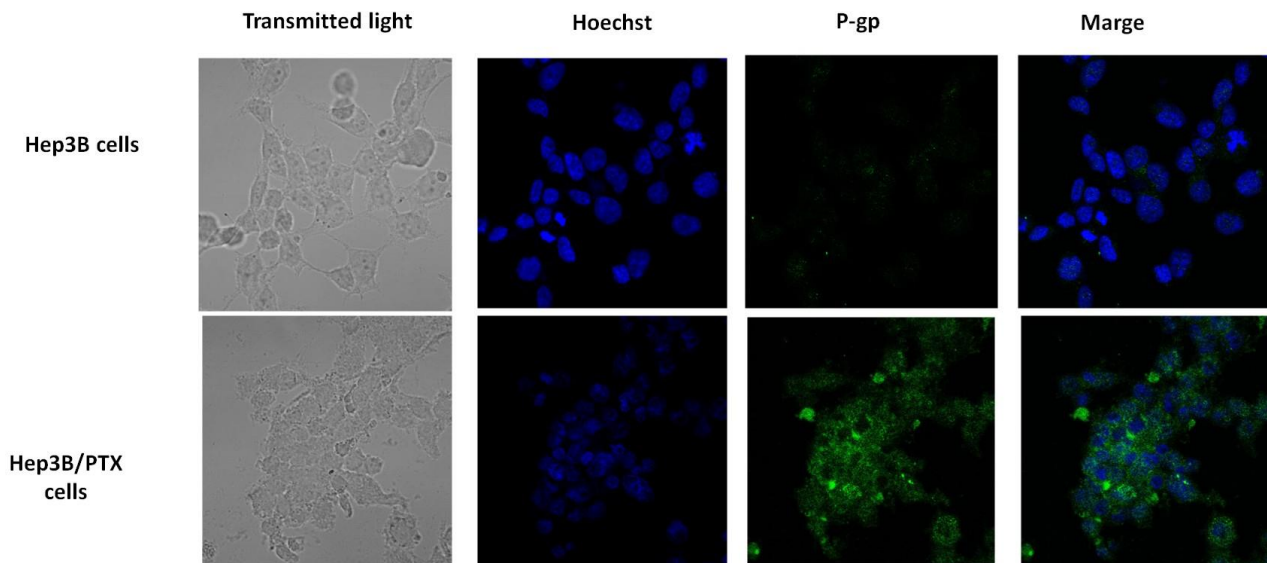


Figura 6. Análisis de la expresión y localización de P-gp en células resistentes Hep3B/PTX y células Hep3B parentales de CHC

El mecanismo de resistencia a los fármacos contra el cáncer más estudiado implica la reducción de la concentración intracelular del fármaco aumentando la salida del fármaco fuera de la célula, las proteínas encargadas de realizar esta función son los transportadores ABC, entre los que destaca P-gp la cual es codificada por el gen MDR1. Nuestros resultados muestran que la línea celular Hep3B/PTX presenta una alta expresión de P-gp comparada con las células Hep3B donde la expresión es nula, esto sugiere que fenotipo de resistencia está asociada a la sobreexpresión de P-gp.

Otros trabajos han documentado que la sobreexpresión de P-gp es característica del fenotipo de resistencia, por ejemplo, otros trabajos donde se obtuvieron líneas celulares resistentes muestran que hay una

sobreexpresión en P-gp comparándola con la expresión en línea celular parental.

Solazzo M *et al.*, analizo líneas celulares de CHC incluidas células parentales P1 y resistentes a fármacos (P1 0.5 y PSI-2) y células NIH/3T3 transfectadas con *mdr1* (PN1A), los experimentos indicaron sobreexpresión y localización de Pgp citoplasmática y nuclear en las células P1 (0.5) y PN1A y una asociación de la expresión de P-gp al fenotipo de resistencia de MDR (Solazzo *et al.*, 2006).

Por su parte Weina Guo *et al.*, detecto la expresión de P-gp en la membrana, citoplasma y los núcleos de las células A2780T de cáncer de ovario resistentes, pero no en las células A2780 parentales. También en este trabajo se observó co-localización de P-gp en mitocondrias en la línea celular A2780T y tejidos de cáncer de ovario, pero no en las células A2780 parentales (Guo *et al.*, 2019).

9. Discusión de resultados

Los estudios sobre los mecanismos de citotoxicidad y resistencia a la quimioterapia en oncología experimental se basan en el desarrollo y análisis de líneas celulares de cáncer resistentes (McDermott *et al.*, 2014). En este contexto, se ha utilizado el establecimiento de líneas celulares tumorales resistentes para obtener información sobre los posibles mecanismos que favorecen la evolución de la malignidad, ya que proporcionan modelos

biológicos útiles para el estudio de tumores que presentan fenotipos de resistencia múltiple a fármacos (MDR) (Zhao *et al.*, 2016).

La MDR se considera un fenómeno multifactorial y se produce principalmente como resultado de la hiperexpresión de los transportadores de la superfamilia de proteínas del casete de unión de ATP (transportadores ABC) (Arrigoni *et al.*, 2016), una gran familia de proteínas que utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para expulsar activamente el fármaco fuera de las células (Choi *et al.*, 2005).

El fenotipo MDR se caracteriza por la sobreexpresión de la P-gp en las membranas plasmáticas de las células que extruye varios fármacos fuera de las células. Las células que expresan el fenotipo MDR son resistentes a la apoptosis relacionada con las mitocondrias y a varios fármacos contra el cáncer. La sobreexpresión de P-gp es la proteína frecuentemente más asociada al MDR. Por lo tanto, muchos estudios actuales se concentran en tratar de suprimir la MDR para lograr una terapia más eficaz contra el cáncer (Solazzo *et al.*, 2006).

Uno de los primeros estudios sobre el establecimiento de una línea celular MDR fue realizado en 1983 por Tsuruo y colaboradores. La inducción *in vitro* de la resistencia de la línea celular K562, una línea celular de eritroleucemia humana, se realizó mediante exposición a dosis crecientes de vincristina de 3 nM a 60 nM, que es la concentración utilizada en la práctica clínica para el tratamiento de leucemias. Este estudio permitió evaluar *in vitro*

los mecanismos implicados en la MDR y realzo la importancia de estos modelos de evaluación (Tsuruo *et al.*, 1983).

El tumor sólido más frecuente para el establecimiento de líneas quimiorresistentes es el pulmonar, y aunque hay una heterogeneidad significativa entre las cepas derivadas del tejido pulmonar, la línea celular parental SBC-3 es la más utilizada en comparación con otras. Por lo tanto, se sugiere que la línea celular SBC-3 es un buen modelo para la inducción de resistencia *in vitro* Koizumi *et al.*, 2005.

También se ha demostrado que la leucemia es un tipo de tumor muy frecuente que se utiliza para el establecimiento de líneas celulares resistentes a fármacos, esto debido a que han demostrado que la resistencia a la quimioterapia en la mayoría de pacientes con leucemia sigue siendo un factor importante en el fracaso del tratamiento antineoplásico, lo que resulta en una supervivencia a corto plazo de los (Zhang *et al.*, 2019). Entre las diferentes líneas celulares parentales utilizadas para desarrollar resistencia, está la K-562 (Seo *et al.*, 2007; Rumjanek *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2007; Wen *et al.*, 2019).

Aunque los tumores pulmonares y las leucemias son los modelos más utilizados para el desarrollo de líneas celulares resistentes a fármacos, la generación de líneas celulares resistentes de otros tipos tumorales como CHC, cáncer de ovario, próstata entre otros también muestra la importancia de estudiar los mecanismos de resistencia a la quimioterapia mediante la inducción de resistencia a través del uso de fármacos quimioterapéuticos en

células parentales, ya que esta metodología ha demostrado ser la más adecuada para el estudio de células que adquieren mecanismos de resistencia (Kim *et al.*, 2019; Intuyod *et al.*, 2019).

El uso de PTX para la generación de células resistentes ha sido documentado Zuo KQ *et al.*, el cual estableció una línea celular de cáncer de mama resistente a múltiples fármacos, MCF-7/PTX, a partir de la línea celular parental sensible a fármacos MCF-7. Las propiedades biológicas de MCF-7/PTX, incluido su IR a fármacos y el perfil de proteínas de unión a PTX, se analizaron y compararon con la línea celular parental encontrando diferencias significativas en el incremento de la CI_{50} de las células resistentes el cual está asociado cambios en la expresión de proteínas implicadas en el fenotipo de resistencia (Zuo *et al.*, 2010).

La validación de células Hep3B/PTX como se describe en este protocolo es importante porque se puede utilizar como una herramienta funcional para identificar nuevos elementos moleculares y relevantes mecanismos celulares de quimiorresistencia y evaluar moléculas que puedan revertir el fenotipo MDR.

El desarrollo de líneas celulares quimiorresistentes de varios tipos tumorales otros tipos no solo comprender los mecanismos de resistencia, sino también identificar herramientas para superar la MDR; su desarrollo también tiene como objetivo ayudar en la selección de nuevos fármacos que sean capaces de superar los mecanismos de resistencia a los quimioterapéuticos y sean eficaces para revertir la resistencia en pacientes que están refractario a

las terapias disponibles (Takeda *et al.*, 1991; Luan *et al.*, 1993; Seo *et al.*, 2007; Rumjanek *et al.*, 2001 and Kiura *et al.*, 1993).

Leary *et al.*, han demostrado que varios inhibidores moleculares, incluidos los inhibidores de P-gp, utilizados en combinación con sustancias citotóxicas, pudieron prevenir el desarrollo de MDR en diferentes sistemas modelo in vitro e in vivo (Leary M *et al.*, 2018).

Por lo que la comprensión de estos mecanismos de resistencia es importante para diseñar estrategias para superar este problema. Para ello, los modelos de líneas celulares resistentes a fármacos nos proporcionan valiosas herramientas in vitro para dilucidar los mecanismos que subyacen a la resistencia clínica a los fármacos anticancerosos y para identificar biomarcadores clínicamente significativos (Coley *et al.*, 2004).

Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas estrategias de tratamiento que se dirijan a los mecanismos que conducen a la resistencia, que en consecuencia serán más efectivos (Singh *et al.*, 2019).

CONCLUSIONES

Conclusiones particulares

- Las células Hep3B/PTX después de estar almacenadas a -80°C por un periodo de 6 meses mostraron un IR similar al obtenido inicialmente.

- Las células Hep3B/PTX mostraron alta expresión de P-gp, mientras que en las células parentales esta expresión estuvo ausente.
- El fenotipo de resistencia a fármacos está asociado a la sobreexpresión de P-gp en el modelo de células HEP3B/PTX resistentes.

Conclusión general

La sobreexpresión de P-gp en las células HEP3B/PTX validó el fenotipo de MDR de la línea celular de CHC. Lo que sugiere que puede ser utilizado como un modelo para la búsqueda de moléculas que puedan revertir MDR.

PERSPECTIVAS

- Analizar el efecto de compuestos de interés sobre la inhibición de la expresión de P-gp en las células Hep3B/PTX
- Analizar el efecto de compuestos de interés sobre la inhibición de la función de P-gp en las células Hep3B/PTX
- Analizar el efecto de compuestos de interés en sinergia con PTX en la búsqueda de compuestos que puedan revertir el MDR en células Hep3B/PTX
- Analizar mecanismos de MDR en células Hep3B/PTX

REFERENCIAS

- Arrigoni E, Galimberti S, Petrini M, Danesi R, Di Paolo A (2016). ATP-binding cassette transmembrane transporters and their epigenetic control in cancer: an overview. *Exp Opin Drug Metabol Toxicol* 12(12): 1419-1432.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2010). *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega.
- Anderson MW., Reynolds SH., You M., Maronpot RM (1992). Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*; 98:13-24.
- Audesirk, T. Audesirk, G. & B. Byers. (2013). *Biología, la vida en la tierra con fisiología*. 9º Edición.
- Bai J, Yang BJ, Luo X (2018). Effects of 5-hydroxy-4'-nitro-7-propionyloxy-genistein on inhibiting proliferation and invasion via activating reactive oxygen species in human ovarian cancer A2780/DDP cells. *Oncol Lett*. 15:5227–35.
- Brunton, L. L. (2012). *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica 12a*. McGraw Hill Mexico.
- Caetano-Pinto P, Jansen J, Assaraf YG, Masereeuw R (2017). The importance of breast cancer resistance protein to the kidneys excretory function and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat*. 30:15–27.
- Chan KF, Zhao Y, Burkett BA, Wong IL, Chow LM, Chan TH (2006). Flavonoid dimers as bivalent modulators for P-glycoprotein-based multidrug resistance: synthetic apigenin homodimers linked with defined-length poly(ethylene glycol) spacers increase drug retention and enhance chemosensitivity in resistant cancer cells. *J Med Chem*. 49:6742–59.
- Chen QW, Zhu XY, Li YY, Meng ZQ (2014). Epigenetic regulation and cancer (review). *Oncol Rep*. (2):523-32.
- Chen, Z., Shi, T., Zhang, L., Zhu, P., Deng, M., Huang, C. Jiang L & Li, J. (2016). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer letters*, 370(1), 153-164.
- Choi CH: ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal (2005). *Cancer Cell Intern* 5(1): 30.

- Cidon, E. U. (2017). Systemic treatment of hepatocellular carcinoma: Past, present and future. *World Journal of Hepatology*, 9(18), 797.
- Coley HM (2004). Development of drug-resistant models. In: *Cancer Cell Culture*. Human Press; Totowa, pp. 267-273. Google Scholar.
- Coley HM (2004). Development of drug-resistant models. In: *Cancer Cell Culture*. Human Press; Totowa, pp. 267-273.
- Cui Q, Wang JQ, Assaraf YG, Ren L, Gupta P, Wei L, et al (2018). Modulating ROS to overcome multidrug resistance in cancer. *Drug Resist Updat*. 41:1–25.
- Fernández, P. L. (2008). Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica*. Ed. Médica Panamericana.
- Ferreira JA, Peixoto A, Neves M, Gaiterio C, Reis CA, Assaraf YG, Santos LL (2016). Mechanisms of cisplatin resistance and targeting of cancer stem cells: Adding glycosylation to the equation. *Drug Resist Updat* 24: 34-54.
- Fletcher, J. I., Williams, R. T., Henderson, M. J., Norris, M. D., & Haber, M. (2016). ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resistance Updates*, 26, 1-9.
- Galun, D., Srdic-Rajic, T., Bogdanovic, A., Loncar, Z., & Zuvella, M. (2017). Targeted therapy and personalized medicine in hepatocellular carcinoma: drug resistance, mechanisms, and treatment strategies. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 4, 93.
- García-Conde, J. (2000). *Oncología clínica básica*. Arán Ediciones.
- Ghouri, Y. A., Mian, I., & Rowe, J. H. (2017). Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *Journal of Carcinogenesis*, 16(1).
- Globocan (2020). Obtenido de https://www.abc.es/salud/enfermedades/abci-tumor-mama-convertido-principal-causa-cancer-todo-mundo-202012151654_noticia.html?ref=https:%2F%2Fwww.google.com%2F
- Guo W, Dong W, Li M, Shen Y (2019). Mitochondria P-glycoprotein confers paclitaxel resistance on ovarian cancer cells. *Onco Targets Ther*;12:3881-3891.
- Hollenstein K, Frei DC, Locher KP (Mar 2007). «Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein». *Nature* 446 (7132): 213-216
- International Agency for Research on Cancer (2020). Population Fact Sheets. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-populations>

- Intuyod K, Hahnvajanawong C, Pinlao P, Pinlaor S (2019). Anti-parasitic drug ivermectin exhibits potent anticancer activity against gemcitabine-resistant cholangiocarcinoma. *In Vitro. Anticancer Res* 39(9): 4837-4843.
- Kathawala RJ, Gupta P, Ashby CJ, Chen ZS (2015). The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. *Drug Resist Updat*.
- Kim JY, Kim HS, Yoo SN (2019). Tyrosine kinase inhibitors imatinib and erlotinib increase apoptosis of antimitotic drug-resistant KBV20C cells without inhibiting P-gp. *Anticancer Res* 39(7): 3785-3793. PMID: 31262905. DOI: 10.21873/anticancer.13527 Abstract/FREE Full TextGoogle Scholar
- Kim MK, Kim Y, Choo H, Chong Y (2017). Quercetin-glutamic acid conjugate with a non-hydrolysable linker; a novel scaffold for multidrug resistance reversal agents through inhibition of P-glycoprotein. *Bioorg Med Chem*. 25:1219–26.
- Kiura K, Ohnoshi T, Tabata M, Shibayama T, Kimura I (1993). Establishment of an adriamycin-resistant sublines of human small cell lung cancer showing multifactorial mechanisms of resistance. *Acta Med Okayama* 47(3): 191-197.
- Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Mastoraki A, Garpis N, Diakosavvas M, Angelou K, Tsatsaris G, Pagkalos A, Ntounis T, Fasoulakis Z (Nov. 2020). Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res*. 40(11):6009-6015.
- Lasley, I. (2011). *21st Century Cancer Treatment*. Isaac Lasley.
- Leary M, Heerboth S, Lapinska K, Sarkar S (2018). Sensitization of drug resistant cancer cells: A matter of combination therapy. *Cancers* 10(12): 483.
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., & Cole, S. P. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and applied pharmacology*, 204(3), 216-237.
- Llovet, J. M. et al. (2016). Hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Primers* 2, 16018.
- Luan FJ (1993). Establishment of the multidrug-resistant cell lines K562/A02 and its drug-resistant properties. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 15(2): 101-103.
- Martins IL, Charneira C, Gandin V, Ferreira DSJ, Justino GC, Telo JP, et al (2015). Selenium-containing chrysin and quercetin derivatives: attractive scaffolds for cancer therapy. *J Med Chem*. 58:4250–65.
- McDermott M, Eustace A, Busschots S, Breen L, Clynes M, O'Donovan N, Stordal B (2014). In vitro development of chemotherapy and targeted

therapy drug-resistant cancer cell lines: a practical guide with case studies. *Front Oncol* 4: 40.

- Meena AS, Sharma A, Kumari R, Mohammad N, Singh SV, Bhat MK (2013). Inherent and acquired resistance to paclitaxel in hepatocellular carcinoma: molecular events involved. *PLoS One*. 8(4):e61524.
- National Cancer Institute of the National Institutes of Health (NIH), www.cancer.gov, Cancer Research UK, <http://www.cancerresearchuk.org/>
- NIH. (S.F.) (Diciembre 03, 2019). Cancer Classification. De National Cancer Institute Sitio web: <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>
- Okamura T, Kikuchi T, Okada M, Wakizaka H, Zhang MR (2013). Imaging of activity of multidrug resistance-associated protein 1 in the lungs. *Am J Resp Cell Mol Biol* 49(3): 335-340.
- Patwardhan, B. (2005). Ethnopharmacology and drug discovery. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1), 50-52.
- Price, P., & Sikora, K. (Eds.). (2014). *Treatment of Cancer Sixth Edition*. CRC Press.
- Rumjanek VM, Trindade GS, Wagner-Souza K, Meletti-de-Oliveira MC, Marques-Santos LF, Maia RC, Capella MA (2001). Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of the multidrug resistant cell lines K562-Lucena 1. *An Acad Bras Ciênc* 73(1): 57-69.
- Saeed M, Kadioglu O, Khalid H, Sugimoto Y, Efferth T (2015). Activity of the dietary flavonoid, apigenin, against multidrug-resistant tumor cells as determined by pharmacogenomics and molecular docking. *J Nutr Biochem*. 26:44–56.
- Sánchez-Carranza JN, Díaz JF, Redondo-Horcajo M, Barasoain I, Alvarez L, Lastres P, Romero-Estrada A, Aller P, González-Maya L (Jun 2018). Gallic acid sensitizes paclitaxel-resistant human ovarian carcinoma cells through an increase in reactive oxygen species and subsequent downregulation of ERK activation. *Oncol Rep*. 39(6):3007-3014.
- Sanchez-Carranza JN, González-Maya L, Razo-Hernández RS, et al. (2019). Achillin Increases Chemosensitivity to Paclitaxel, Overcoming Resistance and Enhancing Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line Resistant to Paclitaxel (Hep3B/PTX). *Pharmaceutics*. 11(10):512.
- Seo T, Urasaki Y, Ueda T (2007). Establishment of an arsenic trioxide-resistant human leukemia cell lines that shows multidrug resistance. *Int J Hemat* 85(1): 26-31.
- Sharom, F. J. (2011). The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem*, 50(1):161–78.

- Shi Z, Liang YJ, Chen ZS, Wang XH, Ding Y, Chen LM, Fu LW (2007). Overexpression of survivin and XIAP in MDR cancer cells unrelated to P-glycoprotein. *Oncol Rep* 17(4): 969-976.
- Silva FEP (2007). [Selection and characterization of a new MDR human leukemic cell line]. In: *Dissertação (Mestrado em Química Biológica) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro*. Google Scholar.
- Singh VK, Coumar MS (2019). Chronic myeloid leukemia: existing therapeutic options and strategies to overcome drug resistance. *Mini Rev Med Chem* 19(4): 333-345.
- Solazzo M, Fantappiè O, Lasagna N, Sassoli C, Nosi D, Mazzanti R (2006, Dec 10). P-gp localization in mitochondria and its functional characterization in multiple drug-resistant cell lines. *Exp Cell Res*. 312(20):4070-8
- Solazzo M, Fantappiè O, Lasagna N, Sassoli C, Nosi D, Mazzanti R (2006, Dec 10). P-gp localization in mitochondria and its functional characterization in multiple drug-resistant cell lines. *Exp Cell Res*. 312(20):4070-8.
- Takeda Y, Nishio K, Sugimoto Y, Kasahara K, Kubo S, Fujiwara Y, Saijo N, Niitani H (1991). Establishment of a human leukemia sublines resistant to the growth-inhibitory effect of 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) and showing non-P-glycoprotein-mediated multi-drug resistance. *Int J Cancer* 48(6): 931-937.
- Tamaki, A., Ierano, C., Szakacs, G., Robey, R. W., & Bates, S. E. (2011). The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. *Essays in biochemistry*, 50, 209-232.
- Tang, A., Hallouch, O., Chernyak, V., Kamaya, A., & Sirlin, C. B. (2017). Epidemiology of hepatocellular carcinoma: target population for surveillance and diagnosis. *Abdominal Radiology*, 1-13.
- Tiptiri-Kourpeti, A., Spyridopoulou, K., Pappa, A., & Chlichlia, K. (2016). DNA vaccines to attack cancer: Strategies for improving immunogenicity and efficacy. *Pharmacology & therapeutics*, 165, 32-49.
- Tsuruo T, Iida H, Ohkuchi E, Tsukagoshi S, Sakurai Y (1983). Establishment and properties of vincristine-resistant human myelogenous leukemia K562. *GANN Japan J Cancer Res* 74(5): 751-758.
- Uchibori K, Kasamatsu A, Sunaga M, Yokota S, Sakurada T, Kobayashi E (2012). Establishment and characterization of two 5-fluorouracil-resistant hepatocellular carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 40(4): 1005-1010. PMID: 22179686.

- Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human genomics*, 3(3), 1.
- Watson, J. D. (2006). *Biología molecular del gen*. Ed. Médica Panamericana.
- Wen XM, Zhang TJ, Ma JC, Zhou JD, Xu ZJ, Zhu XW (2019). Establishment and molecular characterization of decitabine-resistant K562 cells. *J Cell Mol Med* 23(5): 3317-3324.
- Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW, editors (2020). *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention*. Lyon: Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer.
- Ye Q, Liu K, Shen Q, et al. (2019 Jun 12). Reversal of Multidrug Resistance in Cancer by Multi-Functional Flavonoids. *Front Oncol*. 2019;9:487. doi:10.3389/fonc.2019.00487
- Zhang J, Gu Y, Chen B (2019). Mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia. *OncoTargets Ther* 12: 1937.
- Zhang, Y. K., Wang, Y. J., Gupta, P., & Chen, Z. S. (2015). Multidrug resistance proteins (MRPs) and cancer therapy. *The AAPS journal*, 17(4), 802-812.
- Zhao J (2016). Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid. *Pharmacol Therap* 160: 145-158.
- Zuo K, Zhang XP, Zou J, Li D, Lv ZW (2010). Establishment of a paclitaxel resistant human breast cancer cell cell lines (MCF-7/Taxol) and intracellular paclitaxel binding protein analysis. *J Int Med Res* 38(4): 1428-1435.