



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



Facultad
de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

**“MODULACIÓN DEL FENÓMENO DE RESISTENCIA
A MÚLTIPLES FÁRMACOS, POR LA ACCIÓN DE
LOS COMPUESTOS FENÓLICOS, GALATO DE
ETILO Y ÁCIDO TÁNICO EN CÉLULAS DE
CARCINOMA HEPATOCELULAR”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN FARMACIA

PRESENTA:

IBT. LUCERO GARCÍA ARIZMENDI

DIRECTORA DE TESIS

DRA. LETICIA GONZÁLEZ MAYA

CUERNAVACA, MORELOS

FECHA: MAYO, 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA COORDINACIÓN DE POSGRADO

Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. C.P. 62210
Tel. (01 777) 329 7089 y 329 7000 Ext. 3365



Fecha: 12 de diciembre de 2017
Asunto: Cambio de título.
Medio de notificación: Impresa
Folio: FF/D/SAc/CIP/MF/141/2017

**IBT. LUCERO GARCÍA ARIZMENDI
ESTUDIANTE AL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA
P R E S E N T E**

Por este medio le informo que en sesión ordinaria del Consejo Interno de Posgrado celebrada el día 06 de diciembre de 2017, se analizó su solicitud de cambio de título, así como asignación de jurado. Una vez analizado el proyecto le informo que el CIP dictaminó ACEPTAR la solicitud antes mencionada y se asignó el siguiente jurado para evaluar la tesis **“Modulación del fenómeno de resistencia a múltiples fármacos, por la acción de los compuestos fenólicos, galato de etilo y ácido tánico en células de carcinoma hepatocelular”**.

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

PRESIDENTE: Dra. Lourdes Rodríguez Frago.

SECRETARIO: Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza.

VOCAL 1: Dra. Alexandra Rodríguez Sastre.

VOCAL 2: Dra. María Crystal Columba Palomares.

VOCAL 3. Dr. Alexandre T. Cardoso Taketa.

Se le solicita entregar las tesis al jurado designado y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento reciba un cordial saludo.

**ATENTAMENTE
“POR UNA HUMANIDAD CULTA”**

**DR. JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA
JEFATURA DE POSGRADO**

C.c.p. Dra. Lourdes Rodríguez Frago, Dra. Jessica Nalley Sánchez Carranza, Dra. Alexandra Rodríguez Sastre, Dra. María Crystal Columba Palomares, Dr. Alexandre T. Cardoso Taketa.

MITV

Dedicatoria

A mi familia...

*A mis padres: Saúl y Adela,
y a mis hermanos: Azucena, Saúl y Candy.*

Gracias por su apoyo y amor incondicional, por acompañarme en este reto. Con mucho cariño y agradecimiento esto es para ustedes.

“La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo progreso”.
Louis Pasteur

Agradecimientos

A la Dra. Leticia González Maya, por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto en su equipo de trabajo, le agradezco su constante apoyo y asesoría.

A los integrantes de mi comité: las doctoras Lourdes Rodríguez Fragoso y Verónica Rodríguez López, por su asesoría en la realización del proyecto.

A mis compañeros de laboratorios: los doctores Jessica Sánchez y Aldo Clemente, por su apoyo incondicional, les agradezco que siempre estuvieron pendientes de mi avance y me ayudaron en la realización de los experimentos.

A la Facultad de Farmacia de la UAEM, especialmente a los doctores que participaron en mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico para realizar mis estudios y proyecto de maestría.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO	2
2.1.	Cáncer	2
2.2.	Prevalencia del cáncer	5
2.3.	Carcinoma Hepatocelular	6
2.4.	Tratamiento	8
2.4.1.	Quimioterapia	8
2.4.1.1.	Paclitaxel	11
2.5.	Resistencia a múltiples fármacos	12
2.5.1.	Transportadores ABC	13
2.5.1.1.	P-glicoproteína	14
2.6.	Nuevas alternativas	15
2.6.1.	Compuestos fenólicos	16
2.6.1.1.	Galato de etilo	17
2.6.1.2.	Ácido tánico	18
2.7.	Modulación de la resistencia a múltiples fármacos	19
3.	JUSTIFICACIÓN	20
4.	HIPÓTESIS	21
5.	OBJETIVO GENERAL	21
6.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
7.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
7.1.	MATERIAL	22
7.1.1.	Línea celular	22
7.1.2.	Compuestos	22
7.2.	MÉTODOS	22

7.2.1.	Determinación de la viabilidad celular y cálculo de la CI_{50} en la línea Hep3B por efecto del galato de etilo y ácido tánico	22
7.2.2.	Determinación del efecto del galato de etilo y ácido tánico sobre la expresión de ARNm del transportador P-gp en la línea Hep3B.....	23
7.2.3.	Efecto del galato de etilo y ácido tánico sobre la función de transportadores en la línea Hep3B.....	24
7.2.4.	Establecimiento de modelo de resistencia de la línea celular Hep3B	24
8.	RESULTADOS.....	26
8.1.	Efecto del galato de etilo y ácido tánico sobre la viabilidad celular y cálculo de la CI_{50} en la línea Hep3B.....	26
8.2.	Efecto del galato de etilo y ácido tánico sobre la expresión del transportador P-gp en la línea Hep3B	28
8.3.	Efecto del galato de etilo y ácido tánico sobre la función del transportador de eflujo P-gp en la línea Hep3B	31
8.4.	Establecimiento de modelo de resistencia de la línea celular Hep3B	33
9.	DISCUSIÓN	35
10.	CONCLUSIONES	38
11.	PERSPECTIVAS.....	39
12.	BIBLIOGRAFÍA	40

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Células normales y cancerosas.	3
2. Incidencia y Mortalidad del cáncer a nivel mundial.....	5
3. Incidencia y Mortalidad del cáncer en México.	6
4. Ciclo celular.	9
5. Estructuras de los transportadores ABC.	14
6. Estructura química del galato de etilo.....	17
7. Estructura química del ácido tánico.....	18
8. Efecto del galato de etilo, ácido tánico sobre la expresión de ARNm del gen <i>mdr1</i> . ..	28
9. Efecto del galato de etilo, ácido tánico y paclitaxel (solos y en combinación) sobre la expresión de ARNm del gen <i>mdr1</i>	30

ÍNDICE DE GRÁFICAS

1. Efecto sobre la viabilidad celular en células Hep3B.....	27
2. Efecto del galato de etilo y ácido tánico sobre la expresión de ARNm del gen <i>mdr1</i> ... 29	
3. Efecto del galato de etilo y ácido tánico en combinación de paclitaxel sobre la expresión de ARNm del gen <i>mdr1</i>	30
4. Histogramas de intensidad de la fluorescencia intracelular de la doxorubicina.....	32
5. Efecto del galato de etilo y ácido tánico sobre la función de eflujo.	32
6. Efecto sobre la viabilidad celular en células Hep3B y Hep3BTx7.	34

ÍNDICE DE TABLAS

1. Secuencia de oligonucleótidos.....	23
2. Programa de RT-PCR utilizado.....	23
3. Ciclos de tratamiento de paclitaxel en células Hep3B.....	25
4. Concentraciones inhibitorias 50.....	27
5. Análisis estadístico de las curvas de viabilidad celular.....	27
6. Concentraciones inhibitorias 50 Hep3B y Hep3BTx7.....	34
7. Análisis estadístico de las curvas de viabilidad celular de células Hep3B y Hep3BTx7.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Familia de transportadores ATP Binding Cassette
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
CHC	Carcinoma Hepatocelular
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GLOBOCAN	Base de datos sobre la incidencia, mortalidad y prevalencia del cáncer
MDR	Resistencia a múltiples fármacos
<i>mdr1</i>	Gen de resistencia a múltiples fármacos 1
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
P-gp	Glicoproteína P
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Retrotranscripción

RESUMEN

La quimioterapia es uno de los principales tratamientos contra el cáncer, sin embargo su eficacia puede verse alterada debido a la presencia de efectos secundarios, falta de selectividad y la aparición de resistencia al tratamiento, siendo este último de gran importancia. Entre las principales causas de la resistencia se encuentra el fenómeno conocido como resistencia a múltiples fármacos (MDR por sus siglas en inglés), en este mecanismo ciertas proteínas transmembranales pertenecientes al grupo de transportadores ABC, como P-gp, MRP1 y BCRP, actúan como bombas de eflujo del fármaco, impidiendo que este alcance su concentración intracelular requerida para tener efecto terapéutico. Esto ha derivado diversas investigaciones en busca de agentes que logren sensibilizar células que presentan este mecanismo de resistencia, evaluando extractos o metabolitos de plantas, como el té verde y sus polifenoles, obteniendo resultados prometedores para revertir la resistencia a múltiples fármacos.

El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto inhibitorio del galato de etilo y el ácido tánico, sobre el transportador de eflujo P-gp, asociado al mecanismo de resistencia a múltiples fármacos, en la línea celular Hep3B.

Los ensayos de viabilidad celular mostraron un efecto quimiosensibilizante hacia paclitaxel (25 μ M) al ser combinado con galato de etilo (50 μ M) y ácido tánico (25 μ M), utilizando verapamilo (44 μ M) como control positivo, se observaron cambios en la CI_{50} , siendo de 37.140 nM para paclitaxel solo, mientras que al ser combinado fue de 7.093 nM con verapamilo, 9.292 nM con galato de etilo y 0.508 nM con ácido tánico. En cuanto a la evaluación del efecto sobre la expresión de RNAm de P-gp, se observaron inhibiciones de 37.71 % con galato de etilo y 68.05 % con ácido tánico; el tratamiento de paclitaxel solo no mostró efecto inhibitorio, sin embargo al ser suministrado en combinación con galato de etilo o ácido tánico, se logró inhibir la expresión en un 69.5 y 73.3%, respectivamente. Finalmente ninguno de los compuestos mostró efecto sobre la actividad de eflujo de P-gp, ya que no se observaron cambios en la acumulación intracelular de doxorubicina con los tratamientos evaluados.

Los resultados obtenidos por el presente estudio sugieren que el galato de etilo y el ácido tánico presentan un efecto quimiosensibilizante a paclitaxel, aumentando su citotoxicidad además de inhibir la expresión de transcrito de P-gp.

ABSTRACT

Chemotherapy is one of the main treatments against cancer; however its effectiveness can be altered due to the presence of side effects, lack of selectivity and the emergence of resistance to treatment, this latter being of great importance. Among the main causes of resistance is the phenomenon known as multidrug resistance (MDR), in this mechanism certain transmembrane proteins belonging to the group of ABC transporters, such as P-glycoprotein, MRP1 and BCRP, act as drug efflux pumps, preventing it reaches its intracellular concentration required to have therapeutic effect. Actually several investigations are focus in the search of agents to sensitize cells that have developed the MDR phenotype, then extracts and metabolites from plants, such as green tea and polyphenols, have been evaluated and some results showed to reverse the multidrug resistance.

For this reason, the aim of this project was to evaluate the inhibitory effect of ethyl gallate and tannic acid in co-treatment with paclitaxel on the P-gp efflux transporter, associated with the mechanism of multidrug resistance, in the Hepatocellular carcinoma Hep3B cells.

The analysis on cell viability showed a chemosensitizing effect towards paclitaxel (25 μM) when combined with ethyl gallate (50 μM) and tannic acid (25 μM), using verapamil (44 μM) as a positive control, a change in IC_{50} was observed, being 37.140 nM for paclitaxel alone, while combined with verapamil was 7.093 nM; 9.292 nM with ethyl gallate and 0.508 nM with tannic acid. In addition, an effect on the inhibition of the expression of mRNA of P-gp was observed; achieving an inhibition of 37.71% with ethyl gallate and 68.05% with tannic acid; paclitaxel treatments showed no inhibitory effect on expression, but when combined with ethyl gallate or tannic acid, expression was inhibited by 69.5 and 73.3%, respectively. Finally, no effect was observed on P-gp efflux activity, as no changes were found in the intracellular accumulation of doxorubicin with the ethyl gallate and tannic acid treatments but changes statistical significant were observed with verapamil.

The results obtained by the present study suggest that ethyl gallate and tannic acid induce a chemosensitizing effect to paclitaxel treatment, increasing its cytotoxicity as well as inhibiting the expression of P-gp transcript.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una problemática que afecta a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó 8.2 millones de muertes en el 2012. Es un conjunto de enfermedades que se origina a partir de diversos factores genéticos o ambientales. Debido a esto, es complejo proporcionar un tratamiento adecuado y efectivo que ataque las causas específicas que lo originaron. Los principales tratamientos son la cirugía, radioterapia y quimioterapia, estos dependerán del grado de avance y la localización del cáncer. A través de la historia el uso de plantas como una opción curativa ha sido uno de los principales tratamientos de enfermedades, y es a partir de ellas que se han obtenido una gran parte de los medicamentos utilizados hoy en día. Se han desarrollado diversas investigaciones a partir de plantas donde se han identificado actividades terapéuticas como, antiinflamatorias, citotóxicas, antioxidantes, entre otras.

Si bien la quimioterapia es uno de los principales tratamientos contra el cáncer, también presenta algunos inconvenientes, principalmente: efectos secundarios, falta de selectividad y en algunos casos la aparición de resistencia al tratamiento; este último es un gran obstáculo para la efectividad de la quimioterapia. Entre las causas de la resistencia se encuentra el fenómeno conocido como resistencia a múltiples fármacos (MDR por sus siglas en inglés), en este mecanismo ciertas proteínas transmembranales del grupo de transportadores ABC, como P-glicoproteína, MRP1 y BCRP, actúan como bombas de eflujo del fármaco, impidiendo que este alcance su concentración requerida para tener su efecto terapéutico.

Debido a esta problemática es necesario encontrar nuevas opciones de tratamiento por lo que se han realizado diversas investigaciones buscando agentes que logren sensibilizar células que presentan este mecanismo de resistencia. Es por esto que en este proyecto se evaluaron el galato de etilo y el ácido tánico en la línea celular de carcinoma hepatocelular Hep3B, analizando su efecto sobre: la actividad citotóxica del paclitaxel, la expresión de transcrito de P-gp, así como la función de eflujo de esta proteína.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Cáncer

El Instituto Nacional del Cáncer de EUA (NIH), define al cáncer como un conjunto de enfermedades relacionadas que se caracterizan por la presencia de células que se dividen sin control y que son capaces de invadir otros tejidos (NIH, 2015). De manera normal las células crecen de una manera controlada, recibiendo señales para dividirse, diferenciarse o morir, además existen puntos de control que evitan y reparan daños detectados impidiendo que continúe un crecimiento defectuoso; el cáncer aparece cuando las células evaden estas señales, manteniendo una proliferación descontrolada y anormal, de manera que al no tener un control, éstas crecen sin interrupción, y sin tener una óptima funcionalidad (Figura 1). Para que las células logren evadir estos mecanismos de control, éstas sufren cambios o mutaciones en el genoma que afectan la producción 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; Hejmadi, 2009; Muñoz, 1997; Russell *et al.*, 2014).

El cáncer se puede clasificar en diferentes tipos dependiendo el tejido y células donde se originaron:

- Carcinoma: se deriva de células epiteliales y es el tipo de cáncer más común en humanos, esto puede deberse a que la proliferación celular en adultos ocurre en células epiteliales, además que este tipo de células frecuentemente se encuentran expuestas a agentes físico o químicos, lo que podría favorecer el desarrollo del cáncer.
- Sarcoma: se deriva del tejido conjuntivo o de fibras musculares, es decir músculos, cartílagos, huesos y tejido adiposo. Este tipo de cáncer tiene una frecuencia baja a nivel mundial.
- Leucemia: se originan a partir de células sanguíneas con origen en la médula ósea. Ocurre una producción anormal de estas células, un aumento descontrolado de glóbulos blancos.

- Linfoma: se origina en células del sistema inmune dentro del sistema linfático.

A su vez estas categorías tienen subdivisiones que dependen de donde se localicen, el tipo de célula y la estructura del tumor (Alberts *et al.*, 2010).

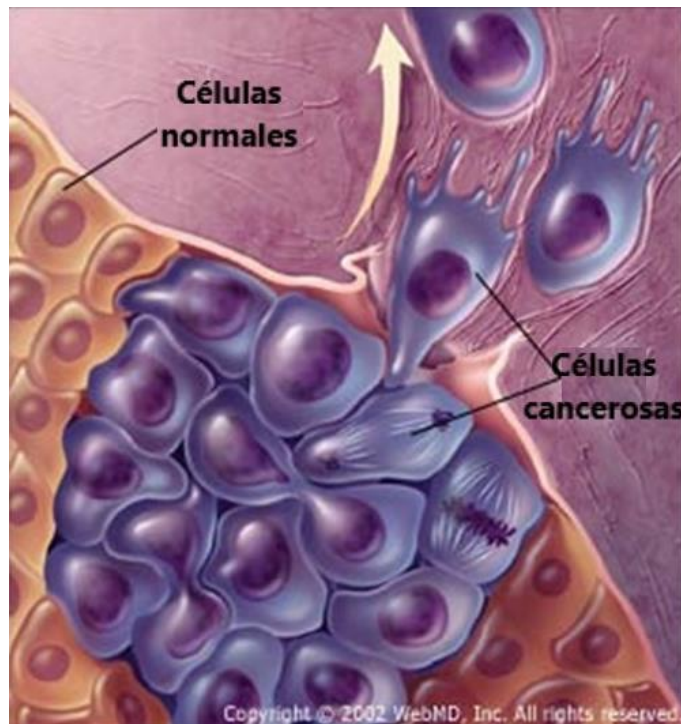


Figura 1. Células normales y cancerosas.
Tomado y modificado de Hejmadi, M. (2009).

El cáncer es un conjunto de enfermedades de origen complejo, es decir, una sola célula tiene un finito número de maneras en las que su crecimiento puede ser afectado, esto dificulta lograr diagnóstico y tratamiento adecuado. El cáncer es el resultado de un conjunto de mutaciones que alteran el control del crecimiento celular, se han identificado que distintos tipos de cáncer tienen en común alteraciones en un gen en particular; por lo general estos genes juegan un papel fundamental en la regulación del crecimiento celular (Alberts *et al.*, 2010; Hejmadi, 2009; Muñoz, 1997; Russell *et al.*, 2014). Este tipo de genes alterados se pueden clasificar en dos grupos:

- **Oncogenes:** Existen genes conocidos como proto-oncogenes, los cuales codifican proteínas implicadas en la regulación de un crecimiento controlado, estimulan la

división en el ciclo celular. Estos genes pueden sufrir alteraciones que afecten su función o expresión, transformándose en genes conocidos como oncogenes, los cuales ya no contarán con la funcionalidad de mantener el crecimiento bajo control, es decir alcanzan un estado permanente activo, estimulando el crecimiento, logrando que la célula prolifere de manera excesiva y sin control (Alberts *et al.*, 2010; Hejmadi, 2009; Muñoz, 1997; Russell *et al.*, 2014).

- **Genes supresores de tumores:** Existen genes encargados de controlar el crecimiento celular suprimiendo o bloqueando la división celular, reparando daños del ADN o mandando a muerte celular cuando sea requerido. Cuando estos genes sufren alteraciones que inactivan su función (a diferencia de los oncogenes que requieren ser activados), se pierde el control antiproliferativo dejando que las células continúen un crecimiento ininterrumpido sin importar las condiciones (Alberts *et al.*, 2010; Hejmadi, 2009; Muñoz, 1997; Russell *et al.*, 2014).

Si bien el origen del cáncer es multifactorial, se sabe que el cáncer se origina debido a un conjunto de mutaciones ocasionadas 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 (Alberts *et al.*, 2010; Hejmadi, 2009; Muñoz, 1997; Russell *et al.*, 2014):

- **Carcinógenos físicos**, como las radiaciones ultravioleta 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).

2.2. Prevalencia del cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades con un gran impacto en la salud a nivel mundial, siendo la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares. La Organización Mundial de la Salud reportó un total de 8,2 millones de muertes en el 2012, casi una de cada seis defunciones en el mundo se debe a esta enfermedad. Como se observa en la Figura 2, los tipos de cáncer con mayor incidencia son de: mama, próstata, pulmón, colon y cervicouterino, mientras que con el mayor mortalidad son de: pulmón, hígado, estómago, colon y mama, a nivel mundial (OMS, 2012).

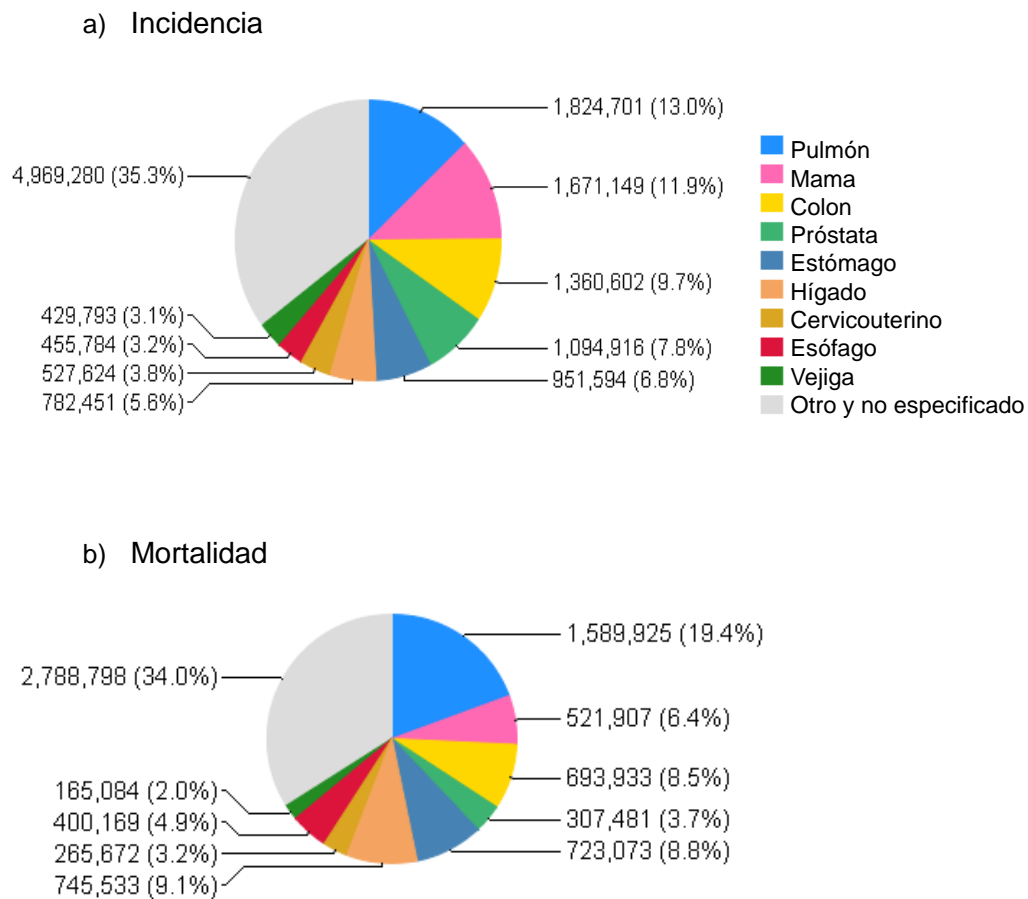


Figura 2. Incidencia y Mortalidad del cáncer a nivel mundial.
Se muestra: a) incidencia y b) mortalidad del cáncer en el mundo. Globocan, 2012.

En México el cáncer es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. La organización mundial de la salud, a través de Globocan, reportó 78 700 muertes a causa de cáncer en el 2012. Se reportaron como los de mayor incidencia: el cáncer de mama, próstata, cervicouterino, colon y pulmón, de mayor índice de mortalidad: pulmón, próstata, estómago, hígado, y mama (Figura 3) (OMS, 2012).

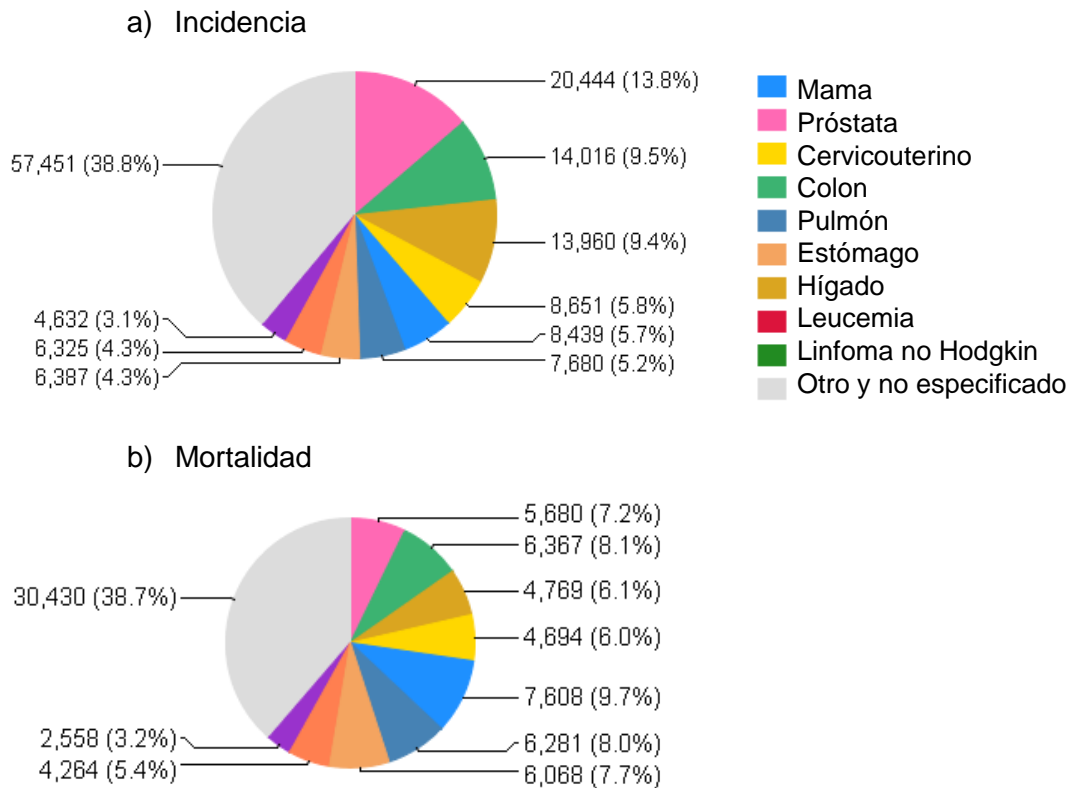


Figura 3. Incidencia y Mortalidad del cáncer en México. Se muestra: a) incidencia y b) mortalidad del cáncer en el mundo. Globocan, 2012.

2.3. Carcinoma Hepatocelular

El carcinoma hepatocelular (CHC) ocupa el sexto lugar en incidencia, y el segundo en mortalidad en el mundo, mientras que en México ocupa el octavo lugar en incidencia y el séptimo lugar en mortalidad entre los tipos de cáncer. Como se muestra en las figuras 2 y 3, el carcinoma hepatocelular tiene un alto porcentaje de mortalidad. En el 2012, a nivel mundial se reportaron 782,451 casos y 745,533 muertes, mientras que a nivel nacional se observa el mismo comportamiento, de 6,387 casos se reportaron 6,068 muertes, con esto

podemos observar que el pronóstico del carcinoma hepatocelular no es favorable, se tiene un número muy similar entre la incidencia y la mortalidad, de ahí la importancia de mejorar los métodos de diagnóstico y tratamiento de este tipo de cáncer (GLOBOCAN, 2012).

El virus de hepatitis B es el principal factor de riesgo de desarrollar CHC, ocasionando un estimado del 50% de todos los cánceres hepáticos, mientras que el virus de hepatitis C ocupa el segundo lugar con un estimado de 10- 25 %, en ambos casos el tener una coinfección con VIH incrementa el riesgo de desarrollar CHC, de igual manera una coinfección de ambos virus de hepatitis B y C, también incrementa el riesgo a desarrollar CHC. El consumo de alcohol se considera la tercera causa más común de CHC, ya que al consumir alcohol excesivamente produce una inflamación recurrente, ciclos de necrosis y regeneración hepatocitaria produciendo estrés oxidativo, resultando finalmente en cirrosis; de igual manera el consumo de alcohol puede trabajar sinérgicamente con infecciones de virus de hepatitis, incrementando el riesgo de desarrollar CHC (Ghouri *et al.*, 2017; Sanyal, *et al.*, 2010; Testino, *et al.*, 2014).

Como muestran los datos estadísticos, el carcinoma hepatocelular 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 carcinoma hepatocelular 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, la detección temprana mediante la vigilancia y el uso de métodos diagnósticos precisos son fundamentales para el manejo del CHC, esto 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 resistencia a fármacos y a la disfunción hepática que limita la administración de estos fármacos. La cirrosis tendrá un impacto en los volúmenes de distribución de fármacos, es decir, el hígado el principal órgano responsable de la metabolización de una gran cantidad de fármacos, por lo que determina su biodisponibilidad, cualquier deficiencia en este órgano afectará la farmacocinética, el metabolismo, y finalmente el efecto del fármaco (Cidon, 2017; Galun *et al.*, 2017; Verbeeck, 2008; Verbeeck y Horsmans, 1998).

2.4. Tratamiento

El cáncer es un conjunto de enfermedades 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. Los principales tratamientos e son la cirugía, la radiación y la quimioterapia (Lasley, 2011; NCI, 2015).

La cirugía a menudo es el primer tratamiento aplicado cuando el cáncer es detectado en una etapa temprana, con este se logra remover el tumor sólido, y evitar así que se propague. La radioterapia consiste en la aplicación de altas dosis de radiación directamente en el tumor para matar células cancerosas; actúa dañando el ADN evitando la replicación, sin embargo también mata algunas células normales. La quimioterapia consiste en administrar fármacos que tienen como objetivo dañar las células que se dividen rápidamente, mucho de estos fármacos están diseñados para interferir con la síntesis de ADN o dañarlo, una de las desventajas es que carece de selectividad hacia células cancerosas, afectando también a las normales. En algunos casos se da un solo tipo de tratamiento, pero en la mayoría se da una combinación de tratamientos, como cirugía con quimioterapia y/o radioterapia, esto dependerá de la zona afectada, si ya hay metástasis y el estado de salud del paciente (Lasley, 2011).

Si bien los principales tratamientos son la cirugía, la radiación y la quimioterapia, también se encuentran en desarrollo nuevos tratamientos como la inmunoterapia, terapia hormonal, trasplantes de células madre, éstos buscan dar un tratamiento más específico y dirigido a las células cancerosas, tomando en cuenta las modificaciones genéticas que originaron el cáncer (Bilusic y Madan, 2012; Tiptiri-Kourpeti *et al.*, 2016).

2.5. 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 ADN 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).

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 4) (Alberts *et al.*, 2010; Siddik, 2010; Watson, 2006):

- **Fase G₁**: la célula duplica su tamaño y se sintetizan las proteínas y sustratos necesarios para la duplicación del ADN.
- **Fase S**: se duplica el material genético.
- **Fase G₂**: se producen todos los sustratos necesarios para la fase de división o mitosis.
- **Fase M**: mitosis celular. Finalmente se originan dos células idénticas (Alberts *et al.*, 2010; Siddik, 2010; Watson, 2006).

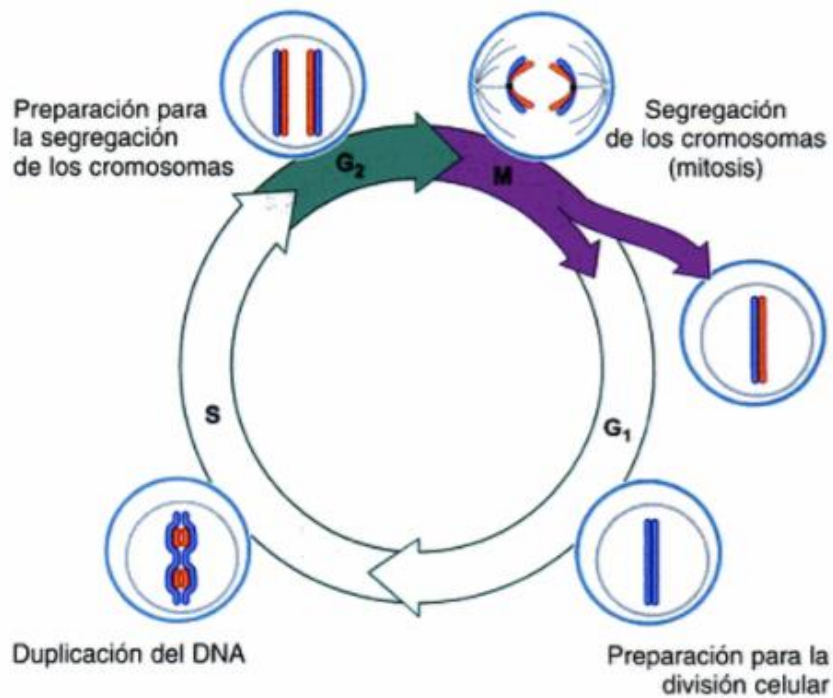


Figura 4. Ciclo celular.

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: G₁, S, G₂ y M. (Watson, 2006).

Durante el ciclo celular existen puntos de control que verifican que el proceso de cierta fase se haya realizado adecuadamente, uno de ellos se encuentra en la fase G₁, justo antes de entrar en fase S y el otro en la fase G₂ antes de la mitosis. Esto evitará que el ciclo continúe con ADN dañado, y de ser necesario actuarán los mecanismos de reparación. También existe la posibilidad de que se dé la fase G₀, ocurre cuando célula permanecen en reposo, debido a que la misma no tiene la capacidad o ya no se requiere continuar con el ciclo (Alberts *et al.*, 2010; Siddik, 2010; Watson, 2006).

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:** Se unen al ADN formando enlaces covalentes con grupos alquilo, de manera que bloquean la replicación del ADN y la transcripción del RNA, y por consiguiente la mitosis y la síntesis de proteínas. Actúan fundamentalmente sobre el final de G₁ y la fase S.
- **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 ARN. Debido a este mecanismo de acción, son más activos cuando las células están en la fase S.
- **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 ADN 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 aislaron de la especie vegetal *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, compuesto de origen natural obtenido de árboles del género *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 aislados 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 (Fernández, 2008; García-Conde, 2000).

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).

Al contar con fármacos con distintos mecanismos de acción, éstos pueden ser administrados solos o en combinación, siendo que esto último permitirá atacar al tumor en una forma más integral, afectando diversas fases del ciclo celular. Por lo general el mecanismo de acción de estos agentes es sobre la proliferación celular en general, por lo que no tienen especificidad y atacan también a células normales, causando efectos secundarios, sin embargo al duplicarse más rápido las células cancerosas tiene un mayor efecto en ellas (Fernández, 2008; García-Conde, 2000).

2.6. Paclitaxel

El paclitaxel perteneciente al grupo de taxanos, fue aislado de la corteza del tejo (*Taxus brevifolia*) en 1971, y tras solucionar problemas de su formulación debido a su poca hidrosolubilidad, se aprobó 2005 su uso por la FDA en forma de solución de nanopartículas unidas a albumina para infusión intravenosas (Brunton, 2012).

El paclitaxel es un compuesto diterpenoide que contiene un complejo de ocho segmentos con un anillo taxano como núcleo. Para su actividad antitumoral es esencial la

cadena lateral unida al anillo de taxano en el sitio C13. Tienen poca hidrosolubilidad y se administra en un vehículo de 50% etanol y 50% de aceite polietoxilado de ricino; es posible que la gran frecuencia de reacciones de hipersensibilidad depende del vehículo (Brunton, 2012).

Los taxanos actúan sobre la tubulina. Actúan promoviendo la polimerización de la tubulina y estabilizan los microtúbulos impidiendo la despolimerización, inhibiendo la formación del huso mitótico en la división celular, evitando la mitosis. Evita la transición de la fase G₀ a la fase S (Aschenbrenner y Venable, 2009; Missailidis, 2008; Weaver, 2014).

El paclitaxel tiene efectividad contra un amplio rango de tumores sólidos, ha mostrado una mayor actividad citotóxica en tratamiento de cáncer de ovario y de mama, como efectos adversos se encuentran principalmente: hipersensibilidad, neutropenia y neurotoxicidad (Bathaie y Tamanoi, 2015; Farooqi e Ismail, 2017; Timmerman, 1995).

2.7. Resistencia a múltiples fármacos

La resistencia a la quimioterapia es uno de los principales obstáculos que enfrenta el tratamiento del cáncer, debido a que ocasiona que el fármaco pierda sus efectos terapéuticos. Este fenómeno se debe a diversos cambios a nivel molecular y farmacocinético, que le permiten a la célula superar los efectos del tratamiento. Estos cambios pueden ser la eliminación o mutación de objetivos terapéuticos, mala absorción o inactivación del fármaco, defectos en los puntos de control del ciclo celular que dejan pasar algunos errores, la sobreexpresión de maquinaria necesaria para la reparación del material genético dañado, o la pérdida de activación de la vía de apoptosis permitiendo que las células continúen su crecimiento. Estos mecanismos de resistencia pueden presentarse de manera intrínseca o adquirirse tras ser sometidos al tratamiento (Brunton, 2012; Housman *et al.*, 2014).

Entre estos mecanismos de resistencia se encuentra la resistencia a múltiples fármacos (MDR, por sus siglas en inglés), en el cual proteínas transportadoras pertenecientes a la familia ABC. Se localizan en la membrana celular actuando como bomba de eflujo, es decir expulsan al fármaco, impidiendo que se acumule al interior de la célula y ejerza su actividad terapéutica. Se conoce como a múltiples fármacos debido a

que un solo transportador puede tener afinidad con diversos fármacos sin importar su estructura o sitio de acción (Fletcher *et al.*, 2016, Zhang *et al.*, 2015).

2.8. Transportadores ABC

Existen proteínas transportadoras localizadas en la membrana, encargadas de transportar iones, carbohidratos y aminoácidos a través de las membranas celulares y de organelos, entre ellas se encuentran los transportadores ABC, los cuales realizan transporte activo, tanto eflujo como influjo, de diversos sustratos obteniendo energía a partir del ATP. En humanos han sido identificados 48 genes de la superfamilia de transportadores ABC que han sido organizados en siete subfamilias ABCA-ABCG. Éstos están expresados de manera endógena en diversos tejidos cumpliendo funciones fisiológicas normales de transporte activo, sin embargo se han identificado al menos 15 genes relacionados con la resistencia a múltiples fármacos, destacando P-gp (ABCB1), MRP1 (ABCC1) y BCRP (ABCG2) (Fletcher *et al.*, 2016; Leslie *et al.*, 2005). 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. 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 (Polgar y Baters, 2005); en leucemia mieloide 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).

Son llamados transportadores ABC debido a que poseen un casete de unión de ATP (ATP Binding Cassete); además en su estructura poseen dominios de unión a nucleótidos (NBD por sus siglas en inglés). Los NBDs tanto de eucariontes como de procariontes han mostrado secuencias conservadas que tienen un papel crucial en la unión e hidrólisis de ATP: el motivo Walker A rico en glicina, el motivo hidrofóbico Walker B, el motivo Signature C, Q-loop y D-loop. En su estructura también contienen dominios transmembranales (TMDs por sus siglas en inglés), los cuales contienen hélices α (Figura 5) (Chen *et al.*, 2016; Fletcher *et al.*, 2016; Leslie *et al.*, 2005; Vasiliou *et al.*, 2009).

Para que un transportador ABC sea funcional debe tener al menos dos dominios transmembranales (TMD) con 6 segmentos cada uno, y dos dominios de unión a nucleótido (NBD). Los dos dominios de unión a nucleótidos se unen al ATP hidrolizando y obteniendo la energía necesaria para activar la bomba de eflujo, mientras que los dominios transmembranales participan en el reconocimiento y translocación a través de la membrana del sustrato (Chen *et al.*, 2016; Fletcher *et al.*, 2016; Leslie *et al.*, 2005; Vasiliou *et al.*, 2009).

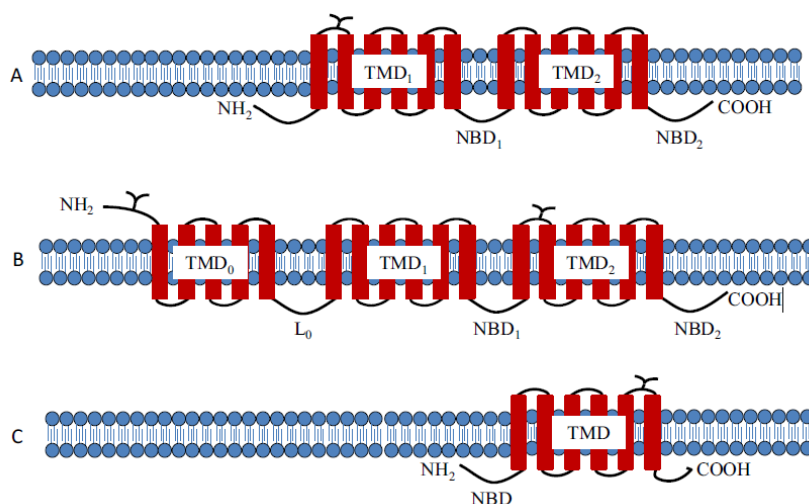


Figura 5. Estructuras de los transportadores ABC.

Se muestran modelos de estructuras secundarias predichas para (A) P-glicoproteína, (B) MRP1 y MRP2 y (C) BCRP/ABCG2. TMD, dominio transmembranal; NBD, dominio de unión a nucleótidos; Lo, loop. (Chen *et al.*, 2016).

2.9. P-glicoproteína

P-glicoproteína fue el primer miembro de los transportadores ABC en ser identificado, ABCB1 (P-gp/MDR1), en 1976, descubierto en células de hámster chino resistentes a colchicina, una glicoproteína sobreexpresada que reduce la permeabilidad del fármaco (Juliano y Ling, 1976).

En humanos existen dos miembros, MDR1 y MDR2, y en roedores son 3, *mdr1a*, *mdr1b* y *mdr2*. P-gp en humanos tiene un peso molecular de 170 kDa, con una secuencia de 1280 aminoácidos, es codificada por el gen *mdr* localizado en el cromosoma 7q21. P-gp en humanos forma una pequeña familia de genes con dos isoformas. La isoforma de clase I (MDR1/ABCB1) es un transportador de fármacos, mientras que la isoforma de clase II (MDR2/3/ABCB4) lleva a cabo la exportación de fosfatidilcolina a la bilis (Ruetz y

Gros, 1994; Sharom, 2011). La molécula de P-gp consiste en dos mitades homólogas (dímero) unidas entre sí. Cada mitad de la molécula presenta seis dominios hidrofóbicos transmembranales unidos, asociados con un dominio hidrofílico C-terminal que contiene la secuencia consenso de unión e hidrólisis del ATP. La secuencia de aminoácidos contiene un extenso segmento hidrofóbico en el extremo N-terminal. Los segmentos transmembranales en la membrana plasmática están orientados de forma que el extremo C-terminal se sitúe en el lado citoplásmico de la membrana. Los tres pares de segmentos transmembranales están separados por largas cadenas de aminoácidos en la cara citoplásmica de la membrana y cortas cadenas en la superficie celular (Figura 5, (A)) (Chen *et al.*, 2016; Fletcher *et al.*, 2016; Leslie *et al.*, 2005; Vasiliou *et al.*, 2009; Sharom, 2011).

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. La 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, inhibidores de la proteasa del VIH, agentes inmunosupresores, antiarrítmicos, bloqueadores del canal de calcio, analgésicos, antihistamínicos, antibióticos, productos naturales, colorantes fluorescentes y pesticidas, entre muchos otros (Chen *et al.*, 2016; Fletcher *et al.*, 2016; Leslie *et al.*, 2005; Vasiliou *et al.*, 2009; Sharom, 2011).

2.10. 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 (Farnsworth, 1990; Patwardhan, 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 polifenólicos, un grupo de metabolitos secundarios de las plantas que poseen en su estructura al menos un anillo aromático al que está unido uno o más grupos hidroxilo, se clasifican como ácidos fenólicos, flavonoides y taninos (Mercado-Mercado *et al.*, 2013). Debido a sus potentes propiedades antioxidantes, los polifenoles han mostrado posibles beneficios para la salud en diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo tales como el cáncer. Los polifenoles pueden inducir la muerte de células tumorales e interferir con la carcinogénesis y el crecimiento del tumor (Rodríguez *et al.*, 2013).

2.11. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un tipo de metabolitos secundarios cuya característica principal es que en su estructura contiene un grupo fenol, es decir un anillo aromático con un grupo funcional hidroxilo. Los compuestos fenólicos son un grupo muy heterogéneo en cuanto a su estructura química, en plantas incluye unos 10 000 compuestos, desde moléculas sencillas hasta polímeros complejos, esta heterogeneidad ocasiona que exista una diversidad en sus funciones, desde defensa contra agentes extraños, participación en soporte mecánico, atracción de polinizadores o dispersantes de frutos, absorción de radiación o reducción de crecimiento de plantas competidoras próximas. Los compuestos fenólicos de las plantas son biosintetizados principalmente por las rutas del ácido shikímico y la del ácido malónico, esta última es utilizada principalmente por hongos y bacterias pero en algunos casos también las plantas. La ruta del ácido shikímico es la responsable de la mayoría de los compuestos fenólicos de las plantas (Bidwell, 1987; Zeiger, 2006).

Sánchez-Carranza y colaboradores (2017) obtuvieron el extracto (Agua:Acetona:Etanol 80:10:10%) de *Caesalpinia coriaria* a partir de vainas, posteriormente se realizó el análisis fitoquímico del extracto, haciendo fraccionamientos cromatográficos para purificar compuestos que fueron caracterizados por resonancia magnética nuclear 1D y 2D. Estos compuestos se identificaron como ácido gálico, galato de etilo, estigmasterol, 5-hidroximetilfurfural y el ácido tánico. Este extracto ha presentado actividad citotóxica en diferentes líneas cancerosas. Alonso-Caspeta (2011) observó

actividad quimiosensibilizante a doxorrubicina en células de cáncer de mama (MCF-7) y de cáncer cervicouterino (Ca Ski), obtenido una CI_{50} con doxorrubicina de 1.9 $\mu\text{g/ml}$, y al ser combinado con el extracto se obtuvo una CI_{50} 0.19 $\mu\text{g/ml}$, siendo con la 10 órdenes de magnitud menor, mientras que en las células Ca Ski se observó un efecto menor, disminuyéndose la CI_{50} en un orden de 2 veces con el tratamiento combinado, sugiriendo que el extracto induce un efecto quimiosensibilizante.

2.12. Galato de etilo

El galato de etilo es un éster de galato que se obtiene por la condensación formal de ácido gálico con etanol. Su fórmula general es $C_9H_{10}O_5$, con peso molecular de 198.17 g/mol (Figura 6). Diversos estudios han reportado su efecto antiproliferativo del galato de etilo en contra diferentes líneas celulares de cáncer (Kalaivani *et al.*, 2011; Mohan *et al.*, 2015; Mohan *et al.*, 2017; Sánchez-Carranza *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2009).

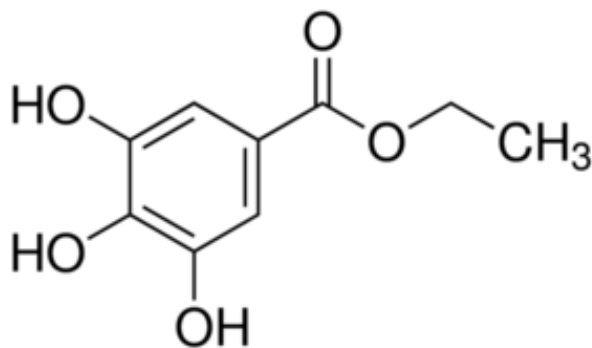


Figura 6. Estructura química del galato de etilo.

2.13. Ácido tánico

El ácido tánico también conocido como ácido galotánico, ácido digálico, entre otros. Está formado por varias moléculas de ácido gálico unidos por un enlace éster y un residuo de glucosa. Su fórmula general es $C_{76}H_{52}O_{46}$, con un peso molecular de 1701.20 g/mol. La formación del ácido tánico proviene de la ruta del ácido shikímico, una vez formado el ácido gálico, se esterifica con una molécula de glucosa y nueve moléculas de ácido gálico.

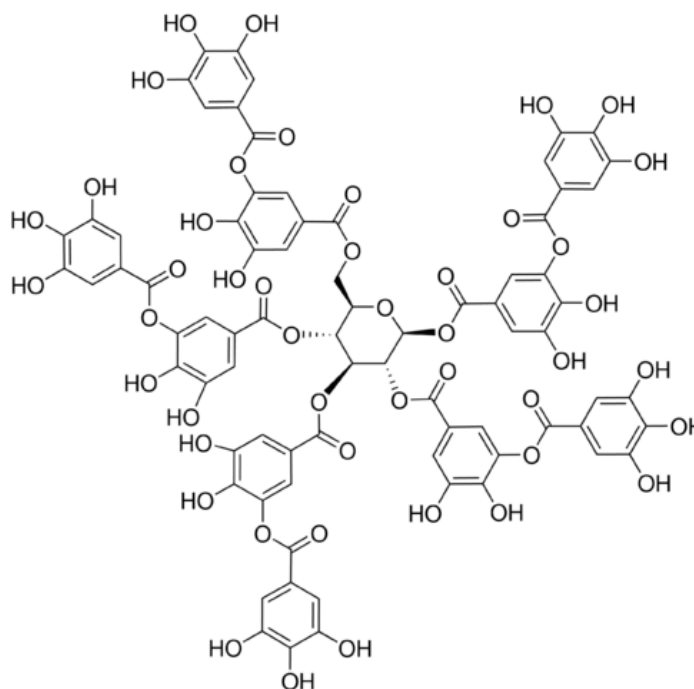


Figura 7. Estructura química del ácido tánico.

2.14. Modulación de la resistencia a múltiples fármacos

Diversos estudios han reportado que algunos flavonoides logran la inhibición de del mecanismo de resistencia a múltiples fármacos (MDR), esto se logra porque se unen en el sitio de unión del ATP impidiendo obtener la energía a partir de su hidrólisis (Yarla y Ganapaty, 2013). Zhang y colaboradores (2004) evaluaron el efecto de 20 flavonoides encontrando que funcionaban como inhibidores de la proteína de resistencia del cáncer de mama (BCRP). Imai y colaboradores (2004) investigaron diversas flavonas, isoflavonas, flavanonas, por su habilidad de revertir la resistencia en células de leucemia mieloide crónica K562 que sobreexpresan BCRP, encontrando que todas las flavonas eran capaces de revertir la resistencia mediada por BCRP, mientras que los flavonoides y las isoflavonas presentaron un menor efecto.

Por otro lado, la Quercetina, un flavonoide de origen vegetal, ha mostrado actividad antineoplásica actuando sobre el control del ciclo celular y apoptosis, además reportes recientes sugieren que puede suprimir el fenómeno resistencia a múltiples fármacos. Estudios en células de carcinoma de páncreas resistentes a doxorubicina (DB EPP85-181), reportaron inhibición de la expresión y función de P-gp en co-tratamiento de doxorubicina y Quercetina, y este efecto fue dependiente de la concentración de Q (Borska *et al.*, 2010).

Por su parte, en células de carcinoma epidermoide orales (KB A-1) resistentes a doxorubicina, se observó que el galato de epigalocatequina (EGCG) y los polifenoles del té verde (TP) revirtieron la resistencia en 2.5 y 5.2 veces, respectivamente, esto no se observó en células KB sensibles (KB 3-1), sugiriendo una selectividad hacia células resistentes. Además el tratamiento con doxorubicina indujo especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares. Sin embargo, a diferencia de las células KB 3-1, en las células resistentes KB A-1 los niveles de ROS se mantienen a niveles elevados, sugiriendo que estas células sufren un estrés oxidativo severo. Este elevado nivel oxidativo fue inhibido por el EGCG y TP. Los resultados sugieren que efecto de TP y EGCG sobre el fenómeno de MDR se debe, al menos en una parte, a la regulación del ROS inducido por el tratamiento con doxorubicina (Mei *et al.*, 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una enfermedad multifactorial, es decir se origina a partir de diversos factores genéticos o ambientales. Debido a esto, es complejo proporcionar un tratamiento adecuado y efectivo que ataque las causas específicas que lo originaron. Si bien la quimioterapia es uno de los principales tratamientos contra el cáncer, también presenta algunos inconvenientes, principalmente: efectos secundarios, falta de selectividad y en algunos casos la aparición de resistencia al tratamiento; este último es un gran obstáculo para la efectividad de la quimioterapia. Entre las causas de la resistencia se encuentra el fenómeno conocido como resistencia a múltiples fármacos.

Debido a esta problemática es necesario encontrar nuevas opciones de tratamiento, por lo que se han realizado diversas investigaciones buscando agentes que logren evitar o revertir este mecanismo de resistencia. Se han evaluado extractos o metabolitos de plantas, como el té verde y sus polifenoles, obteniendo resultados prometedores para revertir la resistencia a múltiples fármacos. Es por esto que en este proyecto se evaluaron el ácido tánico y el galato de etilo, en la línea celular de carcinoma hepatocelular Hep3B, analizando su efecto sobre: la actividad citotóxica del paclitaxel, la expresión de transcrito de P-gp, así como la función de eflujo de estas proteínas transportadora.

4. HIPÓTESIS

El galato de etilo y el ácido tánico inhibirán el fenómeno de resistencia a múltiples fármacos, por su acción sobre la expresión y función del transportador de eflujo (P-gp) en las células de carcinoma hepatocelular Hep3B.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto inhibitorio del galato de etilo y el ácido tánico, sobre la expresión y función del transportador de eflujo P-gp, asociado al mecanismo de resistencia a múltiples fármacos, en las células de carcinoma hepatocelular Hep3B.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar el efecto del galato de etilo y el ácido tánico en combinación con paclitaxel sobre la viabilidad celular en las líneas celulares Hep3B.
- 2) Evaluar los cambios en la expresión del transcrito del transportador de eflujo P-gp, por la acción del galato de etilo y el ácido tánico, solos y en combinación con paclitaxel, en las células de carcinoma hepatocelular Hep3B.
- 3) Analizar el efecto del galato de etilo y el ácido tánico sobre la inhibición de la función del transportador de eflujo P-gp en las células de carcinoma hepatocelular Hep3B.
- 4) Establecer un modelo de resistencia a múltiple fármacos en células de carcinoma hepatocelular Hep3B.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. MATERIAL

7.2. Línea celular

Se utilizó la línea celular Hep3B, derivada de carcinoma hepatocelular (obtenida de ATCC). Las células fueron cultivadas en medio EMEM, suplementado con SFB al 10%, y las condiciones de cultivo fueron a 37° C a atmósfera de CO₂ al 5%.

7.3. Compuestos

Los compuestos empleados para ese proyecto fueron obtenidos comercialmente, paclitaxel, doxorubicina, galato de etilo y ácido tánico fueron comprados en Sigma Aldrich.

7.4. MÉTODOS

7.5. Determinación de la viabilidad celular y cálculo de la CI₅₀ en la línea Hep3B por efecto del galato de etilo y ácido tánico

Se cultivaron 5000 células de Hep3B en 100 µL de medio de cultivo en placas de 96 pozos, basándonos en estudios previos (artículo en redacción) se eligieron las concentraciones de tratamiento, se trataron con concentraciones crecientes de paclitaxel (0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 nM) solo o en combinación de galato de etilo 50 µM, ácido tánico 25 µM, y verapamilo a 44 µM (inhibidor conocido de P-gp, empleado como control positivo) y se incubaron durante 48 horas. Para determinar la viabilidad celular se empleó el kit Cell Titer96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), éste contiene un nuevo compuesto de tetrazolio (3- (4,5-dimetil-2-il) -5- (3-carboximetofenoxi) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazolio: MTS) y un reactivo de acoplamiento de electrones (etosulfato de fenazina: PES), este compuesto es bio-reducido mediante las células a formazan, el cual es cuantificado por absorbancia a 490 nm, la cantidad de producto es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo; se añadieron 20 µL de reactivo a cada pozo y se incubaron nuevamente a 37° C y 5% de CO₂ durante 4 h. Se midió la densidad óptica en un lector de placas de ELISA a 490 nm. El experimento se hizo por triplicado con una n de 3. Los valores obtenidos se analizaron

estadísticamente para calcular las CI50 $Y = \text{Respuesta máxima inhibida} + (\text{Respuesta máxima} - \text{Respuesta máximamente inhibida}) / (1 + 10^{-(X - \text{LogIC50})})$ y las diferencias estadísticas entre las pendientes utilizando una prueba F, con el programa estadístico GraphPad Prism.

7.6. Determinación del efecto del galato de etilo y ácido tánico sobre la expresión de ARNm del transportador P-gp en la línea Hep3B

Se cultivaron 200,000 células Hep3B en 2000 µL de medio de cultivo en placas de 6 pozos, se dejaron incubar por 12 horas, y se hicieron tratamientos con galato de etilo 50 µM, ácido tánico 25 µM y paclitaxel 25 nM, solos y en combinación, por 24 horas. Al terminar los tratamientos se realizaron extracciones de ARN total de células Hep3B, empleando el kit ZR RNA MiniPrep siguiendo las instrucciones del fabricante, y se realizó RT-PCR con el kit de Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Hot-Start, empleando 25 ng de ARN total, 10 pmol de oligos (secuencia de oligonucleótidos mostrados en la Tabla 1), en un volumen final de 10 µL. Para la retrotranscripción y la amplificación se empleó el programa mostrado en la Tabla 2. Como control positivo, se incluyó amplificar un segmento del gen *gapdh*, el experimento se hizo por duplicado (n=1).

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos

Gen	Oligonucleótidos	Tamaño (pb)
<i>mdr1</i>	Sentido: ACCATGGATCTTGAAGGGGACC	328
	Antisentido: CCTCCAGATTCATGAAGAACCC	
<i>gapdh</i>	Sentido: CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG	496
	Antisentido: GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG	

Nota: los oligonucleótidos para *mdr1* fueron diseños usando regiones de exones contiguos, y fueron analizados en Primer Blast.

Tabla 2. Programa de RT-PCR utilizado

Temperatura	Duración	
50 °C	30 min	
94 °C	2 min	} 30 Ciclos
94 °C	15 s	
54.5 °C	35 s	
68 °C	45 s	
68 °C	1 min	

Se analizaron los fragmentos amplificados la RT-PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se detectaron las bandas por UV en el analizador de imágenes. Para realizar una cuantificación semi-cuantitativa, se procedió a realizar un análisis de densitometría, empleando el programa Quantity One, los datos obtenidos fueron graficados y analizados estadísticamente, aplicando ANOVA seguido de un análisis de Tukey para determinar diferencia significativa con $p < 0.05$ con el programa estadístico GraphPad Prism, el experimento se hizo por duplicado ($n=1$).

7.7. Efecto del galato de etilo y ácido tánico sobre la función de transportadores en la línea Hep3B

Para analizar el efecto del galato de etilo y ácido tánico sobre la función del transportador P-gp, se analizó la capacidad de transporte de doxorrubina, fármaco sustrato de esta proteína que emite fluorescencia, para esto se cultivaron 200 000 células Hep3B en 2000 μ L de medio de cultivo en placas de 6 pozos, y se incubaron por 24 horas. Posteriormente, se realizó cambio de medio y se incubaron por 3 horas con los diferentes tratamientos: a) Medio cultivo (blanco), b) Medio cultivo, c) Verapamilo 10 μ M, d) Galato de etilo 50 μ M y e) Ácido tánico 25 μ M; pasado este tiempo se adicionó doxorubicina a 10 μ M a los tratamientos excepto el a, que se ocupará como blanco, incubando por 2 horas más, finalizando el tiempo de tratamiento, se retiró el medio de cultivo y se empleó tripsina para desprender y recuperar las células. Se hicieron dos lavados con PBS y se analizaron en un citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson) en el canal FL2 (Exmax 496 nm/Emmax 578 nm) para determinar los niveles de fluorescencia asociada a la concentración de doxorubicina, que indican la función de los transportadores de eflujo en cada grupo de los análisis.

7.8. Establecimiento de modelo de resistencia de la línea celular Hep3B

Diversos investigadores han logrado establecer modelos de líneas celulares resistentes a distintos fármacos, esto exponiendo las células a tratamientos con concentraciones crecientes del fármaco por cierto periodo, logrando así inducir el mecanismo de resistencia (Chen, *et al.*, 2013; Jensen, *et al.*, 2015; Kim, *et al.*, 2015;

Meena, *et al.*, 2013). En el presente proyecto, células Hep3B fueron expuestas a diversos ciclos de tratamientos con el fármaco. Se cultivaron 200 000 células en 5000 μ L de medio de cultivo en frascos de cultivo celular de 25 cm^2 , y se incubaron por 24 h, posteriormente se adicionó el tratamiento con la concentración correspondiente de paclitaxel (Tabla 3) y se incubaron por 48 h a 37°C y 5% CO_2 ; transcurrido ese tiempo, se retiró el tratamiento y se adicionó medio fresco, las células se dejaron en cultivo por un periodo de recuperación aproximado de una semana, el procedimiento anteriormente descrito corresponde a 1 ciclo de tratamiento. Se realizaron 7 ciclos de tratamiento empleando diferentes concentraciones (mostrados en la Tabla 3).

Tabla 3. Ciclos de tratamiento de paclitaxel en células Hep3B

Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7
Concentración	5 μM	5 μM	5 μM	10 μM	10 μM	20 μM	40 μM

Para evaluar el efecto en la sensibilidad de las células tras los ciclos de tratamiento, se determinó la viabilidad celular. Se cultivaron 5000 células de Hep3B parentales y tratadas en 100 μ L de medio de cultivo en placas de 96 pozos, se trataron con concentraciones crecientes de paclitaxel (1, 10, 100 y 1000 nM) y se incubaron durante 48 horas. Para determinar la viabilidad celular se siguió el procedimiento mencionado anteriormente. El experimento se hizo por triplicado con una n de 3, los valores obtenidos se analizaron estadísticamente para calcular las y las diferencias estadísticas entre las pendientes utilizando una prueba F, con el programa estadístico GraphPad Prism.

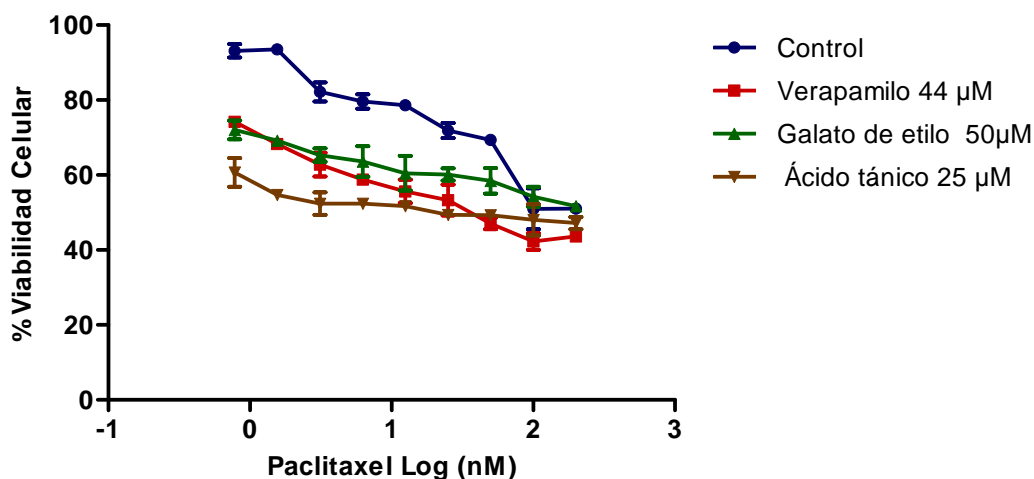
8. RESULTADOS

8.1. Efecto del galato de etilo y ácido tánico sobre la viabilidad celular y cálculo de la CI_{50} en la línea Hep3B

En la Gráfica 1 se muestran las curvas de viabilidad celular obtenidas con los tratamientos de paclitaxel solo y en combinación con galato de etilo 50 μ M, ácido tánico 25 μ M, y verapamilo 44 μ M como control positivo. Se observa que el efecto citotóxico del paclitaxel aumenta en combinación con los tratamientos de galato de etilo y ácido tánico, resultando similares al efecto obtenido con el verapamilo, el cual es un inhibidor conocido de P-gp; de igual manera en la Tabla 4 se pueden observar las concentraciones inhibitorias 50 calculadas, obteniendo una CI_{50} para paclitaxel de 37.140 nM, esta disminuye con los tratamientos de paclitaxel en combinación con: verapamilo 7.093 nM, galato de etilo 9.292 nM, ácido tánico 0.508 nM, siendo este último el que presentó un mayor efecto en la viabilidad celular en la línea celular Hep3B a 48 h.

Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism para comparar las pendientes, éste calcula un valor P (dos colas) que prueba la hipótesis nula de que las pendientes son idénticas, si el valor de P es menor que 0.05 se concluye que las curvas son significativamente diferentes. Los valores de obtenidos del análisis estadístico muestran valores de P de 0.01012 para Paclitaxel vs Paclitaxel + Verapamilo, <0.0001 para Paclitaxel vs Paclitaxel + Galato de etilo, y <0.0001 para Control vs Paclitaxel + Ácido tánico (Tabla 5. Análisis estadístico de las curvas de viabilidad celular., con estos resultados podemos concluir que las curvas obtenidas son estadísticamente diferentes, es decir los tratamientos combinados mejoraron el efecto del paclitaxel solo.

Es interesante observar que estos compuestos fenólicos pueden mejorar el efecto inhibitorio de la viabilidad celular del paclitaxel, y que el efecto sea similar al observado con verapamilo, que es un inhibidor conocido del transportador de eflujo P-gp. Por lo cual es necesario explorar si el efecto del galato de etilo y del ácido tánico es sobre la expresión o la función del transportador P-gp. Para esto se analizará el nivel del transcrito de ambos genes y de la funcionalidad del transportador.



Gráfica 1. Efecto sobre la viabilidad celular en células Hep3B.

Viabilidad celular a diferentes concentraciones de paclitaxel (0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 nM) solo y en combinación con galato de etilo 50 µM, ácido tánico 25 µM, y el inhibidor de P-gp, verapamilo 44 µM, 48 h. El experimento se realizó por triplicado.

Tabla 4. Concentraciones inhibitorias 50.

Concentraciones inhibitorias 50 calculadas para paclitaxel obtenidas en tratamiento solo (control) o en combinación con verapamilo, galato de etilo o ácido tánico

	Paclitaxel	+ Verapamilo 44 µM	+ Galato de etilo 50 µM	+ Ácido tánico 25 µM
CI₅₀	37.140±1.432	7.093±1.427	9.292±1.948	0.508±5.825

Tabla 5. Análisis estadístico de las curvas de viabilidad celular.

Análisis	F	DFn	DFd	P
Paclitaxel vs Paclitaxel + Verapamilo	7.08704	1	56	0.01012
Paclitaxel vs Paclitaxel + Galato de etilo	18.7697	1	56	<0.0001
Paclitaxel vs Paclitaxel + Ácido tánico	30.4245	1	56	<0.0001

F: estadístico F; DFn: Grados de libertad del numerador; DFd: Grados de libertad del denominador; P: probabilidad de elegir aleatoriamente puntos de datos con pendientes diferentes.

8.2. Efecto del galato de etilo y ácido tánico sobre la expresión del transportador P-gp en la línea Hep3B

Se analizaron los niveles intrínsecos del transcrito del gen *mdr1* que codifica para el transportador P-gp, mediante la técnica de RT-PCR tiempo final, en las células Hep3B tratadas con galato de etilo 50 μ M, ácido tánico 25 μ M y paclitaxel 25 nM (Figura 8), solos y en combinación (Figura 9), por 24 h. En las Figuras 8 y 9 se muestra los resultados obtenidos de la electroforesis en gel de agarosa a 1% de los fragmentos amplificados del gen *mdr1*. Se realizó el análisis de densitometría y los datos fueron graficados.

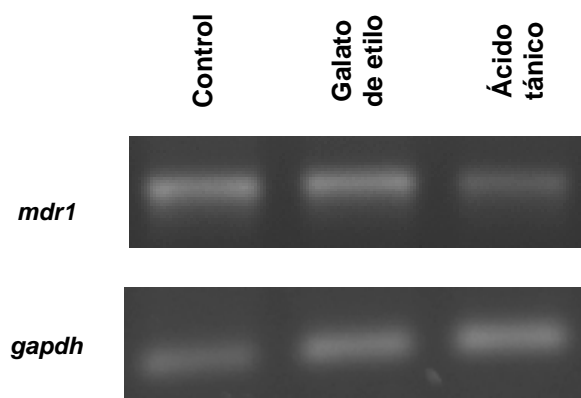
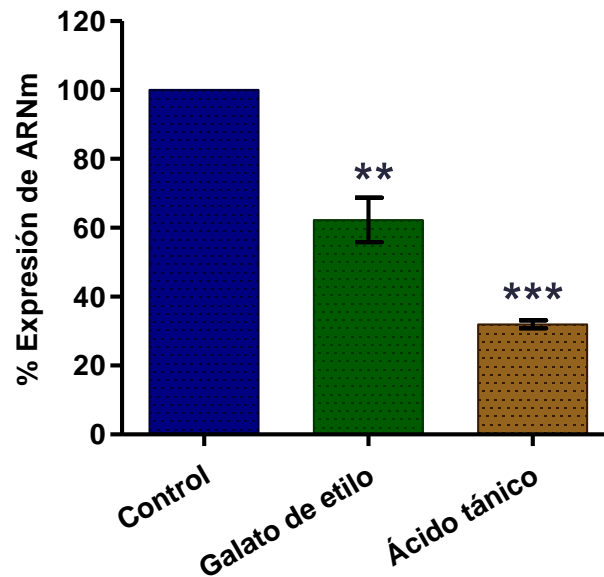


Figura 8. Efecto del galato de etilo, ácido tánico sobre la expresión de ARNm del gen *mdr1*.

Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los fragmentos de los genes *mdr1* y *gapdh* amplificados por RT-PCR. Células tratadas con galato de etilo 50 μ M, ácido tánico 25 μ M, por 24 h. Se realizaron dos experimentos independientes, n=1.

Como se muestra en la Gráfica 2, el galato de etilo y el ácido tánico, disminuyen la expresión del gen *mdr1* en un 37.71 y 68.05 %, respectivamente, siendo más efectivo el ácido tánico. El efecto fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$).



Gráfica 2. Efecto del galato de etilo y ácido tánico sobre la expresión de ARNm del gen *mdr1*.

Expresión de ARNm del gen *mdr1* tras tratamientos con galato de etilo 50 μ M, ácido tánico 25 μ M por 24 h. Los datos representan la media \pm SD de dos experimentos independientes, n=1. Se realizó el análisis estadístico ANOVA, seguido de un análisis de Tukey para determinar diferencia significativa con $p < 0.05$.

Por su parte, el paclitaxel no modificó la expresión del transcrito (Figura 8, Gráfica 3), aunque es conocido que en tratamientos prolongados puede inducir la sobre-expresión de P-gp (Chen *et al.*, 2013; Luque *et al.*, 2012; Podolski-Renić, *et al.*, 2011). Sin embargo, el tratamiento combinado del paclitaxel con galato de etilo o ácido tánico, logró inhibir la expresión en un 69.5 y 73.3%, respectivamente. Pareciera que el efecto sobresaliente es en el galato de etilo, donde se observa mayor represión del transcrito, comparado con su efecto individual. Aunque el ácido tánico sigue mostrando mayor efecto en la represión del gen *mdr1*, y por lo tanto en la represión de la proteína P-gp.

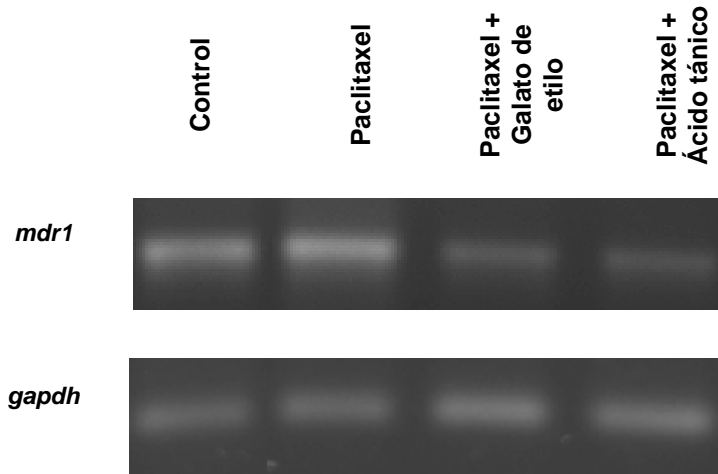
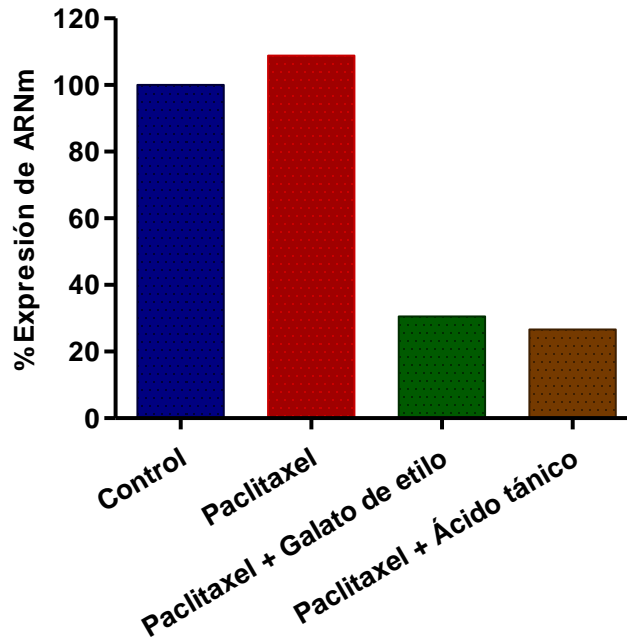


Figura 9. Efecto del galato de etilo, ácido tánico y paclitaxel (solos y en combinación) sobre la expresión de ARNm del gen *mdr1*.

Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los fragmentos de los genes *mdr1* y *gapdh* amplificados por RT-PCR. Células tratadas con paclitaxel 25 nM solo y en combinación con galato de etilo 50 μ M, ácido tánico 25 μ M por 24 h. Se realizó un solo experimento, n=1.



Gráfica 3. Efecto del galato de etilo y ácido tánico en combinación de paclitaxel sobre la expresión de ARNm del gen *mdr1*.

Expresión de ARNm del gen *mdr1* tras tratamientos con paclitaxel 25 nM solo y en combinación con galato de etilo 50 μ M, ácido tánico 25 μ M por 24 h. Se realizó un solo experimento, n=1.

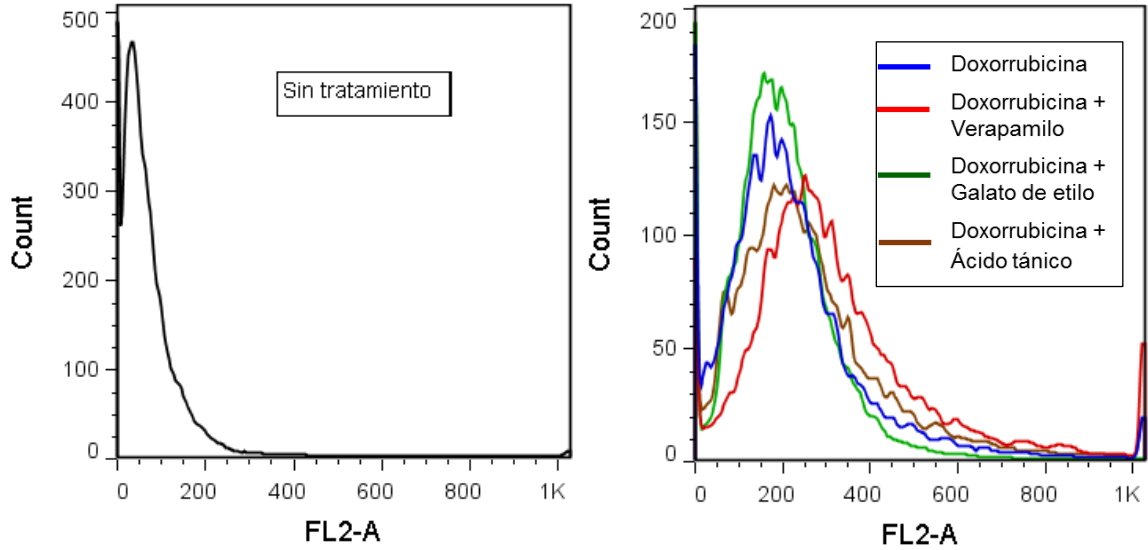
8.3. Efecto del galato de etilo y ácido tánico sobre la función del transportador de eflujo P-gp en la línea Hep3B

Para analizar el efecto de galato de etilo y ácido tánico sobre la función de transporte de P-gp, se midió la cantidad de doxorubicina internalizada en la célula, y debido a su capacidad de emitir fluorescencia, ésta fue evaluada por citometría de flujo.

Las células Hep3B fueron incubadas por separado con medio cultivo, verapamilo 10 μM , galato de etilo 50 μM y ácido tánico 25 μM durante 3 h; pasado este tiempo se adicionó doxorubicina a 10 μM y se incubaron por 2 horas más. Las células se recuperaron y fueron analizadas en un citómetro de flujo, para determinar los niveles de fluorescencia asociada a la concentración de doxorubicina, que indican la función de los transportadores de eflujo en cada grupo de los análisis, es decir, al tener una mayor concentración de doxorubicina al interior de la célula significa que el transporte de eflujo está siendo afectado, evitando que el fármaco sea expulsado.

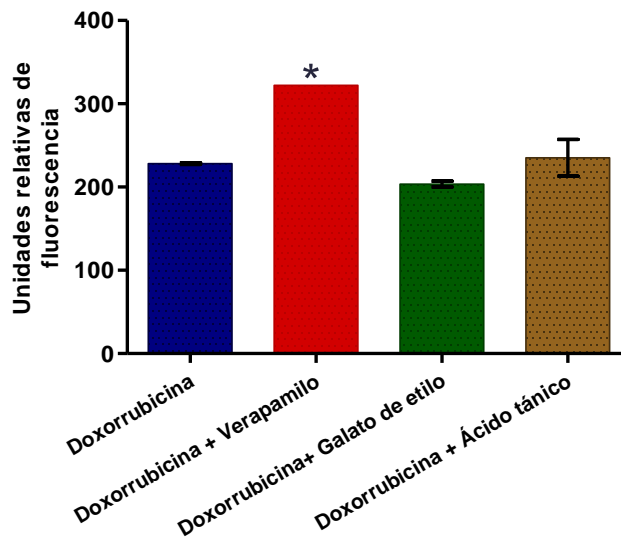
En la Gráfica 4 se muestran los histogramas generados por el análisis de citometría de flujo, donde se observa que las células tratadas con doxorubicina muestran un área baja la curva generada por la intensidad de fluorescencia, no así el control negativo que son células sin tratamiento, ni doxorubicina, y no muestra fluorescencia.

En la Gráfica 5 se observa el efecto sobre la función de transporte mediante la acumulación de doxorubicina, en el control positivo verapamilo 10 μM se observó una mayor acumulación de doxorubicina respecto al control, demostrando su efecto inhibitor sobre el transportador P-gp. Sin embargo, no se observó un cambio estadísticamente significativo en los tratamientos de galato de etilo 50 μM o ácido tánico 25 μM .



Gráfica 4. Histogramas de intensidad de la fluorescencia intracelular de la doxorubicina.

Se midió la intensidad de la fluorescencia intracelular de la doxorubicina mediante citometría de flujo en células no tratadas o células tratadas, por 3 h con verapamilo 10 μM , galato de etilo 50 μM o ácido tánico 25 μM , y a continuación incubadas por 2 h con doxorubicina 10 μM .



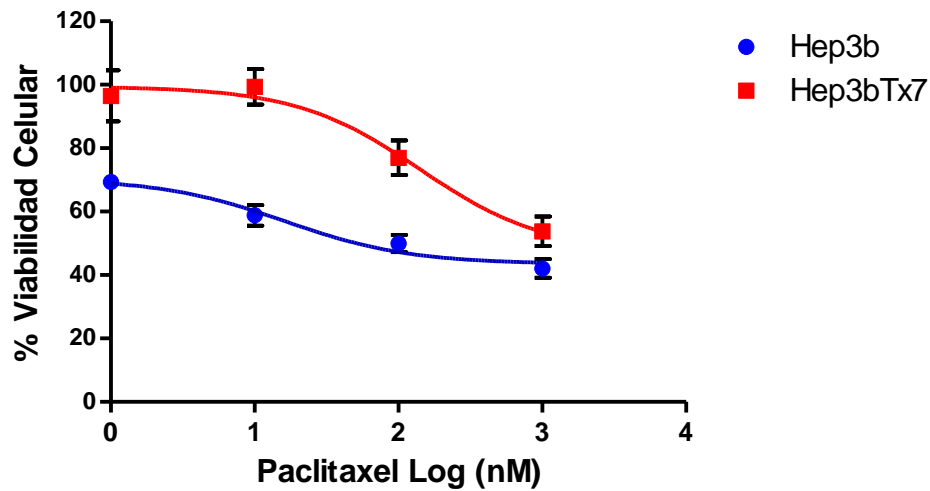
Gráfica 5. Efecto del galato de etilo y ácido tánico sobre la función de eflujo.

Acumulación de doxorubicina por 3 h en presencia de verapamilo 20 μM , galato de etilo 50 μM o ácido tánico 25 μM . Los datos representan la media \pm SD de dos experimentos independientes. Se realizó el análisis estadístico ANOVA, seguido de un análisis de Tukey para determinar diferencia significativa con $p < 0.05$.

Los resultados conjuntamente muestran que bajo estas condiciones experimentales tanto el galato de etilo como el ácido tánico, tienen un efecto inhibitorio sobre la viabilidad celular en células Hep3B. Además, ambos inducen la represión del transcrito del gen *mdr1*, que codifica para la proteína P-gp que es un transportador de eflujo. En tratamientos combinados con paclitaxel, antineoplásico conocido por inducir la expresión del gen *mdr1* en tratamientos prolongados, se observó que mejoran el efecto inhibitorio de la viabilidad celular comparado con el tratamiento de paclitaxel solo, además este aumento en el efecto del paclitaxel fue similar al inducido por verapamilo, un inhibidor conocido de la función de la P-gp. Los resultados de funcionalidad del transportador mostraron que el verapamilo inhibe la función del transportador de eflujo P-gp, sin embargo ni el galato de etilo, ni el ácido tánico mostró este efecto. Sugiriendo que ambas moléculas actúan sólo a nivel de expresión del gen *mdr1*, no así sobre la función de la proteína.

8.4. Establecimiento de modelo de resistencia de la línea celular Hep3B

Cabe mencionar que se logró establecer un primer modelo de resistencia siguiendo la misma metodología, sin embargo este modelo se perdió por lo que se tuvo que realizar este segundo modelo. Tras siete ciclos de tratamiento prolongado con paclitaxel mostrados en el apartado de métodos se logró establecer un modelo de resistencia a paclitaxel en células Hep3B, denominado como Hep3BTx7. Como se observa en la Gráfica 6, las células parentales mostraron una mayor sensibilidad al tratamiento de paclitaxel a diferencia de las tratadas (Hep3BTx7), se obtuvo una CI_{50} de 16.30 μ M y 141.9 μ M, respectivamente, siendo 8.7 veces mayor (Tabla 6). Además, como se muestra en la Tabla 7, el análisis estadístico demostró una diferencia estadísticamente significativa entre las pendientes ($P=0.02797$). Estos resultados muestran una resistencia adquirida tras los ciclos de tratamientos a los que se sometieron las células.



Gráfica 6. Efecto sobre la viabilidad celular en células Hep3B y Hep3BTx7.

Viabilidad celular a diferentes concentraciones de paclitaxel (0, 1, 10, 100 y 1000 nM) en células Hep3B y Hep3BTx7, 48 h. El experimento se realizó por triplicado

Tabla 6. Concentraciones inhibitorias 50 Hep3B y Hep3BTx7.

Concentraciones inhibitorias 50 calculadas con el tratamiento de paclitaxel en células Hep3B y Hep3BTx7

	Hep3B	Hep3BTx7
CI ₅₀	16.30 ±1.821	141.9±1.225

Tabla 7. Análisis estadístico de las curvas de viabilidad celular de células Hep3B y Hep3BTx7.

Análisis	F	DFn	DFd	P
Hep3B vs Hep3BTx7	5.61594	1	20	0.02797

9. DISCUSIÓN

La resistencia a múltiples fármacos es uno de los principales obstáculos del tratamiento del cáncer, es por eso la importancia de encontrar nuevas alternativas que proporcionen un tratamiento más eficaz y selectivo, recurriendo a la investigación a partir de productos naturales como es el caso del extracto (Agua:Acetona:Etanol 80:10:10%) de *Caesalpinia coriaria*, el cual se ha evaluado su actividad citotóxica en distintas líneas celulares cancerosas, de igual manera se identificaron sus compuestos bioactivos, el ácido gálico, ácido tánico y galato de etilo. Los resultados obtenidos en este proyecto demuestran que el galato de etilo y ácido tánico tienen un efecto sobre la citotoxicidad de paclitaxel, disminuyendo la CI_{50} , además se encontró un efecto sobre la expresión de transcrito del transportador de eflujo P-glicoproteína.

Los resultados obtenidos en este proyecto muestran un efecto sinérgico del galato de etilo con paclitaxel en células Hep3B, logrando disminuir la CI_{50} , pasando de 37.14 nM a 9.292 nM, es decir 3.9 veces menor. En estudios previos se ha reportado el efecto citotóxico del galato de etilo. Kim y colaboradores (2012) evaluaron el efecto del galato de etilo aislado de *Galla Rhois* sobre la línea celular de leucemia promielocítica humana (HL-60), encontrando un efecto sobre la viabilidad celular mediante la inducción de apoptosis. Mohan y colaboradores (2015) evaluaron el efecto del galato de etilo y del paclitaxel en la línea celular de carcinoma escamoso oral humano (KB), encontrando una citotoxicidad de una manera dependiente de la dosis, obteniendo una CI_{50} para galato de etilo de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para paclitaxel. Kalaivani y colaboradores (2011) aislaron galato de etilo a partir de un extracto etanólico de hojas de *Acacia nilotica*, y evaluaron su efecto en células de cáncer cervicouterino (HeLa) y células normales de riñón (Vero), obteniendo una CI_{50} de 72 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y >100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, mostrando mayor efecto citotóxico del galato de etilo en células de cáncer, sugiriendo una selección sobre estas, lo cual es un efecto deseado y que podría ser ideal en un tratamiento contra el cáncer. Sánchez-Carranza y colaboradores (2017) evaluaron el galato de etilo sobre células de carcinoma hepatocelular celular (Hep3B) y células normales de hepatocitos (IHH), obteniendo una CI_{50} de 38 μM y 211 μM , respectivamente, donde se ve el mismo efecto de selección sobre células cancerosas, las cuales muestran una mayor sensibilidad al compuesto. Estos estudios sugieren que el galato de etilo tiene efectos citotóxicos y una selectividad hacia células cancerosas.

En el caso del ácido tánico, se observó un efecto sinérgico logrando disminuir la CI_{50} de paclitaxel en células Hep3B, de 37.14 nM a 0.5083 nM, 73 veces menor. Sánchez-Carranza y colaboradores (2017) evaluaron el ácido tánico sobre células de carcinoma hepatocelular (Hep3B) obteniendo una CI_{50} 11 μ M. Darvin y colaboradores (2015) evaluaron el ácido tánico sobre células cancerosas gingivales (YD-38), encontrando una CI_{50} de 60 μ M durante 48 horas de tratamiento, además se encontró que el ácido tánico inhibe significativamente la vía de señalización Jak2/STAT3 (asociadas a la oncogénesis, progresión y metástasis de diferentes cánceres) e induce arresto celular en la fase G_1 y apoptosis mitocondrial. Karakurt y Adali (2016) evaluaron el efecto del ácido tánico sobre células de cáncer de próstata, PC-3 y LNCaP, obteniendo valores de CI_{50} de 35.3 μ M y 29.1 μ M, respectivamente. Darvin y colaboradores (2017) encontraron inhibición de la proliferación de células de cáncer de mama (MDA-MB 231, MCF-7, SK-BR 3) con valores de CI_{50} de 50-70 μ M, además observaron un arresto celular en la fase G_1 , de igual manera se encontró un efecto sinérgico cuando se combinó con Tamoxifen y Gefitinib, incrementando su actividad citotóxica. Chen y colaboradores (2009) evaluaron el ácido tánico en células de leucemia mieloide aguda (HL-60) y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), observando un efecto citotóxico en HL-60 a dosis mayores de 10 μ M, sin embargo esto no se observó efecto en células normales, sugiriendo una selectividad hacia células cancerosa; evaluaron el efecto de la combinación del ácido tánico con trióxido de arsénico (As_2O_3), observando una efecto sinérgico, ya que la CI_{50} del As_2O_3 fue aproximado a 5 μ g/mL, se obtuvo un efecto similar con una dosis más baja de As_2O_3 (2 μ g/mL) combinada con ácido tánico (5 μ M). Este efecto no se detectó en PBMC humanas normales, sugiriendo que la combinación con ácido tánico mejora selectivamente la sensibilidad a As_2O_3 en células HL-60.

Otro efecto observado en el presente estudio fue la disminución de la expresión de ARNm de P-gp, con tratamientos de ácido tánico 25 μ M por 24 h, sin embargo a estas concentraciones no mostraron efecto sobre la función de eflujo; a continuación se mencionan algunos estudios que han reportado efectos del ácido tánico (a distintas concentraciones) sobre estos transportadores. Naus y colaboradores (2007) además de reportar un efecto sinérgico del ácido tánico en combinación con mitomicina C y 5-fluorouracilo, observaron una disminución del eflujo de calceína y de la expresión de ARNm de P-gp, MRP1 y MRP2 con tratamientos de 5 μ M. Kitagaway colaboradores (2007) estudiaron los efectos del ácido tánico sobre la P-glicoproteína (P-gp) en células

multirresistentes que sobreexpresan P-gp (KB-C2), observando una inhibición de eflujo con el tratamiento a 60 μM , aumentando la acumulación intracelular de rodamina 123 y daunorrubicina. Němcová-Fürstová y colaboradores (2016) establecieron líneas de SK-BR-3 y MCF-7 resistentes a paclitaxel y doxorubicina, encontraron una regulación positiva de las proteínas ABCG2/BCRP y ABCC4 en las células SK-BR-3 resistentes, y de ABCB4/MDR3 y ABCC2/MRP2 en las células MCF-7 resistentes, el silenciamiento de la expresión de P-gp usando siRNA específico aumentó significativamente, pero no restituyó completamente la sensibilidad tanto a paclitaxel como a doxorubicina, con esto mostraron un papel clave, pero no exclusivo, de P-gp en los mecanismos de resistencia a paclitaxel.

Por otra parte los resultados obtenidos en el presente proyecto muestran que los ciclos de tratamientos a los que se sometieron las células lograron inducir una mayor resistencia a paclitaxel, obteniendo valores de CI_{50} de 16.30 μM y 141.9 μM , en Hep3B y Hep3BTx7, respectivamente, siendo 8.7 veces mayor. Diversos investigadores han logrado establecer modelos de resistencia, mediante tratamientos prolongados con distintos fármacos. Chen y colaboradores (2013) establecieron un modelo resistente a paclitaxel a partir de la línea de cáncer de mama MCF-7 con tratamientos de paclitaxel (desde 2 nM hasta 30 nM), la CI_{50} obtenida fue de 20 ± 0.85 nM para células parentales y 2291 ± 125 nM para las resistentes, 115 veces mayor; además se observó una sobreexpresión de P-gp en las células resistentes, sugiriendo que los tratamientos indujeron una resistencia a paclitaxel mediante la sobreexpresión de ésta proteína. Jensen y colaboradores (2015) generaron variantes de líneas celulares resistentes a oxaliplatino y SN-38, esto mediante exposiciones a concentraciones incrementado gradualmente, destacando la línea celular de adenocarcinoma colorrectal (HT-29) sometida a tratamientos de oxaliplatino desde 0.1 μM a 10 μM , obteniendo una CI_{50} de 50 μM , 107 veces mayor que la parental 0.46 μM . Meena y colaboradores (2013) expusieron células Hep3B a concentraciones crecientes de paclitaxel que varían de 0.3 a 1 μM , tras estos tratamientos las células mostraron una mayor resistencia, y sobreexpresión de P-gp. Kim, y colaboradores (2015) expusieron células K-562 de leucemia mieloide crónica, a tratamientos con concentraciones crecientes de imatinib, como resultado obtuvieron una línea resistente a distintos fármacos, vinblastina, etopósido, doxorubicina y vincristina, además observaron sobreexpresión de los transportadores BCRP y P-gp.

10. CONCLUSIONES

El galato de etilo y el ácido tánico ejercen un efecto quimiosensibilizante a paclitaxel en células Hep3B.

El galato de etilo y el ácido tánico inhiben la expresión de transcrito del transportador de eflujo P-gp en células Hep3B.

El galato de etilo y el ácido tánico no mostraron efecto sobre la función de transporte de P-gp en células Hep3B.

Por otra parte, tras siete ciclos de tratamiento se logró establecer un modelo de línea celular Hep3B resistente a paclitaxel, denominado He3BTx7, el cual se propone para futuras evaluaciones sobre el mecanismo de resistencia a múltiples fármacos.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que el galato de etilo y el ácido tánico, ejercen un efecto quimiosensibilizante a paclitaxel en las células Hep3B, además este efecto puede estar asociado en cierta medida, por la inhibición de expresión de transcrito del transportador de eflujo P-gp, el cual está implicado en los mecanismos de resistencia a múltiples fármacos. Estos compuestos mostraron un efecto de gran importancia para mejorar tratamientos contra el cáncer actuando como agentes coadyuvantes y quimiosensibilizantes, por lo que se sugiere continuar con la investigación de estos compuestos. Por otra parte, se logró establecer un linaje resistente de Hep3B a paclitaxel (después de haber perdido el primero), sin embargo debido al tiempo no fue posible evaluar el efecto de los compuestos fenólicos.

11. PERSPECTIVAS

Determinar el efecto del galato de etilo y ácido tánico sobre la expresión de la proteína P-gp, mediante la técnica de Western Blot.

Determinar el efecto de los ciclos de tratamiento de paclitaxel en las células He3BTx7 sobre la expresión de ARNm y proteína de P-gp.

Determinar el efecto del galato de etilo y ácido tánico sobre la viabilidad celular, expresión de transcrito y proteína, y función de transporte en el modelo de línea celular Hep3B resistente a paclitaxel, denominado He3BTx7.

12. BIBLIOGRAFÍA

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2010). *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega.

Aschenbrenner, D. S., & Venable, S. J. (2009). *Drug therapy in nursing*. Lippincott Williams & Wilkins. Edition 3.

Bathaie, S. Z., & Tamanoi, F. (Eds.). (2015). *Mechanism of the Anticancer Effect of Phytochemicals*. Elsevier Science.

Bidwell, R. G. S. (1987). *Fisiología Vegetal*. Primera edición en español. Editor. AGT México, DF.

Bilusic, M., & Madan, R. A. (2012). Therapeutic cancer vaccines: the latest advancement in targeted therapy. *American journal of therapeutics*, 19(6), e172.

Borska, S., Sopol, M., Chmielewska, M., Zabel, M., & Dziegiel, P. (2010). Quercetin as a potential modulator of P-glycoprotein expression and function in cells of human pancreatic carcinoma line resistant to daunorubicin. *Molecules*, 15(2), 857-870.

Brunton, L. L. (2012). *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica 12a*. McGraw Hill Mexico.

Chen, S. Y., Hu, S. S., Dong, Q., Cai, J. X., Zhang, W. P., Sun, J. Y., Wang, T. T., Xie, J., He, H. R., Xing, J. F., Lu, J., & Dong, Y. L. (2013). Establishment of paclitaxel-resistant breast cancer cell line and nude mice models, and underlying multidrug resistance mechanisms *in vitro* and *in vivo*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(10), 6135-6140.

Chen, S. Y., Hu, S. S., Dong, Q., Cai, J. X., Zhang, W. P., Sun, J. Y., Wang, T. T., Xie, J., He, H. R., Xing, J. F., Lu, J., Dong, Y. L. (2013). Establishment of paclitaxel-resistant breast cancer cell line and nude mice models, and underlying multidrug resistance mechanisms *in vitro* and *in vivo*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(10), 6135-6140.

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.

Cidon, E. U. (2017). Systemic treatment of hepatocellular carcinoma: Past, present and future. *World Journal of Hepatology*, 9(18), 797.

Darvin, P., Baeg, S. J., Joung, Y. H., Sp, N., Kang, D. Y., Byun, H. J., Park J. U., & Yang, Y. M. (2015). Tannic acid inhibits the Jak2/STAT3 pathway and induces G₁/S arrest and mitochondrial apoptosis in YD-38 gingival cancer cells. *International journal of oncology*, 47(3), 1111-1120.

Darvin, P., Joung, Y. H., Kang, D. Y., Sp, N., Byun, H. J., Hwang, T. S., Sasidharakurup, H., Lee, C. H., Cho K. H., Park, K. D., Lee, H. K., & Yang, Y. M. (2017). Tannic acid inhibits EGFR/STAT1/3 and enhances p38/STAT1 signalling axis in breast cancer cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 21(4), 720-734.

Farnsworth, N. R. (1990). The role of ethnopharmacology in drug development. In *Ciba Foundation Symposium 154-Bioactive Compounds from Plants*; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, pp. 2–21; 6.

Farooqi, A. A., & Ismail, M. (Eds.). (2017). *Molecular Oncology: Underlying Mechanisms and Translational Advancements*. Springer.

Fernández, P. L. (2008). Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica*. Ed. Médica Panamericana.

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., & Zuvela, 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).

Hejmadi, M. (2009). *Introduction to cancer biology*. Bookboon.

Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., & Sarkar, S. (2014). Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers*, 6(3), 1769–1792. <http://doi.org/10.3390/cancers6031769>.

Imai, Y., Tsukahara, S., Asada, S., & Sugimoto, Y. (2004). Phytoestrogens/Flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance. *Cancer Reserch*, 64, 4346–4352.

Jensen, N. F., Stenvang, J., Beck, M. K., Hanáková, B., Belling, K. C., Do, K. N., Viuff, B., Nygard, S. B., Gupta, R., Rasmussen, M. H., Tarpgaard, L. S., Hansen, T. P., Budinská, E., Pfeiffer, P., Bosman, F., Tejpar, Roth, A., Delorenzi, M., Anderse, C. L., Romer, M. U., Brünner, N. & Moreira, J. M. A. (2015). Establishment and characterization of models of chemotherapy resistance in colorectal cancer: Towards a predictive signature of chemoresistance. *Molecular oncology*, 9(6), 1169-1185.

Juliano, R. L., & Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 455, 152–162.

Kalaivani, T., Rajasekaran, C., & Mathew, L. (2011). Free radical scavenging, cytotoxic, and hemolytic activities of an active antioxidant compound ethyl gallate from leaves of *Acacia nilotica* (L.) wild. Ex. Delile subsp. *Indica* (Benth.) Brenan. *Journal of food science*, 76(6), T144-T149.

Karakurt, S., & Adali, O. (2016). Tannic Acid Inhibits Proliferation, Migration, Invasion of Prostate Cancer and Modulates Drug Metabolizing and Antioxidant Enzymes. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 16(6), 781-789.

Kim, H. B., Lee, S. H., Um, J. H., Kim, M. J., Hyun, S. K., Gong, E. J., Oh, W. K., Kang, C. D. & Kim, S. H. (2015). Sensitization of chemo-resistant human chronic myeloid leukemia stem-like cells to Hsp90 inhibitor by SIRT1 inhibition. *International journal of biological sciences*, 11(8), 923.

Kim, W. H., Song, H. O., Choi, H. J., Bang, H. I., Choi, D. Y., & Park, H. (2012). Ethyl gallate induces apoptosis of HL-60 cells by promoting the expression of caspases-8,-9,-3, apoptosis-inducing factor and endonuclease G. *International journal of molecular sciences*, 13(9), 11912-11922.

Kitagawa, S., Nabekura, T., Nakamura, Y., Takahashi, T., & Kashiwada, Y. (2007). Inhibition of P-glycoprotein function by tannic acid and pentagalloylglucose. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 59(7), 965-969.

Lasley, I. (2011). *21st Century Cancer Treatment*. Isaac Lasley.

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.

Luque, R., González-Vicente, A., Soberino, J., Prados, J. C., Melguizo, C., González-Rivas, C. S., Ruiz-Vozmediano J., Conde, V., García-García, J., & Aránega, A. (2012). Drug resistance induced by paclitaxel and carboplatin plasmatic concentrations in lung cancer cell lines. *Journal of Clinical Oncology* 2012 30:30 suppl, 97-97.

Meena, A. S., Sharma, A., Kumari, R., Mohammad, N., Singh, S. V., & Bhat, M. K. (2013). Inherent and acquired resistance to paclitaxel in hepatocellular carcinoma: molecular events involved. *PLoS One*, 8(4), e61524.

Mei, Y., Wei, D., & Liu, J. (2005). Reversal of multidrug resistance in KB cells with tea polyphenol antioxidant capacity. *Cancer biology & therapy*, 4(4), 474-479.

Missailidis, S. (2008). *Anticancer therapeutics*. John Wiley & Sons.

Mohan, S., Thiagarajan, K., & Chandrasekaran, R. (2015). *In vitro* evaluation of antiproliferative effect of ethyl gallate against human oral squamous carcinoma cell line KB. *Natural product research*, 29(4), 366-369.

Mohan, S., Thiagarajan, K., & Chandrasekaran, R. (2017). Evaluation of ethyl gallate for its antioxidant and anticancer properties against chemical-induced tongue carcinogenesis in mice. *Biochemical Journal*, 474(17), 3011-3025.

Muñoz, A. (1997). *Cáncer: genes y nuevas terapias (Vol. 2)*. Editorial Hélice.

National Cancer Institute (NCI). (2015). What Is Cancer? Recuperado de: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>

Naus, P., Henson, R., Bleeker, G., Wehbe, H., Meng, F., & Patel, T. (2007). Tannic acid synergizes the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in human cholangiocarcinoma by modulating drug efflux pathways. *Journal of Hepatology*, 46(2), 222–229. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.08.012>

Němcová-Fürstová, V., Kopperová, D., Balušíková, K., Ehrlichová, M., Brynychová, V., Václavíková, R., Daniel P., Souček, & P., Kovář, J. (2016). Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters. *Toxicology and applied pharmacology*, 310, 215-228

Patwardhan, B. (2005). Ethnopharmacology and drug discovery. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1), 50-52.

Podolski-Renić, A., Anđelković, T., Banković, J., Tanić, N., Ruždijić, S., & Pešić, M. (2011). The role of paclitaxel in the development and treatment of multidrug resistant cancer cell lines. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 65(5), 345-353.

Polgar, O. & Bates, S. (2005). ABC transporters in the balance: is there a role in multidrug resistance? *Biochem. Soc. Trans.* 33, 241–245.

Price, P., & Sikora, K. (Eds.). (2014). *Treatment of Cancer Sixth Edition*. CRC Press.

Ruetz, S, Gros, P. (1994). Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene. *Cell*. 77(7):1071–81.

Russell, P. J., Hertz, P. E., & McMillan, B. (2014). *Biology: The Dynamic Science*, fourth edition. Cengage Learning.

Sánchez-Carranza, J. N., Álvarez, L., Marquina-Bahena, S., Salas-Vidal, E., Cuevas, V., Jiménez, E. W., Veloz-García, R. A., & González-Maya, L. (2017). Phenolic Compounds Isolated from *Caesalpinia coriaria* Induce S and G₂/M Phase Cell Cycle Arrest Differentially and Trigger Cell Death by Interfering with Microtubule Dynamics in Cancer Cell Lines. *Molecules*, 22(4), 666.

Sanyal, A. J., Yoon, S. K., & Lencioni, R. (2010). The etiology of hepatocellular carcinoma and consequences for treatment. *The oncologist*, 15 (Supplement 4), 14-22.

Sharom, F. J. (2011). The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem*, 50(1):161–78.

Siddik, Z. H. (Ed.). (2010). Checkpoint controls and targets in cancer therapy. Springer Science & Business Media.

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.

Testino, G., Leone, S., & Borro, P. (2014). Alcohol and hepatocellular carcinoma: a review and a point of view. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(43), 15943.

Timmerman, H. (1995). *The Chemistry and Pharmacology of Taxol® and Its Derivatives* (Vol. 22). Elsevier.

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.

Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human genomics*, 3(3), 1.

Veloz-García, R. A. (2006). Estudio Citotóxico de Extractos de Cascalote (*Caesalpinia Cacalaco*), en Líneas Celulares de Cáncer Cérvico Uterino y Tumores en Ratones Atímicos. Tesis de Maestría en Farmacia. Facultad de Farmacia UAEM.

Veloz-García, R. A., Marín-Martínez, R., Veloz-Rodríguez, R., Muñoz-Sánchez, C. I., Guevara-Olvera, L., Miranda-López, R., González-Chavira, M. M., Torres-Pacheco, I., Guzmán-Maldonado, S. H., Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G., & Guevara-González,

R. G. (2004). Antimutagenic and antioxidant activities of cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) phenolics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84(13): 1632–1638.

Veloz-García, R. A., Marín-Martínez, R., Veloz-Rodríguez, R., Rodríguez-Guerra, R., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M. M., Anaya-López, J. L., Guevara-Olvera, L., Feregrino-Pérez, A. A., Loarca-Piña, G., & Guevara-González, R. G. (2010). Antimicrobial activities of cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) phenolics-containing extract against fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Industrial Crops and Products* 31(1): 134–138.

Verbeeck, R. K. (2008). Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with hepatic dysfunction. *European journal of clinical pharmacology*, 64(12), 1147.

Verbeeck, R. K., & Horsmans, Y. (1998). Effect of hepatic insufficiency on pharmacokinetics and drug dosing. *Pharmacy World and Science*, 20(5), 183-192.

Watson, J. D. (2006). *Biología molecular del gen*. Ed. Médica Panamericana.

Weaver, B. A. (2014). How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular biology of the cell*, 25(18), 2677-2681.

Yarla, N.S., & Ganapaty, S. (2013). Bioactive Flavonoids as ABC Transporters Inhibitors for Reversion of Multidrug Resistance in Cancer. *J Marine Science Research Development* 4(1).

Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I.

Zhang, S., Yang, X., & Morris, M. E. (2004). Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Molecular pharmacology*, 65(5), 1208-1216.

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.

Zheng, G., Xu, L., Wu, P., Xie, H., Jiang, Y., Chen, F., & Wei, X. (2009). Polyphenols from longan seeds and their radical-scavenging activity. *Food chemistry*, 116(2), 433-436.