



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DEL ESTADO DE MORELOS**



UAEM

Facultad de Farmacia

**“Efecto de los compuestos ácido gálico y ácido tánico sobre la expresión de
ciclina E, A y B1 y reguladores del ciclo celular en células de carcinoma
hepatocelular Hep3B”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN FARMACIA

PRESENTA

L.F. Mariana Yazmin Becerra Flores

Directora de tesis: Dra. Leticia González Maya

Cuernavaca, Morelos

Marzo, 2019



FACULTAD DE FARMACIA

Consejo Interno de Posgrado

MAESTRÍA EN FARMACIA

Cuernavaca, Morelos, 18 de noviembre de 2018

Folio: FF/D/SAC/CIP/MF/123/2018

**L.F. MARIANA YAZMIN BECERRA FLORES
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN FARMACIA
P R E S E N T E**

Por este medio le informo que, con base en la propuesta hecha en su solicitud, el Consejo Interno de Posgrado, aprobó su cambio de título de tesis y le asignó el siguiente jurado para evaluar la tesis "**Efecto de los compuestos ácido gálico y ácido tánico sobre la expresión de ciclinas E, A y B1 y reguladores del ciclo celular en células de carcinoma hepatocelular Hep3B**".

Quedando integrado su comité de la siguiente manera:

PRESIDENTE: Dra. Verónica Rodríguez López
SECRETARIO: Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza
VOCAL1: Dra. María Alexandra Rodríguez Sastre
VOCAL2: Dr. Julio Cesar Rivera Leyva
VOCAL3: Dra. Laura Patricia Álvarez Berber

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
Una universidad de excelencia

Dr. Julio César Rivera Leyva.

Jefatura de Posgrado



ccp: archivo, Dra. Verónica Rodríguez López, Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza, Dra. María Alexandra Rodríguez Sastre, Dr. Julio Cesar Rivera Leyva, Dra. Laura Patricia Álvarez Berber

mitv

Av. Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Facultad de Farmacia edif. 61 ala C,
Tel. 329 70, 00, Ext. 7986 / maestríafarmacia@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

AGRADEZCO A LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS Y AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) POR LA BECA 825900 PARA REALIZAR MIS ESTUDIOS DE MAESTRÍA.

Agradecimientos

A Dios, por la vida, la salud y la oportunidad de aprender algo nuevo cada día.

A mis padres que en todo momento ha demostrado su apoyo incondicional, que se ha traducido en o que soy en todos los aspectos de mi vida, sus consejos, su ayuda y su comprensión encada etapa de mi vida ha sido decisivos para lograr cada objetivo propuesto.

A mis hermanos que siempre han buscado la oportunidad de apoyarme, y siempre lo logran cada uno desde sus posibilidades, habilidades y medios disponibles, los quiero tanto, Flor y Arturo.

A Amiel (mi hija ami) que me ha enseñado a aprender, a conocer y a asombrarme de las cosas más simples que nos da la vida, me recuerdas cada día lo que es volver a la infancia y lo más valiosos que tenemos es nuestra familia.

A Josué, por tu apoyo en todo momento pues a pesar de lo que sea que pase no das un paso atrás en ayudarme y darlo todo con tal de verme feliz. Agradezco haber sobrevivido junto conmigo a este proceso llamado maestría, pues sabes que era una de mis metas en la vida. Agradezco los días y las noches de desvelo estudiando y ensayando junto conmigo. Te amo más.

A la Dra. Leticia González Maya, directora de tesis. Agradezco la maravillosa oportunidad de permitirme formar parte de su grupo de trabajo, permitirme aprender en su laboratorio, por los conocimientos y aprendizajes a lo largo de este par de años en a maestría y los años durante la licenciatura. He aprendido de usted la paciencia, la amabilidad, la empatía y muchos valores más que nos forman como seres humanos. Gracias.

A mi comité revisor. Dra. Verónica Rodríguez, Dra. Jessica Sánchez, Dra. Alexandra Rodríguez, Dr. Julio Rivera y Dra. Laura Berber, por sus valiosos consejos para la mejora de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Jessy, María Jose y Aldo por toda la ayuda en el desarrollo de este trabajo, el ánimo dado en momentos difíciles y sus conocimientos compartidos. Los quiero.

Dedicatoria

A mis padres, hermanos y esposo.

De ustedes aprendí que lo más valiosos que existe y que podemos tener, es la familia.

A mi papá por el consejo diario y el alienta ser mejor cada día, como persona, como humano y como profesionalista.

A mi mamá por esas mañanas de camino a laboratorio, aun cuando el sol no salía tú ya estabas lista para despedirme y decir “me llamas cuando llegues”.

A Flor y Arturo por preocuparse por Josué y por mí, que tuviéramos todo lo necesario para estar bien.

A Josué, por haber decidido pasar el resto de tu vida junto a mi aun sabiendo lo que eso significa. Por dar lo mejor de ti en todo momento y sacar lo mejor de mi cada día.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	10
Resumen	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1 Panorama mundial: Cáncer	13
1.2. Cáncer en México	16
1.3 Cáncer de hígado	17
1.4 Ciclo celular y cáncer	18
1.4.1 Ciclo celular	19
1.4.2 Reguladores del ciclo celular	19
1.4.2.1 CDK - Ciclinas	20
1.4.2.2 Inhibidores de quinasa dependientes de ciclinas (CKI)	22
1.4.3 p53	23
2. ANTECEDENTES	24
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVO GENERAL	27
6. OBJETIVOS PARTICULARES	27
7. MATERIALES Y MÉTODOS	28
7.1 Cultivo celular	28
7.2 Evaluación del efecto sobre ciclo celular	28
7.3 Expresión de ciclinas E, A y B1 y de inhibidores p21 y p53	29
8. RESULTADOS	30
8.1 Evaluación del efecto sobre ciclo celular	30
8.2 Expresión de las ciclinas E, A y B1 por western blot	34
8.3 Expresión de los inhibidores p21 y p53 por western blot	41
9. DISCUSIÓN	45
10. CONCLUSIÓN	51
11. PERSPECTIVAS	52
REFERENCIAS	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Datos mundiales de incidencia y mortalidad	14
Figura 2. Cinco tipos de cáncer más comúnmente diagnosticados en 2018. Datos de incidencia y morbilidad a nivel mundial	15
Figura 3. Ciclo celular típico que puede dividirse en cuatro fases secuenciales: G1, S, G2 y M	19
Figura 4. Progresión del ciclo celular y sus cuatro etapas. El punto crítico del control del ciclo celular es el punto de restricción. Después de pasar este punto, el ciclo celular se compromete irreversiblemente a la siguiente división celular.	20
Figura 5. Modelo de blancos activados por p53 para la supresión de tumores	23
Figura 6. Efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la progresión del ciclo celular en la línea celular de cáncer Hep3B después de un tratamiento de 24h.	30
Figura 7. Efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la progresión del ciclo celular en la línea celular de cáncer Hep3B. después de un tratamiento de 48 horas.	31
Figura 8. Efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la progresión del ciclo celular en la línea celular de cáncer Hep3B después de un tratamiento de 24h.	32
Figura 9. Efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la progresión del ciclo celular en la línea celular de cáncer Hep3B después de un tratamiento de 48h.	33
Figura 10. Análisis de western blot de ciclina E en células Hep3B a 24 horas respectivamente. Se muestra GAPDH como control de carga	34
Figura 11. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de ciclina E en la línea celular de cáncer Hep3B. Después de un tratamiento de 24 horas.	35
Figura 12. Análisis de western blot de ciclina A en células Hep3B a 24 horas respectivamente. Se muestra GAPDH como control de carga	36
Figura 13. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de ciclina A en la línea celular de cáncer Hep3B.	36

Figura 14. Análisis de western blot de ciclina B1 en células Hep3B a 24 horas respectivamente. Se muestra GAPDH como control de carga	37
Figura 15. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de ciclina B1 en la línea celular de cáncer Hep3B.	37
Figura 16. Análisis de western blot de ciclina E en células Hep3B a 48 horas respectivamente. Se muestra GAPDH como control de carga	38
Figura 17. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de ciclina E en la línea celular de cáncer Hep3B.	39
Figura 18. Análisis de western blot de ciclina A en células Hep3B a 48 horas respectivamente. Se muestra GAPDH como control de carga	39
Figura 19. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de ciclina A en la línea celular de cáncer Hep3B.	40
Figura 20. Análisis de western blot de ciclina B1 en células Hep3B a 48 horas respectivamente. Se muestra GAPDH como control de carga	41
Figura 21. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de ciclina B1 en la línea celular de cáncer Hep3B.	41
Figura 22. Análisis de western blot de p53 y p21 en células Hep3B a 24 horas respectivamente. Se muestra GAPDH como control de carga	42
Figura 23. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de ciclina p53 en la línea celular de cáncer Hep3B.	43
Figura 24. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de ciclina p21 en la línea celular de cáncer Hep3B.	43
Figura 25. Análisis de western blot de p53 y p21 en células Hep3B a 48 horas respectivamente. Se muestra GAPDH como control de carga	44
Figura 26. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de ciclina p53 en la línea celular de cáncer Hep3B.	44

Figura 27. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de ciclina p21 en la línea celular de cáncer Hep3B.

45

Tablas	Página
Tabla 1. Causas principales de mortalidad por cáncer en hombres mexicanos (2000-2013)	16
Tabla 2. Causas principales de mortalidad por cáncer en mujeres mexicanas (2000-2013)	17
Tabla 3. Incidencia, mortalidad y prevalencia estimadas (5 años) en todo el mundo en 2012	18
Tabla 4. Cinasas dependientes de ciclina (CDK) y sus ciclinas reguladoras	21
Tabla 5. Inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (CKI) se unen a CDK solo o al complejo CDK-ciclina y regulan actividad de CDK	22

Resumen

Los productos naturales han sido ampliamente estudiados para el tratamiento de diversas enfermedades, dentro de los cuales se encuentran los compuestos fenólicos que han mostrado tener resultados prometedores en la prevención y tratamientos de diversos tipos de cáncer. Por definición, el cáncer es una enfermedad en la que se tiene un crecimiento anormal y descontrolado de células, causado por alteraciones en diferentes mecanismos celulares, uno de ellos es la desregulación del ciclo celular debido a la alteración de proteínas responsables de detener o dar continuidad al ciclo celular. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los compuestos fenólicos ácido gálico y ácido tánico en el ciclo celular de células de carcinoma hepatocelular, Hep3B, particularmente sobre reguladores del ciclo celular como ciclinas E, A y B1, así como inhibidores del ciclo como p53 y p21, en la búsqueda del mecanismo de acción. Los resultados del efecto de los compuestos ácido gálico y ácido tánico sobre ciclinas mostraron que dichos compuestos causan una disminución significativa en la expresión de las ciclinas E, A y B1, explicando de este modo el arresto celular observado en el análisis de ciclo celular por citometría, en donde el ácido tánico en particular causó arresto en la fase S del ciclo celular tanto a 24 como a 48 horas de tratamiento, sin embargo, el ácido gálico no causó arresto en ninguna fase del ciclo celular. Finalmente, se evaluó la expresión de los inhibidores del ciclo celular y se observaron cambios significativos en su expresión. A 24 horas de tratamiento con ácido gálico se observa una disminución en la expresión de p53, sin embargo, a 48 horas de tratamiento con ambos compuestos, p53 no muestran cambios significativos en su expresión, lo cual sugiere que dicha proteína no está involucrada en el mecanismo de acción de ácido gálico y ácido tánico en esta línea celular evaluada. De manera similar se observó que el compuesto fenólico ácido gálico induce una disminución en la expresión de p21 a 24 horas de tratamiento, mientras que ambos compuestos inducen una disminución en la expresión de p21 a 48 horas de tratamiento, lo cual sugiere que p21 no está involucrado en el efecto causado por el tratamiento con ácido gálico y ácido tánico. Debido a que tanto p53 como p21 están involucrados en la regulación de ciclo celular al detener el paso de una fase a otra, la expresión a la baja observada en este trabajo sugiere que ambos compuestos podrían estar favoreciendo la transición celular de una fase a otra del ciclo y por lo tanto no están involucrados en el efecto causado por ambos compuestos. Este trabajo arroja resultados interesantes sobre el efecto de los compuestos fenólicos ácido gálico y ácido tánico sobre los reguladores del ciclo celular y establecer bases para la búsqueda del mecanismo de acción de moléculas de origen natural con potencial antineoplásico.

ABSTRACT

Natural products have been widely studied for the treatment of several illnesses, amongst this, phenolic compounds are found, this have been proofed to have promising result in prevention and treatment of several kinds of cancer. By definition, cancer is an illness in which the cells have an abnormal and uncontrolled growth, caused by alterations in different cellular mechanisms, one of them is the dysregulation of the cell cycle due to the alteration of proteins that are responsible of stopping or continuing the cell cycle. The goal of this study was to evaluate the effect of the phenolic compounds, gallic acid and tannic acid, in the cell cycle of hepatocellular carcinoma cells Hep3B, particularly over cell cycle regulators such as cyclins E, A, B1, and cell cycle inhibitors like p53 and p21, searching for action mechanisms. The results of the effect of the compounds gallic acid and tannic acid over cyclins showed that these compounds cause a significative reduction in the expression of the cyclins E, A, and B1, explaining this way the cell cycle arrest observed in the analysis of the cell cycle by cytometry, where the tannic acid, particularly, caused cell cycle arrest in the phase S of the cell cycle at 24 and 48 hours of treatment, however, the gallic acid did not cause cell cycle arrest in any of the phases of the cell cycle. Finally, the expression of the cell cycle inhibitors was evaluated and significative changes in its expression were observed. After 24 hours of treatment with gallic acid a reduction in the expression of the p53 was observed, however, after 48 hours of treatment with both compounds, p53 does not show any significative changes in its expression, this suggests that this protein is not involved in the action mechanism of the gallic acid and tannic acid in the cell line evaluated. In a similar way, it was observed that the phenolic gallic acid compound induces a reduction in the expression of p21 at 24 hours of treatment, while both compounds induce a reduction in the expression of p21 at 48 hours of treatment, which suggests that p21 is not involved in the effect caused by the treatment with gallic acid and tannic acid. Due to the fact that p53 and p21 are involved in the regulation of the cell cycle, by stopping the transition from one phase to another, the reduction in the expression observed in this work suggests that both compounds could be favoring the transition from one phase of the cell cycle to another, and in this way, they are not involved in the effect caused by both compounds. This work shows interesting results over the effect of the phenolic compounds, gallic acid and tannic acid, over the regulators of the cell cycle and it stablishes the basis for the search of the action mechanism of natural origin molecules with antineoplastic potential.

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la actualización 2015 del National Cancer Institute (NCI), el cáncer es el nombre que se da a un conjunto de enfermedades relacionadas en donde algunas de las células del cuerpo empiezan a dividirse sin detenerse y se diseminan en tejidos circundantes. De manera normal las células del cuerpo van a crecer y dividirse según las necesidades y requerimiento del organismo. En el cáncer estos procesos ordenados y bien controlados se pierden, y es entonces cuando el crecimiento y división celular no obedecen a las necesidades del organismo.

El cáncer puede empezar casi en cualquier lugar del cuerpo humano, el cual está formado de trillones de células. Normalmente, las células humanas crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita. Cuando las células normales envejecen o se dañan, mueren, y células nuevas las remplazan (NCI 2015).

1.1. Panorama mundial: Cáncer

El cáncer es la principal causa de muerte en diferentes países alrededor del mundo, pues se ha visto que existen más de 100 tipos diferentes de cáncer según la ubicación de este en el cuerpo.

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) estima que uno de cada cinco hombres y una de cada seis mujeres en todo el mundo desarrollarán cáncer a lo largo de su vida. Una serie de factores parecen estar impulsando este aumento en la población mundial, que se encuentra en constante crecimiento y envejecimiento, además del aumento en la exposición a factores de riesgo de cáncer como agentes químicos, físicos y biológicos relacionados ampliamente con el desarrollo social y económico (Globocan. 2018).

A pesar de los esfuerzos de las instituciones de salud en materia de prevención que parecieran reducir la tasa de incidencia de cáncer en algunos países, lo cierto es que a nivel mundial varios países aún se enfrentan a un aumento general en el número absoluto de casos de cáncer.

Para 2018 el continente americano se ubicó en el tercer lugar con mayor incidencia y mortalidad, 21.0% y 14.4% respectivamente a nivel mundial en los diferentes tipos de cáncer en ambos sexos de la población, tan solo después de Asia y Europa (Figura 1).

Datos mundiales de cáncer 2018

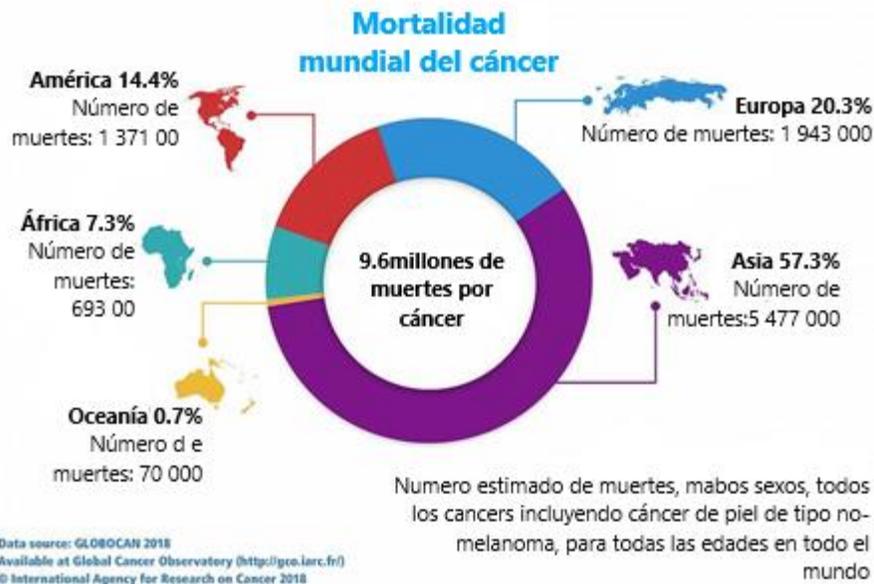


Figura 1. Datos mundiales de incidencia y mortalidad (GLOBOCAN 2018)

Existen diferentes tipos de cáncer que afectan a la población alrededor del mundo y México no es la excepción. La figura 2, muestra de manera gráfica cuales son los tipos de cáncer más comunes, así como su incidencia y mortalidad a nivel mundial, según datos del 2018.

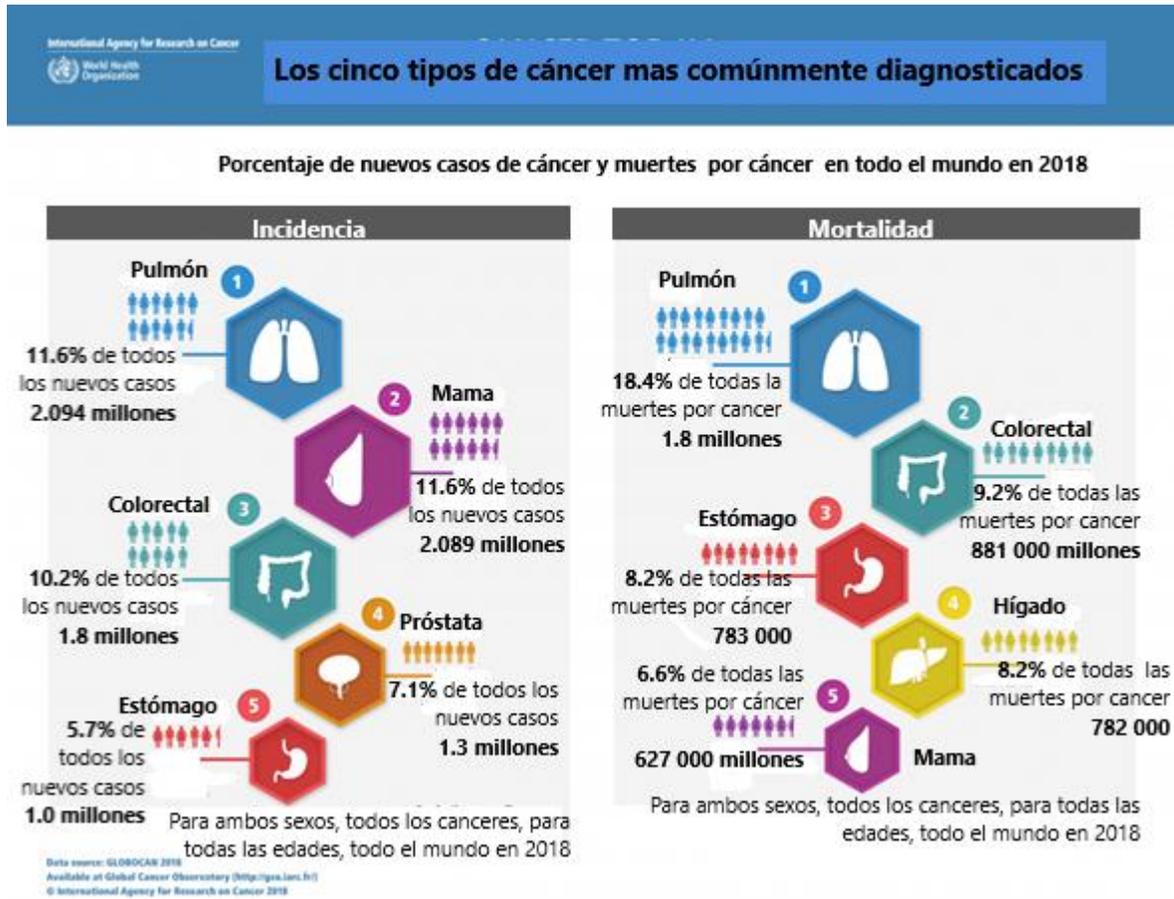


Figura 2. Cinco tipos de cáncer más comúnmente diagnosticados en 2018. Datos de incidencia y mortalidad a nivel mundial (GLOBOCAN 2018)

Dentro de los cinco tipos de cáncer más diagnosticados, el cáncer de hígado se encuentra en el cuarto lugar de mortalidad, tan solo después del cáncer de pulmón, colorectal y estómago, con 8.2% de casos nuevos para 2018 (figura 2). Lo cual vuelve a este tipo de cáncer de importancia para estudio, a nivel mundial (GLOBOCAN 2018).

1.2. Cáncer en México

En México, en el año 2013, el cáncer representó el 12,8% de todas las muertes y fue la tercera causa de muerte en el país, tan solo después enfermedades cardíacas (24,3%) y diabetes (14,3%) (Mohar et al.,2017).

La tasa bruta de mortalidad específica por sexo para las 10 principales causas de muerte por cáncer entre 2000 y 2013 se enumeran en las Tablas 1 para hombres y la tabla 2 para mujeres.

Tasa de mortalidad por año														
Localización de cáncer	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Próstata	7.76	8.02	8.33	8.96	8.72	9.15	8.85	9.25	9.48	9.49	9.87	10.02	10.34	10.19
Pulmón	8.53	8.75	8.97	8.95	8.84	9.12	8.52	8.22	8.16	8.00	7.87	7.58	7.21	7.20
Estomago	5.40	5.14	5.25	5.27	5.20	5.16	5.21	5.14	5.23	5.21	5.19	4.94	5.00	4.82
Hígado	2.55	2.51	2.65	2.72	2.79	2.81	2.90	2.70	2.63	2.81	2.89	2.82	2.88	2.84
Colon	1.96	1.99	2.04	2.15	2.23	2.46	2.50	2.55	2.94	2.79	2.85	3.00	3.38	3.51
Páncreas	2.00	2.09	2.224	2.22	2.31	2.32	2.41	2.54	2.70	2.71	2.59	2.51	2.82	2.62
Riñones	1.43	1.49	1.52	1.79	1.66	1.75	1.79	1.90	1.89	1.80	2.05	2.16	1.95	2.10
Linfoma no Hodking	1.48	1.42	1.68	.49	1.72	1.71	1.68	1.77	1.82	1.79	1.69	1.87	1.85	1.72
No específico	1.51	1.48	1.57	1.46	1.56	1.53	1.53	1.66	1.70	1.71	1.76	1.76	1.75	1.73
Leucemia Linfoblástica Aguda	1.35	1.34	1.46	1.49	1.44	1.48	1.59	1.50	1.58	1.65	1.53	1.61	1.65	1.62
Total	57.14	57.62	60.16	61.44	61.66	63.70	63.33	64.36	66.49	67.23	68.84	69.61	71.74	65.56

Nota: Tasa bruta por 100 000 hombres mexicanos

Tabla 1. Causas principales de mortalidad por cáncer en hombres mexicanos (2000-2013) (National Institute of Public Health; Mohar et al.,2017)

Tasa de mortalidad por año														
Localización de cáncer	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Mama	6.77	6.93	7.33	7.28	7.71	7.71	8.04	8.21	8.48	8.50	8.65	8.81	9.36	8.94
Cervical	9.00	8.66	8.20	8.07	7.82	7.79	7.42	7.16	7.07	7.08	6.72	6.58	6.37	6.21
Estomago	4.32	4.42	4.46	4.44	4.45	4.54	4.40	4.34	4.41	4.29	4.36	4.41	4.24	4.16
Pulmón	3.92	3.87	4.07	4.00	4.13	4.06	4.12	4.01	3.96	3.94	4.04	4.08	3.72	3.94
Hígado	2.94	3.06	2.97	3.04	3.09	3.01	3.18	2.94	3.02	3.18	3.06	2.97	2.99	3.04
Ovarios	2.26	2.43	2.54	2.63	2.68	2.73	2.96	2.95	2.97	3.03	3.16	3.39	3.33	3.41
Páncreas	2.23	2.23	2.39	2.37	2.42	2.47	2.51	2.72	2.83	2.82	2.83	2.86	2.85	2.96
Colon	1.96	2.13	2.01	2.27	2.33	2.41	2.39	2.62	2.62	2.34	2.48	2.58	2.96	3.10
No especificado	1.58	1.57	1.64	1.63	1.59	1.61	1.59	1.72	1.75	1.84	1.80	1.68	1.65	1.76
Linfoma no Hodking	1.08	1.14	1.22	1.30	1.16	1.25	1.32	1.37	1.35	1.41	1.36	1.44	1.50	1.34
Total	60.22	60.66	61.51	62.18	63.23	64.16	64.93	65.71	66.75	67.80	68.94	69.94	70.70	64.71

Nota: Tasa bruta por 100 000 mujeres mexicanas

Tabla 2. Causas principales de mortalidad por cáncer en mujeres mexicanas (2000-2013) (National Institute of Public Health; Mohar et al.,2017)

Tanto en hombres como en mujeres mexicanas el cáncer de hígado se encuentra dentro de los primeros cinco lugares, tan solo seguido del cáncer de próstata, pulmón y estomago en hombres y de mama, cervical, estómago y pulmón en mujeres.

1.3. Cáncer de hígado

El carcinoma hepatocelular (CHC) es la principal forma de cáncer de hígado. Una parte de las infecciones crónicas con el virus de hepatitis B (VHB) y virus de hepatitis C (VHC), son las principales causas de CHC (Boscha et al., 2004; Shu-Chun et al., 2009), la contaminación de los alimentos con aflatoxinas, un grupo de micotoxinas producidas por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, es un importante contribuyente a la carga de CHC en muchos países de bajos ingresos. La cirrosis alcohólica es un factor de riesgo importante para el CHC en poblaciones con baja prevalencia de infección por VHB y VHC, y la asociación entre el consumo de tabaco y el CHC ya está establecida (Shu-Chun et al., 2009). La diabetes también está relacionada con un riesgo excesivo de CHC y la mayor prevalencia de sobrepeso y obesidad probablemente contribuye a ello (Shu-Chun et al., 2009).

En los países de alto riesgo, el cáncer de hígado puede surgir antes de los 20 años de edad, mientras que, en los países de bajo riesgo, el cáncer de hígado es poco frecuente antes de los 50 años (Boscha et al., 2004). Las tasas de cáncer de hígado en los hombres suelen ser de 2 a 4 veces más altas que en las mujeres (Tabla 3)

Números estimados	Hombre		Mujeres	
	Casos	Muertes	Casos	Muertes
Mundial	554 369	521 041	228 082	224 492
Regiones más desarrolladas	92 018	80 425	42 284	42 652
Regiones menos desarrolladas	462 351	440 616	185 798	181 840
Región africana WHO	24 791	23 758	14 032	13 403
Región americana WHO	40 288	34 704	22 872	23 180
Región del mediterráneo oriental WHO	19 844	18 893	9 523	9 056
Región europea WHO	47 155	44 087	23 421	24 959
Región del sudeste asiático WHO	54 678	52 351	25 284	24 395
Región del pacífico occidental WHO	367 572	347 208	132 934	129 484
Estados Unidos de América	22 541	16 863	7 908	7 449
China	293 318	281 802	101 452	101 401
India	17 236	16 755	10 180	10 008
Unión Europea	35893	31 881	15 892	16 571

Tabla 3. Incidencia, mortalidad y prevalencia estimadas (5 años) en todo el mundo en 2012 (IARC, WHO).

La estrategia actual para el tratamiento del cáncer hepatocelular son la resección quirúrgica, trasplante hepático (Forner et al., 2016) y la quimioterapia. Sin embargo, en algunos casos, estas estrategias son limitadas, por lo que se ha recurrido a la búsqueda de nuevas estrategias quimioterapéuticas.

1.4 Ciclo celular y cáncer

La interrupción de la regulación normal de la progresión y división del ciclo celular son eventos importantes en el desarrollo del cáncer (Meeran et al., 2008; Graña et al., 1995).

En muchos casos se ha observado que el crecimiento descontrolado que ocurre en el desarrollo del cáncer está asociado a alteraciones en el ciclo celular y los puntos de control de dicho ciclo. En algunos tipos de cáncer se ha observado una expresión o activación anormal de los reguladores positivos y una supresión funcional de los reguladores negativos (Park et al., 2003), lo que resulta en una proliferación celular desenfrenada.

La desregulación del ciclo celular asociada con el cáncer se produce a través de mutaciones o alteraciones epigenéticas de genes que codifican proteínas importantes en la regulación a diferentes niveles del ciclo celular. En el cáncer, se han observado mutaciones en genes que codifican a las cinasas dependientes de ciclinas (CDK), ciclinas, enzimas activadoras de CDK, sustratos de inhibidores de cinasas dependiente de ciclina (CKI), proteínas de

control; también la represión de la expresión por hipermetilación de las regiones promotoras de algunos CKI como p21 y p16 (McDonald et al., 2000).

1.4.1 Ciclo celular

El ciclo celular es la secuencia recurrente de eventos que incluye la duplicación del contenido de una célula y la subsiguiente división celular (Musthapa et al., 2008). Consiste en dos procesos consecutivos, principalmente caracterizados por la replicación del ADN y la segregación de cromosomas replicados en dos células separadas (Vermeulen et al., 2003).

Tradicionalmente, el ciclo celular en las células eucariotas se ha dividido en cuatro fases: fase 1 (G1) que lleva al ingreso a la fase S; Síntesis de ADN (S); fase 2 (G2), durante la cual la célula se prepara para la división y determina el momento de entrada en la mitosis; y mitosis (M) durante la cual los cromosomas se separan y la célula se divide (Figura 3) (Meeran et al., 2008; Norbury et al., 1992).

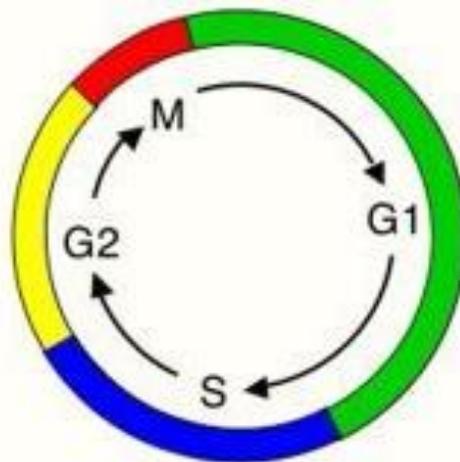


Figura 3. Ciclo celular típico que puede dividirse en cuatro fases secuenciales: G1, S, G2 y M (Van den Heuvel 2005).

La regulación estricta de este ciclo de división celular es crucial para la duplicación de información genética con una fidelidad extremadamente alta, así como para monitorear la correcta segregación de esta información durante la mitosis (Meeran et al., 2008).

1.4.2 Reguladores del ciclo celular

El ciclo celular está regulado de una forma extraordinariamente precisa gracias a una serie de proteínas que interactúan en las diferentes etapas de este.

Por lo que, para que ocurra el paso de una fase a la siguiente tiene lugar la activación secuencial y la inactivación de muchos "puntos de control" que monitorean el estado de la célula. Con el fin de garantizar una progresión adecuada del ciclo celular, las células pasan por diferentes puntos de control internos para verificar la finalización correcta de un paso antes de continuar con el siguiente paso (Meeran et al., 2008), de lo contrario de haber ocurrido algún error que compromete a la célula dichos puntos de control indican un paro en la división celular.

1.4.2.1 CDK - Ciclinas

Una familia de enzimas, denominadas cinasas dependientes de ciclina (CDK) son proteínas clave de dicha regulación, en donde las formas activas de las CDK son un complejo de al menos dos proteínas, una quinasa y una ciclina (Park et al., 2003), las CDK son una familia de proteínas cinasas de serina / treonina que se activan en puntos específicos del ciclo celular (Figura 4) (Vermeulen et al., 2003).

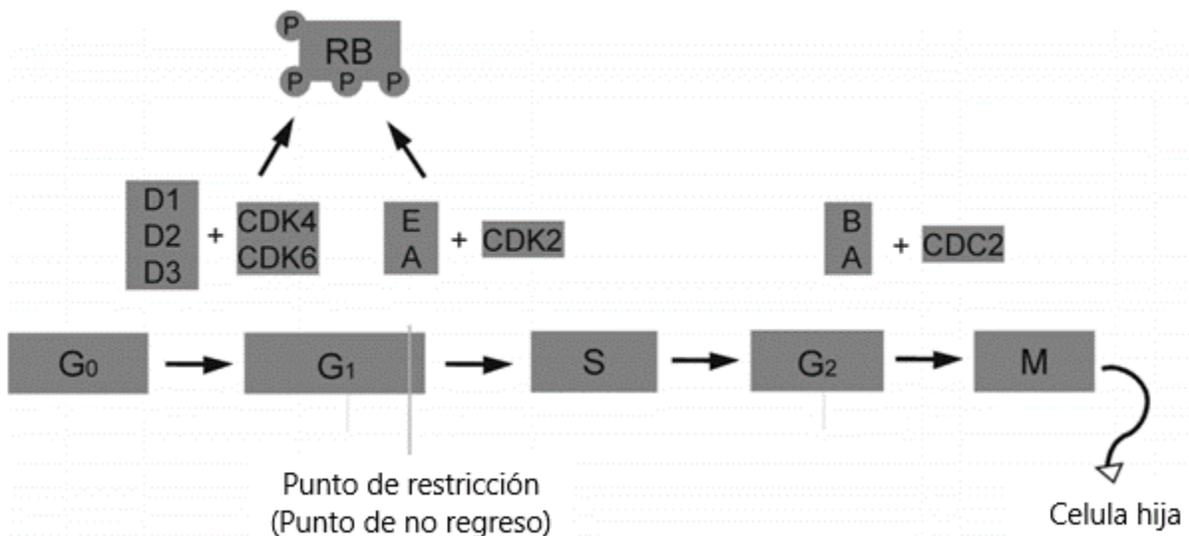


Figura 4. Progresión del ciclo celular y sus cuatro etapas. El punto crítico del control del ciclo celular es el punto de restricción. Después de pasar este punto, el ciclo celular se compromete irreversiblemente a la siguiente división celular. (Park et al., 2003).

Los diferentes miembros de la familia CDK, en asociación con diferentes ciclinas, representan interruptores clave en varios puntos del ciclo celular (Tabla 4). Los complejos de ciclina-CDK están regulados mediante eventos de fosforilación e interacción de proteínas que controlan estrictamente el tiempo y el alcance de la activación de CDK (Meeran et al., 2008).

CDKs	Ciclinas
Cdc2	Ciclina A y B
Cdk2	Ciclina A, E y D
Cdk3	Ciclina E
Cdk4	Ciclina D1, D2 y D3
Cdk5	P35
Cdk6	Ciclina D1, D2 y D3
Cdk7	Ciclina H
Cdk8	Ciclina C
Cdk9	Ciclina T

Tabla 4. Cinasas dependientes de ciclina (CDK) y sus ciclinas reguladoras (Park et al, 2003).

Los puntos de control se encuentran: en G1, en la transición G1 / S, en la transición G2 / M y en la transición metafase / anafase. Cuando existen daños a nivel de ADN se detiene el ciclo en la fase G1, S o G2, dependiendo del momento en que se incurrió en el daño. Dado que las moléculas CDK regulan la progresión del ciclo celular, cualquiera de los genes involucrados en la regulación de la actividad de la quinasa podría estar involucrado en la maquinaria de transducción de señales que conduce a la detención del ciclo celular desencadenando la inducción de los genes de reparación. La detención del ciclo celular permite la reparación del material genético evitando así lesiones secundarias y asegurando la progresión apropiada hacia la siguiente fase del ciclo (Meeran et al., 2008).

La expresión de las ciclinas y su interacción con los CDK está regulada por el punto o momento del ciclo celular en el que van a actuar.

Por mencionar un ejemplo, la ciclina D es esencial para la entrada en G1; la ciclina E desempeña un papel importante en la transición de la fase G1 a la fase S; la ciclina A forma un complejo con CDK2 que es necesario durante la fase S y por otro lado los complejos de ciclina A con CDK1 promueven la entrada en M cuando se está finalizando G2; la ciclina B

regula principalmente mitosis (Meeran et al., 2008; Vermeulen et al., 2003; Park et al., 2003; Graña et al., 1995).

Mientras las CDK con su respectiva ciclina juegan un papel de control positivo en la progresión del ciclo celular, es decir, favorecen el paso de una fase a otra cuando la célula está en condiciones óptimas para su división, por otro lado, se tienen controles negativos del ciclo celular.

1.4.2.2 Inhibidores de quinasa dependiente de Ciclina (CKI)

En la regulación del ciclo celular existen controles negativos, los cuales son llamados inhibidores de quinasa dependiente de ciclina (CKI), estas proteínas se encargan de detener la progresión en el ciclo celular ante señales reguladoras.

Los CKI se asocian con el CDK solo o al complejo CDK-ciclina y regulan negativamente la actividad de CDK. Se conocen dos familias de dichos inhibidores (Tabla 5), una de ellas es la familia INK4 que incluye p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c), p19 (INK4d), que inactivan específicamente CDK4 y CDK6, al formar complejos estables con la enzima CDK antes de la unión a la ciclina evita la asociación con la ciclina, que en este caso es la ciclina D. Por otro lado, la familia Cip / Kip, incluye p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2), p57 (Kip2). Estos inhibidores inactivan múltiples complejos de CDK-ciclina (Meeran et al., 2008; Vermeulen et al., 2003; Park et al., 2003).

Familia CKI	Función	Miembros de la familia	
Familia INK4	Inactivación de G ₁ CDK (CDK4, CDK6)	p15 p16 p18 p19	(INK4b) (INK4a) (INK4c) (INK4d)
Familia Cip/Kip	Inactivación de G ₁ complejo ciclina-CDK y complejo ciclina-CDK1	p21 p27 p57	(Waf1, Cip1) (Cip2) (Kip2)

Tabla 5. Inhibidores de quinazas dependientes de ciclina (CKI) se unen a CDK solo o al complejo CDK-ciclina y regulan actividad de CDK (Vermeulen et al, 2003).

Ante tal panorama el complejo sistema regulador detecta los daños, ya sea por agentes químicos o físicos al DNA, y detiene las células en las fases de separación, por lo que un fracaso de los puntos de control o a la pérdida de equilibrio de las moléculas reguladoras juega un papel importante en el desarrollo del cáncer.

1.4.3 p53

La proteína p53 tiene un papel bien establecido en la protección contra el desarrollo del cáncer pues se trata de una importante proteína supresora de tumores que se altera en la mayoría de los cánceres, es un componente de la respuesta al estrés agudo (Vousden et al., 2007).

p53 puede entonces activar o reprimir transcripcionalmente muchos genes diana (~200) para iniciar diversas respuestas celulares (Figura 5), incluida la detención del ciclo celular del límite G1 / S, por la activación de CKI como p21, la senescencia y arresto celular, la muerte celular apoptótica y la coordinación de la reparación genómica (Valente et al., 2013; Vousden et al., 2007).

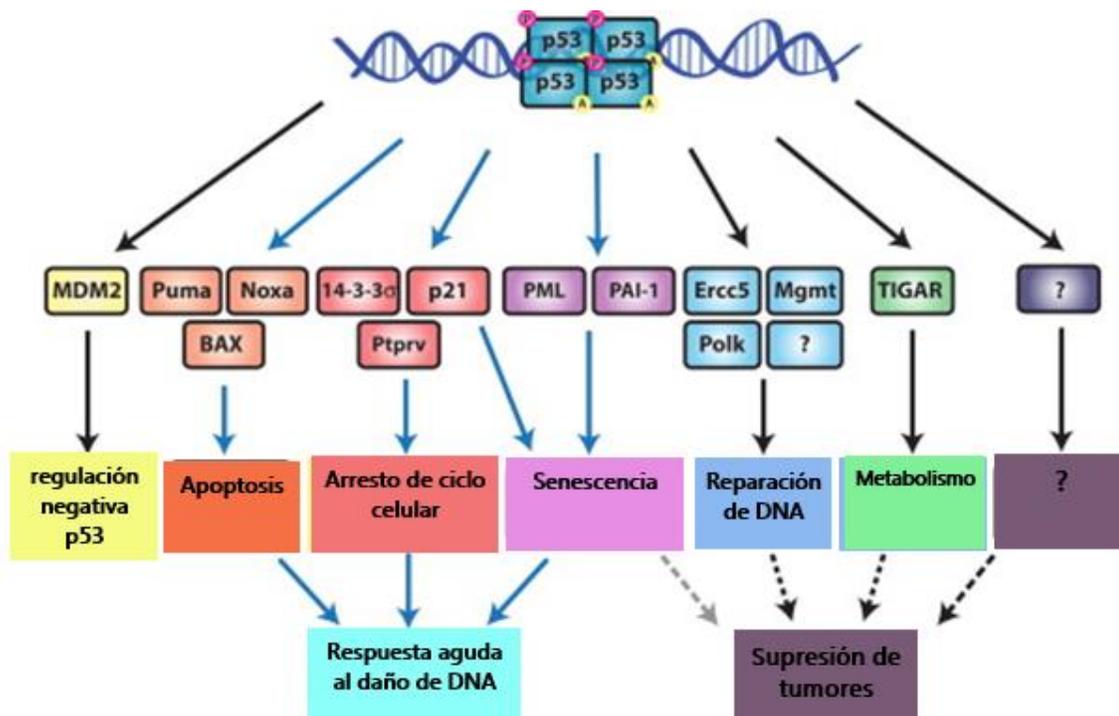


Figura 5. Modelo de blancos activados por p53 para la supresión de tumores (Valente et al., 2013)

La proteína supresora de tumores p53 actúa como un centro que integra múltiples señales intrínsecas y extrínsecas y lanza una gran cantidad de programas de protección celular o programas destructores de células en respuesta a varios tipos de estrés celular. La fuerte activación de p53 después del estrés genotóxico agudo típicamente desencadena la destrucción celular por apoptosis, mientras que, en el daño leve al ADN, p53 actúa como protector de la célula al inducir preferentemente la reparación y la supervivencia del daño (Vousden et al., 2009; Timofeev et al., 2013)

2. ANTECEDENTES

El cáncer se ha vuelto un problema de salud pública a nivel mundial, de ahí el interés en la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas para su tratamiento. En dicha búsqueda, diversos estudios han demostrado que compuestos de origen natural como los de tipo fenólico tienen potencial actividad anticancerígena.

En varios estudios se ha reportado la inhibición del crecimiento de algunas líneas celulares de cáncer debido al resveratrol, el cual es un compuesto fenólico que se encuentra de manera abundante en diferentes especies de plantas, como las uvas y cacahuate, se le han demostrado actividades antioxidantes y antiinflamatorias (Jang, M et al., 1997). En un estudio realizado por Andrew K. Joe *et al.*, (2002), se observó que el resveratrol inducía una marcada inhibición en el crecimiento de cinco de las seis líneas celulares (Seg-1, HCE7, SW480, MCF7, HL60) evaluadas con valores de IC₅₀ entre 70 a 150 µM e inducía arresto celular en la fase S del ciclo celular. En el mismo estudio se observó que después de 24 horas de tratamiento, el resveratrol a 300 µM indujo muerte por apoptosis. A su vez se observó una disminución en la expresión de los niveles de ciclinas D1, A y B1 (Andrew K. Joe *et al.*, 2002).

Otra molécula que han demostrado tener capacidad anticancerígena es el Gallotanino (Gltn), un polifenol natural con propiedades inhibitorias sobre células de cáncer de mama. Tiejun Zhao y colaboradores (2014), demostraron que la inhibición del crecimiento mediada por Gltn se caracteriza por la detención del ciclo celular en la fase S, dependiendo de la activación de Chk (Zhao et al., 2014).

Entre los diversos compuestos fenólicos de interés farmacológico, diversos estudios han sugerido que el ácido gálico (GA) (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico), un compuesto fenólico de bajo peso molecular que se produce de manera natural, posee una fuerte actividad antiproliferativa. Por mencionar un caso, un estudio realizado en 2017 mostró que la

fracción de acetato de etilo de los rizomas de *S. roxburghiana*, con alto contenido de ácido gálico, tuvo una importante actividad citotóxica en las líneas celulares de cáncer HCT-116, HeLa y MCF-7 (Maheshwari et al., 2017).

Por otra parte, un estudio con compuestos fenólicos aislados de un extracto de *C. coriaria* (ácido gálico, etilgalato, estigmasterol, ácido tánico) mostró la capacidad de éstos en la inducción de arresto celular de manera diferencial en líneas celulares de PC3 (próstata), Hep3B y HepG2 (hepatocelular), Ca Ski y HeLa (cervical), mostrando de esta manera un gran potencial antitumoral. De manera particular, ácido gálico inhibió la proliferación celular en todas las líneas celulares de cáncer analizadas, siendo más potente en células de carcinoma hepatocelular (HepG2 y Hep3B), mientras que con el ácido tánico las células más sensibles fueron Hep3B, seguidas de PC3 y células Ca Ski (Sánchez et al., 2017).

Los autores evaluaron el efecto de estos compuestos sobre ciclo celular, observaron que el extracto crudo induce arresto en fase S en células PC3, Hep3B y Ca Ski. Por otro lado, ácido gálico induce arresto en fase S en células PC3, Hep3B y HepG2 y ácido tánico induce arresto en fase S en células Hep3B (Sánchez et al., 2017).

Se ha observado el efecto del ácido gálico sobre la distribución del ciclo celular en diversos estudios al modificar la expresión de proteínas que funcionan como reguladores del ciclo celular. En células HL- 60 se observó que ácido gálico causa un arresto en fase G0/G1 y disminuye la expresión de ciclinas D y E, mientras que promueve la expresión de inhibidores p21 y p27 (Ru-Duan et al., 2011). En la línea celular MDA-MB-231 (células de cáncer de mama triple negativo (TNBC)) ácido gálico condujo a un aumento de la relación de las fases G0 / G1 y sub-G1, regulando a la baja la ciclina D1 / CDK4 y la ciclina E / CDK2, y al alza p21Cip1 y p27Kip1, e induciendo la activación de caspasa-9 y caspasa-3 (Hsiang-Lin et al., 2017).

Sin embargo, aún no es claro el mecanismo por el cual se induce este arresto en el ciclo celular, ni cuáles son los blancos de estos compuestos fenólicos. Por lo cual, este proyecto tiene como objetivo caracterizar molecularmente la activación del arresto celular, mediante el análisis del cambio de expresión de componentes regulatorios de esta fase por la acción de compuestos fenólicos aislados de *Caesalpinia coriaria*.

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer se ha vuelto una de las principales causas de muerte en los últimos años, convirtiéndose de este modo un problema de salud pública importante a nivel mundial, y México no es la excepción, pues según las estadísticas se prevé que aumenten los casos de cáncer en los próximos años. Por otro lado, los tratamientos farmacológicos usados en la clínica para los diferentes tipos de cáncer han presentado problemas que complican el uso y apego al tratamiento de estos fármacos, principalmente debido a los graves efectos secundarios. Ante tal panorama, se ha vuelto necesaria la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas para su tratamiento y prevención que resulten más eficaces y seguras. Los compuestos fenólicos han mostrado en diversos estudios tener propiedades anticancerígenas importantes, mediante modificación en los reguladores del ciclo celular y enzimas involucradas en la división y proliferación celular como probable mecanismo de acción.

Estudios previos en nuestro grupo de trabajo, han mostrado que compuestos fenólicos aislados de plantas (*C. coraria*) presentan actividad anticancerígena sobre diferentes líneas celulares, teniendo un efecto sobre el ciclo celular e inducción de apoptosis. Particularmente, se observó que compuestos fenólicos como el ácido gálico y ácido tánico sobre líneas celulares de carcinoma hepatocelular (Hep3B) causan detención en el ciclo en la fase S, causando muerte celular. Sin embargo, el mecanismo por el cual ejerce dicho efecto aun no es conocido, por lo que en la búsqueda del posible mecanismo de acción se ha vuelto de interés indagar sobre el efecto de dichos compuestos fenólicos sobre la expresión de los reguladores del ciclo celular como ciclinas e inhibidores.

4. HIPÓTESIS

Los compuestos fenólicos ácido gálico y ácido tánico regulan la expresión de proteínas implicadas en los puntos de control del ciclo celular en células de carcinoma hepatocelular (Hep3B).

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de reguladores involucrados en la inducción de arresto de ciclo celular, por la acción de los compuestos fenólicos en la línea celular de carcinoma hepatocelular (Hep3B).

6. OBJETIVOS PARTICULARES

6.1 Evaluar el efecto de ácido gálico y ácido tánico sobre el ciclo celular en células de carcinoma hepatocelular (Hep3B).

6.2 Determinar los cambios de expresión de las ciclinas B, E y A por la acción del ácido gálico y ácido tánico en células de carcinoma hepatocelular (Hep3B).

6.4 Determinar los cambios de expresión de los inhibidores del ciclo celular p21 y p53 por la acción del ácido gálico y ácido tánico en células de carcinoma hepatocelular (Hep3B).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cultivo celular

Las células de carcinoma hepatocelular (Hep3B) se obtuvieron de un stock de líneas celulares congeladas conservadas a -80°C , estas fueron inicialmente adquiridas en American Type Culture Collection (ATCC) (USA). Se cultivaron en medio DMEM (Invitrogen) suplementado con 10% SFB y 2mM de glutamina, a 37°C en una atmosfera de 5% de CO_2 y 95% de humedad.

7.2 Evaluación del efecto sobre ciclo celular

Se sembraron las células Hep3B, 200,000 células por pozo en placas de 6 pozos, se cultivaron y se realizó el tratamiento a 24 horas según la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de ácido gálico y ácido tánico, $64\ \mu\text{M}$ y $40\ \mu\text{M}$ respectivamente, y 48 h $45\ \mu\text{M}$ y $23\ \mu\text{M}$ respectivamente (Sánchez et al., 2017), se usó etopósido como control a diferentes concentraciones $0.25\ \mu\text{g}/\text{mL}$, $0.50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ y $0.75\ \mu\text{g}/\text{mL}$ para 24h y 48h. Las células de cada tratamiento se tripsinizaron y recogieron en suspensión de células individuales, se centrifugaron y se fijaron con etanol frio (70%) durante la noche a -20°C . Las células se trataron entonces con RNasa (0.01 M, Sigma Aldrich) y se tiñeron con yoduro de propidio (IP) ($7.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$, Invitrogen) durante 30 minutos en la oscuridad. El porcentaje de células en fase sub-G1, G1, S y G2 se analizó un citómetro de flujo (Becton, Dickinson, FACS Calibur, San José, CA); el número de células analizadas para cada muestra fue de 10000. Los experimentos se realizaron por triplicado entre experimentos independientes. Los datos obtenidos del citómetro de flujo se analizaron utilizando el FlowJo Software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, EEUU) para generar histogramas de frecuencia del contenido de DNA y cuantificar el porcentaje de células en cada fase. Se analizaron los cambios en el porcentaje de células en cada fase después de los tratamientos respecto al control sin tratamiento los datos se analizaron empleando el programa estadístico GraphPad Prisma6 y las diferencias estadísticas se analizaron por ANOVA y se consideraron significativos con un valor de $p < 0.05$.

7.3 Expresión de las ciclinas B, E y A y de inhibidores p21 y p53 por western blot

Las células Hep3b se cultivaron en placas de 6 pozos con 150000 células por pozo, se realizó el tratamiento a 24 horas según las IC_{50} de ácido gálico y ácido tánico a 24 h, 64 μ M y 40 μ M, respectivamente, y a 48 h, 45 μ M y 23 μ M, respectivamente (Sánchez et al., 2017), se usó etopósido como control a 0.50 μ g/mL para 24 h y 0.25 μ g/mL para 48 h. Después del tiempo de cada tratamiento se realizó la extracción proteica mediante acción mecánica y con buffer de lisis RIPA (Tris-HCL 50 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%) e inhibidores de proteasas. La proteína se cuantificó usando el kit de cuantificación BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE) siguiendo instrucciones del fabricante. La concentración de proteína se determinó por absorbancia a 450 nm utilizando un lector de Elisa automatizado (PROMEGA). Una vez cuantificadas las proteínas se disolvieron en buffer de carga 5X con 10% β -mercaptoetanol, se calentaron a 95 °C, 3 minutos y se cargaron en un gel SDS-PAGE 8%. La transferencia se realizó en un sistema de transferencia utilizando PVDF de membrana (MILLIPORE, tamaño de poro 0.45 μ M), después de transferir se bloqueó con leche 5% en PBS-Tween 20 (0.1%) durante 1 hora y media, se realizaron los lavados correspondientes, se procedió a incubar la membrana toda la noche a 4°C con el anticuerpo correspondiente. Los anticuerpos usados fueron: Ciclina A (SC-239 mouse monoclonal), Ciclina E (SC-25303 mouse monoclonal), Ciclina B1(SC-245 mouse monoclonal), p21 (SC-6246 mouse monoclonal) y p53 (DO-1, santa cruz), en dilución 1:1000; GAPDH (GA1R Invitrogen) fue usado como control de carga a una dilución 1:2000. La membrana se lavó y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente, el anticuerpo secundario usado fue una dilución 1:1000 m-IgGk conjugada a HRP (sc-516102). Los experimentos fueron experimentos independientes con tres replicas. Las proteínas se visualizaron por inmuno-detección en el sistema de imagen táctil ChemiDoc XRS+ System (Biorad) utilizando SuperSignal™ West Femto Trial Kit (Thermo SCIENTIFIC, cat. 34094) como revelador siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó un análisis densitométrico de las bandas. Los valores densitométricos fueron normalizados al correspondiente control de carga y comparados entre grupos control y tratamiento. Se realizó el análisis estadístico ANOVA en el programa GraphPad Prisma6. Se consideraron significativos con un valor de $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Evaluación del efecto sobre ciclo celular

El efecto de los compuestos de ácido gálico y ácido tánico a 24 y 48 horas de tratamiento fue evaluado sobre la progresión del ciclo celular de las células cancerosas Hep3B, acorde a sus CI_{50} . Etopósido (ETO) se incluyó como un control positivo de arresto celular. El compuesto ácido tánico mostro un efecto diferencial en la progresión del ciclo celular en la línea celular evaluada.

Más específicamente, a 24 horas de tratamiento ácido tánico mostró un aumento significativo aproximadamente del 17% en la población en fase S del ciclo celular con respecto al control, el tratamiento con ácido gálico no mostró diferencia significativa en la distribución del ciclo celular con respecto al control positivo (Figura 6).

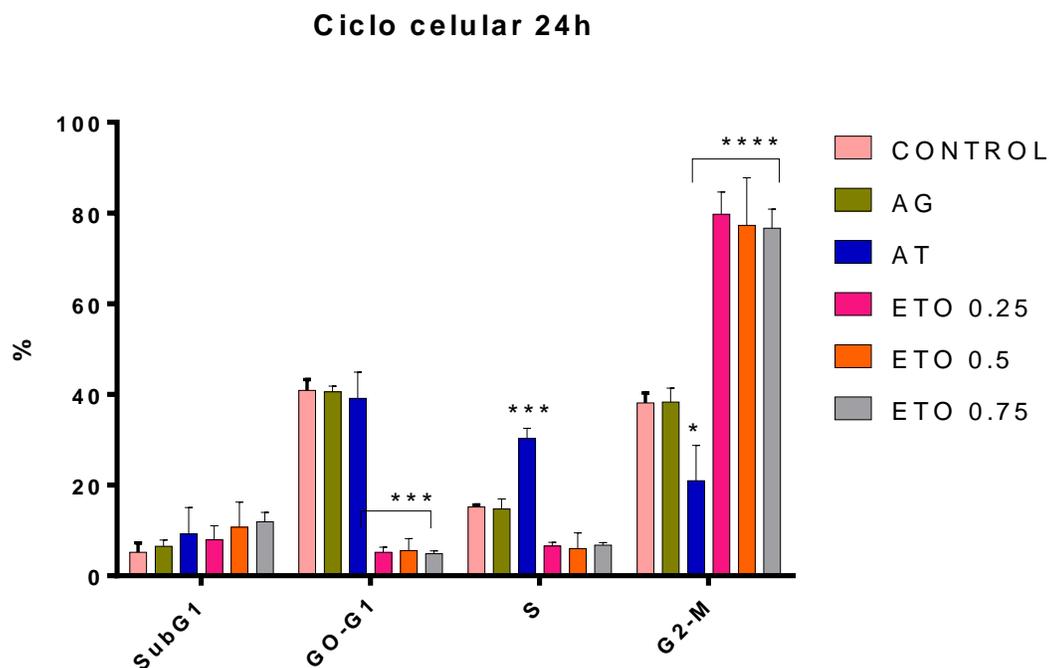


Figura 6. Efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la progresión del ciclo celular en la línea celular de cáncer Hep3B después de un tratamiento de 24h.

Etopósido (ETO) fue usado como control. * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ comparada con el grupo control negativo.

Por otro lado, a 48 horas de tratamiento, el ácido tánico mostró un aumento significativo aproximadamente de aproximadamente 5% en la población en fase S del ciclo celular con respecto al control, mientras que el tratamiento con ácido gálico no mostró diferencia significativa en la distribución del ciclo celular con respecto al control positivo (Figura 7).

Ciclo celular 48h

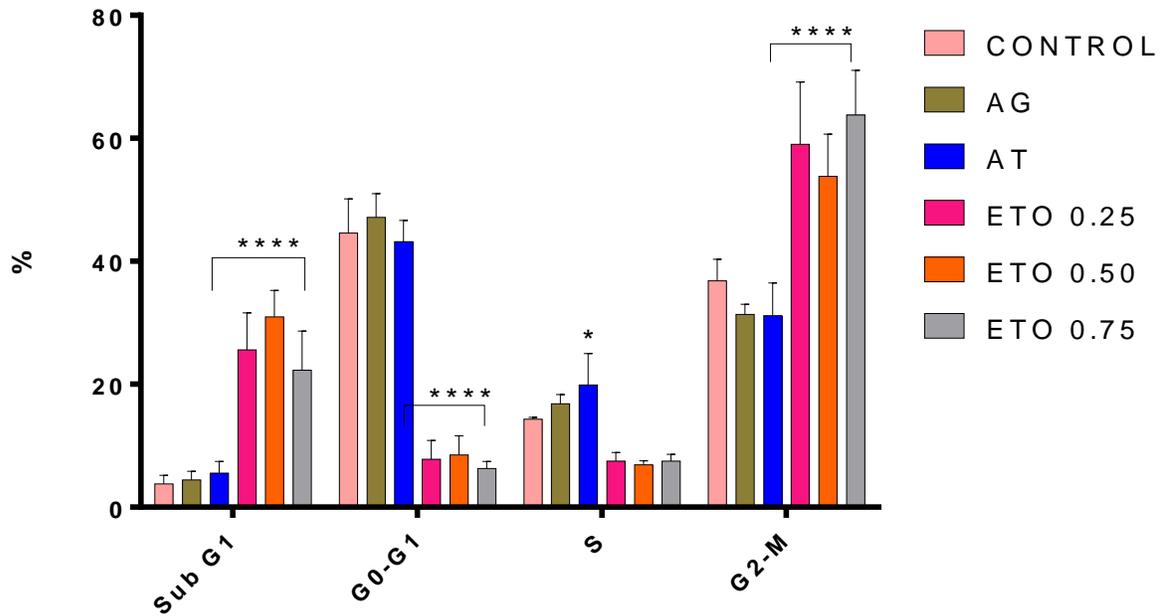


Figura 7. Efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la progresión del ciclo celular en la línea celular de cáncer Hep3B. Después de un tratamiento de 48 horas. Etopósido (ETO) fue usado como control. * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ comparada con el grupo control negativo

Los histogramas del ciclo celular para células Hep3B se muestran en la figura 8 para 24 horas de tratamiento y en la figura 9 para 48 horas de tratamiento a sus IC_{50} correspondientes.

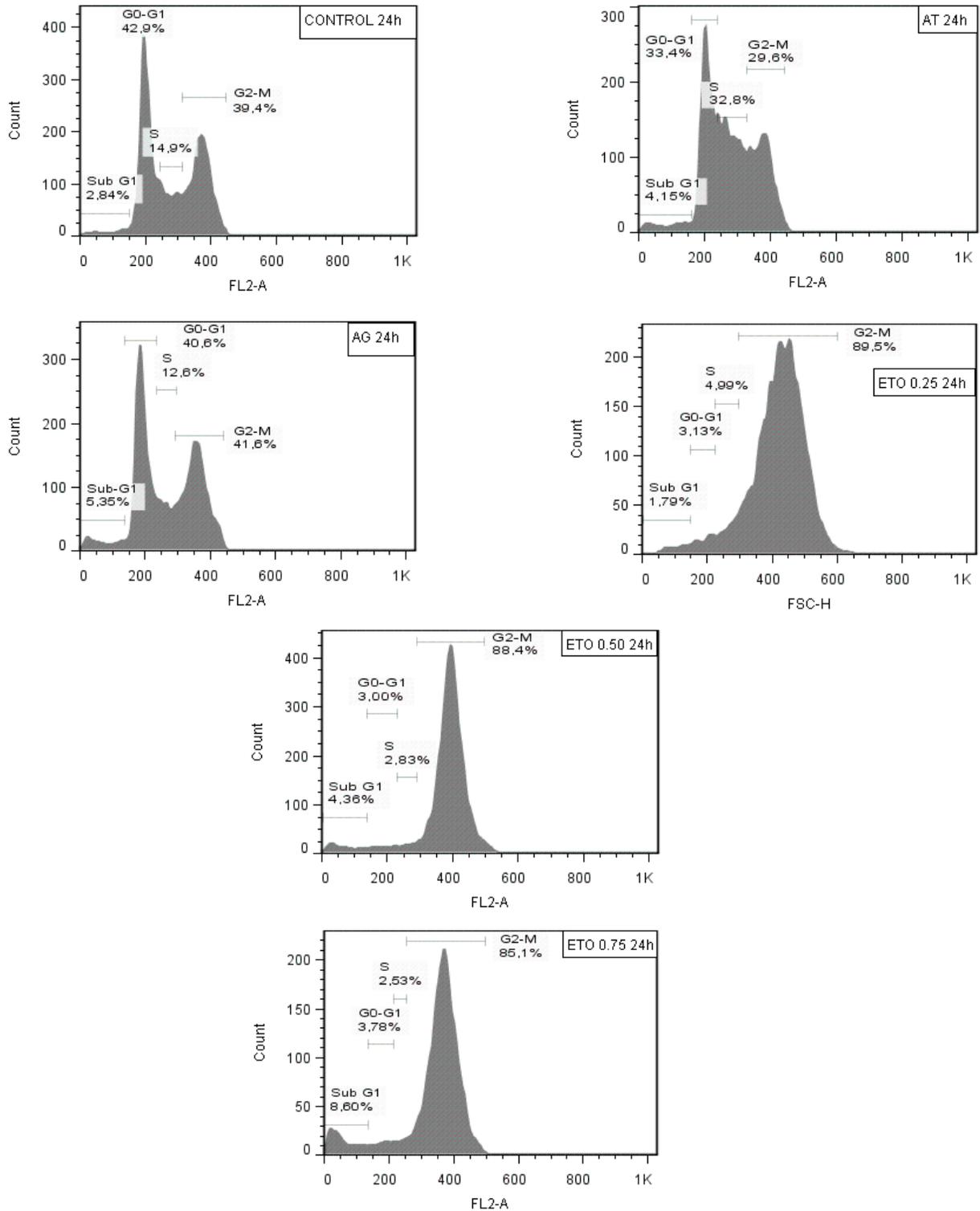


Figura 8. Efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la progresión del ciclo celular en la línea celular de cáncer Hep3B después de 24h de tratamiento. Etopósido (ETO) fue usado como control.

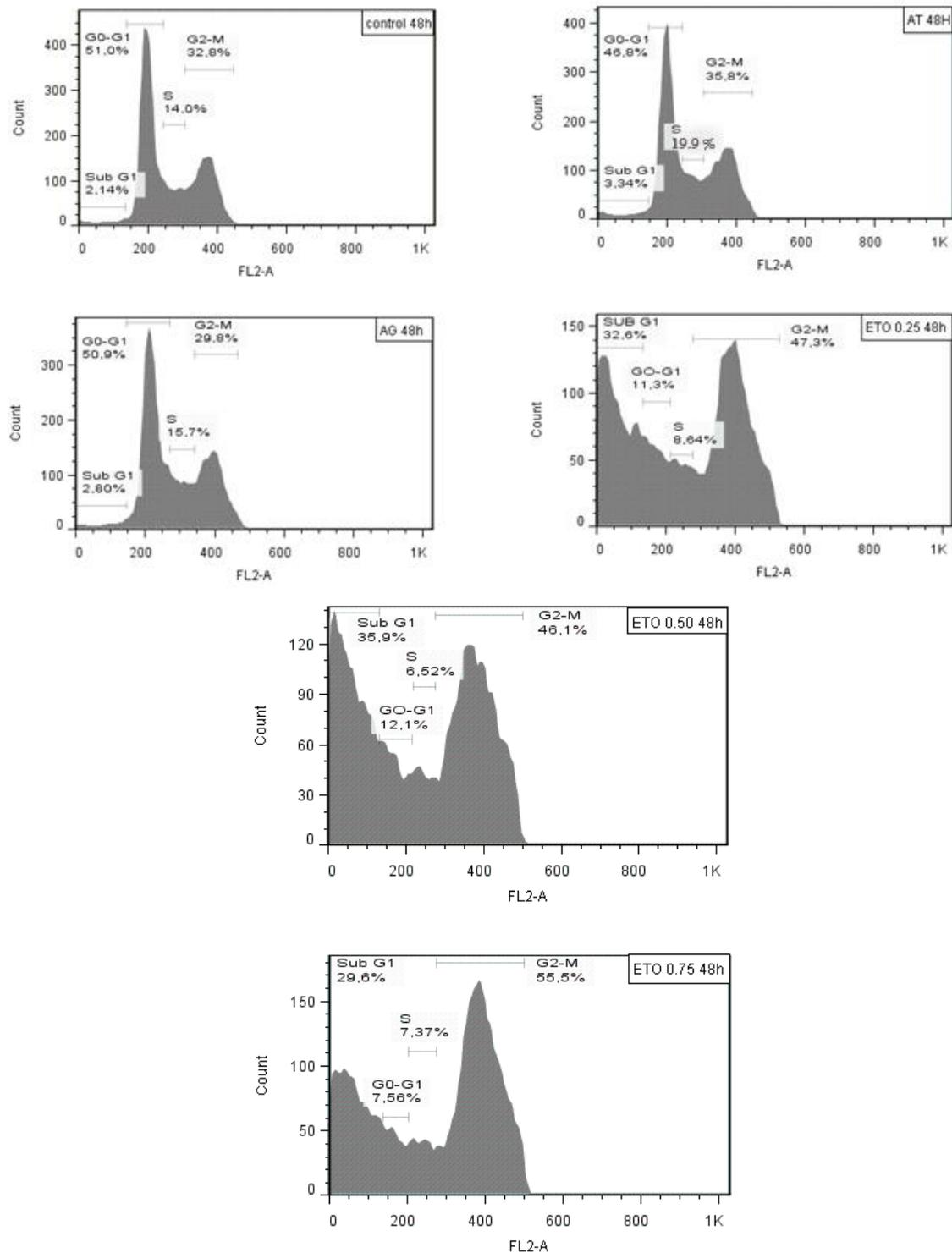


Figura 9. Efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la progresión del ciclo celular en la línea celular de cáncer Hep3B después de 48h de tratamiento. Etopósido (ETO) fue usado como control.

8.2 Expresión de las ciclinas E, A y B1 por western blot

En las figuras 10 a la 15 se muestran los cambios de expresión de las ciclinas E, A y B1 por western blot respectivamente, por la acción del ácido gálico, ácido tánico y el etopósido a 24 horas de tratamiento en línea de carcinoma hepatocelular (Hep3B), se incluye GAPDH como controles de carga, así como los gráficos del análisis estadístico correspondiente a la expresión relativa de proteína por densitometría.

En la figura 10 se observa una disminución en la expresión de ciclina E con respecto al control para los tratamientos de ácido gálico y ácido tánico a las 24 horas de tratamiento, con una menor expresión de esta ciclina para el tratamiento de ácido gálico.

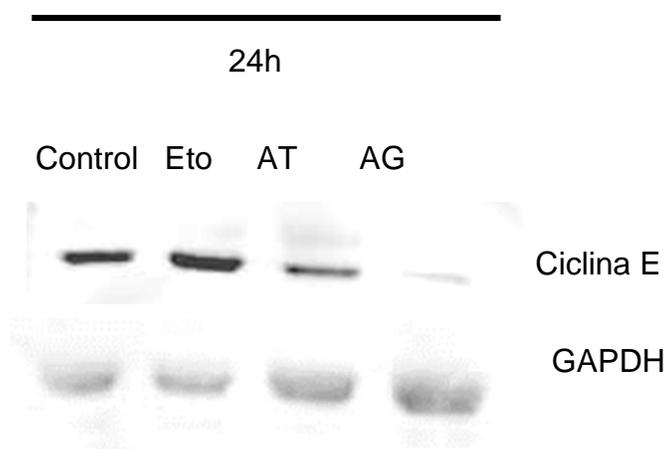


Figura 10. Análisis de western blot de ciclina E en células Hep3B a 24 horas de tratamiento con Etopósido (ETO), ácido tánico (AT) y ácido gálico (AG). Se muestra GAPDH como control de carga

Después de realizar el análisis estadístico de la expresión relativa de ciclina E a 24 horas de tratamiento se observó un cambio significativo de la disminución en la expresión de ciclina E por efecto de los compuesto ácido gálico y ácido tánico (figura 11).

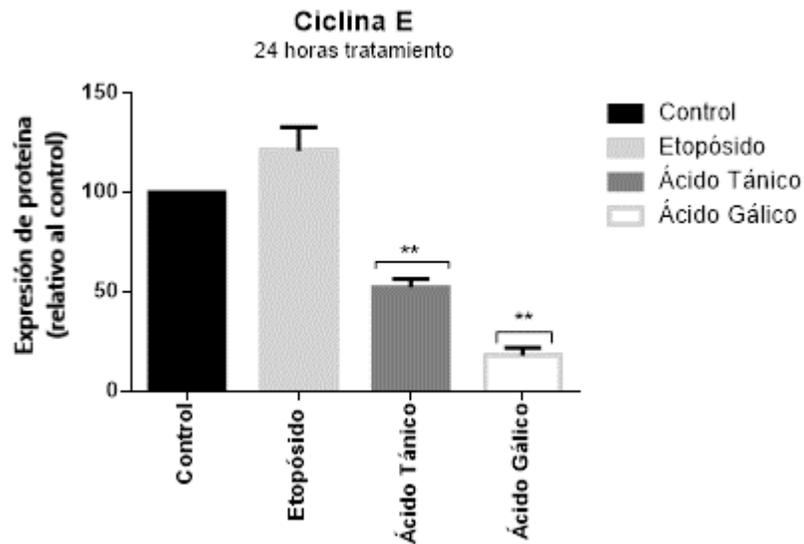


Figura 11. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de ciclina E en la línea celular de cáncer Hep3B. Después de un tratamiento de 24 horas. Etoposido (ETO) fue usado como control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparada con el grupo control negativo.

Se analizó la expresión de la siguiente ciclina involucrada en el ciclo celular, la ciclina A.

En la figura 12 se puede observar que la expresión de la ciclina A disminuye con respecto al control al ser tratada con ácido gálico y ácido tánico a 24h.

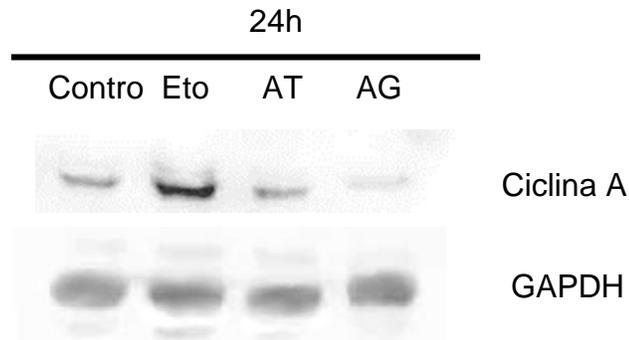


Figura 12. Análisis de western blot de ciclina A en células Hep3B a 24 horas de tratamiento con Etopósido (ETO), ácido tánico (AT) y ácido gálico (AG). Se muestra GAPDH como control de carga

El análisis estadístico de la expresión relativa de la proteína, mostró un cambio significativo en la disminución de la expresión de ciclina A después del tratamiento a 24 horas con ácido gálico y ácido tánico (Figura 13)

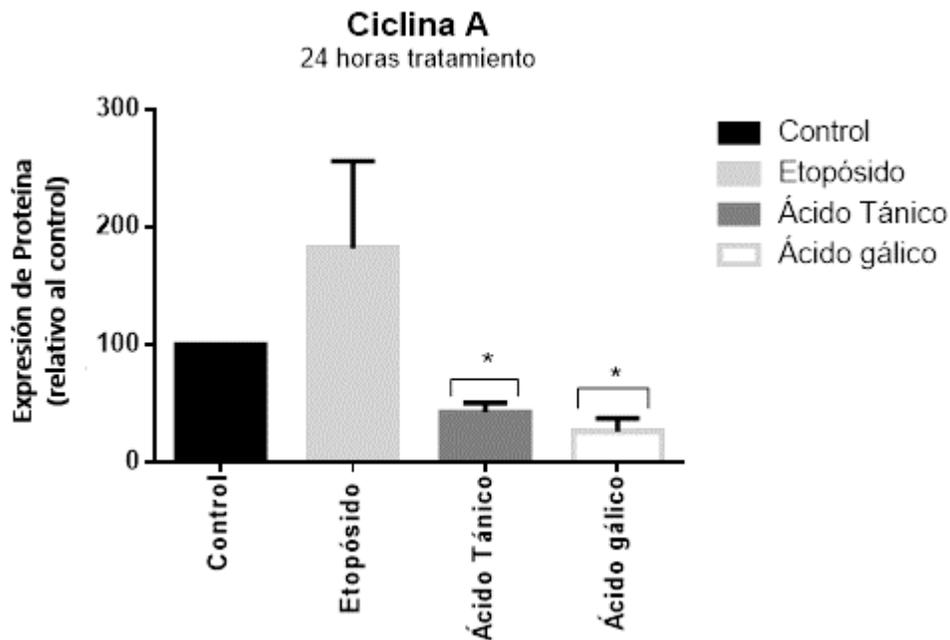


Figura 13. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de ciclina A en la línea celular de cáncer Hep3B. Después de un tratamiento de 24 horas. Etopósido (ETO) fue usado como control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparada con el grupo control negativo.

La ciclina B1 es la siguiente ciclina involucrada en la progresión de ciclo celular después de a ciclina A, dando paso a la fase M. En la figura 14 se observa la disminución de la expresión de esta ciclina en ambas condiciones de tratamiento con respecto al control. El análisis densitométrico muestra un cambio significativo y una expresión nula de la ciclina B1 después de ser tratada con ácido gálico (Figura 15).

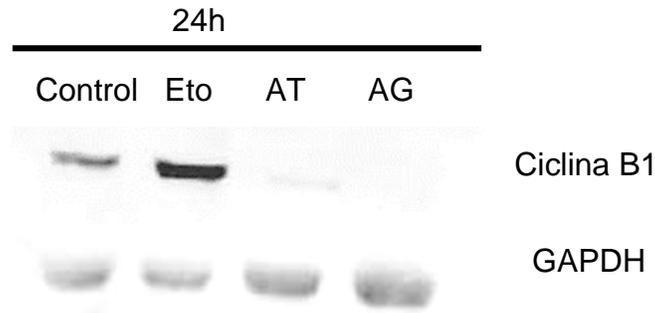


Figura 14. Análisis de western blot de ciclina B1 en células Hep3B a 24 horas de tratamiento con Etopósido (ETO), ácido tánico (AT) y ácido gálico (AG). Se muestra GAPDH como control de carga

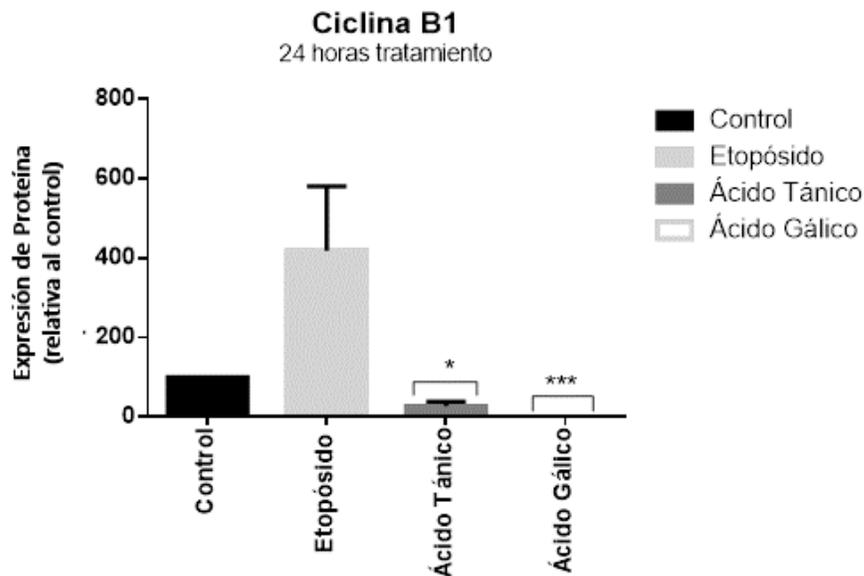


Figura 15. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de ciclina B1 en la línea celular de cáncer Hep3B. Después de un tratamiento de 24 horas. Etopósido (ETO) fue usado como control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparada con el grupo control negativo.

En las figuras 16 a 21 se observa la evaluación de ciclinas E, A y B1 a 48 horas de tratamiento, se observó que se sigue una tendencia similar a la observada a 24 horas de tratamiento en donde ácido gálico es la que induce una menor expresión de las tres ciclinas evaluadas, seguido del tratamiento con ácido tánico.

En la figura 16, el tratamiento con ácido gálico mostró una mayor inhibición de la ciclina E con respecto al control negativo, sin embargo, se observa que ácido tánico también causa una disminución importante en dicha ciclina.

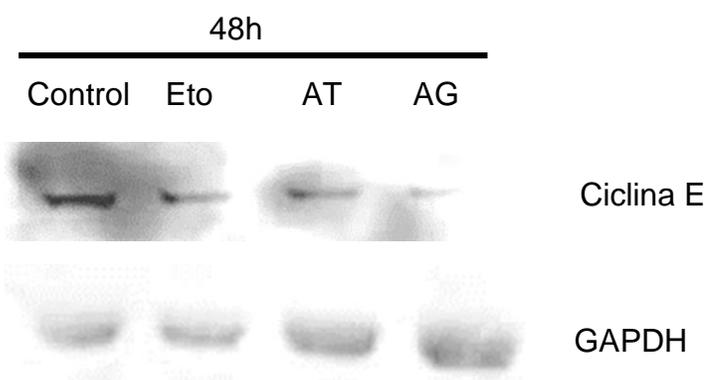


Figura 16. Análisis de western blot de ciclina E en células Hep3B a 48 horas de tratamiento con Etopósido (ETO), ácido tánico (AT) y ácido gálico (AG). Se muestra GAPDH como control de carga

El análisis de densitometría de la expresión relativa de proteína (Figura 17) muestra una disminución significativa en la expresión de ciclina E con respecto al control negativo después de los tratamientos con ácido gálico y ácido tánico a 48 horas.

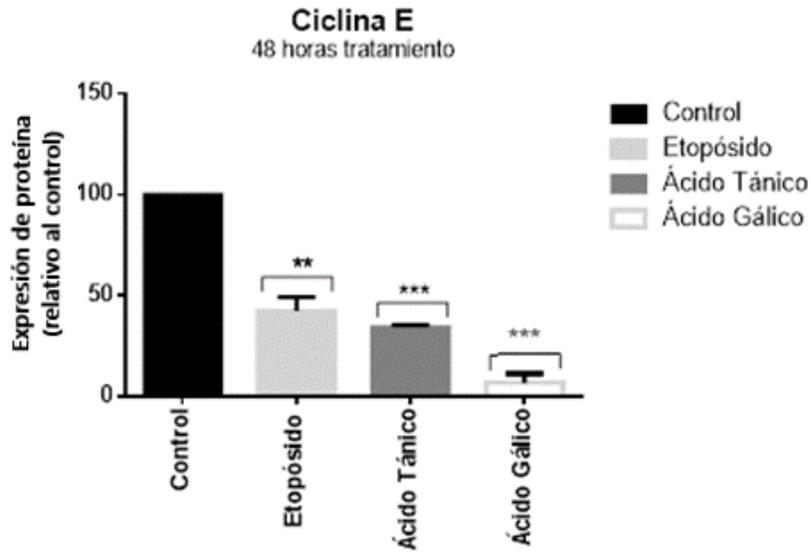


Figura 17. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de ciclina E en la línea celular de cáncer Hep3B. Después de un tratamiento de 48 horas. Etopósido (ETO) fue usado como control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparada con el grupo control negativo.

En la figura 18 se muestra el efecto sobre Ciclina A, ciclina involucrada en fase S del ciclo celular, a 48 horas de tratamiento. Se observó que ácido gálico es el que tiene una mayor disminución de ciclina A que el ácido tánico.

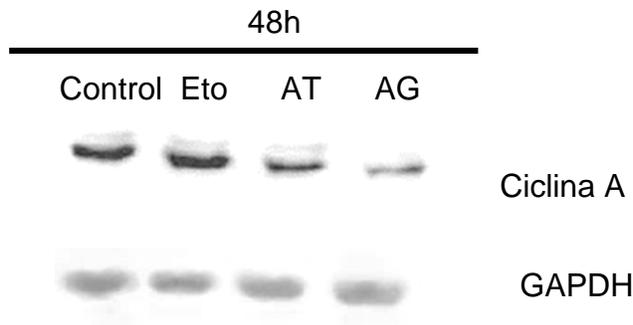


Figura 18. Análisis de western blot de ciclina A en células Hep3B a 48 horas de tratamiento con Etopósido (ETO), ácido tánico (AT) y ácido gálico (AG). Se muestra GAPDH como control de carga.

En la figura 19 el análisis estadístico muestra un cambio significativo en la expresión relativa de ciclina A después de su tratamiento con ácido gálico y ácido tánico a 48 horas.

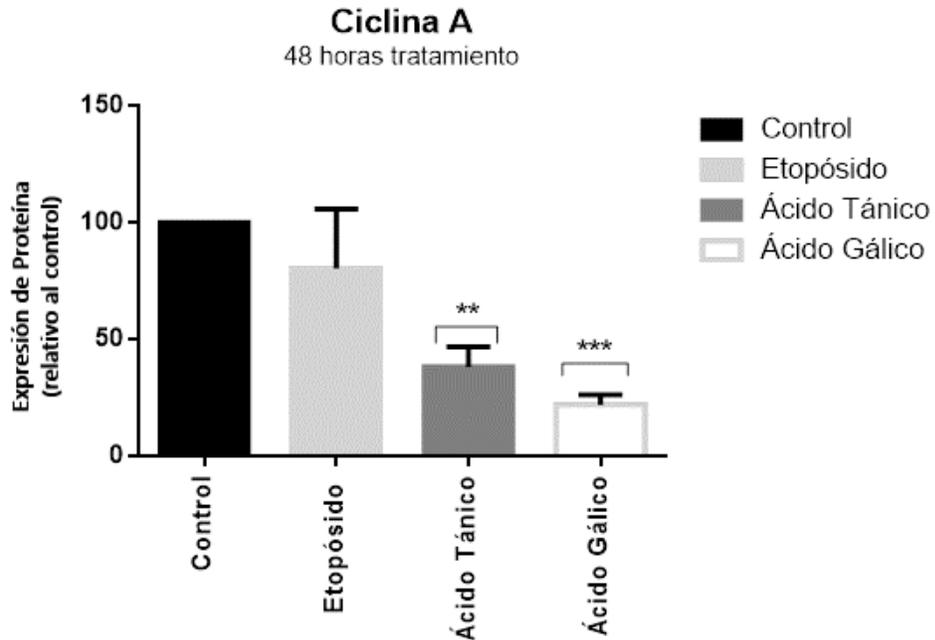


Figura 19. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de ciclina A en la línea celular de cáncer Hep3B. Después de un tratamiento de 48 horas. Etoposido (ETO) fue usado como control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparada con el grupo control negativo.

Finalmente, el efecto observado a 48 horas de tratamiento sobre ciclina B1 fue importante, pues tanto ácido gálico como ácido tánico causan una disminución casi total en la expresión de esta ciclina, el resultado se observa en la Figura 20 y en la Figura 21 se tiene el análisis estadístico.

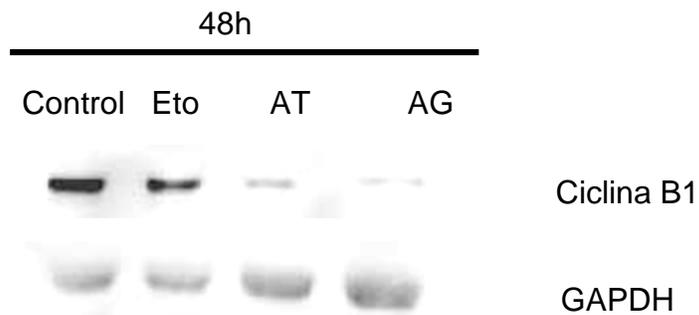


Figura 20. Análisis de western blot de ciclina B1 en células Hep3B a 48 horas de tratamiento con Etopósido (ETO), ácido tánico (AT) y ácido gálico (AG). Se muestra GAPDH como control de carga

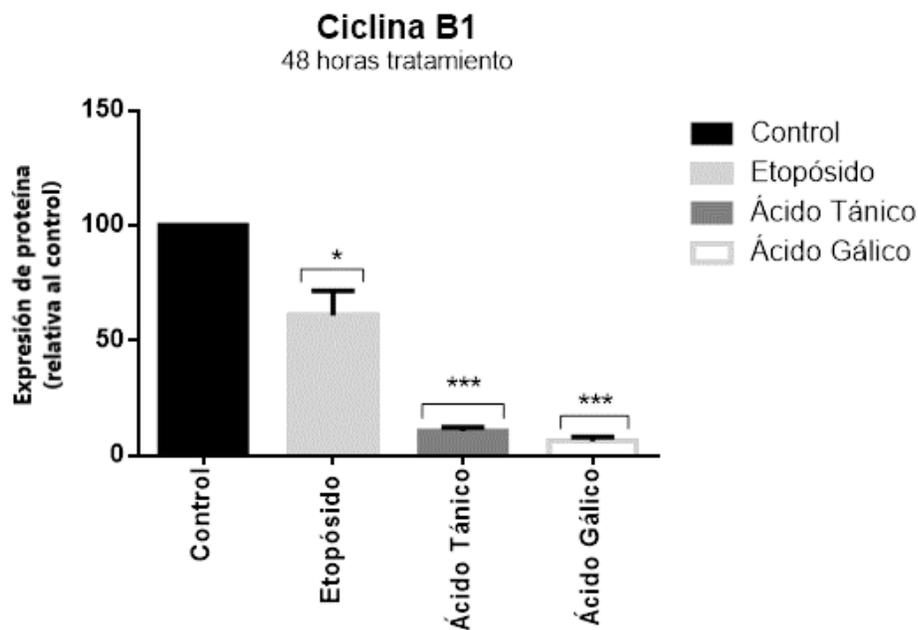


Figura 21. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de ciclina B1 en la línea celular de cáncer Hep3B. Después de un tratamiento de 48 horas. Etopósido (ETO) fue usado como control. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 comparada con el grupo control negativo.

8.3 Expresión de los inhibidores p21 y p53 por western blot

En la figura 22 se muestra la expresión de p53 y p21 en células Hep3B después de un tratamiento de 24 horas con ácido gálico y ácido tánico.

No se observa expresión de p53 después del tratamiento con ácido gálico y ácido tánico induce una disminución significativa en la expresión de p53, mientras que, por otro lado, no se observa cambio significativo en la expresión de p53 después del tratamiento con etopósido (figura 23). La expresión de p21 se ve disminuida con respecto al control después de los tratamientos usados (figura 24) En la bibliografía consultada se ha reportado que las células hep3B son deficientes de p53.

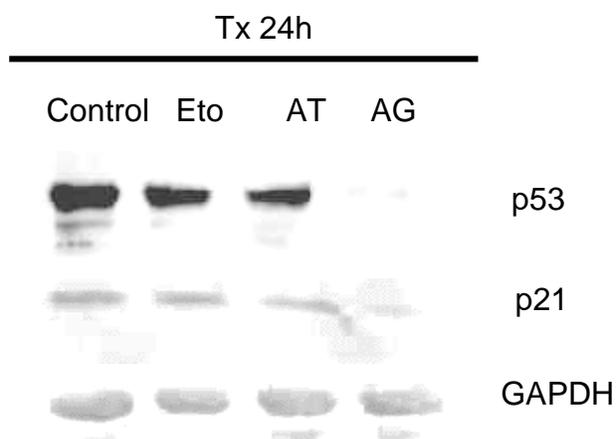


Figura 22. Análisis de western blot del inhibidor p53 y p21 en células Hep3B a 24 horas de tratamientos con Etopósido (ETO), ácido tánico (AT) y ácido gálico (AG). Se muestra GAPDH como control de carga.

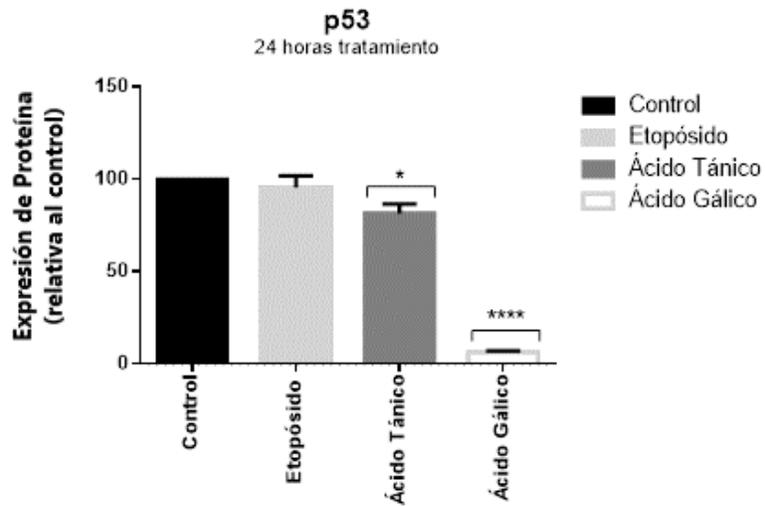


Figura 23. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de p53 en la línea celular de cáncer Hep3B. Después de un tratamiento de 24 horas. Etopósido (ETO) fue usado como control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparada con el grupo control negativo.

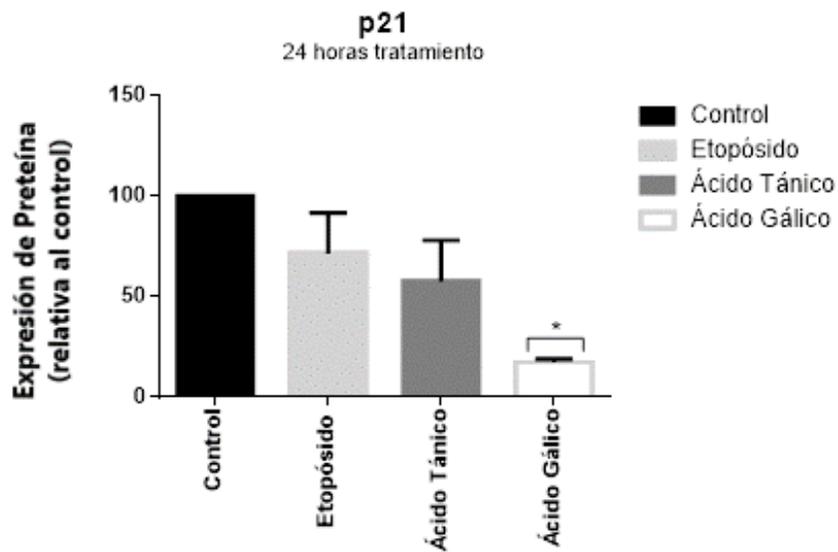


Figura 24. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de p21 en la línea celular de cáncer Hep3B. Después de un tratamiento de 24 horas. Etopósido (ETO) fue usado como control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparada con el grupo control negativo.

Mientras que a 48 h de tratamiento tanto en western blot como en el análisis estadístico no se observa cambio en la expresión de p53 después de los tratamientos (figura 25 y 26), por otro lado, p21 muestra cambios estadísticamente significativos en la expresión (figura 27).

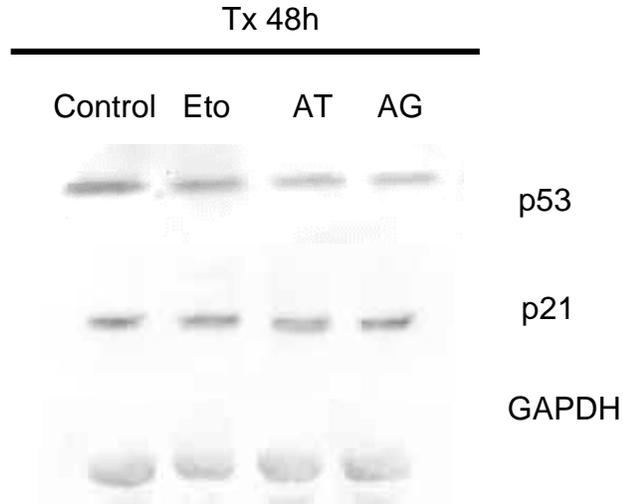


Figura 25. Análisis de western blot del inhibidor p53 y p21 en células Hep3B a 48 horas de tratamiento con Etopósido (ETO), ácido tánico (AT) y ácido gálico (AG). Se muestra GAPDH como control de carga

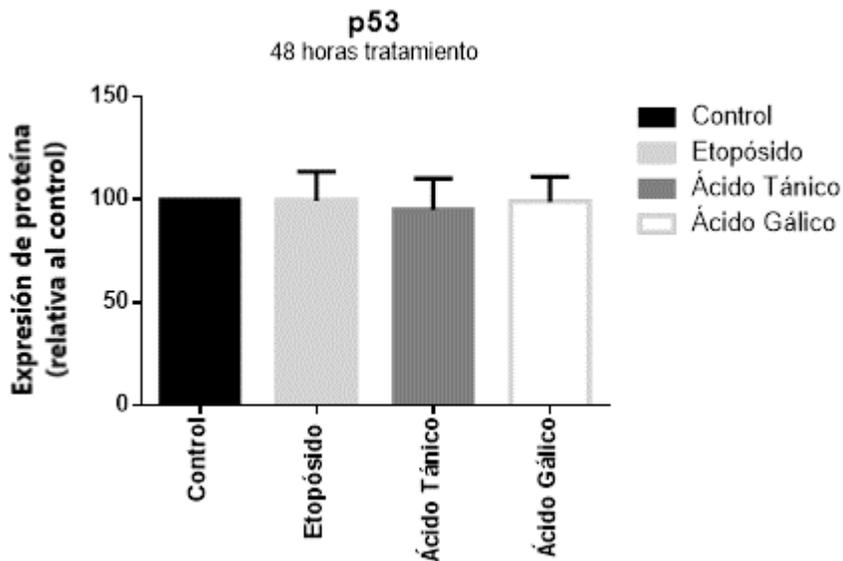


Figura 26. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de p53 en la línea celular de cáncer Hep3B. Después de un tratamiento de 48 horas. Etopósido (ETO) fue usado como control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparada con el grupo control negativo.

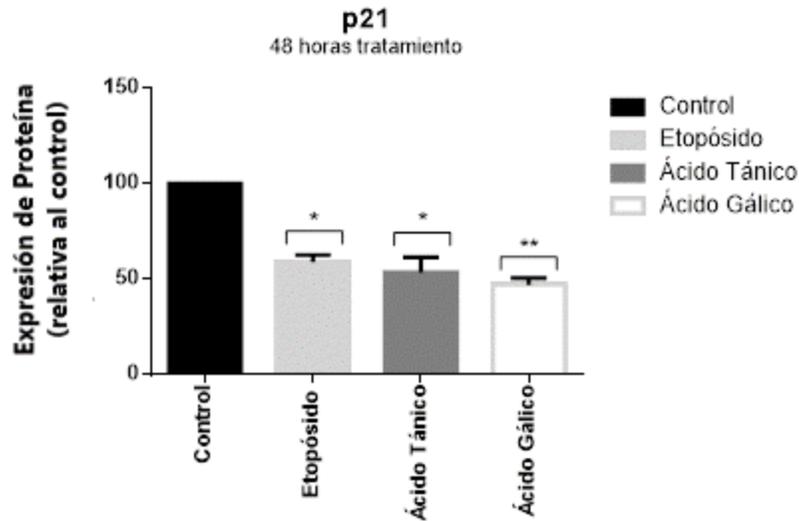


Figura 27. Expresión relativa de proteína por efecto de los compuestos ácido gálico (AG) y ácido tánico (AT) sobre la expresión relativa de p21 en la línea celular de cáncer Hep3B. Después de un tratamiento de 48 horas. Etopósido (ETO) fue usado como control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparada con el grupo control negativo.

9. DISCUSIÓN

El ácido gálico y ácido tánico son metabolitos secundarios de tipo fenólico producidos por diferentes plantas y se encuentran en una variedad de alimentos de consumo diario, previamente se ha identificado su potencial como agentes anticancerígenos en diferentes líneas celulares (Sánchez Carranza et al., 2017; Guojun Sun et al., 2016; Russell et al., 2012; Faried et al., 2007).

En nuestro grupo de trabajo un estudio previo mostró la actividad antiproliferativa y proapoptótica de compuestos fenólicos como ácido tánico y ácido gálico, además se observó mediante el análisis del ciclo celular que dichos compuestos causan arresto en la fase S del ciclo celular en células de carcinoma hepatocelular Hep3B al ser tratadas por 72 horas (Sánchez Carranza et al., 2017). Los resultados anteriores pretenden elucidar el mecanismo de acción de dicho efecto. Y sugieren que el mecanismo por el cual ácido gálico y ácido tánico ejercen su efecto anticancerígeno puede deberse a un arresto en la fase S del ciclo celular debido a modificaciones en la expresión de moléculas responsables de su progresión.

En el presente estudio, con el análisis de la progresión del ciclo celular se mostró un aumento en el número de células presentes en la fase S después de ser tratadas con ácido tánico por 24 h a su respectiva IC_{50} . Sin embargo, ácido gálico no mostró un cambio significativo con respecto al control. Modificaciones en la progresión del ciclo celular como las mostradas en este trabajo, han sido observada en diferentes líneas celulares por efecto de compuestos fenólicos de origen natural, por mencionar un caso, en un estudio se evaluó el compuesto hidroxitirosol, un polifenol presente en hojas de oliva, se evaluó sobre células de cáncer de mama MCF-7 y los investigadores observaron una modificación en la progresión del ciclo celular, un arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular y como consecuencia una disminución de la ciclina D, proteína clave de la fase G1 (Zouhaier et al., 2012) . Por otro lado, el resveratrol, un conocido compuesto fenólico presente en las uvas y en vino tinto, ha mostrado causar alteraciones en la distribución del ciclo celular en líneas celulares cancerígenas de diferentes tipos. Por mencionar un caso en células de cáncer de pulmón A549 se observó que el resveratrol induce alteración en ciclo celular al causar un arresto en la fase G0/G1 de la célula después de un tratamiento de 48 horas (Long et al., 2015). También se ha observado el efecto sobre ciclo celular en líneas de cáncer de próstata, se ha demostrado que resveratrol bloquea la progresión del ciclo celular en la fase G1/S en células C4-2B y en G2/M para las células DU145 (Santosh et al., 2017).

El ácido elágico ha mostrado tener un efecto similar al observado en nuestros resultados pues en células de cáncer de mama MCF-7 dicho polifenol inhibe la proliferación celular mediante un arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 (Hong et al., 2015). De manera similar en células de carcinoma de ovario ES-2 y PA-1 se observa que la distribución del ciclo celular en la fase G1 incrementa al ser tratadas con ácido elágico (Yuan et al., 2013).

Por otro lado, la disminución en la expresión de reguladores del ciclo celular, ciclinas E, A y B1, explican el arresto observado en fase S, para los tratamientos con ácido tánico. Durante la progresión del ciclo celular están involucradas diferentes moléculas como las ciclinas que se encargan de permitir la transición de una fase a otra, dichas moléculas son específicas de cada fase del ciclo celular (Vermeulen et al., 2003). En este trabajo se evaluó la expresión de las ciclinas E, A y B1. Por su parte, es bien sabido que la ciclina E desempeña un papel importante en la transición de la fase G1 a la fase S, mientras que la ciclina A es necesaria durante la fase S y promueve la entrada en M cuando se está finalizando la fase G2 y finalmente la ciclina B regula la mitosis (Meeran et al., 2008; Vermeulen et al., 2003; Park et al., 2003; Graña et al., 1995). Nuestros resultados muestran

una disminución en la ciclina E y A con respecto al control de las células tratadas a 24 h con ambos compuestos fenólicos y una ausencia de la expresión de ciclina B1, lo cual nos sugiere que al disminuir la expresión de la ciclina A que da continuidad al ciclo de la fase S a la fase G2, se está causando un arresto en fase S y por lo tanto, al no pasar a la fase G2/M, no se expresa ciclina B1, la cual está involucrada en dichas fases, llevando de este modo a una muerte celular. Este efecto se observó sostenido cuando las células fueron tratadas a sus respectivas IC₅₀ por un tiempo de 48 h, la distribución del ciclo celular mostró un aumento en el número de células presentes en fase S para ácido tánico particularmente, ácido gálico nuevamente no presentó a este tiempo de tratamiento un aumento significativo con respecto al control en algunas de las fases del ciclo celular. Sin embargo, en la expresión de las ciclinas si se observó una disminución en las ciclinas A y E, así como una inhibición casi total en la expresión de la ciclina B1. En diferentes estudios se ha demostrado este mismo efecto de ácido gálico y ácido tánico sobre los reguladores del ciclo celular de diferentes líneas celulares; en células de carcinoma de próstata DU145 ácido gálico causa un arresto en la fase S del ciclo celular a 6 h y 12 h de tratamiento y arresto en G2/M tras un tratamiento de 24 horas al evaluar la distribución del ciclo celular y una disminución de la expresión de ciclinas D1, D3, A y B1 (Agarwal et al., 2006); por otro lado, en células humanas del cáncer de vejiga urinaria (TSGH-8301) ácido gálico causa un arresto del ciclo celular en la fase G2/M del ciclo y una disminución en la expresión de la ciclina B1 (Chung et al., 2018); en células HL-60 de leucemia promielocítica humana al examinar su distribución celular después de un tratamiento de 24 h se observó un arresto en la fase G0/G1 del ciclo mientras que los niveles de ciclinas D1 / 2 / 3 y E disminuyeron en el tratamiento (Ru-Duan et al., 2011). Proponiendo con estos resultados el posible mecanismo de acción de ácido gálico y ácido tánico.

Por otro lado, compuestos fenólicos de origen natural como el resveratrol han mostrado causar alteraciones en la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular como las ciclinas e inhibidores de las ciclinas. En células de cáncer de próstata (C4-2B) se observó que el resveratrol favorecía un incremento en la expresión de p53, p21 y p27, así como una inhibición en la expresión de ciclina D1, explicando de este modo el efecto anticancerígeno del resveratrol (Santosh et al., 2017). Del mismo modo, se ha observado que el ácido elágico causa un arresto celular en la fase G1 del ciclo en células de carcinoma de ovario ES-2 y PA-1, al examinar las proteínas controladoras del ciclo se demostró que la expresión de las ciclinas B1, D1 y E se modificaba después del tratamiento con ácido elágico (Yuan et al., 2013).

Basándose en nuestros resultados sobre la expresión de moduladores del ciclo celular, estos efectos podrían conducir a la detención de la fase S en células Hep3B tratadas con ácido gálico y particularmente con ácido tánico. Los resultados de citómetro de flujo obtenidos en el análisis del ciclo celular se observó que para los tratamientos de ácido tánico se presentaba un aumento significativo del número de células en la fase S del ciclo celular después de ser tratadas a su IC_{50} a 24 y 48 horas de tratamiento, efecto explicado por la disminución de ciclinas involucradas en dicha fase del ciclo. Este efecto se ha observado en otras líneas celulares como células cancerosas gingivales YD-38, donde tras un tratamiento con ácido tánico se observaba un arresto en fase G1/S del ciclo, así como una disminución en sus ciclinas D1 y E correspondientes a esa fase del ciclo (Pramod et al., 2015); en diferentes líneas celulares de cáncer de próstata (C4-2, DU145, PC-3) se observó un arresto en la fase G1 del ciclo celular así como una disminución de los modulares de ciclina D1 (Prashanth et al., 2018). Por otro lado, ácido gálico no mostró arresto en ninguna fase del ciclo celular a los tiempos y concentraciones empleadas, sin embargo, en estudios previos se ha observado que ácido gálico causa arresto del ciclo celular en la fases S del ciclo celular de células Hep3B a 72 horas de tratamiento a su IC_{50} correspondiente (Sánchez Carranza et al., 2017), por lo que es probable que el efecto de la inhibición del ciclinas E, A y B1 sea el inicio de dicho arresto a 24 y 48 horas y que el efecto de paro en el ciclo celular sea evidente solo hasta las 72 horas de tratamiento, así como la modificación de la expresión de ciclinas involucradas sea más evidente en dichas condiciones. Cabe mencionar que, si bien no se observa un cambio estadísticamente significativo sobre el arresto celular en la fase S del ciclo celular en las evaluaciones por citometría del tratamiento con ácido gálico, si podemos observar una tendencia donde se observa un aumento en la población celular en fase S del ciclo, ante tal panorama se propone evaluar las ciclinas a un tratamiento de 72 h de tratamiento a su IC_{50} de ácido gálico correspondiente.

El ciclo celular es regulado por varias moléculas; además de las ciclinas, los inhibidores de quinasa dependientes de ciclinas son otra forma de control sobre la progresión del ciclo celular. Es sabido que los inhibidores de quinasa dependientes de ciclinas regulan negativamente la actividad de los complejos ciclinas-CDK al asociarse con la CDK correspondiente y evitar la asociación con su ciclina, impidiendo de este modo la progresión del ciclo celular (Meeran et al., 2008; Vermeulen et al., 2003; Park et al, 2003).

En el presente trabajo en la búsqueda del mecanismo de acción de los compuestos fenólicos ácido gálico y ácido tánico se realizó la evaluación de la expresión de dos de estas moléculas, p53 y p21.

Es bien sabida la importancia que juega p53 en la protección contra el desarrollo del cáncer como proteína supresora de tumores (Vousden et al., 2007), además de ser la responsable de activar o reprimir transcripcionalmente muchos genes diana (~200) para iniciar diversas respuestas celulares, dentro de dichos genes diana se encuentra p21 (Valente et al., 2013; Vousden et al., 2007). Estudios recientes han demostrado que la expresión de proteínas como p53 y p21 se ve modificada cuando el ciclo celular sufre alteraciones debido al tratamientos de compuestos fenólicos de origen natural. Por mencionar un caso, el ácido elágico causa arresto en la fase G1 del ciclo celular y modificaciones de las proteínas reguladoras del ciclo como la ciclina B1, D1 y E en células de carcinoma de ovario (ES-2 y PA-1), en este estudio se observó que el ácido elágico causa un incremento en la expresión de las proteínas p53 y p21, asociando de este modo el efecto inhibitorio del crecimiento de acción de dicho compuesto sobre las líneas celulares mencionadas (Yuan et al., 2013). Un efecto similar se ha observado en células de cáncer de próstata (C4-2B y DU-145) al ser tratadas con resveratrol, en donde la expresión de los inhibidores de ciclo celular p21 y p53 se ven modificadas al alza (Santosh et al., 2017). Un estudio publicado en 2018, se evaluaron dos compuestos fenólicos, octil galato y ácido gálico en células de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), en donde se observó una regulación al alza de los inhibidores del ciclo celular p18, p21 y p27, asociado al efecto antiproliferativo de dichos compuestos (Sales et al., 2018).

En los resultados obtenidos se observó un cambio significativo a la baja en la expresión de p53, inducido tanto por ácido gálico como por ácido tánico a 24 horas de tratamiento, mientras que a 48 horas de tratamientos no se observó cambio significativo en la expresión de dicha proteína, sugiriendo así que p53 no juega un papel relevante en la alteración del ciclo celular por efecto de los compuestos fenólicos evaluados sobre la línea celular Hep3B. Además, en algunos estudios han demostrado que las células Hep3B son nulas de p53 y que la regulación del ciclo celular podría estar dada alguna otra vía celular independiente de p53 (Liou et al., 2017; Lin et al., 2014; Ahn et al., 2002).

Por otro lado, en los resultados obtenidos se observó una disminución en la expresión de p21 después de ambos tratamientos usados a los tiempos evaluados, lo cual nos lleva a pensar que las modificaciones en el ciclo celular debido a dichos tratamientos pudiesen, además, deberse a la expresión de otros inhibidores involucrados en la fase S del ciclo celular como son p27 (Meeran et al., 2008; Vermeulen et al., 2003; Park et al., 2003), y que la expresión de p21 observada podría indicar que ácido gálico y ácido tánico lo expresan en respuesta a estímulos celulares desencadenados vía independiente de p53, debido a que según la bibliografía p53 en células Hep3B es nulo, lo cual nos lleva a indagar en otros probables blancos terapéuticos.

10. CONCLUSIONES

Los cambios en la expresión de los reguladores del ciclo celular como las ciclinas tienen un efecto importante sobre para la progresión del ciclo celular en las células Hep3B.

Ácido tánico causa un arresto en fase S del ciclo celular después de su tratamiento a 24 y 48 horas a su IC_{50} correspondiente.

En células Hep3B ácido gálico y ácido tánico tienen efecto en la disminución de la expresión de reguladores del ciclo celular ciclinas A, E y B1, lo cual sugiere el arresto en fase S observado en la distribución del ciclo celular.

La expresión a la baja de p21 y p53 en células Hep3B, sugiere que no está involucrado en el efecto sobre la distribución del ciclo celular causado por el tratamiento por ácido gálico y ácido tánico.

11. Perspectivas

Evaluar el efecto de los compuestos ácido gálico y ácido tánico sobre el inhibidor de ciclo celular p27 a 24 h, 48 h y 72 h.

Hacer tratamientos con ácido gálico y ácido tánico a 72 horas para observar el efecto sobre la expresión de ciclinas E, A y B1.

Evaluar el efecto de los compuestos ácido gálico y ácido tánico sobre la distribución del ciclo celular a 72 h de tratamiento.

REFERENCIAS

Agarwal Chapla, Tyagi Alpna, and Agarwal Rajesh. Gallic acid causes inactivating phosphorylation of cdc25A/cdc25C-cdc2 via ATM-hk2 activation, leading to cell cycle arrest, and induces apoptosis in human prostate carcinoma DU145 cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006;5(12): 3294 - 3302.

Ahn Ji Young, Young Jung Eun, Kwun Hyun Jin, Lee Chang-Woo, Sung Young-Chul and Jang Kyung Lib. Dual effects of hepatitis B virus X protein on the regulation of cell-cycle control depending on the status of cellular p53. *Journal of General Virology*. 2002; 83: 2765–2772

Andrew K. Joe, Hui Liu, Masumi Suzui, Muhammet E. Vural, Danhua Xiao, and I. Bernard Weinstein. Resveratrol Induces Growth Inhibition, S-phase Arrest, Apoptosis, and Changes in Biomarker Expression in Several Human Cancer Cell Lines. *Clinical Cancer Research*. 2002; 8: 893–903.

Boscha F.Xavier, Ribes Josepa, Díaz Mireia, Clériesa Ramon. Primary liver cancer: Worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*. 2004; 127(5): S5- S16.

Chung-Chia Liao, Shu-Chun Chen, Hui-Pei Huang, Chau-Jong Wang. Gallic acid inhibits bladder cancer cell proliferation and migration via regulating fatty acid synthase (FAS). *Journal of food and drug analysis*. 2018; 26: 620 – 627.

Faried A., Kurnia D., Faried L.S., Usman N., Miyazaki T., Kato H. and Kuwano H. Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. *International Journal of Oncology*. 2007; 30: 605-613

Feng Yan, Zhang Haili, Gao Wei, Wen Shuxin, Huangfu Hui, Sun Ruifang, Bai Wei and Wang Binqun. Expression of DNA topoisomerase II- α : Clinical significance in laryngeal carcinoma. *Oncol Lett*. 2014; 8(4): 1575–1580.

Forner Alejandro, Reig María, Varela María, Burrel Marta, Feliu Jaime, Briceno Javier, Sastre Javier, Martí-Bonmati Luis, Llovet Josep María, Bilbao José Ignacio, Sangro Bruno, Pardo Fernando, Ayuso Carmen, Brud Concepción, Tabernero Josep y Bruix Jordi. Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular. Actualización del documento de consenso de la AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI y SETH. *Medicina Clinica*. 2016; 146(11): 511.e1-511.e22.

Graña Xavier, Reddy E. Premkumar. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene*. 1995; 11: 211 – 219.

Goswami Prabhat C., Roti Roti Joseph L. and Hunt Clayton R. The Cell Cycle-Coupled Expression of Topoisomerase IIa during S Phase Is Regulated by mRNA Stability and Is Disrupted by Heat Shock or Ionizing Radiation. *Molecular and Cellular Biology*. 1996; 16(4): 1500–1508

Guojun Sun, Shuqin Zhang, Yanru Xie, Ziyu Zhang and Wenjing Zhao. Gallic acid as a selective anticancer agent that induces apoptosis in SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Letters*. 2016; 11(1): 150–158.

Hong-Sheng Chen, Ming-Han Bai, Tao Zhang, Guo-Dong Li, Ming Liu. Ellagic acid induces cell cycle arrest and apoptosis through TGF- β /Smad3 signaling pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *International Journal of Oncology*. 2015: 46(4); 1730-1738

Hsiang-Lin Lee; Chun-Shiang Lin; Shao-Hsuan Kao; Ming-Chih Chou. Gallic acid induces G1 phase arrest and apoptosis of triple-negative breast cancer cell MDA-MB-231 via p38 mitogen-activated protein kinase/p21/p27 axis. *Anti-Cancer Drugs*. 2017: 28(10);1150–1156

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. WHO. The Global Cancer Observatory (GCO). 2018 <http://gco.iarc.fr/today/data/pdf/fact-sheets/cancers/cancer-fact-sheets-7.pdf>

Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., and Pezzuto, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science (Wash. DC)*, 275: 218–220, 1997.

Liu YP, Chen HL, Tzeng CC, Lu PJ, Lo CW, Lee YC, Tseng CH, Chen YL, Yang CN. TCH-1030 targeting on topoisomerase I induces S-phase arrest, DNA fragmentation, and cell death of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2013: 138(2):383-93

Lin Weiping and Tongyi Sun. Role of Bax/Bcl-2 family members in green tea polyphenol induced necroptosis of p53-deficient Hep3B cells. *Tumor Biol*. 2014; 35(8): 8065–8075

Liou An-Ting, Chen Mei-Fang and Yang Chu-Wen. Curcumin Induces p53-Null Hepatoma Cell Line Hep3B Apoptosis through the AKT-PTEN-FOXO4 Pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2017: 1-12

LONG YUAN, YONGRONG ZHANG, JUAN XIA, BIN LIU, QINGYU ZHANG, JIE LIU, LIMING LUO, ZHOU PENG, ZEQING SONG, and RUNZHI ZHU2. Resveratrol induces cell cycle arrest via a p53-independent pathway in A549 cells. *Mol Med Rep*. 2015; 11(4): 2459–2464.

Maheshwari Rajalekshmi, Shastry Shreedhara Chandrashekara, Rao Polu Picheswara, Suresh Managuli Renuka, Kanniparambil Xavier Seenaa, Lobo Richard, Setty Manjunath, and Mutalik Srinivas. Characterization of the Phenolic Compound, Gallic Acid from *Sansevieria roxburghiana* Schult and Schult. f. Rhizomes and Antioxidant and Cytotoxic Activities Evaluation. *Pharmacogn Mag*. 2017; 13 (3): S693–S699.

Meeran Syed Musthapa and Kumar Katiyar Santosh. Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. *Front Biosci*. 2008; 13: 2191–2202.

McDonald ER, El-Deiry WS. Cell cycle control as a basis for cancer drug development. *Int J Oncol*. 2000; 16:871–886.

Mohar Betancourt Alejandro, Reynoso-Noverón Nancy, Armas-Texta Daniel, Gutiérrez-Delgado Cristina, Torres Domínguez Juan A. Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies. 2017; 3(6): 740-748.

National Institute of Public Health: General direction of information on health: Dynamic cubes—Mortality 1998 to 2013.

New Global Cancer Data: GLOBOCAN 2018. <https://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018>

Norbury Chris, Nurse Paul. Animal cell cycles and their control. *Ann Rev Biochem* 1992; (61):441–470.

Park Moon-Taek and Lee Su-Jae. Cell Cycle and Cancer. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2003; 36(1): 60 – 65.

Pramod Darvin Seung Jo Baeg Youn Hee Joung Nipin Sp Dong Young Kang Hyo Joo Byun Je Uk Park Young Mok Yang. 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*. 2015; 47: 1111-1120

Prashanth K.B. Nagesh, Elham Hatami, Pallabita Chowdhury, Vivek K. Kashyap, Sheema Khan, Bilal B. Hafeez, Subhash C. Chauhan, Meena Jaggi and Murali M. Yallapu. Tannic Acid Induces Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis in Prostate Cancer. *Cancers*. 2018; 10 (68): 1-17.

Ru-Duan Yeh, Jung-Chou Chen, Tung-Yuan Lai, Jai-Sing Yang, Chun-Shu Yu, Jo-Hua Chiang, Chi-Cheng Lu, Su-Tso Yang, Chien-Chih Yu, Shu-Jen Chang, Hui-Yi Lin and Jing-Gung Chung. Gallic Acid Induces G0/G1 Phase Arrest and Apoptosis in Human Leukemia HL-60 Cells through Inhibiting Cyclin D and E, and Activating Mitochondria-dependent Pathway. *Anticancer Research*. 2011; 31 (9); 2821-2832

Russell Larry H. Jr, Mazzio Elizabeth, Badisa Ramesh B., Zhu Zhi-Ping, Agharahimi Maryam, Oriaku Ebenezer T. and Goodman Carl B. Autoxidation of Gallic Acid Induces ROS-dependent Death in Human Prostate Cancer LNCaP Cells. *Anticancer Research*. 2012; 32 (5): 1595-1602.

Sales Mary Selesty, Roya Anita, Antony Ludas, Banu Sakhila K., Jeyaraman Selvaraj, Manikkam Rajalakshmi. Octyl gallate and gallic acid isolated from *Terminalia bellarica* regulates normal cell cycle in human breast cancer cell lines. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018; 103: 1577-1584.

Sánchez-Carranza JN, Alvarez L, Marquina-Bahena S, Salas-Vidal E, Cuevas V, Jiménez EW, Veloz G RA, Carraz M, González-Maya L. 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*. 2017; 22;22(4).

Santosh Kumar Singh, Saswati Banerjee, Edward P. Acosta, James W. Lillard, Rajesh Singh. Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis with docetaxel in prostate cancer cells via a p53/ p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 pathway. *Oncotarget*. 2017; 8(10): 17216-17228

Scotti Luciana, Bezerra Mendonça, Jr. Francisco Jaime, Fávoro Ribeiro Frederico, Fachine Tavares Josean, Sobral da Silva Marcelo, Barbosa Filho José Maria and Tullius Scotti

Marcus. Natural Product Inhibitors of Topoisomerases: Review and Docking Study. *Current Protein and Peptide Science*. 2018; 19: 275-291

Shu-Chun Chuanga, Carlo La Vecchia, Paolo Boffetta. Liver cancer: Descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection. *Cancer Letters*. 2009; 286(1): 9 -14.

Simo Tagne Richard, Phelix Telefo Bruno, Noel Nyemb Jean, Mefokou Yemele Didiane, Nguedia Njina Sylvain, Chekem Goka Stéphanie Marie, Lienou Landry Lienou, Nwabo Kamdje Armel Hervé, Fewou Moundipa Paul, Dar Farooq Ahsana. Anticancer and antioxidant activities of methanol extracts and fractions of some Cameroonian medicinal plants. *Asian Pac J Trop Med*. 2014; 7(1): S442-S447

Singh Swati, Awasthi Manika, Pandey Veda P. and Dwivedi Upendra N. Natural Products as Anticancerous Therapeutic Molecules with Special Reference to Enzymatic Targets Topoisomerase, COX, LOX and Aromatase. *Current Protein and Peptide Science*. 2018; 19: 238-274

Singh Thakur Devendra. Topoisomerase II Inhibitors in cancer treatment. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 2011; 3(4): 1173 - 1181

Timofeev Oleg, Schlereth Katharina, I Wanzel Michae, Braun Attila, Nieswandt Bernhard, Pagenstecher Axel, Rosenwald Andreas, Elsässer Hans-Peter, Stiewe Thorsten. p53 DNA Binding Cooperativity Is Essential for Apoptosis and Tumor Suppression In Vivo. *Cell Reports*. 2013; 3: 1512–1525.

Valente Liz J, Gray Daniel H.D, Michalak Ewa M, Pinon-Hofbauer Josefina, Egle Alex, Scott Clare L, Janic Ana, Strasser Andreas. p53 Efficiently Suppresses Tumor Development in the Complete Absence of Its Cell-Cycle Inhibitory and Proapoptotic Effectors p21, Puma, and Noxa. *Cell Reports*. 2013; 3(5): 1339-1345.

Van den Heuvel, S. Cell-cycle regulation (September 21, 2005), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.28.1

Vermeulen Katrien, Van Bockstaele Dirk R. and Berneman Zwi N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 2003; 36: 131–149

Vousden Karen H. and Lane David P. p53 in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007: 8: 275–283.

Vousden, K.H., and Prives, C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. 2009; Cell 137: 413–431

Villman Kenneth, Ståhl Elisabeth, Liljegren Göran, Tidefelt Ulf, G. Karlsson Mats. Topoisomerase II- α Expression in Different Cell Cycle Phases in Fresh Human Breast Carcinomas. Mod Pathol. 2002;15(5):486–491

Yuan-Chiang Chung, Li-Cheng Lu, Ming-Hsiu Tsai, Yu-Jen Chen, Yi-Ying Chen, Shih-Ping Yao, and Chih-Ping Hsu. The Inhibitory Effect of Ellagic Acid on Cell Growth of Ovarian Carcinoma Cells. Evid Based Complement Alternat Med. 2013; 2013: 1 – 12.

Żabka Aneta, Polit Justyna Teresa, Bernasińska Joanna, Maszewski Janusz. DNA topoisomerase II-dependent control of the cell cycle progression in root meristems of *Allium cepa*. Cell Biology International. 2014; 38(3): 355-367

Zhao Tiejun, Sun Qiang, del Rincon Sonia V., Lovato Amanda, Marques Maud, Witcher Michael. Gallotannin Imposes S Phase Arrest in Breast Cancer Cells and Suppresses the Growth of Triple-Negative Tumors *In Vivo*. PLOS ONE. 2014; 9: 1-11.

Zouhaier Bouallagui, Junkuy Han, Hiroko Isoda, Sami Sayadi. Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. Food and Chemical Toxicology. 2012; 50(6): 2253

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Becerra Flores Mariana Yazmin

Título de la tesis: "Efecto de los compuestos ácido gálico y ácido tánico sobre la expresión de ciclinas E, A y B1 y reguladores del ciclo celular en células de carcinoma hepatocelular Hep3B"

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Verónica Rodríguez López

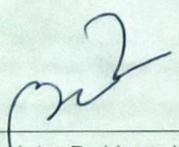
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Dra. Verónica Rodríguez López

Firma del miembro del jurado

4/Marzo/2019

Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Becerra Flores Mariana Yazmin

Título de la tesis: "Efecto de los compuestos ácido gálico y ácido tánico sobre la expresión de ciclinas E, A y B1 y reguladores del ciclo celular en células de carcinoma hepatocelular Hep3B"

Grado a obtener:

- X Maestría en Farmacia
Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza

Firma del miembro del jurado

04 Marzo 2019

Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Becerra Flores Mariana Yazmin

Título de la tesis: "Efecto de los compuestos ácido gálico y ácido tánico sobre la expresión de ciclinas E, A y B1 y reguladores del ciclo celular en células de carcinoma hepatocelular Hep3B"

Grado a obtener:

- X Maestría en Farmacia
Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. María Alexandra Rodríguez Sastre

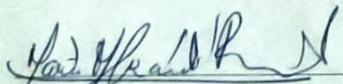
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____


Dra. María Alexandra Rodríguez Sastre
Firma del miembro del jurado

19.03.19.

Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Becerra Flores Mariana Yazmin

Título de la tesis: "Efecto de los compuestos ácido gálico y ácido tánico sobre la expresión de ciclinas E, A y B1 y reguladores del ciclo celular en células de carcinoma hepatocelular Hep3B"

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Julio Cesar Rivera Leyva

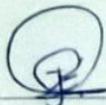
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Dr. Julio Cesar Rivera Leyva

Firma del miembro del jurado

4 Marzo 19

Fecha

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Becerra Flores Mariana Yazmin

Título de la tesis: "Efecto de los compuestos ácido gálico y ácido tánico sobre la expresión de ciclinas E, A y B1 y reguladores del ciclo celular en células de carcinoma hepatocelular Hep3B"

Grado a obtener:

- X Maestría en Farmacia
Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Laura Álvarez Bereber

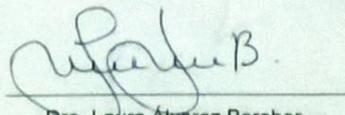
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Dra. Laura Álvarez Bereber

Firma del miembro del jurado

04/Marzo/2019

Fecha