UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

“Ácido gálico y galato de etilo en co-tratamiento con cisplatino, antineoplásico de referencia, en células de Carcinoma Pulmonar”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN FARMACIA

PRESENTA:

QFB MICHELLE ALEJANDRA MORENO ENRIQUEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. LETICIA GONZÁLEZ MAYA

CUERNAVACA, MORELOS **MARZO, 2025**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., a 26 de marzo del 2025
Folio: FF/CAM/OF/029/2025

QFB MICHELLE ALEJANDRA MORENO ENRÍQUEZ
ALUMNA DE LA MAESTRÍA EN FARMACIA

Por este medio le informo que la Comisión académica de Maestría en su Sesión ordinaria del 25 de marzo del 2025, designó a los siguientes sinodales como integrantes de la Comisión Revisora y Jurado para la revisión y evaluación de la tesis titulada: **"Ácido gálico y galato de etilo en co-tratamiento con cisplatino, antineoplásico de referencia, en células de Carcinoma Pulmonar".**

Sinodal		**Adscripción**
Presidente	Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa	CEIB-UAEM
Secretaria	Dr. Erick Ayala Calvillo	Facultad de Farmacia-UAEM
Vocal	Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara	CCG-UNAM
Suplente 1	Dr. Edgar Rangel López	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
Suplente 2	Dra. Leticia González Maya	Facultad de Farmacia-UAEM

Se le solicita entregar el presente oficio y manuscrito borrador de tesis a esta comisión, así como dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos. Además de dar seguimiento a la respuesta de los sinodales asignados, quienes tendrán que resolver de su aceptación o rechazo para formar parte de esta comisión y jurado dentro de un plazo de 5 días hábiles después de la entrega del presente oficio.

Nota (Art. 74 RGEP-UAEM): Los sinodales tendrán un plazo máximo de 20 días hábiles contados a partir de la recepción del documento de tesis para entregar los comentarios de la revisión y para emitir un voto aprobatorio o negatorio. En caso de condicionar el voto a la entrega de un documento en el que el tesista deberá solventar lo revisado, este contará con un plazo no mayor a 20 días hábiles, contados a partir de la notificación del primer dictamen emitido, para integrar las correcciones señaladas, una vez fenecido dicho plazo el sinodal emitirá el voto aprobatorio o negatorio que corresponda.

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta

efirma-UAEM
Dr. Germán Bernal Fernández
Jefe de Posgrado
Facultad de Farmacia

c.c.p Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa, Dr. Erick Ayala Calvillo, Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara, Dr. Edgar Rangel López, Dra. Leticia González Maya
c.c.p. Archivo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

GERMAN BERNAL FERNANDEZ | Fecha:2025-03-26 12:43:04 | FIRMANTE

khya6pwoqUhtNJlWm5CDU5y8v0ltx+12lG/bayGCAciT94/fzR2imwFldSQ1syhKt5/40ZHmy7jSBJt8iqP2385d5bH2wKeEmXscDL8vSXZxh+5XlUNypPj2h7rcqGJ1Mc2x2UfUzxXxb67XOgx+7qg/44cfAA4KXTLxwqZHndMdsJbxtvg1mKAnQGPrizD/gG4o5R5DKC1b8QtQFTPL2uvFxZoU1zES+LlgGLKhEshnYZt7fklDudknKsq5CKVKYS7j3qgHEZ/2nhwtO83mqLrJymEHKK3vGIeOB2nN9K5y/bwR5Cu5JoZc7TZxcuteY9uu9knFmKhzfQqrt9HDnw==

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

bIfvYMyca

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/23JRrvCS1StAofXvio34Rcig1wl1uJNf

DEDICATORIA

A mi esposo, Emilio, quien ha sido un gran apoyo en mi vida. Gracias por estar siempre a mi lado.

A mi suegra, Zonia, que es como una madre para mí. A quien dedico esta tesis como un pequeño agradecimiento por todo el apoyo emocional, económico y presencial que me ha brindado. Una mujer increíble y fácil de admirar.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Leticia González Maya, que ha sido una gran inspiración tanto como ser humano, como profesional. Le agradezco no solo el haberme aceptado en su laboratorio y guiado académicamente a través de estos dos años, sino también el apoyo que me brindó durante el embarazo y pérdida de mis hijos. Gracias por todo lo que ha hecho por nosotros, sin usted no hubiera sido posible mantenernos aquí.

A Melissa Hernández Uribe, quien me regaló de su tiempo para enseñarme todo lo que sé de cultivo celular.

A CONAHCYT por la beca otorgada bajo el CVU 1263483.

ÍNDICE

ABREVIATURAS ..... **VIII**

RESUMEN **1**

ABSTRACT **2**

INTRODUCCIÓN **3**

1. Antecedentes **4**

1.1 Cáncer 4
1.2 Epigenética del cáncer 5
1.3 Genética del cáncer 6
1.4 Epidemiología del cáncer 6
1.5 Carcinoma pulmonar 7
1.6 Terapia del carcinoma pulmonar 9
1.6.1 Cirugía 9
1.6.2 Radioterapia 10
1.6.3 Inmunoterapia 10
1.6.4 Quimioterapia 10
1.6.4.1 Cisplatino 11
1.7 Compuestos fenólicos 12
1.7.1 Ácido gálico 12
1.7.2 Galato de etilo 14
1.8 Co-tratamientos 15

2. Justificación **15**

3. Pregunta de investigación **15**

4. Hipótesis **16**

5. Objetivos **16**

5.1 Objetivo general 16
5.2 Objetivos específicos 16

6. Metodología **16**

6.1 Cultivo celular 17
6.2 Actividad citotóxica 17
6.3 Co-tratamientos 18
6.4 Muerte celular 19

7. Resultados **21**

7.1 Actividad citotóxica y co-tratamientos 21

7.2 Muerte celular 27
8. Discusión 31
9. Conclusiones 35
10. Perspectivas 35
BIBLIOGRAFÍA 36
ANEXOS 44
Anexo 1. Preparación de soluciones 44
Anexo 2. Espectros de los compuestos fenólicos AG y GE. 45
Anexo 3. Imágenes de los 10 campos. 46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje del cáncer de pulmón según su clasificación histológica. Fuente: elaboración propia con base en Schabath & Cote, 2019. 8
Figura 2. Representación de las cirugías disponibles para el cáncer de pulmón. Donde a) muestra un pulmón sin modificaciones, b) un pulmón con lobectomía y c) un pulmón con neumonectomía. Fuente: elaboración propia con base en Arrieta *et al*., 2013. 9
Figura 3. Estructura química del cisplatino (CDDP). Fuente: Sigma-Aldrich. 11
Figura 4. Esquema representativo del mecanismo de acción del cisplatino. Fuente: modificado de Cheng *et al*., 2021. 12
Figura 5. Estructura química del ácido gálico. Fuente: modificado de Wianowska & Olszowy-Tomczyk, 2023. 13
Figura 6. Estructura química del galato de etilo. Fuente: Liu *et al.,* 2019. 14
Figura 7. Representación del co-tratamiento entre la IC_{20}, IC_{40} o IC_{60} de los compuestos fenólicos (AG y GE) y las concentraciones decrecientes de cisplatino (CDDP). Fuente: elaboración propia. 19
Figura 8. Representación gráfica del co-tratamiento entre la IC_{20} del GE y el cisplatino (CDDP). Fuente: elaboración propia. 20
Figura 9. Comparación entre la IC_{50} del ácido gálico (AG), galato de etilo (GE) y cisplatino (CDDP) en células H1299, tras 48 h de tratamiento. 21
Figura 10. Comparación entre la IC_{50} del co-tratamiento de cisplatino (CDDP) con ácido gálico (AG) y galato de etilo (GE) en concentraciones de IC_{20} (1 y 5 µg/mL, respectivamente), a 48 h de tratamiento. 22
Figura 11. Comparación entre la IC_{50} del co-tratamiento de cisplatino (CDDP) con ácido gálico (AG) y galato de etilo (GE) en concentraciones de IC_{40} (1.6 y 12 µg/mL, respectivamente), a 48 h de tratamiento. 23
Figura 12. Comparación entre la IC_{50} del co-tratamiento de cisplatino (CDDP) con ácido gálico (AG) y galato de etilo (GE) en concentraciones de IC_{60} (3 y 28 µg/mL, respectivamente), tras 48 h de tratamiento. 24
Figura 13. IC_{50} del ácido gálico (AG), galato de etilo (GE) y cisplatino (CDDP) en células HaCaT a 48 h de tratamiento. 25
Figura 14. Células H1299 tras el tratamiento durante 48 h del control negativo (C-), galato de etilo (GE) a 5 µg/mL, cisplatino (CDDP) 3.12 µg/mL, el co-tratamiento entre cisplatino y galato de etilo (CDDP-GE) 3.12 y 5 µg/mL, control de apoptosis (CA) y el control de necrosis (CN). 29
Figura 15. Espectro experimental H-RMN de ácido gálico. 45
Figura 16. Espectro experimental correspondiente al galato de etilo por H-RMN. 46

Figura 17. Toma de 10 campos a 40X, de CDDP (3.12 µg/mL), en células H1299. 47
Figura 18. Toma de 10 campos a 40 X del co-tratamiento CDDP (3.12 µg/mL) y GE (5 µg/mL). 48
Figura 19. Toma de 10 campos, de apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno en células H1299. 49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación entre el número de casos, muertes y tipo de cáncer a nivel mundial en 2022 (Bray *et al.,* 2024)..... 7
Tabla 2. Concentraciones utilizadas en µg/mL para el AG, GE y CDDP, según la línea celular empleada..... 18
Tabla 3. IC_{50} en **µg/mL**, obtenidas en los tratamientos empleados, según la metodología de viabilidad celular y co-tratamientos..... 25
Tabla 4. IC_{50} en **µM**, obtenidas de los tratamientos empleados, según la metodología de viabilidad celular y co-tratamiento..... 25
Tabla 5. Índice de selectividad (IS). 26
Tabla 6. Análisis de varianza entre las IC_{50} obtenidas de los tratamientos CDDP, CDDP-GE y CDDP-AG. 26
Tabla 7. Dunnett entre CDDP, CDDP-GE y CDDP-AG. 27
Tabla 8. Resultado obtenido al capturar 10 campos y realizar el conteo de las células totales frente a las células necróticas, en células H1299 a 48 h de tratamiento..... 30

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Ácido gálico
AO	Naranja de acridina
CDDP	Cisplatino (cis-diaminodicloroplatino (II))
CO_2	Dióxido de carbono
CPCP	Cáncer de pulmón de células pequeñas
CPCNP	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
DE	Desviación estándar
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 (Developed by Eagle and modified by Dulbecco)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNMT	ADN metil-transferasa
EA	Efectos adversos
EB	Bromuro de etidio
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
GE	Galato de etilo
IC	Concentración inhibitoria
PBS	Disolución salina tamponada con fosfato
RB	Retinoblastoma
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Roswell park Memorial Institute
SFB	Suero fetal bovino
UV	Ultravioleta
VEF1	Volumen espiratorio forzado en un segundo
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer a nivel mundial, a pesar de los tratamientos actualmente disponibles, por lo que es imprescindible la búsqueda de nuevas alternativas; con base a esto, en el presente proyecto se analiza la alternativa del uso del antineoplásico de referencia, cisplatino (CDDP), en co-tratamiento con el ácido gálico (AG) o el galato de etilo (GE), buscando el sinergismo entre dichos compuestos. Para ello, se realizó el análisis de la actividad citotóxica, por el método de cristal violeta, tanto de forma individual (AG, GE, CDDP) en células H1299 y HaCaT, como en co-tratamiento en células H1299; así como la observación de cambios morfológicos celulares asociados a la muerte celular con tinción de bromuro de etidio y naranja de acridina en microscopia de epifluorescencia. Analizando los resultados, se observó que el mejor co-tratamiento fue el de CDDP-GE (manteniendo 5 µg/mL de galato de etilo constante) con el que se aprecia el aumento en la actividad citotóxica del cisplatino, así como la disminución de células con morfología celular asociada a necrosis. Por lo que se recomienda como perspectiva, el análisis de este co-tratamiento tanto en células no cancerosas, como realizar un estudio molecular para valorar la inhibición de la necrosis como muerte celular observada con el tratamiento individual de cisplatino.

ABSTRACT

Despite the currently available treatments, lung cancer is the leading cause of cancer-related death worldwide, making the search for new alternatives essential. Based on this, the present project analyzes the alternative use of the reference antineoplastic drug, cisplatin (CDDP), in co-treatment with gallic acid (GA) or ethyl gallate (EG), seeking synergy between these compounds. For this purpose, an analysis of cytotoxic activity was conducted using the crystal violet method, both individually (GA, EG, CDDP) in H1299 and HaCaT cells, and in co-treatment in H1299 cells. Additionally, cell death was evaluated using ethidium bromide and acridine orange staining and observing morphological changes associated with cell death under an epifluorescence microscope. Analyzing the results, the best co-treatment was found to be CDDP-EG (5 µg/mL of ethyl gallate), which showed an increase in the cytotoxic activity of cisplatin, as well as a noticeable decrease in cells whose death was caused by necrosis. Therefore, it is recommended as a perspective, to analyze this co-treatment in both non-cancerous cells, as well as a molecular study to assess the inability to induce necrosis as cell death observed with individual cisplatin.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un término genérico que hace referencia a toda aquella enfermedad con un aumento anormal de células, con la capacidad de propagarse por el cuerpo o extenderse más allá de sus límites habituales. Según la OMS (2022) el cáncer es la principal causa de muerte en el mundo, siendo el cáncer de pulmón el de mayor número de muertes (Ferlay *et al.,* 2020).

Actualmente existen una serie de tratamientos disponibles para el carcinoma pulmonar, incluyendo la cirugía, radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, aún con los tratamientos que se encuentran actualmente, este cáncer presenta una baja tasa de supervivencia a 5 años (Lage *et al.,* 2021; OMS, 2023). Como alternativa, se ha propuesto el estudio de la eficacia citotóxica de los co-tratamientos del antineoplásico de referencia con compuestos fenólicos, que han mostrado actividad citotóxica relevante en células derivadas de tumores.

Algunos de estos compuestos, como el ácido gálico y el galato de etilo, se han estudiado como tratamiento para el cáncer en distintas líneas celulares mostrando actividad favorable (Mohan *et al.,* 2017; Muller et al., 2019; Sánchez Carranza *et al*., 2017).

La alta mortalidad del cáncer de pulmón se relaciona con la baja eficacia terapéutica e importantes efectos adversos causados por los tratamientos, sin mencionar la resistencia a los fármacos actualmente utilizados y la tardía detección del cáncer. Por lo que es imprescindible la búsqueda de nuevas alternativas (Ferlay *et al.,* 2020; Reig *et al*., 2021). Debido a esto, en el presente proyecto se busca evaluar el efecto de compuestos fenólicos (AG y GE), en co-tratamiento con cisplatino, antineoplásicos de referencia, en la búsqueda de terapias más eficaces.

1. Antecedentes

1.1 Cáncer

Actualmente el cáncer es considerado como la principal causa de muerte a nivel mundial; se le denomina así a la enfermedad que se propaga por el cuerpo e implica el aumento anormal de células, como resultado de la acumulación de mutaciones y alteraciones epigenéticas (OMS, 2022; Chen *et al*., 2014).

Entre las alteraciones o marcadores que se presentan en el desarrollo del cáncer se encuentran:

1. Mantenimiento de la señalización proliferativa; este es considerado el rasgo fundamental del cáncer, hace referencia a la capacidad para mantenerse en constante proliferación. Para esto producen ligandos de factores de crecimiento o mediante el envío de señales a las células normales para el suministro de factores de crecimiento.
2. Evasión de los supresores del crecimiento; existe varios tipos de supresores de tumores que actúan regulando negativamente la proliferación celular. Estos supresores codifican, por ejemplo, a la proteína asociada a retinoblastoma (RB) y p53, quienes intervienen en algunos puntos de control que llevan a la célula a proliferar, activar senescencia o apoptosis; sin embargo, en el cáncer las células evaden la función de estos supresores.
3. Resistencia a la muerte celular; la muerte celular programada tiene diversas funciones, una de ellas es la protección natural para el desarrollo del cáncer. La apoptosis se induce por la transmisión señales de reguladores y efectores, como la proteína Bcl-2 la cual es una inhibidora de la apoptosis que actúa por unión y suprime dos proteínas proapoptóticas (Bax y Bak), por mencionar algunas. Las células tumorales limitan o evitan la apoptosis al promover la sobreexpresión de reguladores antiapoptóticos.
4. Habilitación de la inmortalidad replicativa; para generar tumores macroscópicos se requiere de un potencial replicativo ilimitado. La mayoría de los linajes celulares, *in vivo*, tienen un número limitado de ciclos de división

celular, limitados por la senescencia y la muerte celular. En las células tumorales la longitud de los telómeros se mantiene suficiente para evadir esta limitación, comúnmente mediante la expresión de la telomerasa o el mantenimiento de los telómeros.

5. Inducción de angiogénesis; los tumores generan vasculatura nueva, mediante la expresión del gen VEGF (y otros factores) que los provee de nutrientes y oxígeno, y a su vez evacúan los desechos metabólicos y CO_2.
6. Activación de invasión y metástasis; el cáncer se define por su capacidad de invasión local y la metástasis, ambas controladas por las proteínas de adhesión celular, como las integrinas y la E-cadherina, entre otras, esta última es una molécula clave en la adhesión de las células. La regulación negativa de esta molécula es común en carcinomas humanos.
7. Desbloqueo de la plasticidad fenotípica; la plasticidad fenotípica permite la alteración en la diferenciación celular, tal es el caso de la desdiferenciación, la diferenciación bloqueada y la transdiferenciación.
8. Reprogramación epigenética no mutacional; se refiere al cambio en la expresión de genes por modificaciones únicamente epigenéticas.
9. Microbiomas polimórficos; en la actualidad existe una gran variedad de microorganismos, como hongos y bacterias, que han sido relacionados con los fenotipos del cáncer y cada vez se reconoce más su importancia modulando el desarrollo del cáncer.
10. Células senescentes; la senescencia es la detención, normalmente irreversible, de la proliferación celular que complementa a la muerte celular programada para el mantenimiento de la homeostasis tisular, sin embargo, bajo algunos contextos las células senescentes estimulan el desarrollo del tumor (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011).

1.2 Epigenética del cáncer

La heterogeneidad genética, transcripcional y fenotípica caracterizan al cáncer; estos factores afectan la metástasis y la resistencia a los medicamentos

(Hinohara & Polyak, 2019; Lawson *et al*., 2018). Las alteraciones epigenéticas son más frecuentes que las mutaciones somáticas, pero éstas están involucradas, ya que mutaciones somáticas pueden inducir silenciamiento epigenético (Chatterjee *et al*., 2017). La metilación del ADN es una de las alteraciones epigenéticas involucradas en el desarrollo del cáncer. Se ha observado la sobreexpresión de las ADN metiltransferasas (DNMT, por sus siglas en inglés), provocando la hipermetilación de islas CpG en las regiones promotoras de los genes supresores de tumores, induciendo su silenciamiento; el cual se asocia con la invasión, progresión, metástasis y desarrollo del cáncer (Han *et al.,* 2018).

1.3 Genética del cáncer

Existe un número importante de mutaciones somáticas relacionadas con cáncer, de manera particular, podemos mencionar que la translocación EML-4-ALK y las mutaciones ROS-1, B-Raf y PI3KCA son los principales responsables del cáncer de pulmón. En algunos pacientes, las mutaciones secundarias o adicionales en los genes estimulantes del crecimiento celular (k-ras, MYC) causan alteraciones en la señalización del receptor del factor de crecimiento (EGFR, HER2/neu) e inhibe la apoptosis, lo que a su vez contribuye a la proliferación descontrolada de células (Kris *et al.*, 2014). Además, las alteraciones genéticas pueden variar desde mutaciones puntuales gasta la ganancia de brazos cromosómicos (Tovar *et al*., 2007).

1.4 Epidemiología del cáncer

Los tipos de cáncer más frecuentes en el mundo son mama, pulmón, colorrectal, próstata, piel y gástrico; dentro de estos, el cáncer de pulmón ocupa el primer lugar en defunciones (Tabla 1) (OMS, 2022), el cual ha mantenido durante las últimas décadas, con una tasa de supervivencia a cinco años del 19% (Schabath & Cote, 2019).

Tabla 1. Comparación entre el número de casos, muertes y tipo de cáncer a nivel mundial en 2022 (Bray *et al.,* 2024).

Cáncer	Casos	Defunciones
Pulmón	2 480 675	1 817 469
Colorrectal	1 926 425	904 019
Hepático	866 136	758 725
Mama	2 296 840	666 103
Gástrico	968 784	660 175

Es destacable que el cáncer de pulmón es más común en hombres que en mujeres, lo que está relacionado a diferencias históricas en la adopción y abandono del hábito del tabaquismo (Schabath & Cote, 2019).

1.5 Carcinoma pulmonar

El carcinoma pulmonar o cáncer de pulmón se divide en dos clasificaciones histológicas, cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) o también conocido como no microcítico y cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), microcítico. El 85% de los casos corresponden a CPCNP, mientras que el 15% restante a CPCP, no obstante, este último tiende a crecer y propagarse con mayor rapidez (Kris *et al.,* 2014).

A su vez, del 85% de los casos del CPCNP, el adenocarcinoma representa el 40%, el carcinoma de células escamosas el 30% y el carcinoma de células grandes el 15% (Figura 1) (Schabath & Cote, 2019).

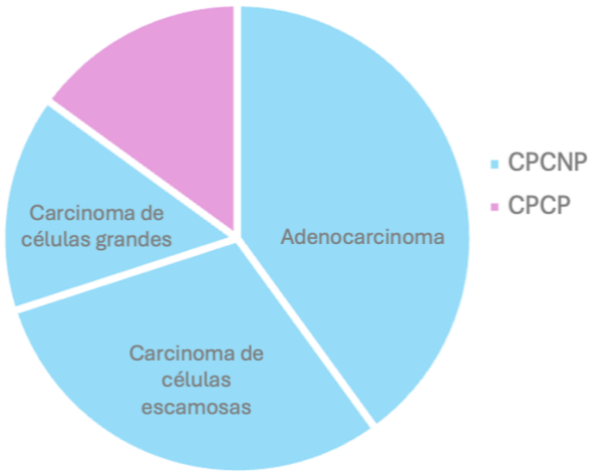


Figura 1. Porcentaje del cáncer de pulmón según su clasificación histológica. Fuente: elaboración propia con base en Schabath & Cote, 2019.

Dentro de los factores de riesgo, se sabe que la mayoría de los casos están relacionados con el tabaquismo (80-90%), sin embargo, también se considera el tabaquismo pasivo, la contaminación atmosférica, peligros ocupacionales y las enfermedades crónicas previas, como la inflamación crónica, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la deficiencia de alfa-1 antitripsina y la fibrosis pulmonar (Schabath & Cote, 2019).

Este cáncer no suele presentar síntomas, pero en caso de presentarse, sus síntomas más comunes son tos persistente, dolor torácico y pérdida de peso (Kris *et al.,* 2014; OMS, 2023).

Actualmente es detectado mediante la tomografía computarizada de baja dosis (LDCT, por sus siglas en inglés), la radiografía de tórax y la citología de esputo, entre otras. No obstante, una de las principales razones por las que el cáncer de pulmón encabeza las listas de mortalidad, es debido a la tardía detección del cáncer, en la que más del 75% de los pacientes son diagnosticados en estadios III o IV (Nooreldeen & Bach, 2021).

1.6 Terapia del carcinoma pulmonar

En la actualidad existen una serie de tratamientos disponibles como la cirugía, radioterapia, inmunoterapia y quimioterapia. El tratamiento por elegir dependerá del tamaño y localización del tumor, así como la edad y comorbilidad del paciente (OMS, 2023).

1.6.1 Cirugía

En el carcinoma pulmonar, la cirugía es el tratamiento de elección en etapas tempranas (estadios I y II). En pacientes con volumen espiratorio forzado (VEF1) mayor o igual a 2 L, se les realiza neumonectomía, que consiste en la remoción completa del pulmón.

En cambio, a pacientes con VEF1 igual o mayor a 1.5 L, se les realiza lobectomía, que se refiere a la extirpación de un lóbulo o más de los cinco que conforman los pulmones humanos (Figura 2) (Arrieta *et al*., 2013).

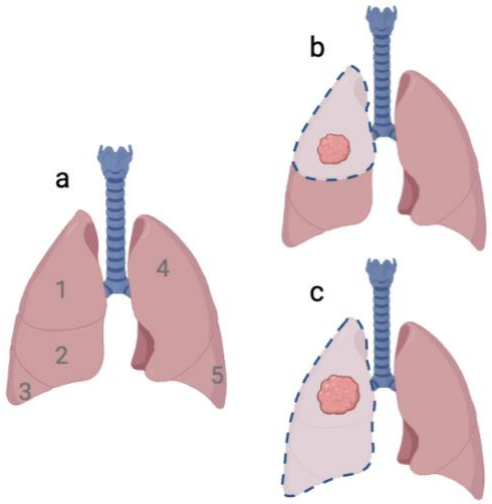


Figura 2. Representación de las cirugías disponibles para el cáncer de pulmón. Donde a) muestra un pulmón sin modificaciones, b) un pulmón con lobectomía y c) un pulmón con neumonectomía. Fuente: elaboración propia con base en Arrieta *et al*., 2013.

1.6.2 Radioterapia

La radioterapia es el tratamiento que actúa mediante radiaciones ionizantes que rompen la doble cadena del ADN. Este tratamiento se utiliza de forma alternativa en etapas tempranas de CPCNP. Dentro de estas están la radioterapia conformada tridimensionalmente, la radioterapia de intensidad modulada y la radioterapia corporal estereotáctica; a pesar de los avances, este tratamiento aún es utilizado solo en caso de que los tratamientos estándares no sean factibles debido al daño al tejido sano (Arrieta *et al*., 2013; OMS, 2023).

1.6.3 Inmunoterapia

La inmunoterapia busca activar la respuesta inmune celular, especialmente por el antígeno específico del tumor, aumentando las células dendríticas, asesinas naturales, macrófagos y citocinas. Algunos de estos tratamientos son por vacunas terapéuticas y moduladores inmunológicos. Sin embargo, debido a la baja respuesta inmune, este tratamiento se había considerado inadecuado para el cáncer de pulmón, aunque en años recientes han aumentado las investigaciones al respecto; en el 2015 la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) aprobó el uso de la inmunoterapia cuando el tratamiento de primera línea (quimioterapia) fallase (Lahiri *et al*., 2023).

1.6.4 Quimioterapia

Es un tratamiento sistémico que consiste en la aplicación de un agente quimioterapéutico, se considerada el tratamiento de primera línea para la mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón a nivel mundial. En el cáncer de pulmón, se recomienda como tratamiento adyuvante para reducir el riesgo de reaparición (estadios I y II) o bien, en fases avanzadas, del cáncer metastásico (OMS, 2023); para este tratamiento se emplean antineoplásicos como el cisplatino (Barrón-Barrón *et al*., 2018).

1.6.4.1 Cisplatino

El cisplatino o *cis*-diaminodicloroplatino (II) (CDDP) (Figura 3), es un polvo amarillento, cuya fórmula molecular es $Pt(NH_3)_2Cl_2$ y peso molecular de 300.05 g/mol.

Es un antineoplásico de amplia actividad, se utiliza en el tratamiento de tumores sólidos de ovarios, testículos y vejiga. Además de cánceres de cabeza, esófago, cuello y pulmón; siendo del cáncer de pulmón uno de los antineoplásicos más utilizados en la clínica (Dasari & Tchounwou, 2014; Konoshenko *et al*., 2022).

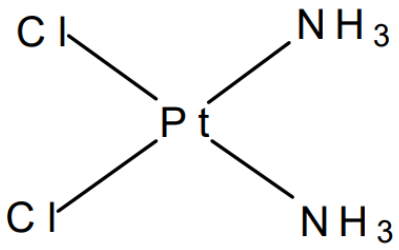


Figura 3. Estructura química del cisplatino (CDDP). Fuente: Sigma-Aldrich.

El CDDP ingresa a las células por difusión pasiva o transporte activo, mediante transportadores de cobre (CTR1); su cloruro es reemplazado con agua formando especies activas con carga positiva, estas cargas reaccionan con el ADN y se entrecruza con las bases púricas (guanina y adenina), mediante enlaces covalentes; interfiriendo con los mecanismos de reparación, conduciendo a la muerte apoptótica y necrótica (Figura 4). Sin embargo, se le relaciona a numerosos efectos secundarios como ototoxicidad, cardiotoxicidad, neurotoxicidad, hepatotoxicidad y nefrotoxicidad (Dasari & Tchounwou, 2014; Konoshenko *et al*., 2022; Kopacz-Bednarska & Król, 2022).

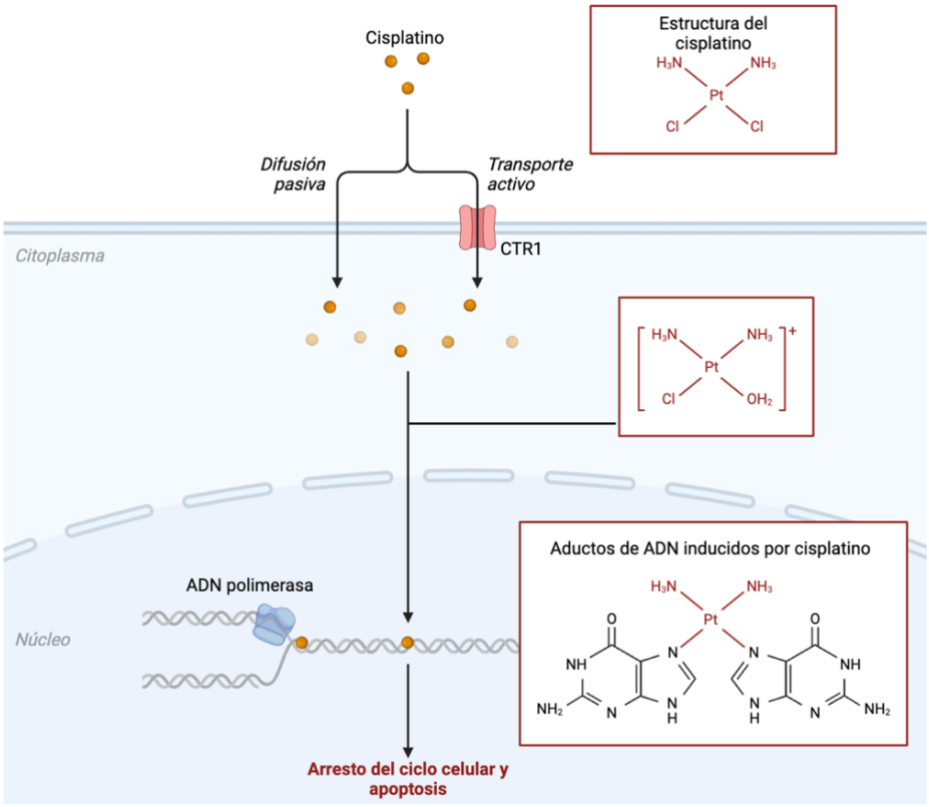


Figura 4. Esquema representativo del mecanismo de acción del cisplatino. Fuente: modificado de Cheng *et al*., 2021.

1.7 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un grupo de metabolitos secundarios producidos, por plantas y hongos, como protección para el estrés oxidativo. Se caracterizan por poseer al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo; algunos de estos compuesto han sido estudiados como tratamiento para el cáncer en distintas líneas celulares, tal es el caso del ácido gálico y el galato de etilo (Mohan *et al.,* 2017; Muller *et al*., 2019; Sánchez-Carranza *et al*., 2017).

1.7.1 Ácido gálico

El ácido gálico (AG) es un ácido trihidroxibenzoico con fórmula $(OH)_3C_6H_2CO_2H$ (Figura 5), con peso molecular de 107.12 g/mol. Se encuentra de forma natural y abundante en hojas de té, arándanos, nueces, uvas y otras fuentes vegetales.

La concentración de este que se pueda encontrar en los tejidos vegetales dependerá de los factores externos, como radiación UV e infecciones microbianas, que estimulen a dicho tejido (Kosuru *et al*., 2018).

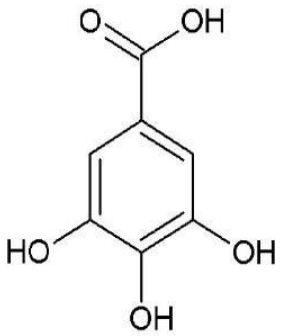


Figura 5. Estructura química del ácido gálico. Fuente: modificado de Wianowska & Olszowy-Tomczyk, 2023.

Además de sus fuentes naturales, el AG es producido industrialmente por oxidación de galotaninos naturales, como el ácido tánico. Al adquirirse, es un polvo de color blanco amarillento, soluble en alcohol, éter, acetona, glicerol y DMSO (Keyvani-Ghamsari & Khorsandi, 2023).

El AG, junto con sus galatos (ésteres) son de los antioxidantes más estudiados. Se le han atribuido propiedades contra infecciones bacterianas, enfermedades inflamatorias, metabólicas, gastrointestinales y cáncer. El AG presenta actividad anticancerígena al involucrarse en procesos como la migración, la metástasis, la detención del ciclo celular y apoptosis, esta última mediante la disminución de la expresión de oncogenes (Jiang *et al*., 2022; Keyvani-Ghamsari & Khorsandi, 2023).

Tian y colaboradores (2022) reportan el efecto dosis-dependiente del AG en células H1299, sobre el efecto antiproliferativo y proapoptótico; Wang y Bao (2020) señalan que este efecto ocurre al inhibir la activación de EGFR, reduciendo la formación del complejo CARM1-PELP1 (en células H1299 y A549). Además, observaron la inhibición del crecimiento tumoral en ratones.

Aunado a esto, Ko y colaboradores (2022) informan la regulación de la vía PI3K/ Akt y la regulación positiva de p53 en células A549, obteniendo la inhibición de la proliferación celular.

1.7.2 Galato de etilo

Este compuesto fenólico es un éster etílico del ácido gálico (Figura 6). Se aísla principalmente de las raíces de *euphorbia fischeriana* y *galla rhois*; se le han atribuido actividades anticancerígenas, antiinflamatorias y antioxidantes (Liu *et al.*, 2019).

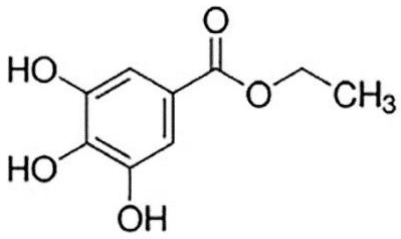


Figura 6. Estructura química del galato de etilo. Fuente: Liu *et al.,* 2019.

Sánchez-Carranza y colaboradores (2017), estudió el efecto del GE en células de carcinoma hepatocelular, observando la reducción de la viabilidad celular, detención del ciclo celular en la fase G2/M y promoción de apoptosis.

Asimismo, Kim *et al.,* 2012, reportó la inducción de cambios morfológicos y la fragmentación del ADN, conduciendo a la reducción de la viabilidad celular dosis-dependiente en células HL-60.

1.8 Co-tratamientos

Con la búsqueda de terapias más eficaces, se ha estudiado el uso del co-tratamiento entre diversos compuestos de fuentes naturales, como el ácido gálico y el galato de etilo, con antineoplásicos utilizados en la clínica.

Algunos de los co-tratamientos reportados incluyen el uso del AG con CDDP, probado para la protección contra los efectos adversos como la ototoxicidad, nefrotoxicidad y hepatotoxicidad, probado en ratas (Doğan *et al*., 2022; Kilic *et al.*, 2019).

Con el GE se encuentra menor información disponible sobre el uso de este compuesto aislado, uno de los reportados menciona los efectos potencializadores sobre el paclitaxel en células de carcinoma hepatocelular (Sánchez-Carranza *et al.,* 2023).

2. Justificación

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial (OMS, 2023), esto relacionado con factores que incluyen la baja eficacia de los tratamientos actualmente utilizados, la resistencia a los fármacos y la tardía detección del cáncer, así como el abandono al tratamiento por lo numerosos efectos adversos; por lo que es imprescindible la búsqueda de nuevas alternativas (Ferlay *et al*., 2020; Jiang *et al*., 2022). A causa de, en el presente proyecto se busca evaluar el efecto de los compuestos fenólicos (AG y GE), en co-tratamiento con cisplatino, antineoplásico de referencia, buscando terapias más eficaces.

3. Pregunta de investigación

¿Los compuestos fenólicos (AG y GE) mejorarán la eficacia del antineoplásico de referencia, cisplatino, mediante sinergismo en las células de carcinoma pulmonar?

4. Hipótesis

Los compuestos fenólicos (AG y GE) tienen sinergismo con el antineoplásico de referencia, cisplatino, en células de carcinoma pulmonar.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de los compuestos fenólicos (AG y GE) en co-tratamiento con el antineoplásico de referencia, cisplatino, en células de carcinoma pulmonar.

5.2 Objetivos específicos

- Cultivar células de cáncer de pulmón H1299 y células no cancerosas, HaCaT.
- Determinar la IC_{50} de los compuestos fenólicos y cisplatino en células de carcinoma pulmonar.
- Evaluar el efecto del co-tratamiento en la viabilidad celular en células de carcinoma pulmonar.
- Identificar el tipo de muerte celular causada por el co-tratamiento en células de carcinoma pulmonar.

6. Metodología

Las células H1299, son células de cáncer de pulmón no microcítico provenientes de un paciente de 43 años; obtenidas de ATCC (CRL-5803). Mientras que las células no cancerosas, HaCaT, son queratinocitos humanos transformados espontáneamente a partir del cultivo primario a largo plazo; obtenidas de Comercializadora e Importadora de Productos Químicos (T0020001).

Los compuestos fenólicos, AG (CAS: 5995-86-8; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y GE (CAS: 831-61-8; Merck Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) fueron solubilizados en DMSO puro para la solución stock, en una concentración de 200 mg/mL y se almacenaron en congelación.

El CDDP (CAS: 15663-27-1; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) se solubilizó en solución salina 0.9% para el stock de 0.5 mg/mL y se conservó en refrigeración.

6.1 Cultivo celular

Se cultivaron las células HaCaT con DMEM-F12 y las células H1299 con medio RPMI, ambos suplementados al 10% con suero fetal bovino (SFB), 1 % de aminoácidos no esenciales y glutamina al 2 mM; en una incubadora a 37 °C con 5% CO_2 y 95% de humedad relativa (HR).

6.2 Actividad citotóxica

La viabilidad celular se realizó por el método de cristal violeta, para el cual se sembraron 4 800 (H1299) y 6 000 (HaCaT) células por pozo en una placa de 96 pozos; tras 24 horas, se añadieron por triplicado los tratamientos a 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 µg/mL, en el caso de CDDP en H1299 y 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 µg/mL en HaCaT; para el AG se utilizaron concentraciones de 2, 4, 8, 16, 32 µg/mL, y 6.25, 12.5, 25, 50, 100 en el caso del en células H1299 y HaCaT, respectivamente y de 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/mL para el GE (ambas líneas celulares), como se observa en la Tabla 2. Además del control negativo, de DMSO en el caso de AG y GE, y solución salina para CDDP. Después se les incubó durante 48 h, para obtener una curva dosis/ respuesta. Al finalizar el periodo de tratamiento, se realizaron dos lavados con PBS 1X, se adicionó formol al 10% y se mantuvo a 4°C durante 24 h. Posteriormente, se realizaron nuevamente dos lavados con PBS 1X, se añadió el cristal violeta al 0.01% y se agitó durante 10 min. Finalmente se lavó dos veces con PBS 1X, se adicionó ácido acético al 33%, fue incubado 4 min y se determinó la absorbancia a 550 nm en un lector multimodal Synergy HTX. La IC_{50} (concentración inhibitoria media, por sus siglas en inglés) se determinó por regresión con el software GraphPad Prism 9° Versión. Todos los volúmenes utilizados fueron de 100 µL por pozo y cada uno de los experimentos se repitió de forma independiente, al menos dos veces para obtener la desviación estándar (DE).

Tabla 2. Concentraciones utilizadas en µg/mL para el AG, GE y CDDP, según la línea celular empleada.

	AG	GE	CDDP
H1299	32-2	200-12.5	50-3.125
HaCaT	100-6.25	200-12.5	1-0.0625

Donde AG corresponde al ácido gálico, GE al galato de etilo y CDDP al cisplatino.

Esta técnica se fundamenta en la capacidad para adherirse de las células vivas, donde tras la muerte celular, las células se desprenden de la placa de cultivo y son eliminadas con los lavados de PBS 1X. Luego, el cristal violeta interactúa con las proteínas y el ADN de las células aún adheridas, por lo que, a mayor coloración, mayor será la viabilidad celular y, por tanto, menor inhibición (Feoktistova *et al.,* 2016).

6.3 Co-tratamientos

Debido a la diferencia en la concentración inhibitoria media del cisplatino en HaCaT y H1299, el procedimiento del co-tratamiento se realizó únicamente con células cancerígenas. Los valores de la IC_{20}, IC_{40} e IC_{60} fueron calculados mediante regresión no lineal, a partir de los datos obtenidos en los tratamientos individuales de AG y GE en células H1299.

24 h antes se sembraron 4 800 células H1299 por pozo en una placa de 96 pozos, se realizaron por triplicado los co-tratamientos entre 50 µL de la IC_{20}, IC_{40} o IC_{60} de los compuestos fenólicos y 50 µL de cisplatino en concentraciones crecientes (3.125 a 50 µg/mL) (Figura 7), así como el control negativo (DMSO + solución salina), después fueron incubados durante 48 h. Al finalizar el tratamiento, se determinó la viabilidad celular por medio del método de cristal violeta. Finalmente se determinó la IC_{50} por regresión no lineal. Cada uno de los experimentos fue realizado al menos dos veces de forma independiente, con lo que se calculó la desviación estándar (DE). Adicionalmente se realizó el análisis de varianza de un

factor, seguida de una prueba post hoc (Dunnett) comparando las IC_{50} de CDDP con las IC_{50} de los co-tratamientos CDDP-GE (IC_{20}) y CDDP-AG (IC_{20}), con el software IBM SPSS Statistics; estos análisis estadísticos se realizaron únicamente con los co-tratamientos con IC_{20} de GE y AG; esta decisión se tomó basada en el comportamiento de los co-tratamientos al aumentar la concentración del compuesto fenólico.

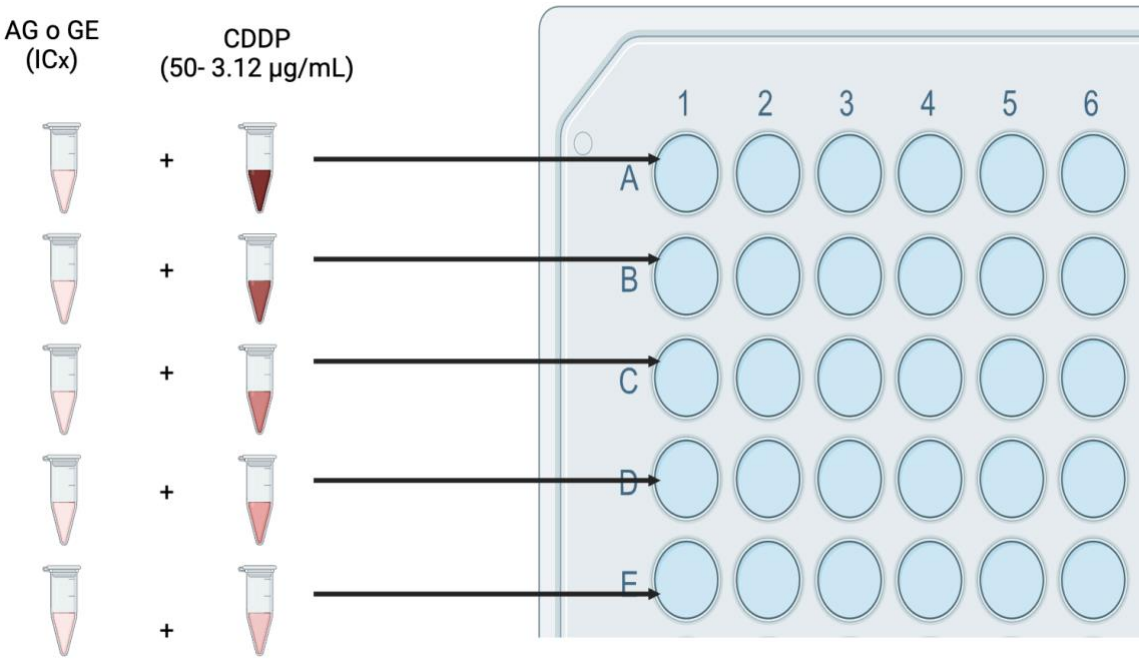


Figura 7. Representación del co-tratamiento entre la IC_{20}, IC_{40} o IC_{60} de los compuestos fenólicos (AG y GE) y las concentraciones decrecientes de cisplatino (CDDP). Fuente: elaboración propia.

6.4 Muerte celular

Se plaquearon 32 000 (H1299) células en una placa de 24 pozos, utilizando 6 pozos que corresponden al control negativo, control de apoptosis, control de necrosis, GE IC_{20} (5 µg/mL), CDDP (3.12 µg/mL) y co-tratamiento entre GE y CDDP, a las mismas concentraciones antes mencionadas (Figura 8).

El control de necrosis se obtuvo por necrosis térmica con agua a 95 °C durante 15 segundos, mientras que la apoptosis se indujo con peróxido de hidrógeno 0.099 M durante 90 minutos (apoptosis inducida por estrés oxidativo). El resto de los tratamientos se dejaron durante 48 h. Pasados estos periodos, las células se expusieron a solución de naranja de acridina (AO) y bromuro de etidio (EB), y se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400. Finalmente, se tomaron 10 imágenes de los campos de CDDP, CDDP-GE y el control de apoptosis, para la cuantificación de células necróticas por tratamiento.

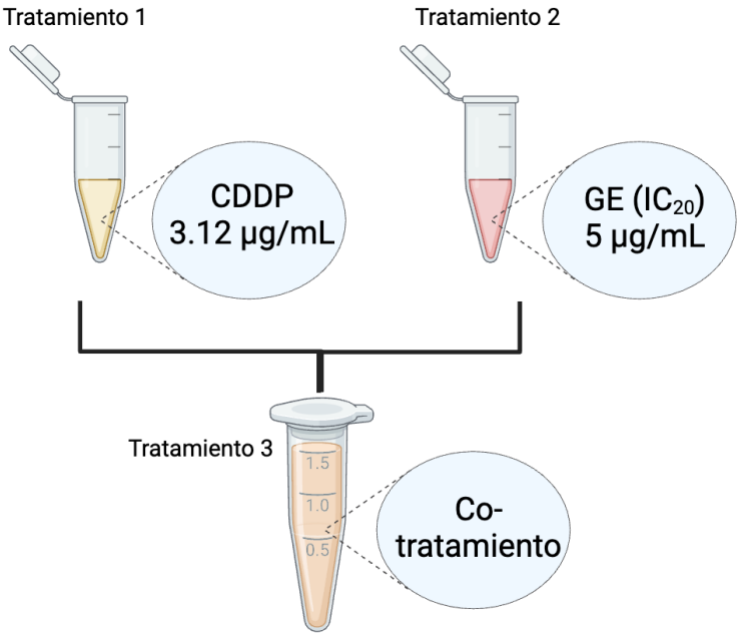


Figura 8. Representación gráfica del co-tratamiento entre la IC_{20} del GE y el cisplatino (CDDP). Fuente: elaboración propia.

La AO tiene la capacidad de pasar a través de las membranas celulares intactas, pero EB requiere de un daño en la membrana para atravesar, por lo que las células necróticas se tiñen de fluorescencia roja, pero con una morfología nuclear parecida a la de las células viables. Las células apoptóticas fluorescen en verde y se observan cambios morfológicos como la compactación de la cromatina, la

formación de vesículas en la membrana plasmática y formación de cuerpos apoptóticos (Kasibhatla *et al.,* 2006).

7. Resultados

7.1 Actividad citotóxica y co-tratamientos

Tras analizar la actividad citotóxica por medio de regresión no lineal, se obtuvieron las figuras mostradas a continuación. En la Figura 9 se presentan las tres gráficas correspondientes al tratamiento individual del AG, GE y CDDP en células H1299; donde el AG tuvo la mayor potencia con una IC_{50} de 2.247 µg/mL, a diferencia del GE con 18.19 µg/mL y CDDP con 6.954 µg/mL.

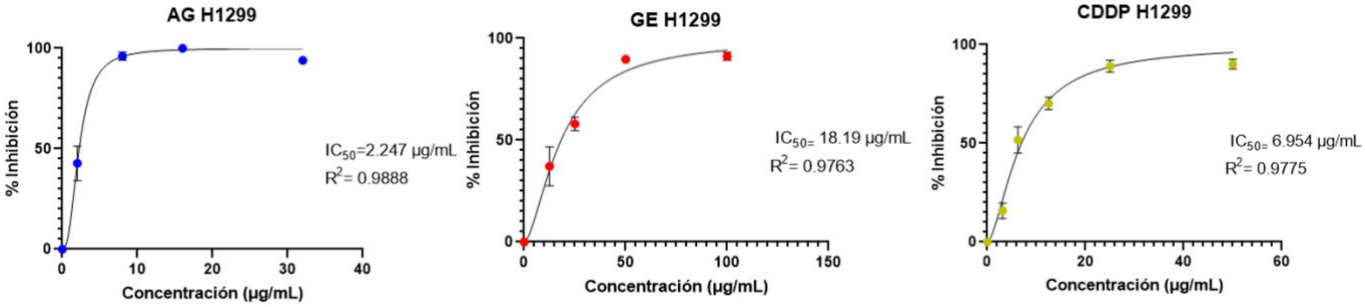


Figura 9. Comparación entre la IC_{50} del ácido gálico (AG), galato de etilo (GE) y cisplatino (CDDP) en células H1299, tras 48 h de tratamiento.

En la Figura 10 se muestra el cambio en la actividad citotóxica del CDDP al adicionar la IC_{20} de AG (1 µg/mL) o GE (5 µg/mL). En estos co-tratamientos, aunque ambos aumentaron la actividad citotóxica del CDDP disminuyendo la IC_{50} de 6.954 a 4.742 o 3.125 µg/mL, el co-tratamiento con GE presentó mayor potencia frente al de AG.

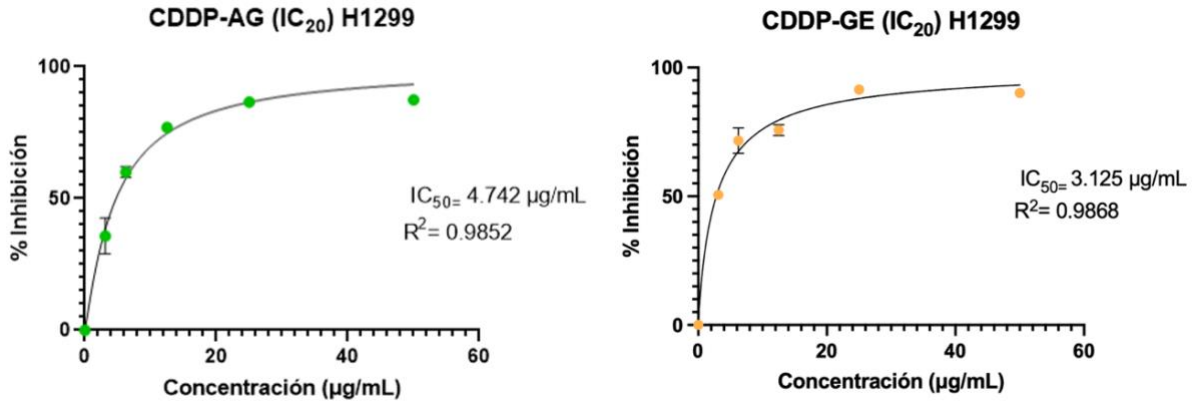


Figura 10. Comparación entre la IC_{50} del co-tratamiento de cisplatino (CDDP) con ácido gálico (AG) y galato de etilo (GE) en concentraciones de IC_{20} (1 y 5 µg/mL, respectivamente), a 48 h de tratamiento.

Con el fin de esclarecer el comportamiento de los co-tratamientos de CDDP, se repitieron los experimentos aumentando la concentración únicamente del compuesto fenólico (AG o GE) que se adicionó al CDDP. En la Figura 11, se observan las gráficas de los co-tratamientos al aumentar a la IC_{40} (AG 1.6 y GE 12 µg/mL), en esta figura se reafirma el aumento de la actividad citotóxica del CDDP en co-tratamiento con GE, sin embargo, no es el caso del co-tratamiento con AG, el cual a una IC_{40} no presenta cambios significativos al tratamiento individual con CDDP.

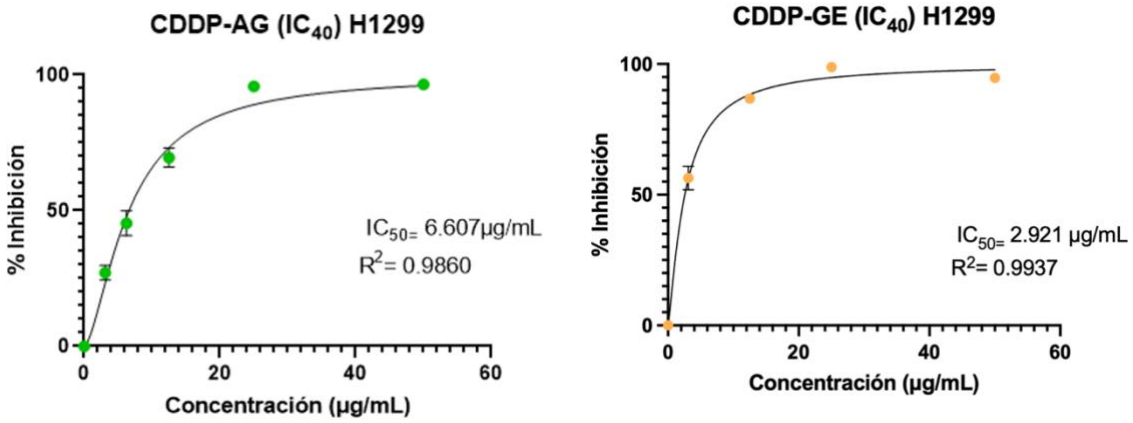


Figura 11. Comparación entre la IC_{50} del co-tratamiento de cisplatino (CDDP) con ácido gálico (AG) y galato de etilo (GE) en concentraciones de IC_{40} (1.6 y 12 µg/mL, respectivamente), a 48 h de tratamiento.

Como se observa en la Figura 12, al aumentar la concentración de los compuestos fenólicos a la IC_{60} (AG 3 y GE 28 µg/mL), se confirma el comportamiento del co-tratamiento CDDP-AG, en el cual, al aumentar la concentración de AG aumenta también la IC_{50} del co-tratamiento, es decir, no hubo un efecto aditivo o sinérgico entre ellos, contrariamente, el AG disminuyó el efecto citotóxico del cisplatino en células H1299. Por otra parte, no existe cambio significativo en el co-tratamiento CDDP-GE al aumentar la concentración de GE de IC_{20} a IC_{60}. Debido a esto, se continuó únicamente con el análisis de la muerte celular en el co-tratamiento con la IC_{20} de GE y cisplatino.

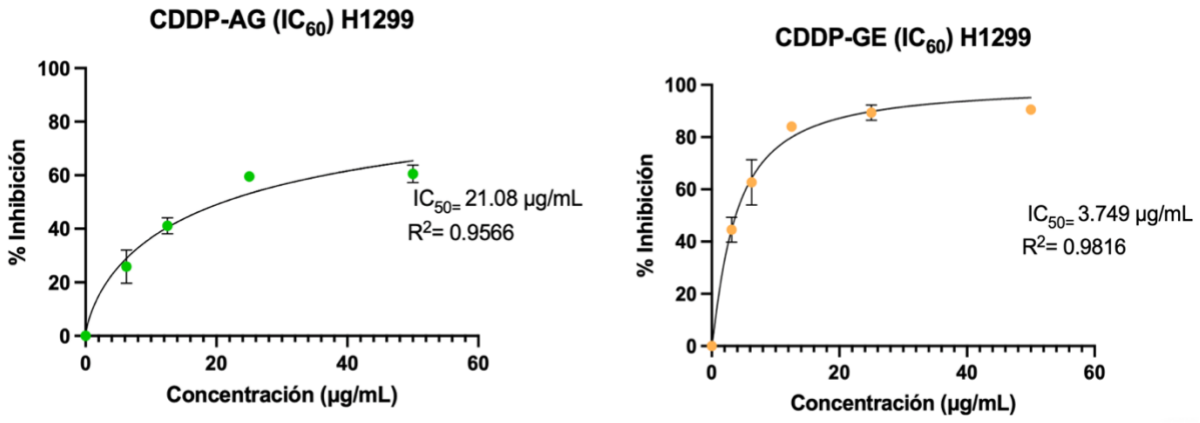


Figura 12. Comparación entre la IC_{50} del co-tratamiento de cisplatino (CDDP) con ácido gálico (AG) y galato de etilo (GE) en concentraciones de IC_{60} (3 y 28 µg/mL, respectivamente), tras 48 h de tratamiento.

El tratamiento individual de AG, GE y CDDP en células no cancerosas, HaCaT (Figura 13), presentó la IC_{50} de 24.19, 13.25 y 0.635 µg/mL, respectivamente. Siendo el AG el de menor actividad citotóxica, seguido del GE y en último lugar el antineoplásico de referencia, CDDP; al ser las células no cancerosas, lo que se espera obtener es una actividad citotóxica mínima, que permita índices de selectividad (IS) deseables, mayores a 1. En el caso de estos tratamientos, el AG es el único presentando un IS de 10.77, considerado un índice de selectividad alto (Tabla 5).

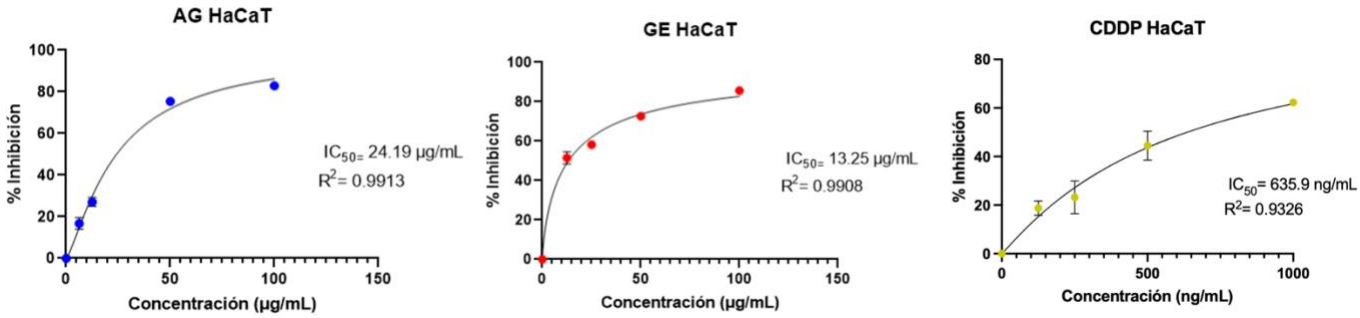


Figura 13. IC_{50} del ácido gálico (AG), galato de etilo (GE) y cisplatino (CDDP) en células HaCaT a 48 h de tratamiento.

Los resultados de la actividad citotóxica (IC_{50}) fueron registrados en las Tablas 3 (en µg/mL) y 4 (en µM**).**

Tabla 3. IC_{50} en **µg/mL**, obtenidas en los tratamientos empleados, según la metodología de viabilidad celular y co-tratamientos.

	AG	**GE**	**CDDP**	**CDDP-AG**			**CDDP-GE**		
				IC_{20}	IC_{40}	IC_{60}	IC_{20}	IC_{40}	IC_{60}
H1299	2.240± 0.021	18.645 ±2.397	6.868± 0.341	7.327± 3.655	4.859± 2.475	22.220 ±1.612	3.418± 0.864	1.961± 0.861	4.046± 0.566
HaCaT	22.135 ±3.854	12.650 ±0.849	0.6474± 0.0314						

Donde AG es ácido gálico, GE es galato de etilo y CDDP es cisplatino, ± DE.

Tabla 4. IC_{50} en **µM**, obtenidas de los tratamientos empleados, según la metodología de viabilidad celular y co-tratamiento.

	AG	**GE**	**CDDP**	**CDDP-AG**			**CDDP-GE**		
				IC_{20}	IC_{40}	IC_{60}	IC_{20}	IC_{40}	IC_{60}
H1299	13.17± 0.12	94.09± 12.10	22.89± 1.136	24.419 ±12.18	16.194 ±8.249	74.054 ±17.90	11.391 ±2.880	6.536± 2.870	13.484 ±1.88
HaCaT	130.11 ±22.65	63.83± 4.28	2.158± 0.105						

Donde AG es ácido gálico, GE es galato de etilo y CDDP es cisplatino, ± DE.

El índice de selectividad, Tabla 5, se determinó por la fórmula:

$$Índice\ de\ selectividad\ (IS) = \frac{control}{muestra}$$

Donde *muestra* corresponde al tratamiento (AG, GE, CDDP-AG, CDDP-GE o CDDP) en H1299 y *control* al efecto del tratamiento en las células no cancerosas, HaCaT.

Tabla 5. Índice de selectividad (IS).

	AG	**GE**	**CDDP**
IS	10. 77	0.73	0.09

Donde AG es ácido gálico, GE es galato de etilo y CDDP es cisplatino.

En el análisis de varianza de un factor entre las IC_{50} de los co-tratamientos y el CDDP, se observa un F calculada mayor a la F crítica, con lo que se concluye el rechazo de la hipótesis nula, resultando en que al menos dos de las medias son diferentes (Tabla 6). Es decir, que uno de los co-tratamientos tiene una actividad citotóxica diferente al tratamiento individual de CDDP.

Tabla 6. Análisis de varianza entre las IC_{50} obtenidas de los tratamientos CDDP, CDDP-GE y CDDP-AG.

	ANOVA				
IC_{50}					
	Suma de cuadrados	**gl**	**Media cuadrática**	**F**	**Sig.**
Entre grupos	55.157	2	27.578	9.330	.002
Dentro de grupos	44.336	15	2.956		
Total	99.493	17			

Con la prueba Dunnett, analizando CDDP-GE con CDDP se encontró una diferencia negativa de 3.5175 frente al grupo control (CDDP), además de una significancia menor a 0.05 (0.003), por lo que esta diferencia es estadísticamente significativa (Tabla 7). Por el contrario, la comparación entre CDDP y CDDP-AG indica una media del grupo CDDP-AG mayor, sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa. Este análisis evidencia que el co-tratamiento con una IC_{20} de GE es mejor que el tratamiento individual con CDDP.

Tabla 7. Dunnett entre CDDP, CDDP-GE y CDDP-AG.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: IC_{50}
T de Dunnett (<control)[a]

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite superior
CDDP-GE	CDDP (control)	-3.517500*	0.992599	0.003	-1.46581
CDDP-AG	CDDP (control)	0.364833	0.992599	0.796	2.41652

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.
a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

7.2 Muerte celular

Los resultados obtenidos de la muerte celular se encuentran en la Figura 14; donde se observa el control de viabilidad (C-) con un color verde brillante uniforme, núcleos celulares íntegros y el citoplasma ligeramente teñido. Las células apoptóticas (CA) presentan condensación de cromatina, con un color verde brillante intenso, debido a la compactación del ADN, vesículas de la membrana (blebbings) y la formación de cuerpos apoptóticos. Por su parte, las células necróticas (CN) presentan una morfología nuclear íntegra con fluorescencia rojo brillante.

En las células tratadas con GE (5 µg/mL) no se aprecian cambios morfológicos evidentes en comparación con el control negativo. Por otro lado, las células

tratadas únicamente con CDDP (3.12 µg/mL) presentan características típicas de apoptosis, como las antes mencionadas, pero también una coloración rojiza indicativa de muerte por necrosis. En cambio, en el co-tratamiento se observan características similares a la muerte por apoptosis del CDDP junto con una reducción en las células con fluorescencia roja.

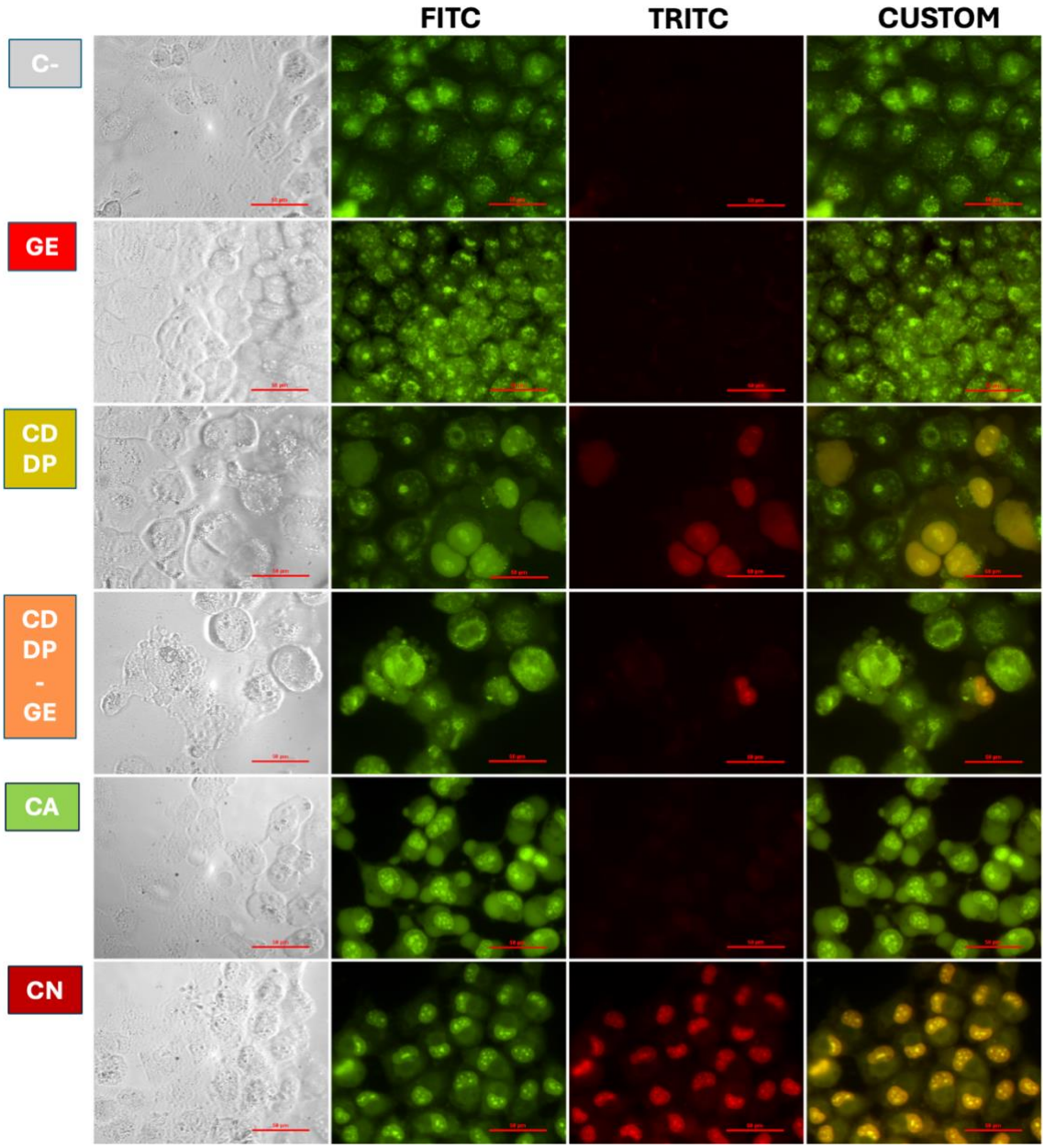


Figura 14. Células H1299 tras el tratamiento durante 48 h del control negativo (C-), galato de etilo (GE) a 5 µg/mL, cisplatino (CDDP) 3.12 µg/mL, el co-tratamiento entre cisplatino y galato de etilo (CDDP-GE) 3.12 y 5 µg/mL, control de apoptosis (CA) y el control de necrosis (CN).

En un análisis cuantitativo, se contó el número de células en 10 campos de los diferentes tratamientos (se incluyen las imágenes correspondientes en el Anexo 3). En la Tabla 8, se observa una disminución aparente de 27.5 veces menos de

células necróticas al tratarlas con CDDP-GE frente a CDDP de forma individual, en células H1299.

Tabla 8. Resultado obtenido al capturar 10 campos y realizar el conteo de las células totales frente a las células necróticas, en células H1299 a 48 h de tratamiento.

	CDDP		**CDDP-GE**		**CA**	
	Total	Necróticas	Total	Necróticas	Total	Necróticas
	86	55	55	2	124	0
Promedio		5.5		0.2		0

Donde CDDP corresponde a cisplatino, CDDP-GE al co-tratamiento entre cisplatino (3.12 µg/mL) y 5 µg/mL de galato de etilo (GE), y CA al control de apoptosis.

8. Discusión

Aún con las terapias actualmente disponibles, el cáncer de pulmón es el cáncer con mayor número de muertes a nivel mundial, lo que requiere la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de este cáncer. De este, el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) es el más común (Kris *et al.,* 2014).

El tratamiento de primera línea para el cáncer de pulmón es la quimioterapia, siendo el antineoplásico de referencia el cisplatino (CDDP); un quimioterapéutico a base de platino que mejora la supervivencia a cinco años. No obstante, el tratamiento de este cáncer enfrenta el abandono de la terapia, dado a la reducción de la calidad de vida de los pacientes por los diversos efectos adversos (EA), siendo los más comunes la nefrotoxicidad, neuropatía periférica y la ototoxicidad. Actualmente se sugiere que el desarrollo de estos EA se debe a la inflamación causada por el tratamiento (Domingo *et al.,* 2022; Makovec, 2019; OMS, 2023).

Aunado a esto, el CDDP enfrenta la disminución de la efectividad, afectada por factores como la resistencia extrínseca e intrínseca de las células con mecanismos como la inactivación del fármaco por glutatión, la reparación del daño al ADN y el eflujo de fármacos con sistemas de transporte (Makovec, 2019).

Por ello, aumenta cada vez más la búsqueda de moléculas que, en conjunto con el cisplatino, atiendan estas áreas de oportunidad, brindando un tratamiento igual o más efectivo. El estudio de productos naturales para el tratamiento del cáncer, tanto individual como en co-tratamiento, ha mostrado el efecto de los compuestos fenólicos al interferir en la proliferación y metástasis tumoral (Li *et al*., 201; Zhang *et al.,* 2018).

Basado en esto, se planteó en este proyecto el uso combinado del cisplatino (CDDP), con los compuestos fenólicos ácido gálico (AG) y galato de etilo (GE), de los que se ha reportado previamente su actividad anticancerígena; utilizando

las células H1299 de CPCNP y la línea celular HaCaT como control para células no cancerosas.

Al analizar la viabilidad celular podemos observar que el AG en H1299, de forma individual, tiene mayor efecto que el GE, sin embargo, en co-tratamiento con el CDDP presenta un menor efecto citotóxico, siendo prácticamente el mismo que el CDDP individualmente. Esto probablemente debido a que GSH forma complejos con CDDP (GS-Pt) aniónicos que son refluidos desde las células cancerígenas, impidiendo así su interacción con el ADN (Makovec, 2019).

Asimismo, el CDDP ataca a las mitocondrias y promueve la liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), destruye los lisosomas por la liberación de proteasas lisosomales y degrada el retículo endoplasmático, lo que conduce al mal plegamiento de las proteínas (Makovec, 2019; Mirzaei *et al.,* 2021), mientras que el glutatión reducido (GSH) disminuye el daño de las ROS, por lo que a mayores concentraciones de GSH, mayor resistencia al CDDP habrá (Riverón *et al*., 2022).

En un estudio realizado por Doğan y colaboradores (2022) se observó que los niveles de GSH aumentan con el tratamiento de ácido gálico, en ratas, lo que podría esclarecer el comportamiento del co-tratamiento entre AG y CDDP, el cual al aumentar la concentración de AG de IC_{20} a IC_{40} o IC_{60}, disminuye aún más el efecto citotóxico del CDDP, es decir, el AG tiene efecto inhibitorio dosis-dependiente sobre el CDDP.

Por otra parte, según el análisis comparativo de Rodríguez y colaboradores (2023) entre el AG y el GE, el AG tiene una actividad antioxidante mayor al GE, lo que explica que, de forma contraria al AG, el GE en co-tratamiento con CDDP mejoró el efecto citotóxico de 6.954 a 3.125 µg/mL, además este no parece ser dependiente de la dosis, ya que no se observan cambios significativos sobre la actividad citotóxica del CDDP al aumentar el GE a IC_{20}, IC_{40} o IC_{60}.

No obstante, nuestros hallazgos contrastan con lo informado por Zhang y colaboradores en el 2019, quienes observaron que al tratar las células A549 con cisplatino (2.5 µg/mL) en combinación con ácido gálico (28 µg/mL), aumentaba la actividad citotóxica del CDDP mediante la modulación de la vía JAK1/STAT3. Estas discrepancias se podrían atribuir a las diferentes alteraciones genéticas y epigenéticas entre cada línea celular.

Respecto a la muerte celular, existen diversos tipos como autofagia, necroptosis, ferroptosis, pyroptosis, aunque los más comunes son apoptosis y necrosis. La apoptosis es la muerte celular programada, no lítica e inmunológicamente silenciosa, mientras que la necrosis es lítica y proinflamatoria, considerada un proceso tóxico. La necrosis y apoptosis pueden ocurrir de forma simultánea, independiente o secuencial e incluso ambos tipos pueden ser causados por el mismo estímulo dependiendo de la dosis. En el caso de la apoptosis, cundo este proceso ocurre *in vivo,* los restos son fagocitados por las células circundantes, como macrófagos, lo que previene la necrosis secundaria (Elmore, 2007; Newton *et al.,* 2024).

Con el tratamiento de CDDP se han observado células apoptóticas y necróticas en la misma población celular, planteándose que dependiendo del daño celular la necrosis podría ser directa o como resultado de un proceso apoptótico inconcluso (González *et al.,* 2001).

La metodología de este proyecto permite visualizar características morfológicas de estos dos tipos de muerte celular, más no es determinante. La necrosis inducida (necrosis térmica) causa la desnaturalización de las proteínas y la destrucción de la membrana celular, liberando el contenido citoplasmático, permitiendo la penetración del bromuro de etidio, obteniendo la fluorescencia roja. Por su parte, la apoptosis inducida por estrés oxidativo comienza con el aumento de ROS, que dañan proteínas, lípidos y ADN, este proceso activa la vía mitocondrial; con el naranja de acridina se visualizan los cambios morfológicos como la contracción celular, condensación de la cromatina, blebbings en la

membrana plasmática y formación de cuerpos apoptóticos, con una fluorescencia verde (Elmore, 2007; Kasibhatla *et al.,* 2006).

Al analizar los resultados (Figura 14 y Tabla 8) del co-tratamiento CDDP-GE, se observa una disminución aparente en el número de células cuya muerte fue causada por necrosis, observándose mayor muerte por apoptosis. Diversos análisis esclarecen la relación del aumento de células necróticas como determinante clave en el desarrollo de efectos adversos (EA), como la enfermedad renal crónica, después de la administración de CDDP; trasladado a la clínica, esto podría disminuir los EA aumentando la calidad de vida del paciente (Landau *et al.,* 2019). De hecho, se ha reportado que el uso combinado de cisplatino con algunos productos naturales protege los órganos de la toxicidad causada por el CDDP, al modular factores de transcripción (Dasari *et al.,* 2022).

Finalmente, es necesario mencionar que las características entre necrosis y apoptosis pueden superponerse, por lo que es necesario el empleo de más de una técnica de muerte celular para confirmar el resultado con ensayos de iniciación y ejecución de la apoptosis (Elmore, 2007).

9. Conclusiones

El co-tratamiento con mayor efecto es el de CDDP con GE, con una IC_{20} de GE (5 µg/mL); con este co-tratamiento, se observan células con morfología de apoptosis y una aparente disminución en la necrosis causada por el CDDP.

A pesar de esto, es necesario realizar la metodología tanto del co-tratamiento como de la muerte celular con la línea celular no cancerosa, HaCaT, para contrastar los resultados en la línea H1299.

10. Perspectivas

Con base a los resultados obtenidos en este proyecto, se sugiere continuar con la investigación del co-tratamiento entre CDDP-GE en células HaCaT, así como emplear técnicas específicas para corroborar el efecto sobre la muerte celular observada en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

Arrieta, O., Guzmán-de Alba, E., Alba-López, L. F., Acosta-Espinoza, A., Alatorre-Alexander, J., Alexander-Meza, J. F., Allende-Pérez, S. R., Alvarado-Aguilar, S., Araujo-Navarrete, M. E., Argote-Greene, L. M., Aquino-Mendoza, C. A., Astorga-Ramos, A. M., Astudillo-de La Vega, H., Avilés-Salas, A., Barajas-Figueroa, L. J., Barroso-Quiroga, N., Blake-Cerda, M., Cabrera-Galeana, P. A., Calderillo-Ruíz, G., … Zinser-Sierra, J. W. (2013). Consenso nacional de diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas. *Revista de Investigacion Clinica*, *65*(SUPPL. 1), 5–84.

Barrón Barrón, F., Guzmán de Alba, E., Alatorre Alexander, J., Aldaco Sarvide, F., Bautista Aragón, Y., Blake Cerda, M., ... & Arrieta Rodríguez, O. G. (2018). Guía de Práctica Clínica Nacional para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadios tempranos, localmente avanzados y metastásicos. *Gaceta mexicana de oncología*, *17*(4), 201-232.

Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Soerjomataram, I., Jemal, A., (2022). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2024 May-Jun;74(3):229-263. doi: 10.3322/caac.21834. Epub 2024 Apr 4. PMID: 38572751

Chatterjee, A., Rodger, E. J., & Eccles, M. R. (2017). Epigenetic drivers of tumourigenesis and cancer metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, *51*, 149–159. https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2017.08.004

Chen, W., Chiang, C. L., & Dawson, L. A. (2021). Efficacy and safety of radiotherapy for primary liver cancer. *Chinese Clinical Oncology*, *10*(1). https://doi.org/10.21037/CCO-20-89

Cheng, Y., Li, S., Gao, L., Zhi, K., & Ren, W. (2021). The Molecular Basis and Therapeutic Aspects of Cisplatin Resistance in Oral Squamous Cell

Carcinoma. Frontiers in oncology, 11, 761379. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.761379

Chen, Z., Fillmore, C. M., Hammerman, P. S., Kim, C. F., & Wong, K.-K. (2014). Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nature Reviews Cancer*, *14*(8), 535–546. https://doi.org/10.1038/nrc3775

Dasari, S., Njiki, S., Mbemi, A., Yedjou, C. G., & Tchounwou, P. B. (2022). Pharmacological Effects of Cisplatin Combination with Natural Products in Cancer Chemotherapy. *International journal of molecular sciences*, *23*(3), 1532. https://doi.org/10.3390/ijms23031532

Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*, *740*, 364–378. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025

Doğan, D., Meydan, İ., & Kömüroğlu, A. U. (2022). Protective Effect of Silymarin and Gallic Acid against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity and Hepatotoxicity. *International journal of clinical practice*, *2022*, 6541026. https://doi.org/10.1155/2022/6541026

Domingo, I. K., Latif, A., & Bhavsar, A. P. (2022). Pro-Inflammatory Signalling PRRopels Cisplatin-Induced Toxicity. *International journal of molecular sciences*, *23*(13), 7227. https://doi.org/10.3390/ijms23137227

Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, *35*(4), 495–516. https://doi.org/10.1080/01926230701320337

Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor protocols, 2016 4*, pdb.prot087379 .

Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., & Bray, F. (2020). Observatorio Mundial del Cáncer: El cáncer hoy. Lyon, Francia: Agencia Internacional para la Investigación del

Cáncer. Disponible en: https://gco.iarc.fr/today, consultado 06 de mayo de 2023.

Gonzalez, V. M., Fuertes, M. A., Alonso, C., & Perez, J. M. (2001). Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis?. *Molecular pharmacology*, *59*(4), 657–663. https://doi.org/10.1124/mol.59.4.657

Han, T. S., Ban, H. S., Hur, K., & Cho, H. S. (2018). The epigenetic regulation of HCC metastasis.

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31–46. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Hinohara, K., & Polyak, K. (2019). Intratumoral Heterogeneity: More Than Just Mutations. *Trends in Cell Biology*, *29*(7), 569–579. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.03.003

Jiang, Y., Pei, J., Zheng, Y., Miao, Y. J., Duan, B. Z., & Huang, L. F. (2022). Gallic Acid: A Potential Anti-Cancer Agent. Chinese journal of integrative medicine, 28(7), 661–671. https://doi.org/10.1007/s11655-021-3345-2

Kasibhatla, S., Amarante-Mendes, G. P., Finucane, D., Brunner, T., Bossy-Wetzel, E., & Green, D. R. (2006). Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. *CSH protocols*, *2006*(3), pdb.prot4493. https://doi.org/10.1101/pdb.prot4493

Keyvani-Ghamsari, S., Rahimi, M., & Khorsandi, K. (2023). An update on the potential mechanism of gallic acid as an antibacterial and anticancer agent. *Food science & nutrition*, *11*(10), 5856–5872. https://doi.org/10.1002/fsn3.3615

Kim, W. H., Song, H. O., Choi, H. J., Bang, H. I., Choi, D. Y., & Park, H. (2012).

Ethyl gallate induces apoptosis of HL-60 cells by promoting the expression of caspases-8, -9, -3, apoptosis-inducing factor and endonuclease G. *International journal of molecular sciences*, *13*(9), 11912–11922. https://doi.org/10.3390/ijms130911912

Ko, E. B., Jang, Y. G., Kim, C. W., Go, R. E., Lee, H. K., & Choi, K. C. (2022). Gallic Acid Hindered Lung Cancer Progression by Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptosis in A549 Lung Cancer Cells via PI3K/Akt Pathway. *Biomolecules & therapeutics*, *30*(2), 151–161. https://doi.org/10.4062/biomolther.2021.074

Konoshenko, M., Lansukhay, Y., Krasilnikov, S., & Laktionov, P. (2022). MicroRNAs as Predictors of Lung-Cancer Resistance and Sensitivity to Cisplatin. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(14). https://doi.org/10.3390/ijms23147594

Kopacz-Bednarska, A., & Król, T. (2022). Cisplatin—Properties and clinical application. *Oncology in Clinical Practice*, *18*(3), 166-176.

Kosuru, R. Y., Roy, A., Das, S. K., & Bera, S. (2018). Gallic Acid and Gallates in Human Health and Disease: Do Mitochondria Hold the Key to Success? *Molecular Nutrition and Food Research*, *62*(1), 1–10. https://doi.org/10.1002/mnfr.201700699

Kris, M. G., Johnson, B. E., Berry, L. D., Kwiatkowski, D. J., Iafrate, A. J., Wistuba, I. I., Varella-garcia, M., Wilbur, A., Aronson, S. L., Su, P., Shyr, Y., Ross, D., Sequist, L. V, Glisson, B. S., Khuri, F. R., Garon, E. B., Pao, W., Rudin, C., Schiller, J., … Bunn, P. A. (2014). Using Multiplexed Assays of Oncogenic Drivers in Lung Cancers to Select Targeted Drugs. *Jama*, *311*(19), 1998–2006. https://doi.org/10.1001/jama.2014.3741.Using

Lage, A. T., Otero, J. C. C., Trueba, G. G., & Toirac, R. D. J. R. (2021). Supervivencia global de pacientes con carcinoma del pulmón de células no pequeñas. *Revista Cubana de Oncología*, 19(2).

Lahiri, A., Maji, A., Potdar, P. D., Singh, N., Parikh, P., Bisht, B., Mukherjee, A., & Paul, M. K. (2023). Lung cancer immunotherapy: progress, pitfalls, and promises. *Molecular cancer*, *22*(1), 40. https://doi.org/10.1186/s12943-023-01740-y

Landau, S. I., Guo, X., Velazquez, H., Torres, R., Olson, E., Garcia-Milian, R., ... & Safirstein, R. (2019). Regulated necrosis and failed repair in cisplatin-induced chronic kidney disease. *Kidney international*, *95*(4), 797-814.

Lawson, D. A., Kessenbrock, K., Davis, R. T., Pervolarakis, N., & Werb, Z. (2018). Tumour heterogeneity and metastasis at single-cell resolution. *Nature Cell Biology*, *20*(12), 1349–1360. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0236-7

Lecun- Aguerrevere, Pablo. (2009). Hepatocarcinoma. *Gen*, *63*(4), 298-301. Recuperado en 22 de octubre de 2022, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-35032009000400013&lng=es&tlng=es

Liu, F., Zu, X., Xie, X., Liu, K., Chen, H., Wang, T., Liu, F., Bode, A. M., Zheng, Y., Dong, Z., & Kim, D. J. (2019). Ethyl gallate as a novel ERK1/2 inhibitor suppresses patient-derived esophageal tumor growth. *Molecular Carcinogenesis*, *58*(4), 533–543. https://doi.org/10.1002/mc.22948

Makovec T. (2019). Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. Radiology and oncology, 53(2), 148–158. https://doi.org/10.2478/raon-2019-0018

Mirzaei, S., Hushmandi, K., Zabolian, A., Saleki, H., Torabi, SMR., Ranjbar, A., SeyedSaleh, S., Sharifzadeh, SO., Khan, H., Ashrafizadeh, M., et al. (2021). Esclarecimiento del papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la quimioterapia con cisplatino: un enfoque en las vías

moleculares y posibles estrategias terapéuticas. *Moléculas* **2021** , *26* , 2382. https://doi.org/10.3390/molecules26082382

Mohan, S., Thiagarajan, K., & Chandrasekaran, R. (2017). Evaluation of ethyl gallate for its antioxidant and anticancer properties against chemical-induced tongue carcinogenesis in mice. *Biochemical Journal*, *474*(17), 3011–3025. https://doi.org/10.1042/BCJ20170316

Muller, A. G., Sarker, S. D., Saleem, I. Y., & Hutcheon, G. A. (2019). Delivery of natural phenolic compounds for the potential treatment of lung cancer. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, *27*(1), 433–449. https://doi.org/10.1007/s40199-019-00267-2

Newton, K., Strasser, A., Kayagaki, N., & Dixit, V. M. (2024). Cell death. *Cell*, *187*(2), 235-256.

Nooreldeen, R., & Bach, H. (2021). Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. International journal of molecular sciences, 22(16), 8661. https://doi.org/10.3390/ijms22168661

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2022). Cáncer. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer, consultado el 16 de febrero de 2023.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2023). Cáncer de pulmón. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/lung-cancer, consultado el 17 de octubre de 2023.

Reig, M., Forner, A., Ávila, M. A., Ayuso, C., Mínguez, B., Varela, M., Bilbao, I., Bilbao, J. I., Burrel, M., Bustamante, J., Ferrer, J., Gómez, M. Á., Llovet, J. M., De la Mata, M., Matilla, A., Pardo, F., Pastrana, M. A., Rodríguez-Perálvarez, M., Tabernero, J., … Bruix, J. (2021). Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Update of the consensus document of the AEEH, AEC, SEOM, SERAM, SERVEI, and SETH. *Medicina Clinica*,

156(9), 463.e1-463.e30. https://doi.org/10.1016/j.medcli.2020.09.022

Riverón Forment, G., Fernández García, S., Pandolfi Blanco, A., Contreras Roura, J., & López Izada, Y. (2022). Estado redox en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadios avanzados tratados con poliquimioterapia. *Revista Finlay*, *12*(2), 221-227.

Rodríguez, L. M., Flores, N. R., Ferreira, D. S., Guerrero, A. M., Ciangherotti, C., Bermúdez, J., ... & Bor, M. (2023). Efecto comparativo de la actividad antioxidante del Ácido Gálico y diferentes Alquilgalatos. *Revista de la Facultad de Farmacia*, *86*(1y2).

Sánchez-Carranza, J. N., Alvarez, L., Marquina-Bahena, S., Salas-Vidal, E., Cuevas, V., Jiménez, E. W., Veloz, G. R. A., Carraz, M., & González-Maya, L. (2017). Phenolic compounds isolated from Caesalpinia coriaria induce S and G2/M phase cell cycle arrest differentially and trigger cell death by interfering with microtubule dynamics in cancer cell lines. *Molecules*, *22*(4). https://doi.org/10.3390/molecules22040666

Schabath, M. B., & Cote, M. L. (2019). Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 28(10), 1563–1579. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-0221

Tian, X., Xu, J., Ye, Y., Xiao, X., Yan, L., Yu, S., Cai, J., Du, Q., Dong, X., Zhou, L., Shan, L., & Yuan, Q. (2023). Gallic acid in theabrownin suppresses cell proliferation and migration in non-small cell lung carcinoma via autophagy inhibition. *Oncology Letters*, *26*(1), 1–10. https://doi.org/10.3892/ol.2023.13880

Wang, D., & Bao, B. (2020). Gallic Acid Impedes Non-Small Cell Lung Cancer Progression via Suppression of EGFR-Dependent CARM1-PELP1 Complex. *Drug design, development and therapy*, *14*, 1583–1592.

https://doi.org/10.2147/DDDT.S228123

Wianowska, D., & Olszowy-Tomczyk, M. (2023). A Concise Profile of Gallic Acid—From Its Natural Sources through Biological Properties and Chemical Methods of Determination. *Molecules*, *28*(3). https://doi.org/10.3390/molecules28031186

Zhang, T., Ma, L., Wu, P., Li, W., Li, T., Gu, R., ... & Xiao, Z. (2019). Gallic acid has anticancer activity and enhances the anticancer effects of cisplatin in non-small cell lung cancer A549 cells via the JAK/STAT3 signaling pathway. Oncology reports, 41(3), 1779-1788.

Zhang, Y., Chen, S., Wei, C., Rankin, G. O., Rojanasakul, Y., Ren, N., Ye, X., & Chen, Y. C. (2018). Dietary Compound Proanthocyanidins from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves inhibit angiogenesis and regulate cell cycle of cisplatin-resistant ovarian cancer cells via targeting Akt pathway. *Journal of functional foods*, *40*, 573–581. https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.045

Zhou, D., Yang, Q., Tian, T., Chang, Y., Li, Y., Duan, L. R., ... & Wang, S. W. (2020). Gastroprotective effect of gallic acid against ethanol-induced gastric ulcer in rats: Involvement of the Nrf2/HO-1 signaling and anti-apoptosis role. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *126*, 110075.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de soluciones

Anexo 1.1 PBS 1X

Se pesaron 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.15 g de Na_2HPO_4 y 0.27 g de KH_2PO_4, estos se disolvieron en 300 mL de agua destilada, que se aforó en un matraz de 1 L, para luego ser esterilizado por filtración con una membrana de 0.22 µm o en autoclave durante 15 min a 121 °C (15 lb de presión).

Anexo1. 2 Cristal violeta al 0.1%

Se pesaron 0.05 g de cristal violeta (Hycel) y fueron colocados en un vaso de precipitado con 50 mL de PBS 1X, se utilizó un agitador magnético para mezclarlo, luego se filtró con papel filtro y se colocó en un recipiente de 100 mL cubierto de pape aluminio.

Anexo 1. 3 Ácido acético al 33%

Se colocaron 50 mL de agua destilada en una probeta de 100 mL, después se añadieron 33 mL de ácido acético glacial (Anasol) y se aforó a 100 mL con agua destilada, finalmente se mezcló perfectamente y colocó en un recipiente de vidrio.

Anexo 1. 4 Formol al 10%

En una probeta de 50 mL, se colocaron 13.51 mL de formol al 37% y se aforó con PBS 1X.

Anexo 1.4 Tripsina al 0.25%

Se pesaron 2.5 g de tripsina, 8 g de NaCl, 0.4 g de KCl, 0.58 g de $NaHCO_3$, 0.2 g de EDTA y 1 g de dextrosa, los cuales fueron disueltos en 800 mL de agua destilada antes de aforar a 1 L. Se filtró con la unidad de filtración con una membrana de 0.22 µm dentro de la campana de flujo laminar. Finalmente se conservó a -20 °C.

Anexo 2. Espectros de los compuestos fenólicos AG y GE.

El espectro correspondiente al ácido gálico y al galato de etilo se muestran en las Figuras 15 y 16.

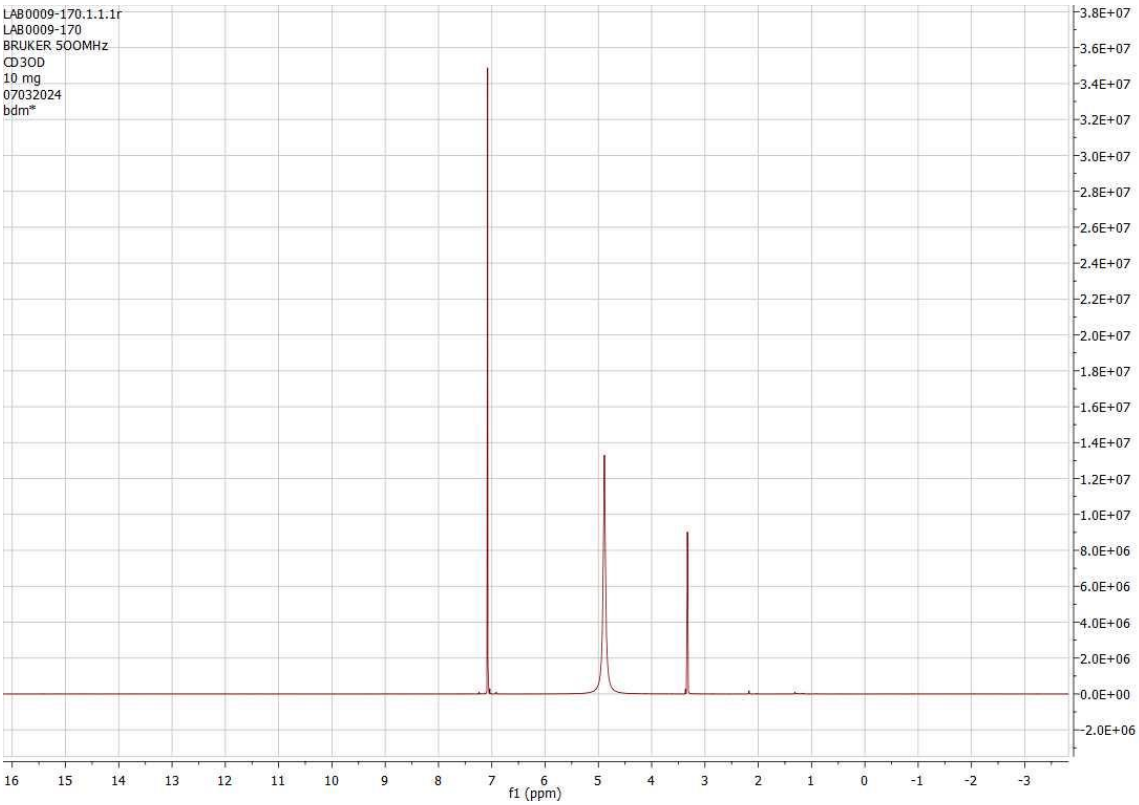


Figura 15. Espectro experimental H-RMN de ácido gálico.

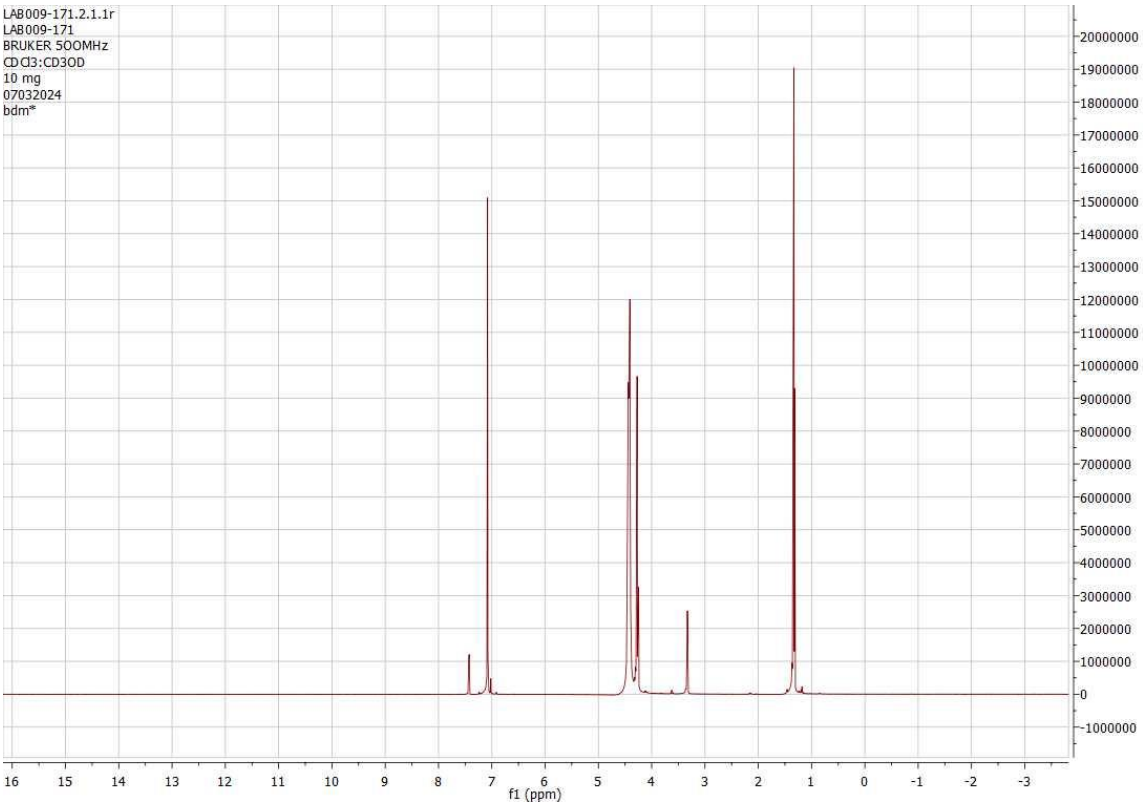


Figura 16. Espectro experimental correspondiente al galato de etilo por H-RMN.

Anexo 3. Imágenes de los 10 campos.

Las Figuras 17, 18 y 19 muestran los 10 campos capturados para la metodología del apartado 6.4.

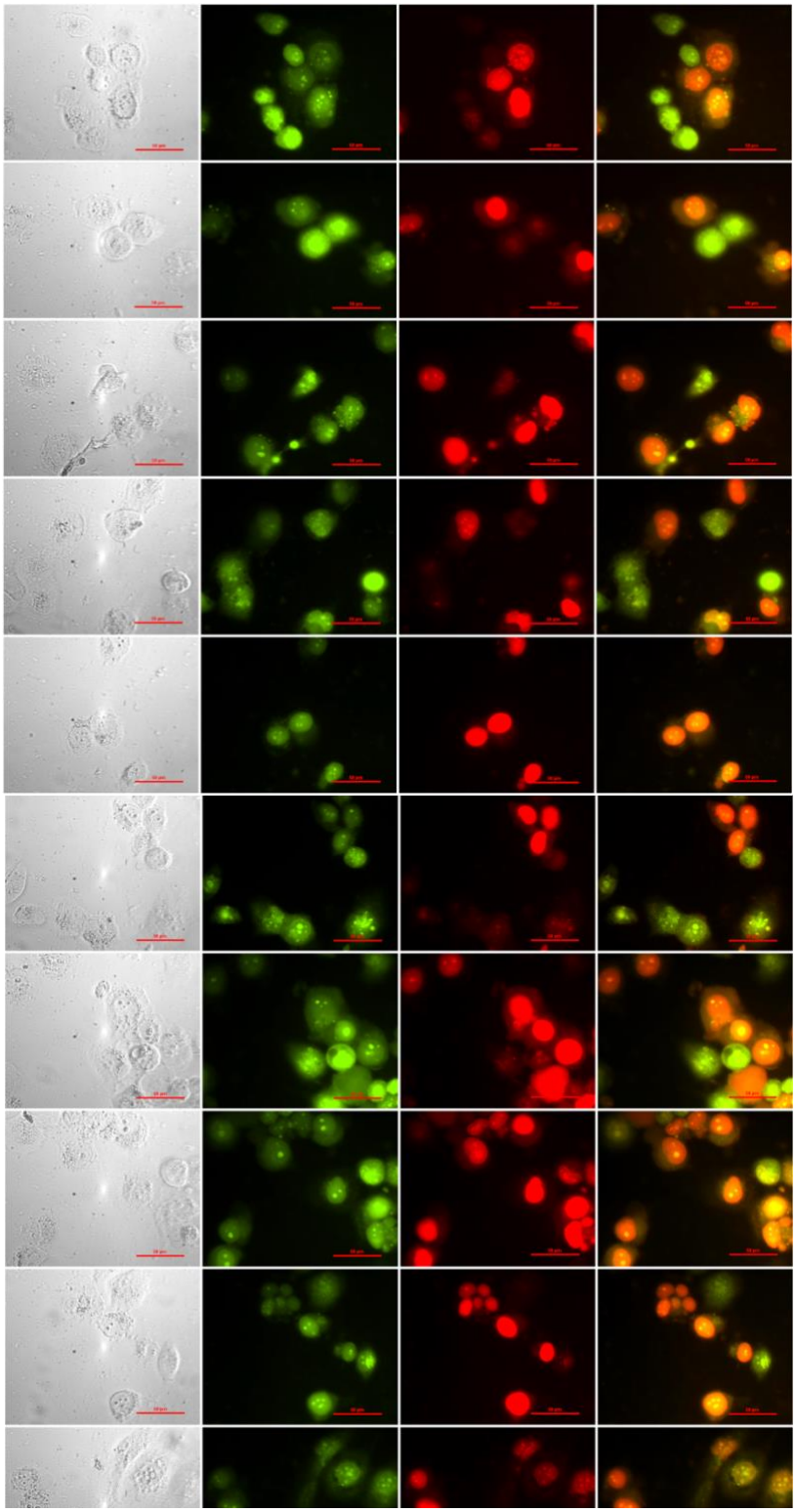


Figura 17. Toma de 10 campos a 40X, de CDDP (3.12 µg/mL), en células H1299.

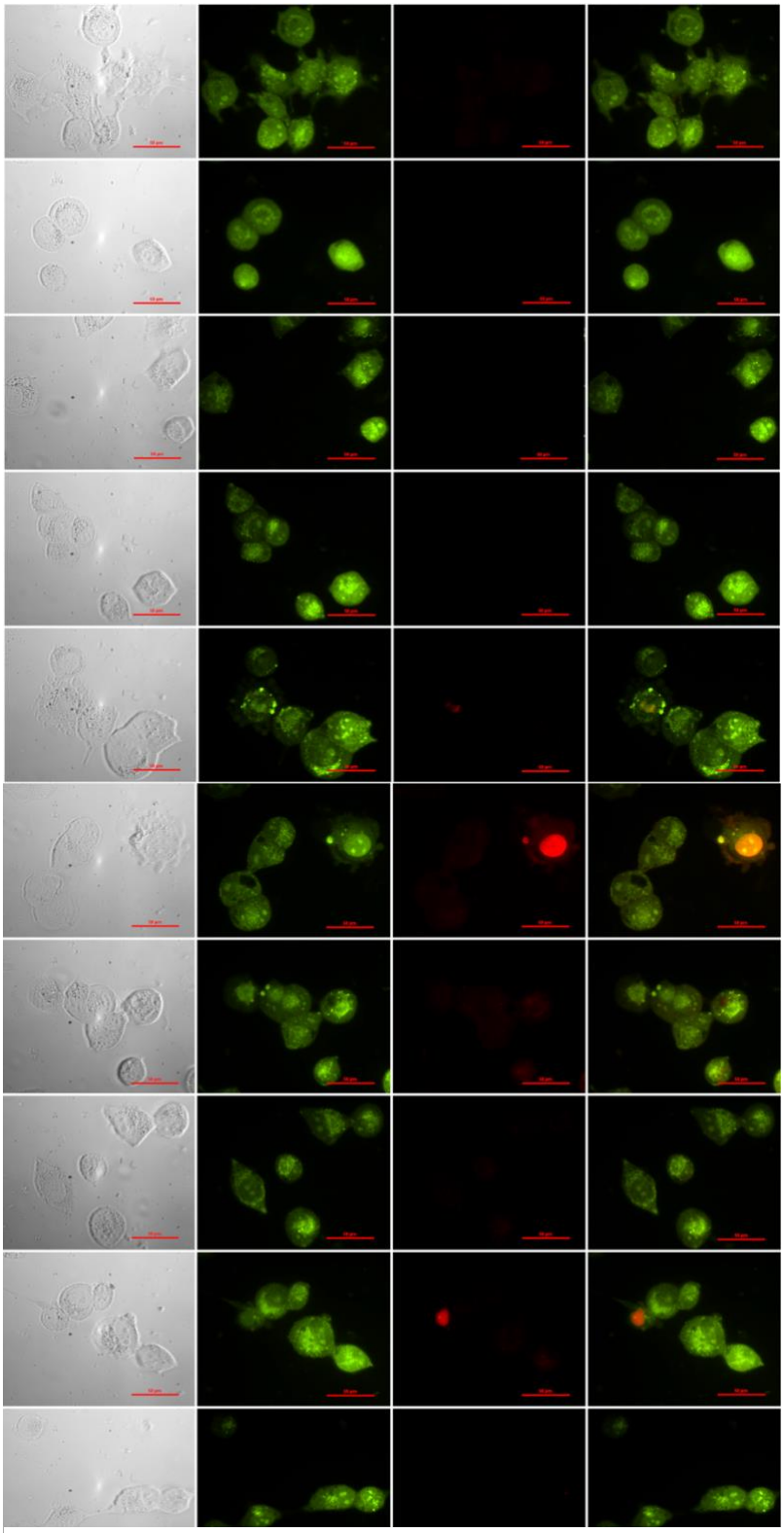


Figura 18. Toma de 10 campos a 40 X del co-tratamiento CDDP (3.12 µg/mL) y GE (5 µg/mL).

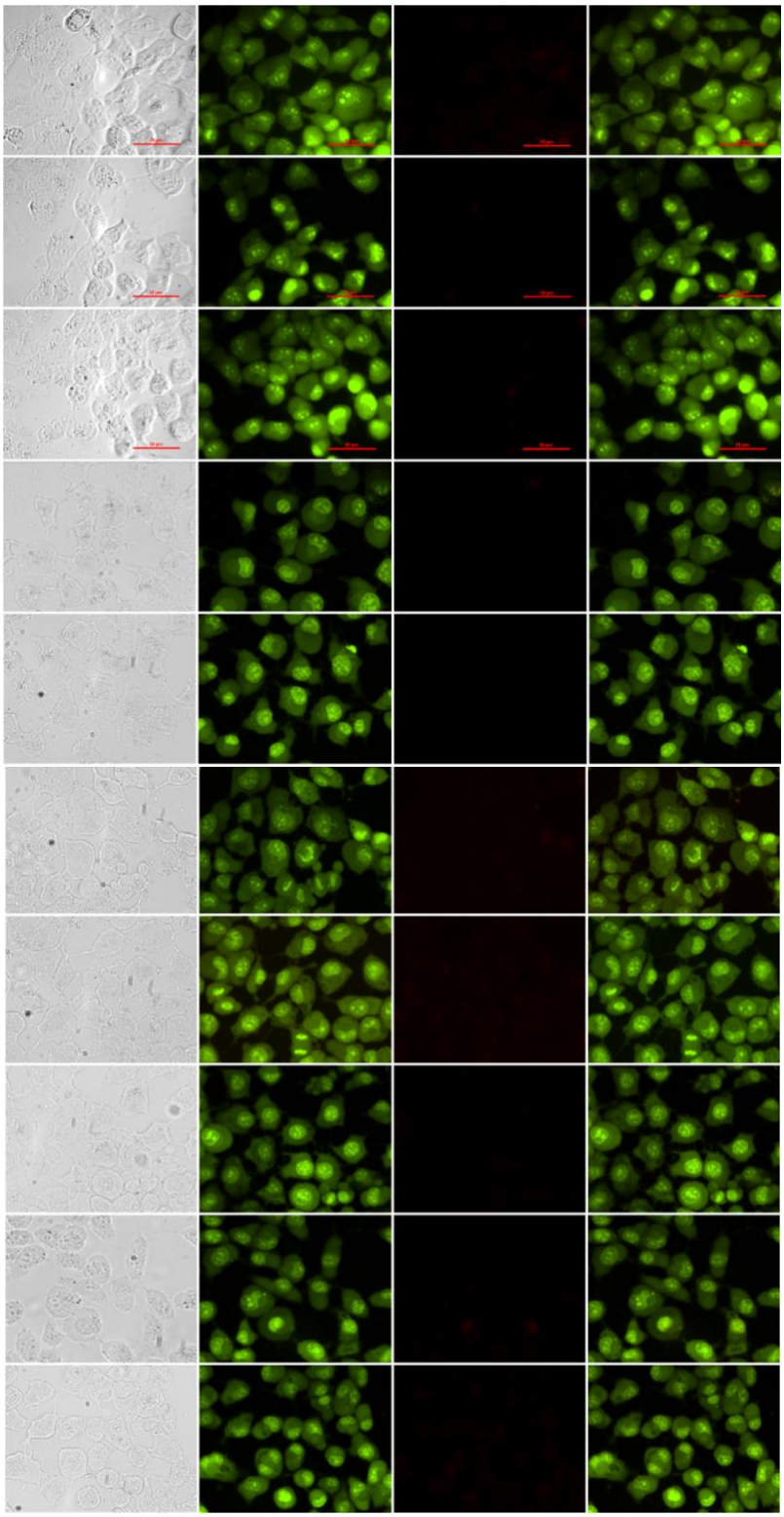


Figura 19. Toma de 10 campos, de apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno en células H1299.

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

Nombre del alumno: **Michelle Alejandra Moreno Enríquez**

Título de la tesis: "Ácido gálico y galato de etilo en co-tratamiento con cisplatino, antineoplásico de referencia, en células de Carcinoma Pulmonar"

Grado a obtener:

X Maestría en Farmacia
_____ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dr. Alexandre Cardoso Taketa**
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

X Si se aprueba tal como se presenta
_____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

_____

_____

_____

_____
Firma del miembro del jurado

13 de mayo del 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2025-05-15 13:46:07 | FIRMANTE

K+yLxwK1WEQ/N+DLrLgbDZBFnlDOIA/3lBGa5ZV1cBjxKpuENGnyZyD9uzH5FZKHePFVXgsU5z93833I74hfx2656Wl9c2km8kp15qTFWoR4D56n2gbL+EqxOYpwiJp0Y+9
uSBLu3bCHUVcLIl0iPDk+bleztuNEwBut2INI6l6UtYVUv7iWSpeugw6BytonFTlDswpMaDqtCa2LEXX8dFG2VKg8Ro2GIwqZqKwujtD7SaF92n8gsMHRzl11NRuIQG0rXaHGq
uT3xQvk6vSCdA8kXMyFY4Yz9Jkaq+PIlt/NFs8bSKldAOBjHbIP0p5qqjZX8dEwY/S7WyPPi4tJZw==

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

O3MxthYm0

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ukwUz2Mxj7GBFvJqYrjcBS1HsWbTmt3w

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

Nombre del alumno: **Michelle Alejandra Moreno Enríquez**

Título de la tesis: "Ácido gálico y galato de etilo en co-tratamiento con cisplatino, antineoplásico de referencia, en células de Carcinoma Pulmonar"

Grado a obtener:

X Maestría en Farmacia
_____ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dr. Erick Ayala Calvillo**
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

X Si se aprueba tal como se presenta
_____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

_____

_____

_____

_____
Firma del miembro del jurado

13 de mayo del 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

ERICK AYALA CALVILLO | Fecha:2025-05-14 18:28:12 | FIRMANTE

n5+CoYLSB6ngBFfTQp3Z5qz208Mj+bFVBnM7ktfXrxaATe1V7TbJzZ4dXLTXcxlX5lgbbNaVvEa0DHIrwD6rLRw7NTMBt6xkMdwt3PsceSJS573X8qtOY0TgJafoXfl6oC5upAemLtQUb9i7p7Y9H8xl65Ocyi6AkFNiOelKcDrx5rIURKD4B9YkAtJUcWQN9SGlGr2g6MbihmxFvjjU/hjy3TG8u+z9UyOwYozwjVFn2Bc0hp8tg7SeaQvi+x9UBea9SrmMvxkY46BuRy4qX7RlY5ROMZbsG2+/y8rFSQpZ7fcjXV/JY5FU0hcSDpIX6fVTmvVaGuQC92UJuUs2qg==

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

0gKhGVbli

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/gBTGMZrEhaDwZ7mKFLG7WpmqX600F0ak

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

Nombre del alumno: **Michelle Alejandra Moreno Enríquez**

Título de la tesis: "Ácido gálico y galato de etilo en co-tratamiento con cisplatino, antineoplásico de referencia, en células de Carcinoma Pulmonar"

Grado a obtener:

X Maestría en Farmacia
_____ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara**
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

X Si se aprueba tal como se presenta
_____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

_____

_____

_____

_____
Firma del miembro del jurado

13 de mayo del 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

SERGIO MANUEL ENCARNACIÓN GUEVARA | Fecha:2025-05-14 19:32:25 | FIRMANTE

kIxLQGU0r/9sGQR1MfB1p5mMB//m1WmCUiKhAzmAlddh+a1DlwGxeFaPkSERVVLKC4m8R4cShiGtJMYZNe0Jy1vDrHjJjMSQfg0/sooW7JQ5+T2AUk4LhOrIzvqqA0xL/S+qReb4iLJrZGfW5wLfhWyD5LJ5VmOX5vwGPXSd+3zJHJMjUADtgXFYdxptjOqmv8EcgjdJINrD3Eynd5yfWPQ1ayOg4vdKMjBaf7f2qz1A59Fi4uxRSmDJCA1cFpnwtJhi7F0KEWD/tMrQpr6oAQGgDCyLU8HMKfgAmqH+hYEQs/yssrywA7MkzGFSf1ZiZKQ7vsJvuSAnN4M4hCsNaA==

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

X3jSuhLps

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/kbs4BamHf7POP9m5hmIRBGVfnNHThYDE

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

Nombre del alumno: **Michelle Alejandra Moreno Enríquez**

Título de la tesis: "Ácido gálico y galato de etilo en co-tratamiento con cisplatino, antineoplásico de referencia, en células de Carcinoma Pulmonar"

Grado a obtener:

X Maestría en Farmacia
_____ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dr. Edgar Rangel López**
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

X Si se aprueba tal como se presenta
_____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

_____

_____

_____

_____
Firma del miembro del jurado

13 de mayo del 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

EDGAR RANGEL LÓPEZ | Fecha:2025-05-15 11:35:05 | FIRMANTE

EG6wO7OY0vEJyfqaLBZ113INuktoelFEf2CmXrRXmOV0nZn00LdHYq0XgICcuRCtSOXv9YQbyWGmIbrMOx574gZtIZLk/WAjEFUHhqbp8N+li6Qv16QXWN3dB+WQt9jLQufRhLjZguj5sY5Hi2oBCiEdVWynaHZMs0e6a5tEn7IM98muF29niaM7AYvj+toikwDsKE4XXV5eYsoCbvZSJB5M0rAxNUJHWK+Hgw8VzYE4nbP6zqJRuHuP3Gb5W/2A+s/6gG+zR2V1BEk3dD1l2Zj9HuDjYXpQH7Sagpfso1ODrWxb+i77gdrMo5fXd0ynvboBh1dabz2hcwa8aXOEvg==

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

pxRNjHs7W

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/SGd82C1FgIk4NbftSoP8EsHnUFiI9lPO

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

Nombre del alumno: **Michelle Alejandra Moreno Enríquez**

Título de la tesis: "Ácido gálico y galato de etilo en co-tratamiento con cisplatino, antineoplásico de referencia, en células de Carcinoma Pulmonar"

Grado a obtener:

X Maestría en Farmacia
_____ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dra. Leticia González Maya**
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:
La tesis:

X Si se aprueba tal como se presenta
_____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

_____

_____

_____

_____
Firma del miembro del jurado

13 de mayo del 2025
Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

LETICIA GONZALEZ MAYA | Fecha:2025-05-14 18:02:19 | FIRMANTE

V7qh4uyO+94KCZCui34pXF3tqFWaUXnBZG8lXz7ZFsPNzHAnsBSz5KJsjulsDbLiKpm7ET/+1FO1ORaQ3oon/z2S7LnWUR1kxMO4//MYoP3vIKl/G4z+nWkgd3wBsTOEubhsbmi7ZeHa4y9q2vrJGThT84Rzs/l+l2zAivn+h1EsHsx1rXAC+7d5QEQr1UGLNodbSA6TGNKFh8kYktKgbSl5FIKkTg5VdcJRU87G9n10hMVOITInDV/rUGTo3ARyu+mGvAkNfE9k7sDyhEVdvmf7g0VCaJuaHS8WY0H3QQUT3qew405ga3xoYh9KWra577NDRKkZk51albPKKwf9+Q==

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

q4I2PAUCe

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/cx8dRYGQul03NbO5182nfS1gt4P02y58