



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**LICENCIATURA EN BIOMEDICINA**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA**

**LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGÍA**



***Efecto del ácido elálgico sobre la capacidad proliferativa en la línea celular de  
cáncer de pulmón de células no pequeñas A549***

Tesis que para obtener el grado de

**Licenciada en Biomedicina**

Presenta

**Maria Esther Blanco Aguilar**

Director de tesis

D. C. Eduardo Monjaraz Guzmán

*Eduardo Monjaraz G.*

Puebla, Pue. Mayo 2024

*A papá, mi vida entera.*

La historia se repite, pero la ciencia reverbera.

Siddhartha Mukherjee\*

\*Mukherjee, S. (2017). *El emperador de todos los males*. Penguin Random House Grupo Editorial.

Las esperanzas tienen ese destino que cumplir, nacer unas detrás de otras, por eso, pese a tantas decepciones, todavía no se han acabado en el mundo.

José Saramago\*

\*Saramago, J. (2020). *Las intermitencias de la muerte*. Penguin Random House Grupo Editorial.

## **Agradecimientos**

Con todo mi amor, a papá por darme tantas enseñanzas, recuerdos, reflexiones y amor durante el tiempo que estuvo conmigo que me alcanzarán para toda mi vida. Mi corazón está lleno de ti, mis acciones tienen tus rasgos y en mis memorias siento tu aroma. Te amo y te extraño todos los días; encontraste la forma de siempre estar conmigo, papi querido.

A mamá por ser mi lugar seguro, por ser la más noble, linda y reconfortante. Has hecho mi camino más llevadero y me recuerdas que no estoy sola. Te amo mucho, gracias infinitas.

A mi hermano Roberto por ser mi compañía, por tolerarme y ser el hermano mayor que cuida, solo somos los dos. Gracias por estar.

A tío Hugo, nadie me brindó apoyo como tú en el momento más roto de mi vida. Sé que confiabas que lograría todas mis metas y estarías ahí. Gracias por ser mi segundo papá a pesar de las circunstancias, te extraño.

A mi abuelo Asunción por su cariño indiscutible y dejar lo mejor en mí. También agradezco a mi familia que ha estado para mí en todo momento. A tía Sonia por ser incondicional y siempre estar, te quiero mucho. Igualmente, a mis abuelos, tíos, primos (especialmente a MJ por ser mi cómplice desde siempre) y sobrinos por acompañarme en las alegrías y complicaciones. Han dado soporte a mi vida al interpretar cada uno su papel.

A Ringuis por ser esencial en la familia y ser el más amoroso regalo que la vida me pudo dar para sobrellevar lo más difícil y ser un soporte emocional tan especial.

A mis amigos, principalmente a Diana por ser mi alter ego y no soltarme desde el día uno, tu amistad ha sido vital para mí desde la adolescencia y no hemos parado de reír a carcajadas desde entonces, nada sería llevadero sin tu compañía. Gracias por todo.

También agradezco a aquellos que han formado parte de mi vida; los que fueron y los que permanecen, porque han sido significativos en mi crecimiento personal. Son especiales para mí y los llevo en el alma porque todos han dejado trazos en mí.

A mis mentores, profesores y compañeros a lo largo de mi vida académica. Sus enseñanzas han sido guía fundamental en mi desarrollo personal y profesional. Especialmente agradezco al Dr. Monjaraz, a la Dra. Amira, al Dr. Cebada y a los que conforman el Laboratorio de Neuroendocrinología por brindarme el conocimiento teórico y práctico para desarrollar esta tesis y mantener vivo en mí el gusto por la investigación científica.

## Índice

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES GENERALES.....	5
3.1 Estadísticas del cáncer .....	5
3.2 Cáncer de pulmón.....	7
3.2.1 Origen.....	7
3.2.2 Clasificación .....	9
3.2.3 Factores de riesgo.....	10
3.2.4 Tratamiento.....	11
3.2.4.1 Tratamiento Convencional.....	11
3.2.4.2 Tratamiento alternativo.....	11
4. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	12
4.1 Ciclo celular .....	12
4.2 Proliferación .....	14
4.3 Control del ciclo celular.....	15
4.4 Apoptosis .....	21
4.5 Ácido elágico.....	26
4.5.1 Ácido elágico y cáncer.....	28
4.5.2 Ácido elágico y cáncer de pulmón .....	36
5. JUSTIFICACIÓN.....	40
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	41
7. HIPÓTESIS.....	41
8. OBJETIVOS.....	41
8.1 OBJETIVO GENERAL .....	41
8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
9. MATERIAL Y MÉTODOS .....	42
9.1 Cultivo celular .....	42
9.2 Ensayo de conteo celular.....	43
9.3 Ensayo de expresión génica .....	43
9.3.1 Extracción de ARN total.....	43

9.3.2	Cuantificación de ARN total .....	44
9.3.3	Síntesis de ADN complementario (Transcripción reversa) .....	45
9.3.4	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	45
9.3.5	Electroforesis .....	47
9.3	Densitometría.....	48
9.4	Análisis de datos .....	48
10.	RESULTADOS .....	49
11	DISCUSIÓN.....	58
12	CONCLUSIONES.....	65
13	BIBLIOGRAFÍA.....	66



## 1. RESUMEN

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizado por la proliferación rápida y descontrolada de células anormales que pueden llegar a invadir tejidos y órganos distantes de su lugar de origen. El cáncer de pulmón ocupa el segundo lugar de incidencia y el primer lugar de mortalidad en la población adulta a nivel mundial. La principal causa de muerte por cáncer de pulmón es la metástasis. Muchos grupos de investigación están enfocados en la búsqueda de compuestos de origen natural (fitoquímicos) que provoquen de manera efectiva y selectiva la muerte de las células tumorales, sin afectar de manera significativa a las células normales. El ácido elágico, compuesto polifenólico, presente en la cáscara de frutos rojos y frutos secos, tiene efectos antiinflamatorios, antioxidantes y para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, como es el caso de mama, endometrio, estómago y colón. Particularmente, el ácido elágico, inhibe la capacidad proliferativa de las células no pequeñas de cáncer de pulmón, sin conocerse a detalle el proceso celular afectado, por lo que el propósito del presente trabajo de tesis es dilucidar si este compuesto, afecta la tasa replicativa o la tasa apoptótica de las células tumorales A549. Los objetivos planteados en el estudio incluyen evaluar los efectos del ácido elágico en la población celular, analizando la expresión de genes relacionados con el ciclo celular (ciclinas) y la apoptosis (marcadores pro-apoptóticos y anti-apoptóticos).

## 2. INTRODUCCIÓN

El cáncer se designa como un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Se caracteriza por la multiplicación rápida de células anormales que, si sobrepasa sus límites habituales, puede propagarse a otras partes del cuerpo (Organización Mundial de la Salud, 2023).

A medida que las células normales evolucionan progresivamente hacia un estado neoplásico adquieren capacidades distintivas y que el progreso de la patogénesis del tumor podría racionalizarse por la necesidad de que las células cancerosas adquieren características que les permiten volverse tumorigénicos y finalmente malignos (Hanahan et al., 2011).

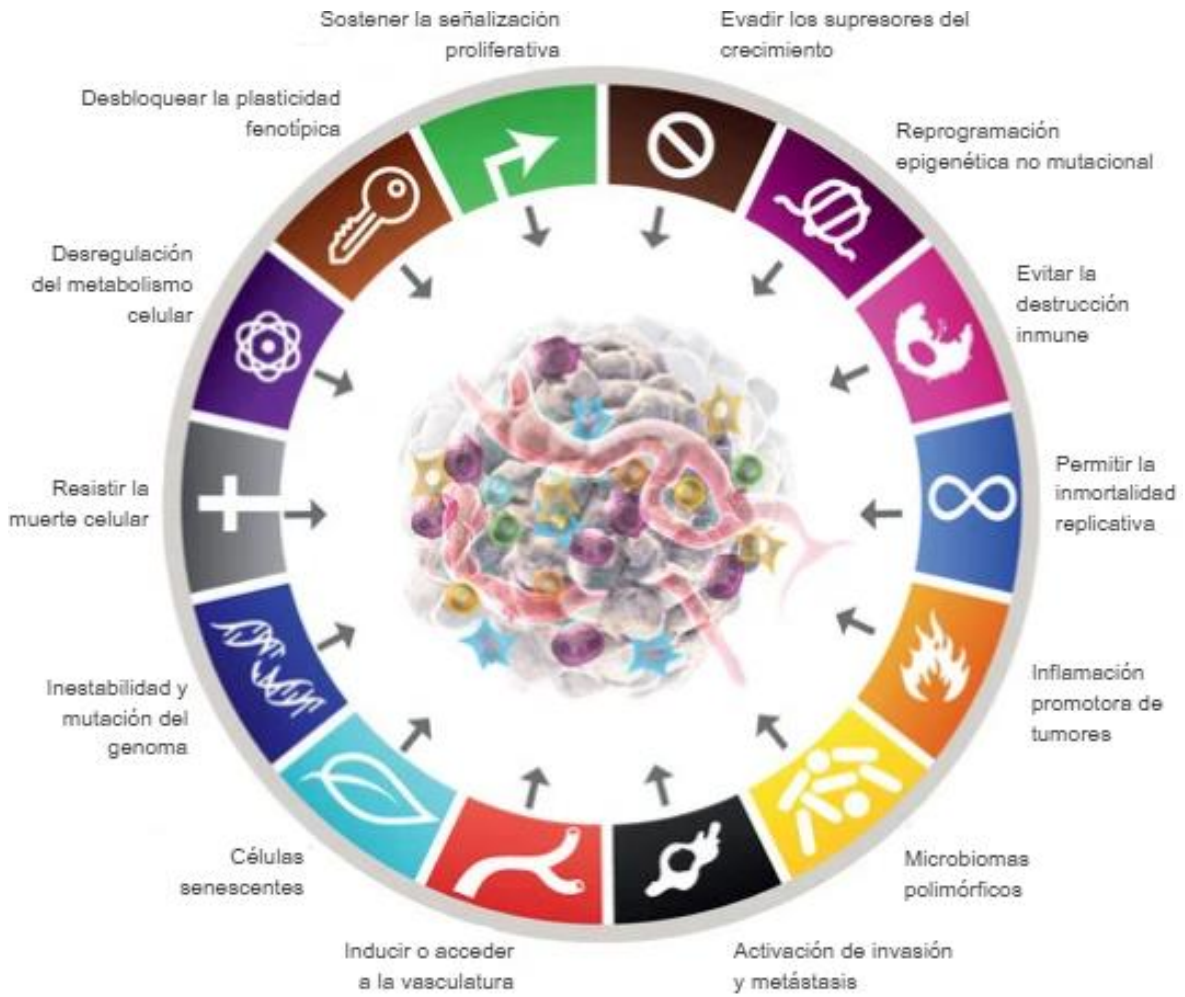
Los mecanismos supresores de tumores presentes en células normales se distinguen de las células cancerosas que crecen anormalmente, pero la problemática queda expuesta cuando las funciones de los genes supresores de tumores son restringidas por factores ambientales (contaminación, radiación, infecciones...) o el estilo de vida (fumar, mala alimentación, tomar alcohol, etc.) (Dutta et al., 2019).

Los tumores son tejidos complejos compuestos por múltiples tipos de células distintas que participan en interacciones heterotípicas entre sí. Siendo participantes activos en la tumorigénesis contribuyendo al desarrollo y expresión de capacidades distintivas, abarcando las contribuciones del microambiente tumoral, que considera a las células cancerosas, células madre cancerosas, células endoteliales, células madre y progenitoras del estroma tumoral, pericitos, células inflamatorias inmunes, fibroblastos asociados al cáncer y recientemente se plantea considerar a las células senescentes (Hanahan et al., 2011; Hanahan, 2022).

La comprensión de la biología del cáncer se ha fortalecido gracias a la descripción de las características distintivas del cáncer por Hanahan et al. desde el 2000. Originalmente se plantearon como características distintivas el mantenimiento de la señalización proliferativa, la evasión de los supresores de crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la habilitación de la inmortalidad replicativa, la inducción de la

angiogénesis y la activación de invasión y metástasis. Añadiendo en 2022 por Hanahan, la desregulación del metabolismo celular y la evasión de la destrucción inmune, consideradas en 2011 como sellos distintivos emergentes; así como el desbloqueo de la plasticidad fenotípica. Dichas características son capacidades funcionales cruciales adquiridas por las células a medida que pasan de la normalidad a la formación de tumores malignos, o sea la homogenización del fenotipo celular de todos los tipos de células cancerosas (Hanahan et al., 2000; Hanahan et al., 2011; Hanahan, 2022).

Pero los mecanismos moleculares y celulares de la patogénesis no son abordados por completo por las capacidades distintivas, por lo que se considera a las características habilitadoras debido a que la condición aberrante de la neoplasia que proporcionan los medios por los que las células cancerosas y los tumores pueden adoptar rasgos funcionales. Los procesos habilitadores son la inestabilidad y la mutación del genoma, la inflamación promotora de tumores, la reprogramación epigenética no mutacional y las variaciones polimórficas en los microbiomas de órganos y tejidos. Además de incorporar a las células senescentes como componentes genéricos del microambiente tumoral (Hanahan, 2022).



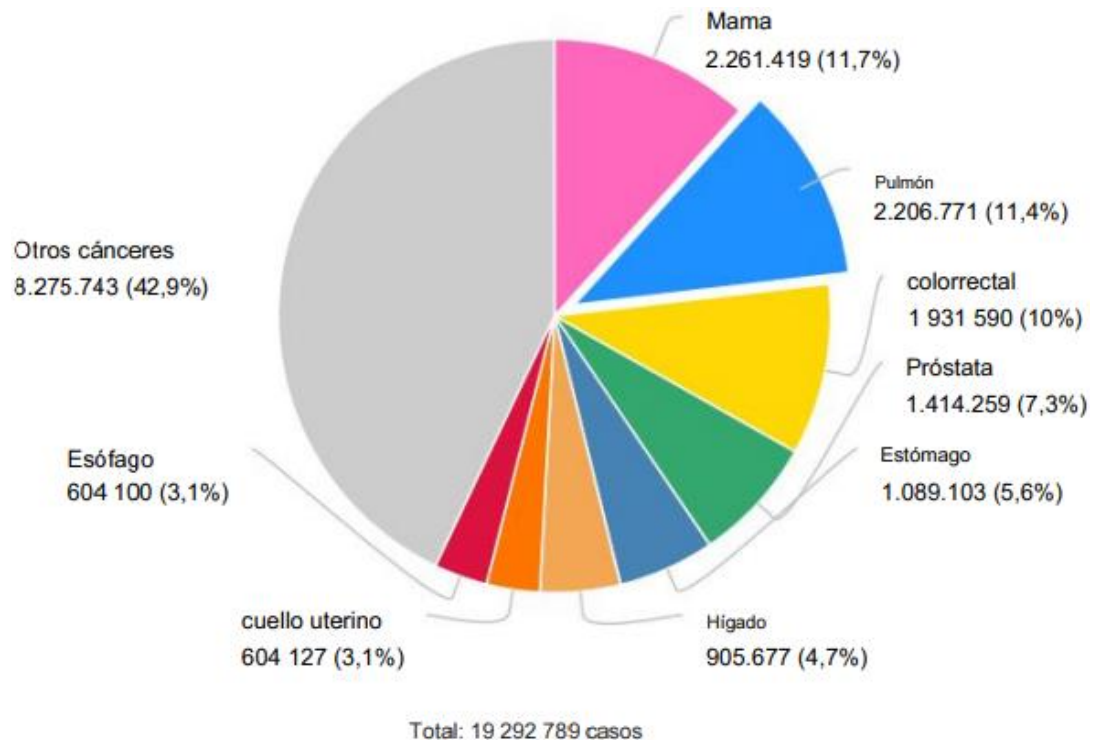
**Figura 1. Características canónicas y potenciales que identifican a las células tumorales** (Modificado de Hanahan, 2022).

### 3. ANTECEDENTES GENERALES

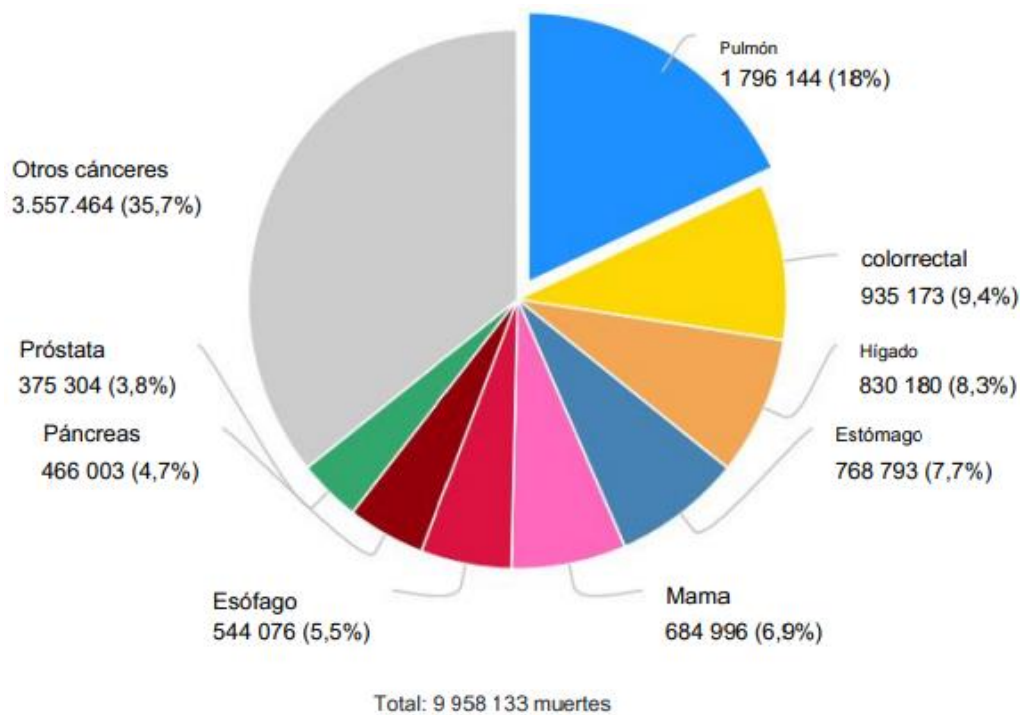
#### 3.1 Estadísticas del cáncer

En el 2020 se registraron 19.29 millones nuevos casos de cáncer y 9.95 millones de muertes a nivel mundial por tumores malignos (International Agency for Research on Cancer, 2020). El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), reportó en el año 2023 al cáncer como la tercera causa de muerte.

El cáncer de pulmón es el segundo más común referente a nuevos casos, con 2.21 millones de casos (Figura 2). Asimismo, ocasionó 1.8 millones de defunciones (Figura 3), siendo el causante del mayor número de fallecimientos por cáncer (International Agency for Research on Cancer, 2020).



**Figura 2. Número de casos nuevos de cáncer** (Tomada de International Agency for Research on Cancer, 2020).



**Figura 3. Número de muertes por cáncer** (Tomada de International Agency for Research on Cancer, 2020).

En 2021, México registró 1.12 millones de defunciones, de las cuales, el 8 % fue ocasionado por tumores malignos (90123 muertes). La tasa de defunciones por esta causa ha estado aumentando de forma constante, al pasar de 6.09 defunciones por cada 10 mil personas en el año 2010, a 7.06 en 2021 (INEGI, 2023). Además, México reportó 7588 nuevos casos y 7100 muertes por cáncer de pulmón (International Agency for Research on Cancer, 2020).

La incidencia del cáncer aumenta demasiado con la edad, probablemente porque se van acumulando factores de riesgo de determinados tipos de cáncer. A esta acumulación global se suma la pérdida de eficacia de los mecanismos de reparación celular que suele ocurrir con la edad (Organización Mundial de la Salud, 2023).

Para las personas adultas mayores (60 años y más) que fallecieron por tumores malignos, la principal causa en los hombres se debió a tumores malignos en

próstata, seguida del tumor maligno de tráquea, de los bronquios y del pulmón, con tasas de 10.59 y 4.44 defunciones por cada 10 mil hombres, respectivamente. En las mujeres de 60 años y más, la tasa más alta se ubicó en el tumor maligno de la mama, con 4.81 defunciones por cada 10 mil mujeres, seguida por tumor maligno del hígado y de las vías biliares intrahepáticas con una tasa de 3.29 defunciones por cada 10 mil mujeres (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2023).

### **3.2 Cáncer de pulmón**

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo, es un término usado para designar a los tumores epiteliales malignos que surgen de la mucosa respiratoria; como los bronquios, bronquiolos y alveolos (Gazdar et al., 2011).

#### **3.2.1 Origen**

El pulmón es un órgano complejo compuesto por distintos tipos celulares con funciones reservadas que convergen en el intercambio de gases. El paso eficiente de oxígeno y dióxido de carbono entre la sangre y el medio ambiente se lleva a cabo en un contexto de exposición a gases tóxicos, partículas contaminantes y agentes infecciosos (Gridelli et al., 2015).

En general, las partículas inhaladas grandes son eliminadas por acción ciliar en las vías respiratorias grandes, los agentes infecciosos por células inmunitarias y, las células productoras de moco y las células neuroendocrinas desempeñan un papel en el mantenimiento de la función (Gridelli et al., 2015).

Las células de las vías respiratorias y los compartimientos alveolares son mantenidas por sus células progenitoras que desempeñan un papel decisivo en la homeostasis, la reparación y el cáncer. El pulmón es un órgano con la función de intercambiar gases en el aire y sangre. Cuenta con dos estructuras diferenciadas:

las vías respiratorias y los alvéolos. Estos se encargan de que el sistema respiratorio sea eficiente en el intercambio gaseoso y de proteger el epitelio pulmonar de microorganismos y partículas inhaladas diariamente. En las vías respiratorias, las células basales dan lugar a las ciliadas, a las neuroendocrinas y a las células club (Sainz et al., 2021).

Las células basales son células progenitoras consideradas candidatas de origen del carcinoma de células escamosas. Por otro lado, las células ciliadas son las que predominan en las vías respiratorias, eliminan los elementos exógenos del pulmón mediante la coordinación de sus cilios, además de ser quimiosensores y mecanosensores de dichas vías. Son el tipo de célula más diferenciado en el pulmón, con una capacidad proliferativa limitada por lo que es posible que puedan dar lugar al adenocarcinoma (Sainz et al., 2021).

Las células neuroendocrinas pulmonares están invadas, pueden responder a condiciones de estiramiento mecánico, hipoxia o hipercapnia. Además, pueden acumular y liberar serotonina, así como activar respuestas inmunitarias. Así, en una lesión pulmonar pueden dar lugar a células ciliadas y club. Estas células neuroendocrinas contribuyen al carcinoma de células grandes, carcinoma de células pequeñas y tumores carcinoides pulmonares (Sainz et al., 2021).

Las células club son cuboidales que se propagan a través de las vías respiratorias grandes y pequeñas encargadas de secretar componentes que recubren los bronquiolos y regulan el contenido secretado en el tracto respiratorio distal, así como un papel en la desintoxicación del pulmón a través de enzimas del citocromo p450 en su retículo endoplásmico liso, además pueden autorrenovarse y son precursores de células ciliadas, caliciformes y alveolares tipo 2; y pueden dar lugar a adenocarcinoma de la mano de una respuesta inflamatoria después de la activación oncogénica de KRAS (Sainz et al., 2021).

Las células caliciformes secretan mucina que confieren la capacidad de atrapar y transportar partículas y microorganismos inhalados. Se ha asociado niveles altos de mucinas (MUC1) con mayor agresividad en el adenocarcinoma (Sainz et al., 2021).



La unión del conducto bronquioalveolar contiene células madre bronquioalveolares que son la principal fuente de regeneración en el pulmón ya que dan lugar a las vías respiratorias y a las células alveolares. Se ha asociado con la formación de adenocarcinoma (Sainz et al., 2021).

Las células alveolares tipo 2 se encuentran en el espacio alveolar aportando surfactante pulmonar, encargado de reducir la tensión superficial en los alvéolos, evitando su colapso. Dichas células pueden autorrenovarse y llevar a las células alveolares tipo 1, que forman parte de la barrera aire-sangre. Además de ser las células de origen más caracterizadas en el adenocarcinoma, derivado independientemente de su entorno (Sainz et al., 2021).

### **3.2.2 Clasificación**

El cáncer de pulmón es una enfermedad compleja heterogénea que se clasifica de acuerdo con los histotipos en dos categorías: cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) (Gridelli et al., 2015).

NSCLC incluye los histosubtipos de adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes. Representa alrededor del 85% de todos los casos. Por otro lado, SCLC representa el 15% restante (Schabath et al., 2019).

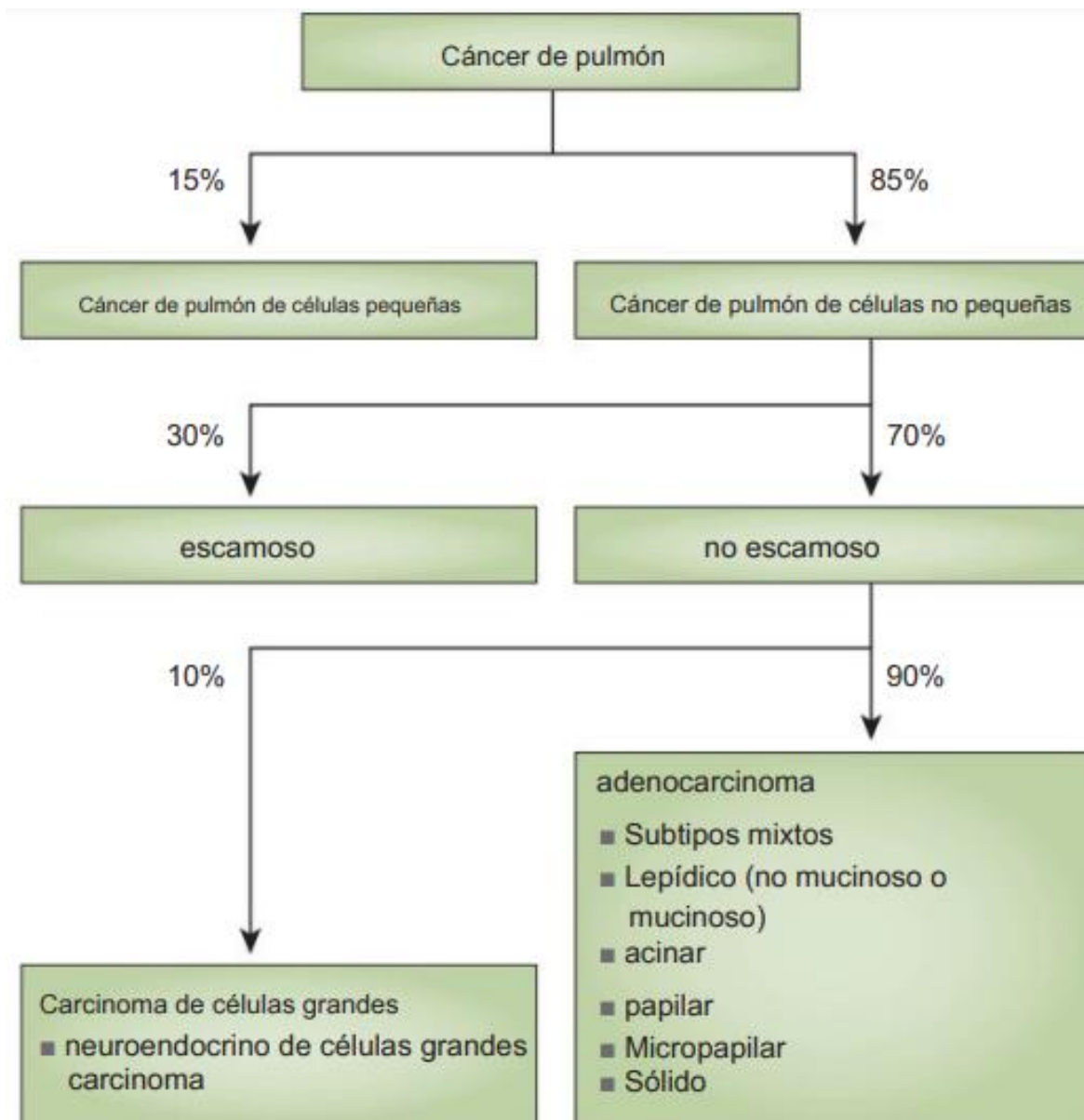


Figura 4. Clasificación del cáncer de pulmón (Tomada de Gridelli et al., 2015).

### 3.2.3 Factores de riesgo

Fumar es el principal factor de riesgo para desarrollar cáncer de pulmón (Gridelli et al., 2015). También se ha asociado el cáncer de pulmón con la contaminación del aire. La exposición al radón, que surge de la descomposición del uranio y su inhalación son responsables del 9% de las muertes por este tipo de cáncer. Cuando el radón es inhalado, casi se exhala inmediatamente, pero su progenie sólida

(productos de descomposición del radón) puede depositarse en el epitelio bronquial (Gridelli et al., 2015).

### **3.2.4 Tratamiento**

#### **3.2.4.1 Tratamiento Convencional**

El tratamiento del cáncer de pulmón es específico de la etapa. Los regímenes citotóxicos han demostrado mayor efecto en estadios tempranos, mientras que la resección quirúrgica es más eficaz en estadios I a II y algunos IIIA. A pesar de ello, un alto porcentaje de tumores recurren, con una supervivencia de 5 años que oscila entre el 83% para el estadio IA y 36% para el IIIA. La terapia estándar para estadios avanzados es la combinación de terapia citotóxica y radiación torácica (Herbst et al., 2018).

La identificación de alteraciones genéticas ha transformado el tratamiento con la incorporación de una terapia dirigida al genotipar el tumor, generando respuestas notables en los pacientes (Herbst et al., 2018).

La alta mortalidad es consecuencia de la presencia de metástasis al momento del diagnóstico en la mayoría de los pacientes, lo que indicaría que la supervivencia a largo plazo requiere de una terapia sistémica efectiva (Herbst et al., 2018).

#### **3.2.4.2 Tratamiento alternativo**

El cáncer de pulmón suele presentar resistencia a la mayoría de los tratamientos convencionales, como la radioterapia, la quimioterapia y la terapia dirigida. A pesar de eso, los tratamientos antitumorales sintéticos químicamente aún desempeñan un papel importante en la clínica. Sin embargo, los pacientes resienten los efectos secundarios de estos, por lo que la búsqueda de alternativas eficaces a partir de fuentes naturales de fármacos ha tomado relevancia (Wei et al., 2022).

Los productos naturales aislados de plantas se han usado para el tratamiento de diversas enfermedades desde la antigüedad. Los compuestos naturales de las plantas (fitoquímicos), han sido recursos fundamentales para la prevención y tratamientos de enfermedades como el cáncer, así como pieza clave el descubrimiento de fármacos contra el cáncer. Actualmente diferentes fitoquímicos naturales están adquiriendo importancia para el descubrimiento y la investigación de fármacos. La accesibilidad de diversos enfoques para el descubrimiento de agentes terapéuticos novedosos y potenciales que modulen las cascadas de señalización celular hace que los productos naturales de plantas medicinales y otras fuentes sean un enfoque rentable y prometedor que actúen selectivamente sobre los marcadores característicos del cáncer (Dutta et al., 2019; Farghadani et al., 2023).

Los polifenoles, son un grupo diverso de fitoquímicos que se encuentran en alimentos y bebidas de origen vegetal, que pueden contribuir actividades beneficiosas para la salud, como antioxidantes, antiinflamatorios, antiproliferativos y neuroprotectores, así como un papel emergente anticancerígenos (Farghadani et al., 2023).

Si bien, las generalidades de las propiedades de estos compuestos son prometedoras, todavía existen desafíos por abordar en cuanto a la dosis, la biodisponibilidad o la toxicidad para determinar la seguridad y eficacia de los polifenoles en pacientes con cáncer de pulmón.

## **4. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS**

### **4.1 Ciclo celular**

El ciclo celular representa una serie de eventos estrictamente controlados que llevan a la duplicación fiel del genoma del ADN y la reproducción de dos células hijas (Liu et al., 2022).

El ciclo celular mitótico se divide en dos etapas: interfase y fase M. Durante la interfase ocurre la separación temporal de la duplicación del contenido celular y su separación en dos células hijas genéticamente idénticas en la mitosis. La fase G1 es un evento crucial para ingresar al ciclo celular. Seguida a esta fase, la replicación del ADN ocurre en interfase durante la fase S, tiempo en interfase durante el cual se inicia, pero no se completa la replicación del ADN. Después de la fase S, inicia el proceso que conduce a la segregación cromosómica durante G2 (Matthews et al., 2022).

Antes de la fase S, en la fase G1 pre-replicativa existe una ventana de decisión durante la cual las células pueden comprometerse a iniciar la replicación del ADN e ingresar al ciclo celular o permanecer en la fase G1. También, durante G1, las células pueden salir del ciclo celular a un estado no proliferativo G0 o quiescencia; estado en el que la mayoría de las células del cuerpo adulto se encuentran y requieren transitar hacia G1 para poder iniciar la replicación del ADN iniciando el ciclo celular. Adicionalmente, una vez que se ha completado la replicación del ADN, en la ventana de decisión durante la fase G2 posreplicativa ocurre que las células pueden comprometerse a ingresar a la fase M, iniciando la condensación de la cromatina y la alineación central de los cromosomas. La fase M se caracteriza por separar con precisión el ADN duplicado (mitosis) y dividir todo el contenido celular en dos nuevas células hijas (citocinesis), ya que durante la fase M, las células se comprometen a segregar el material genético y reiniciar el ciclo para volver a interfase (Matthews et al., 2022).

De acuerdo con el papel clave de la maquinaria del ciclo celular en la determinación de la duplicación fiel del ADN del genoma, la variación genética o la transducción de señales, la interrupción de los reguladores del ciclo celular o de los puntos de control del ciclo celular se puede ocasionar un reingreso inadecuado al ciclo y divisiones celulares aberrantes, una característica importante del cáncer (Liu et al., 2022).

## 4.2 Proliferación

Inicialmente, Ki67 se identificó como un antígeno en los núcleos de células del linfoma de Hodgkin por Gerdes en 1991, que se definió por primera vez por la ciudad de origen Kiel y el número del clon original (clon 67) en una placa de 96 pocillos.

Ki67 es una proteína nuclear y nucleolar sin histonas que se expresa en todos los vertebrados. El gen MKI67 codifica dos isoformas proteicas que se generan por empalme alternativo de un precursor de ARNm con o sin exón 7 con pesos moleculares de 345 y 395 kDa. Las regiones principales incluyen un dominio N-terminal asociado a la cabeza de la horquilla (FHA), un dominio de unión a proteína fosfatasa 1 (PP1), una región central conservada con repeticiones en tándem y un dominio C-terminal rico en leucina-arginina (Sun et al, 2018; Menon et al., 2019).

Ki67 se expresa altamente durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y M); excepto su regulación muy a la baja en las células en fase de reposo (G0), así como en fases posteriores de la mitosis (anafase y telofase) donde hay una fuerte disminución de los niveles de Ki67. Esto lo ha convertido en un marcador de proliferación de poblaciones celulares en tumores malignos, debido a que su expresión refleja la tasa de proliferación tumoral y se correlaciona con el inicio, la progresión, la metástasis y el pronóstico; demostrándose su potencial como marcador confiable en cánceres de mama, pulmón, próstata, cuello uterino y sistema nervioso central (Sun et al., 2018; Li et al., 2015).

Ki67 localiza componentes granulares en los cromosomas mitóticos, por lo que desempeña un papel importante en la segregación nucleolar entre células hijas. Inicialmente, en fase G1 se localiza en la región perinucleolar, en interfase se encuentra en el componente fibrilar denso del nucleolo y en mitosis, se asocia con la cromatina a medida que los nucleolos se rompen. Cuando ocurre la condensación cromosómica, Ki67 tiene lugar en la capa pericromosómica, que funciona como una película protectora alrededor de los cromosomas que funcionan como plataforma durante el ensamblaje nucleolar. Puede funcionar como un surfactante que permite

motilidad cromosómica y su interacción con el huso mitótico, evitando el colapso del cromosoma (Menon et al., 2019).

Se ha demostrado que Ki67 está regulado por fosforilación; se ha confirmado que la fosforilación dependiente del ciclo celular está estrechamente ligada a la descomposición del núcleo al comienzo de la mitosis y se revierte a medida que se completa la separación de las cromátides hermanas. El análogo humano del ciclo de división celular 2 (cdc2), CDK-1 es la quinasa reguladora clave que controla la entrada en mitosis, así que el complejo proteico ciclina B/cdc2 quinasa es un mecanismo regulador esencial que controla la entrada a mitosis. La fosforilación de Ki67 por CDK-1 durante la mitosis lleva al paso de la mitosis hasta la metafase a anafase, transición en la que se lleva a cabo la separación de las cromátides hermanas y el reensamblaje del núcleo (Menon et al., 2019).

Por otro lado, en la fase G1 tardía, Cdk2 se une a la ciclina E y completa la fosforilación de Rb (familia de proteínas de retinoblastoma), que conduce a una mayor activación de la transcripción mediada por E2F y después lleva al paso a través del punto de restricción en el límite de la fase G1/S y al inicio de la fase S. Cuando las células entran en fase S, Rb es hiperfosforilado y así permanece. Ki67 se encuentra unida a E2F, y en condiciones de cáncer una sobreexpresión de E2F está relacionado con una acumulación de ARNm de Ki67. Además, como la expresión de Rb se pierde en muchos cánceres, la expresión de Ki67 puede estar sobre-expresada (Menon et al., 2019).

### **4.3 Control del ciclo celular**

El control del ciclo celular se centraliza en la replicación del ADN genómico y su posterior segregación entre las células hijas. Generalmente se considera que en las células cancerosas ocurre una progresión incontrolada del ciclo celular debido a que todos los puntos de control han sufrido un defecto que lleva a que una célula sana se vuelva cancerosa. No obstante, se tienen bases de que solo se requiere alterar aspectos específicos del control del ciclo celular para que la división celular se

mantenga en las células cancerosas; o sea que, estas se ven comprometidas en su capacidad para salir del ciclo celular y continúan dividiéndose, en lugar de la idea original de una división celular descontrolada (Matthews et al., 2022).

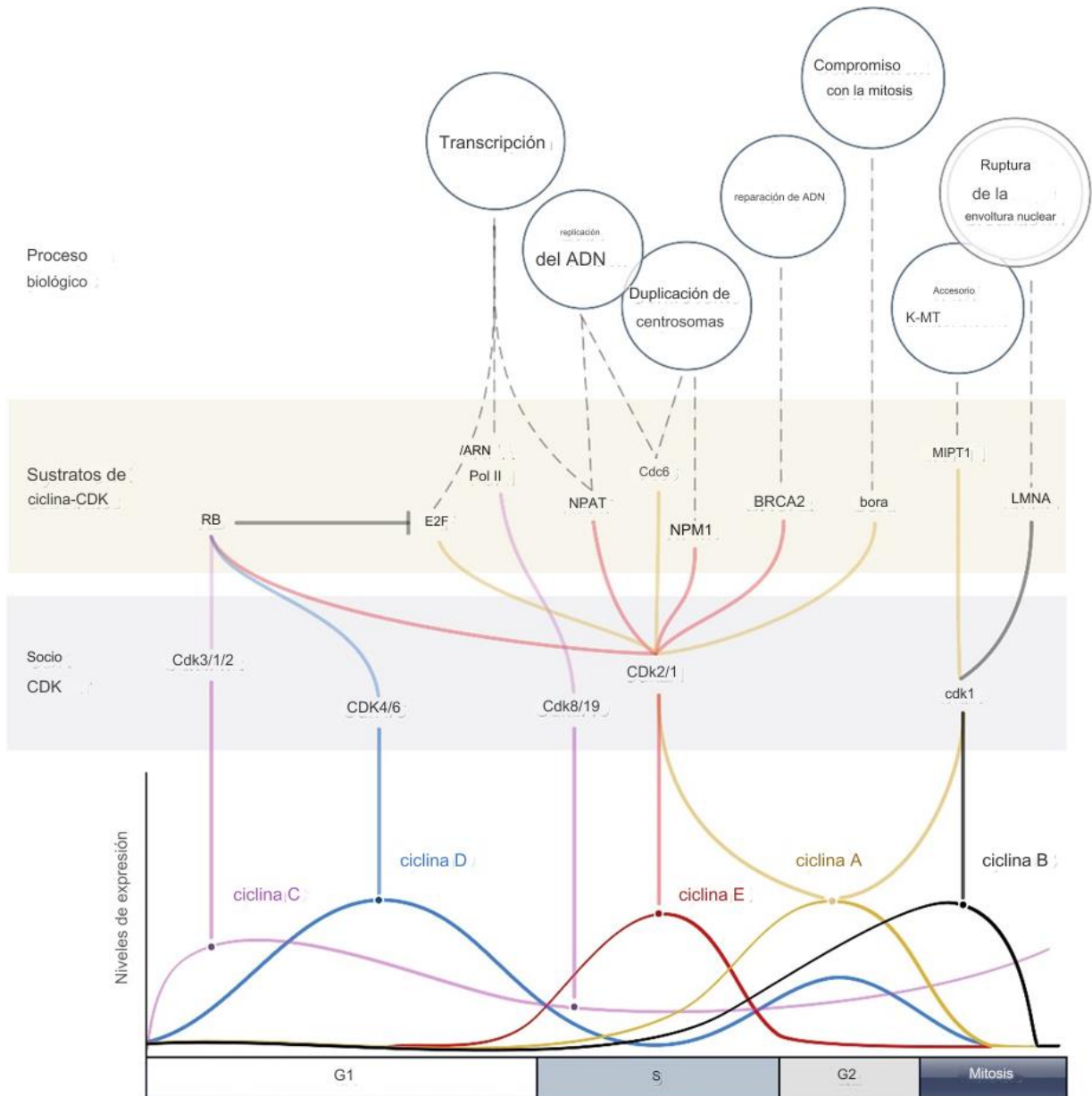
Es primordial diferenciar en el contexto del cáncer que el punto de control del daño del ADN puede verse comprometido en las células cancerosas, que llevaría a una división celular continua a pesar de la acumulación de errores genéticos. A diferencia de los genes implicados en el punto de control del estrés de replicación rara vez puede mutar en las células cancerosas debido a que el cáncer se puede volver más dependiente de la función del punto de control para tolerar el estrés de replicación. Las células cancerosas también dependerían de un punto de control mitótico funcional para prevenir una segregación errónea catastrófica de los cromosomas. Este enfoque proporcionaría una nueva y mejor comprensión de marcadores específicos de los puntos de control que permitan nuevas oportunidades terapéuticas (Matthews et al., 2022).

El aumento de la proliferación celular es una de las características críticas a considerar. La proliferación está regulada por el ciclo celular y existen mecanismos reguladores bien definidos (Sofi et al., 2022).

El ciclo celular está controlado por ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDK) que mantienen la coherencia, la integridad y el mantenimiento de cada paso del ciclo celular. Las CDK y la transcripción regulada por el ciclo celular impulsan la progresión del ciclo celular, ya que las ciclinas específicas se acumulan durante diferentes etapas del ciclo celular, impulsadas por la transcripción regulada por el ciclo celular y la inhibición de la degradación de proteínas. A la par, la transcripción regulada por el ciclo celular depende de la actividad de CDK para su activación. Dicha correlación crea una red reguladora que garantiza la progresión del ciclo celular de forma secuencial y unidireccional y los cambios dependientes del ciclo celular en la actividad de CDK impulsan la entrada, la progresión y la finalización del ciclo celular. La actividad CDK en la fase G1 prereplicativa es necesaria para el inicio de la replicación del ADN, o sea la entrada al ciclo celular. Mientras que durante la fase G2 posreplicativa, la actividad CDK tiene un papel clave en la



preparación para la segregación cromosómica, por el inicio de la condensación, la permeabilización de la envoltura nuclear y la alineación central del ADN cromosómico replicativo (Sofi et al., 2022; Matthews et al., 2022).



**Figura 5. Ciclinas mitóticas, quinasas asociadas y sustratos vinculados a los principales procesos celulares relacionados con el ciclo celular mitótico (Tomada de Martínez-Alonso et al., 2020).**

Las ciclinas originalmente reciben dicho nombre porque los niveles de estas proteínas fluctúan de forma cíclica durante el ciclo celular. La familia de las ciclinas de los mamíferos no está bien definida, pero el genoma humano contiene al menos 30 genes cuyos productos contienen un dominio de aminoácidos conocido como caja de ciclina (CBD) que es responsable de la unión y activación de las CDK (Quandt et al., 2020).

Las ciclinas fueron nombradas con caracteres alfabéticos según el momento de su descubrimiento, su participación en las células de los mamíferos muestra una distribución diferente en el ciclo celular. Las ciclinas C y D controlan la entrada al ciclo desde la inactividad y la progresión a lo largo de la fase G1, las ciclinas de tipo E controlan la entrada a la fase S, ciclinas de tipo A controlan diferentes aspectos de la replicación y progresión del ADN a través de la fase G2 y las ciclinas de tipo B actúan como reguladores de la entrada en la fase M (Martínez-Alonso et al., 2020).

La ciclina E1 es codificada por el gen CCNE1 humano. Los genes CCNE son reprimidos por Rb 1 e inducidos por factores de transcripción E2F en respuesta a la actividad de ciclina D-Cdk 4/6, alcanzando su punto máximo en la transición G1/S, mientras que su degradación después de la fase S está mediada por la fosforilación dependiente de Cdk 2/1 o GSK3b y la posterior ubiquitinación por la ubiquitina ligasa SCF-Fbw7 (Martínez-Alonso et al., 2020).

La ciclina E1 funciona durante las fases G1 y S del ciclo celular que se une y activa la CDK2 a través de la hélice C y el segmento de activación de CDK2, pero también puede activar CDK1 y CDK3 ya que se propone que CDK1 compensa la falta de CDK2 en el entorno nulo esta (Chu et al., 2021).

Durante la progresión de la fase G1, la fosforilación mediada por ciclina D- CDK 4/6 de la proteína RB1, lleva a la activación de E2F que, a su vez, promueven la transcripción de genes de ciclina E. Ya inducida la ciclina E se une y activa CDK2, dicha quinasa impulsa la hiperfosforilación de RB1, aumentando la actividad de E2F y regulando aún más la expresión de ciclina E, formando un bucle autorregulador de retroalimentación positiva que inactiva RB1 iniciando el programa transcripcional

dependiente de E2F que es necesario para la entrada de las células en la síntesis de ADN (fase S). Al avanzar a fase S, el proteosoma degrada las ciclinas E, en la que su principal vía de degradación implica a SCF y su degradación por esta vía se desencadena por la fosforilación de la ciclina E por CDK2 o GSK3 (Chu et al., 2021).

Los complejos ciclina E-CDK pueden ser inhibidos por la familia de inhibidores Cip/Kip. P27 es tanto inhibidor como sustrato de dichos complejos, ya que lo fosforilan y promueven su degradación dependiente del proteosoma. Adicionalmente, las proteínas mutantes de ciclina E que no pueden activar las CDK aún son capaces de promover la entrada en la fase S, y se cree que las ciclinas de tipo E muestran funciones cinasa-independiente a través de mecanismos poco claros (Martínez-Alonso et al., 2020).

La sobreexpresión de ciclina E está asociada con una división incontrolada de las células tumorales y su desregulación en las células cancerosas induce la inestabilidad del genoma, como un asociación con un aumento anormal de la activación de los orígenes de replicación del ADN, interferencia entre la replicación y la transcripción; así las células con dichos defectos podrían conducir a anomalías en anafase, producir deleciones cromosómicas y funciones comprometidas del centrosoma (Chu et al., 2021).

Cabe destacar que se ha documentado niveles elevados de ciclina E en distintos cánceres humanos con una amplificación de los genes de ciclina E1, además la interrupción de la degradación fisiológica de la proteína puede contribuir al aumento de los niveles de ciclina E. El mecanismo implicado es la inactivación de la proteína FBW7, una subunidad de reconocimiento de sustrato de SCF que media la degradación de la ciclina E; así como una regulación positiva mediante vías de señalización oncogénica mediante regulación negativa, exportación nuclear o inactivación de inhibidores de Kip/Cip (Chu et al., 2021).

Otros mecanismos oncogénicos de la ciclina E se relacionan con su capacidad de fosforilar oncogenes como Myc, Smad3 (contribuye a la agresividad de cánceres de mama que sobreexpresan ciclina E) y Mcl-1 (promueve la resistencia a tratamientos pro-apoptóticos) (Chu et al., 2021).

La ciclina B1 es codificada por el gen CCNB1 y su expresión alcanza su punto máximo durante la transición de G2 a M, mientras que su degradación ocurre durante la transición de metafase a anafase. Su localización es citoplasmática durante la fase G2 y solo se acumula en el núcleo al comenzar la mitosis, justo antes de ruptura de la envoltura nuclear (Martínez-Alonso et al., 2020).

Ciclina B1 es una proteína reguladora implicada en la mitosis y forma un complejo con CDK1 para formar el factor promotor de la fase M (MPF). La localización del citoplasma de la ciclina B1 está regulada por la región amino terminal CRS, que cuando se inhibe, la ciclina B1 se localiza en el núcleo durante todo el ciclo mitótico (Liu et al., 2020).

La división celular comienza después de que el complejo ciclina B1/CDK 1 ingresa al núcleo. Por lo que, durante la interfase, CDK1 se fosforila para dejar el complejo ciclina B1/CDK1 en un estado inactivo. La división previa de CDC25C activa el complejo ciclina B1/CDK1 que a su vez fosforila CDC25C y activa aún más la unión de dicho complejo, los cuales son pasos obligatorios del circuito de activación autocatalítica (Liu et al., 2020).

Plk1 fosforila y activa la ciclina B1 en los centrosomas, induciendo la translocación nuclear antes de la mitosis. Ya activados los complejos ciclina B1/CDK1, fosforilan proteínas necesarias para la segregación de orgánulos, la actividad y fisión de las mitocondrias, la ruptura de la envoltura nuclear y la segregación de cromosomas (Martínez-Alonso et al., 2020).

Además, la degradación de la ciclina B1 durante la salida mitótica es llevada a cabo por el complejo APC/C-Cdc20 ya que ciclina B1 es estabilizada por la fosforilación de Cdc20 mediada por CDK para evitar su asociación con APC/C, ocasionando acumulación de ciclina B1 en G2 y la entrada mitótica eficiente. Pero una vez que todos los cromosomas están unidos bipolarmente en metafase, APC/C-Cdc20 se activa y ciclina B es marcada con ubiquitina para su rápida degradación dependiente del proteosoma, iniciando la anafase y la salida mitótica (Martínez-Alonso et al., 2020).

Al participar en la regulación del ciclo celular, la ciclina B1 se asocia con procesos patológicos como el cáncer. Se ha reportado que ratones transgénicos que sobreexpresan ciclina B1 son propensos a desarrollar tumores debido a defectos de segregación cromosómica, así como una sobreexpresión de ciclina B1 se ha asociado con agresividad tumoral y mal pronóstico en varios tipos de tumores (Martínez-Alonso et al, 2020).

Lo anterior respalda que, en las neoplasias malignas, la desregulación del ciclo celular altera la coordinación de este y conduce a la proliferación continua de células cancerosas, ya que una activación inadecuada de las CDK asociada con la amplificación y sobreexpresión del gen de la ciclina, la mala localización celular o su expresión prematura de la ciclina conducen a alteraciones del ciclo celular, que resulta en cáncer (Sofi et al., 2022).

#### **4.4 Apoptosis**

La apoptosis es un proceso fisiológico de muerte celular altamente regulado realizado de forma rutinaria como una decisión racional y activa tomada para sacrificar células específicas por mayores beneficios para el organismo que mantienen la homeostasis. Por esto, juega un papel indispensable tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Por ejemplo, el cáncer se caracteriza por una apoptosis insuficiente abrumada por el potencial replicativo ilimitado de las células (Xu et al., 2019).

En consecuencia, la eficacia de los tratamientos contra el cáncer depende no solo de poder ocasionar daño celular, sino también de su capacidad para activar el proceso de apoptosis. Es por esto por lo que, la investigación en terapia del cáncer se ha centrado en alternativas destinadas a inducir la muerte celular programada prestando atención en los mecanismos moleculares subyacentes mediante los cuales las células tumorales pueden evadir la apoptosis (Morana et al., 2022).

En el ciclo celular, la apoptosis actúa como una medida a prueba de fallos que garantiza la fidelidad y calidad de la proliferación. A pesar de que se pueden permitir

y favorecer ciertos grados de variación genética, las células producidas con errores genéticos extensos y daños celulares están sujetas a apoptosis donde se activan proteasas cisteína-aspárticas (caspasas) que degradan los componentes celulares para preparar las células hacia su eliminación por los fagocitos con un estrés mínimo para el organismo. Las señales de muerte se transmiten a través de vías de señalización que, tanto por estímulos externos como internos, acoplados a vías de apoptosis extrínsecas (mediada por el receptor de muerte) e intrínsecas (mediada por mitocondrias); pueden iniciar la apoptosis, un proceso activo que requiere un aporte de energía (Xu et al., 2019; Singh et al., 2019).

La vía extrínseca es el tipo de muerte celular mediada por receptores en la que los receptores de muerte están anclados a la membrana celular por sus regiones transmembrana. Seguido a la interacción con un ligando extracelular, los receptores transmembrana transmiten señales de muerte al espacio intracelular por medio de sus dominios de muerte citoplasmáticos. Los receptores de muerte pro-apoptóticos incluyen Fas, TNFR1, TNFR2 y los receptores TRAIL DR4 y DR5. Así que sus ligandos naturales contemplan a FasL, TNF o TRAIL que se unen a Fas, los receptores TNFR o TRAIL DR4 y DR5 respectivamente (Carneiro et al., 2020; Xu et al., 2019).

Luego de la unión del ligando, los receptores de muerte se trimerizan y agregan dentro de la membrana celular; seguido por el reclutamiento de proteínas adaptadoras (FADD) y (TRADD); acentuando la apoptosis mediante la acción de proteínas caspasas iniciadoras (caspasa 8 o 10), cuya activación está regulada negativamente por c-FLIP, y su activación puede llevar a la activación de las caspasas ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7) así como la escisión de BID, familia de proteínas Bcl-2 (Carneiro et al., 2020; Xu et al., 2019).

Tras la unión, las proteínas adaptadoras reclutan (TRADD y FADD) a los receptores de TNFR en el lado citoplasmático, donde los dominios de muerte de las proteínas adaptadoras interactúan con sus homólogos de los receptores. FADD recluta a procaspasa 8 que luego se autoescinde para producir caspasa 8 activa que inicia la fase de ejecución final de la degradación proteolítica de proteínas intracelulares.

Mientras que la vía mediada por Fas es desencadenada por FasL al unirse a los receptores de Fas (CD95), donde FADD se asocia con los receptores de Fas y recluta caspasa 8 y se formará el complejo de señalización inductor de muerte (DISC) (Carneiro et al., 2020; Xu et al., 2019).

Por otro lado, la cascada intracelular de TRAIL-DR4/DR5 es similar a la vía Fas. TRAIL es reconocido como un supresor de tumores por su capacidad para inducir exclusivamente la apoptosis en células malignas y xenoinjertos, también independientemente de p53 (Xu et al., 2019).

La vía intrínseca de la apoptosis se caracteriza por la iniciación y regulación mitocondrial no mediada por receptores en la que los estímulos generan señales intracelulares que llevan a cambios bioquímicos dentro de la célula. Esta vía implica la permeabilización de la membrana externa mitocondrial con la liberación de citocromo c de las mitocondrias que forma el apoptosoma con APAF1; y este escinde la procaspasa-9 para producir caspasa-9 activa que activará a caspasa-3 (efectora) (Xu et al., 2019; Carneiro et al., 2020).

La permeabilización de la membrana externa mitocondrial y la liberación de citocromo c en el citoplasma son requisitos críticos para desencadenar la apoptosis, por lo que es considerado el punto sin retorno en el compromiso con la muerte celular que puede generarse independientemente de la actividad de caspasas (Carneiro et al., 2020).

En la vía intrínseca de la apoptosis dependiente de caspasa son de importancia las proteínas SMAC (pequeños activadores de caspasas derivados de mitocondrias) se unen a IAP (grupo de proteínas inhibidoras de la apoptosis) después de la liberación en el citosol. Las SMAC pueden desactivar a las IAP, lo que puede permitir la apoptosis (Xu et al., 2019).

La muerte celular programada por vía independiente de caspasas se genera tras un estímulo apoptótico que provoca la traslocación de proteínas proapoptóticas (Bax) del citoplasma a la mitocondria, en donde la traslocación es causada por la activación de proteasas, calpaínas y catepsinas liberadas por los lisosomas que se

activan tras la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula inducido por el estrés del retículo endoplásmico. Las catepsinas y calpaínas también provocan la escisión y traslocación de Bid a la mitocondria y la escisión de AIF. Además, Bax y Bid escindidos en la membrana mitocondrial inducen la despolarización mitocondrial, lo que provoca la liberación de AIF escindido y SMAC. Por último, AIF escindido se transloca al núcleo y junto con la endonucleasa G induce la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN (Bhadra, 2022).

El equilibrio de la familia Bcl-2 de proteínas proapoptóticas controla el umbral de muerte celular en las células de mamíferos debido a que la liberación de citocromo c está regulada positivamente por los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 como Bax y regulada positivamente por los miembros anti-apoptóticos como Bcl-2. Por lo que, Bax es un efector central de la apoptosis, ya que forma macroporos en la membrana externa de las mitocondrias que promueve la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial. Mientras que los miembros anti-apoptóticos modulan la sensibilidad y resistencia a la apoptosis (Carneiro et al., 2020).

La familia BCL-2 exhibe un alto grado de similitud, pero se divide en tres grupos según su función principal: proteínas anti apoptóticas (BCL-2), formadores de poros pro-apoptóticos (BAX) y proteínas proapoptóticas exclusivas de regiones de homología 3 (BH3). Los miembros anti-apoptóticos y formadores de poros contienen los cuatro dominios BH y dotan una estructura terciaria altamente conservada que forma un surco hidrofóbico de unión al dominio BH3 que actúa como receptor para los dominios BH3 de otros miembros de la familia. Una característica común es que las proteínas de la familia BCL-2 interactúan entre sí para controlar la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa por lo que la familia controla la vía intrínseca de la apoptosis. Así que su regulación podría verse alterada en las células tumorales, conduciendo a una mayor resistencia en estas células a los estímulos apoptóticos; lo que hace a esta familia atractiva para el desarrollo de terapias contra el cáncer (Kale et al., 2018; Senichkin et al., 2020).

Ante señales apoptóticas, los miembros apoptóticos como la proteína multidominio Bax (proteína X asociada a Bcl-2) se recluta en la membrana mitocondrial externa,



penetrando parcialmente y oligomerizándose en los poros perforantes de la membrana mitocondrial externa que liberan factores apoptóticos que llevan a la muerte celular. Pero para evadirlo, la proteína anti-apoptótica Bcl-2 incorporada en la membrana mitocondrial externa puede secuestrar directamente cualquier Bax activado asociado a la membrana para evitar la destrucción de la membrana y garantizar la supervivencia celular. Característicamente, los tumores pueden evadir este proceso apoptótico mediante la sobreproducción de la proteína Bcl-2 protectora de las células, permitiendo a las células cancerosas crecer y aumentar su resistencia a la terapia. A pesar de tener funciones opuestas, Bcl-2 y Bax comparten estructuras secundarias similares y contienen varios dominios de homología Bcl-2 (BH) conservados; pero Bax es una proteína soluble en el citosol que puede asociarse a la membrana luego de su activación y Bcl-2 es insoluble ubicada en la membrana mitocondrial externa. Además, la región BH3-BH1-BH2 en Bcl-2 forma un surco de unión extendido que reconoce el motivo del dominio de muerte BH3 de Bax y puede secuestrar la proteína completa; unión fundamental para su función. Así que, la activación e inhibición de eventos apoptóticos que ocurren en la membrana mitocondrial externa requieren que la proteína con dominios BH3 interactúe con los surcos hidrofóbicos de Bcl-2 (Mushtaq et al., 2022).

La muerte celular es un proceso que requiere regulación. Los inhibidores de las proteínas de la apoptosis (IAP) son una familia que controla la apoptosis caracterizada por un dominio BIR implicado en la interacción proteína-proteína (repetición de IAP de baculovirus), dominio RING (dominio de dedo de zinc del anillo C-terminal), dominio CARD (dominio de reclutamiento de caspasas) y dominio UBC (dominio de conjugación de ubiquitina C-terminal). Actúan como proteínas prooncogénicas anti-apoptóticas al bloquear la muerte celular y promover la división celular incontrolada a través de la vía intrínseca de la apoptosis que está regulada un 35.7%, la vía extrínseca un 29% y la fase de ejecución de la apoptosis en un 18.3% por los IAP en todos los cánceres. Además, se describe que BIRC3 y BIRC6 regulan alrededor del 36.4% de los cánceres (Liang et al., 2020).

BIRC3 inhibe la actividad de caspasa-9 mediante la unión de su tetrapéptido N-terminal (ATPF), dando como resultado el bloqueo de la vía intrínseca de la apoptosis. Además, se ha reportado que una expresión disminuida de BIRC3 se asocia con un resultado favorable y el aumento de sus niveles fue paralelo a la adquisición de quimioresistencia. Así que, los IAP al estar regulados positivamente en las células cancerosas, pueden servir como objetivo para la terapia contra el cáncer (Cossu et al., 2019; Frazzi, 2021).

#### **4.5 Ácido elágico**

Los fitoquímicos, se han convertido en un recurso fundamental en el descubrimiento de fármacos contra el cáncer. Una dieta rica en polifenoles se ha asociado con beneficios para la salud y una disminución en el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas. Los polifenoles que cuentan con uno o más anillos fenólicos estructuralmente son el grupo más diverso de fitoquímicos que se encuentran en alimentos de origen vegetal (Lu et al., 2023).

El ácido elágico es un compuesto polifenólico natural bioactivo presente en frutas como granadas, frambuesas, fresas, melocotones, frutos secos como nueces, almendras y en el vino. Además, hay evidencia de encontrarse en niveles relativamente altos en algunas leguminosas germinadas como frijoles, guisantes y soja. Se ha demostrado que puede participar en la regulación de un espectro de vías de señalización celular para prevenir, mitigar o ralentizar la progresión de trastornos crónicos al tener efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antitumorales. Las propiedades antiproliferativas y antioxidantes de ácido elágico han impulsado su investigación a nivel de los mecanismos moleculares, proporcionando una base teórica que sustente su aplicación clínica emergente adyuvante (Derosa et al., 2016; Sharifi-Rad et al., 2022; Lu et al., 2023; Farghadani y Naidu, 2023).

El ácido elágico es una molécula altamente termoestable con un peso molecular de 302.197 g/mol, ligeramente soluble en agua, alcohol y éter. Es un ácido débil que se ioniza a un pH fisiológico. Cuenta con cuatro anillos que representan el dominio

lipófilo, cuatro grupos fenólicos y dos lactonas, que forman lados con enlaces de hidrógeno y actúan como aceptores de electrones, respectivamente, y que representan el dominio hidrófilo (Derosa et al., 2016).

Además del ácido elágico libre que está naturalmente en los alimentos de origen vegetal, una porción se produce en el tracto gastrointestinal resultado de la degradación enzimática o no enzimática de moléculas polifenólicas de la dieta, los elagitaninos. El ácido elágico dentro del tracto gastrointestinal tiene una biodisponibilidad restringida por su naturaleza hidrofóbica y baja solubilidad en agua, por lo que solo una fracción se absorbe en el intestino delgado y las moléculas no absorbidas son transformadas metabólicamente dentro del intestino grueso: proceso que conduce a la formación de urolitinas, grupo de metabolitos lipófilos que se absorben en el torrente sanguíneo (Sharifi-Rad et al., 2022).

Así que, las plantas comestibles que contienen ácido elágico y sus derivados hidrolizables, los elagitaninos, son una fuente valiosa de este fitoquímico, ya que se ha demostrado que la hidrólisis de los elagitaninos y la liberación de ácido elágico se producen en el estómago y/o el intestino delgado debido a que los enlaces éster en los elagitaninos se hidrolizan lentamente, lo que lleva a la secreción gastrointestinal prolongada de ácido elágico (Sharifi-Rad et al., 2022).

Una de las propiedades más estudiadas del ácido elágico es su actividad antioxidante. Debido a que el estrés oxidativo puede llevar a daños en el ADN, induciendo mutaciones en protooncogenes y genes supresores de tumores, el ácido elágico es una de las principales moléculas antioxidantes al contener dos lactonas y cuatro grupos hidroxilo que permiten eliminar varias especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que cuenta con una capacidad prevista para regenerarse y no reducirse después de su metabolismo, lo que permite que este compuesto de una protección continua. La producción de 8-oxo-2-desoxiguanosina es un marcador del estrés oxidativo y se ha demostrado que el ácido elágico puede disminuirlo significativamente, lo que se correlaciona con la capacidad para unirse al ADN, correlacionándolo con un mecanismo de protección contra los radicales libres. Además, el ácido elágico es capaz de aumentar la expresión de enzimas

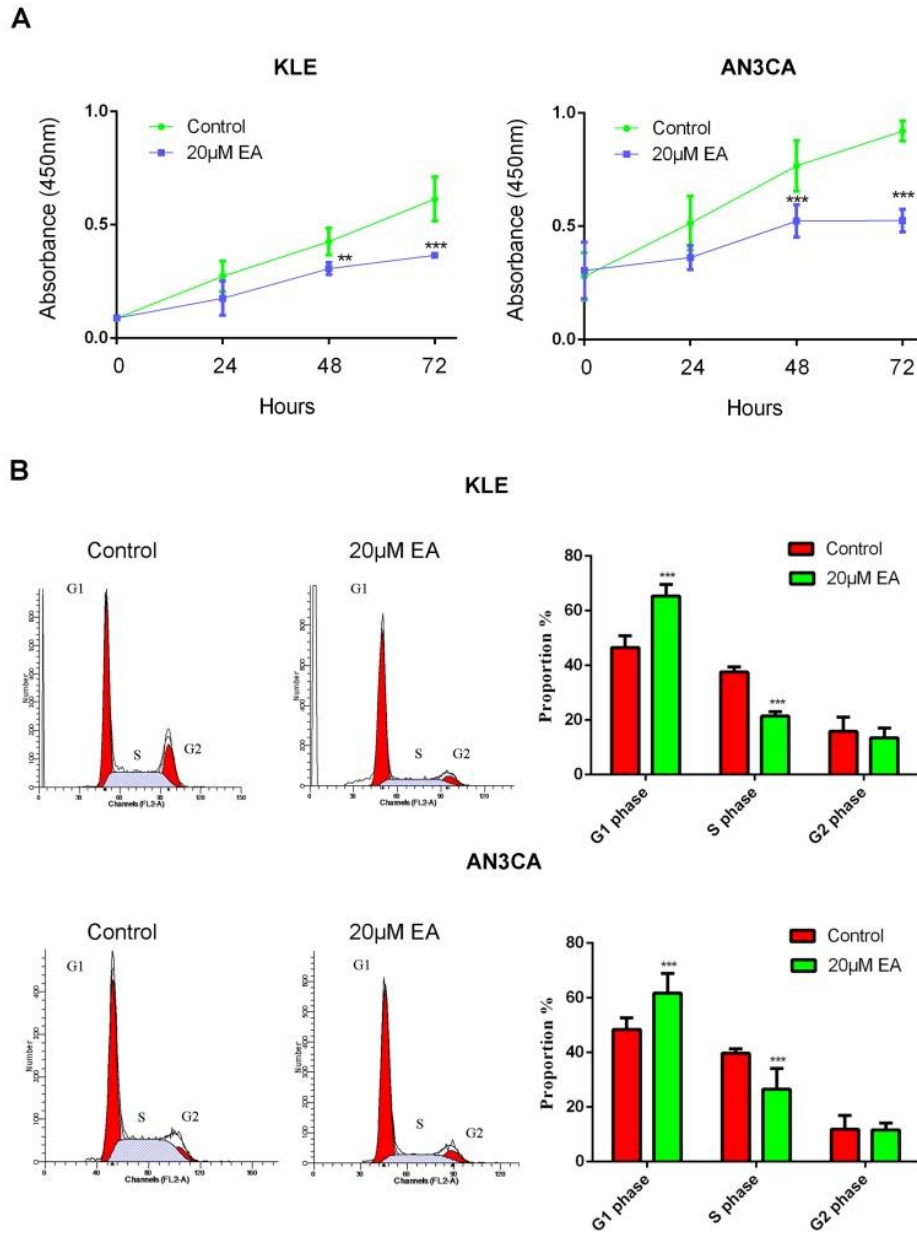
antioxidantes como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa. Esto lo hace un posible agente potencial para promover la respuesta antioxidante (Srinivasan et al., 2002; Galano et al., 2014).

De nuevo, los fitoquímicos naturales utilizados para el tratamiento de enfermedades, como el cáncer, han adquirido importancia para el descubrimiento y la investigación de fármacos, ya que se ha descubierto que son eficaces contra varios tipos de cáncer al mostrar eficacia en el inicio, desarrollo y la progresión del cáncer; así como irrumpir en varios mecanismos como la apoptosis, angiogénesis, metástasis y proliferación celular (Dutta et al., 2019).

Se ha encontrado que el ácido elágico desempeña un papel antitumoral al inhibir la proliferación celular, promover la apoptosis, inhibir la metástasis y la invasión de las células tumorales como en el cáncer de mama, próstata, endometrial, colorrectal, de pulmón y glioblastoma (Lu et al., 2023).

#### **4.5.1 Ácido elágico y cáncer**

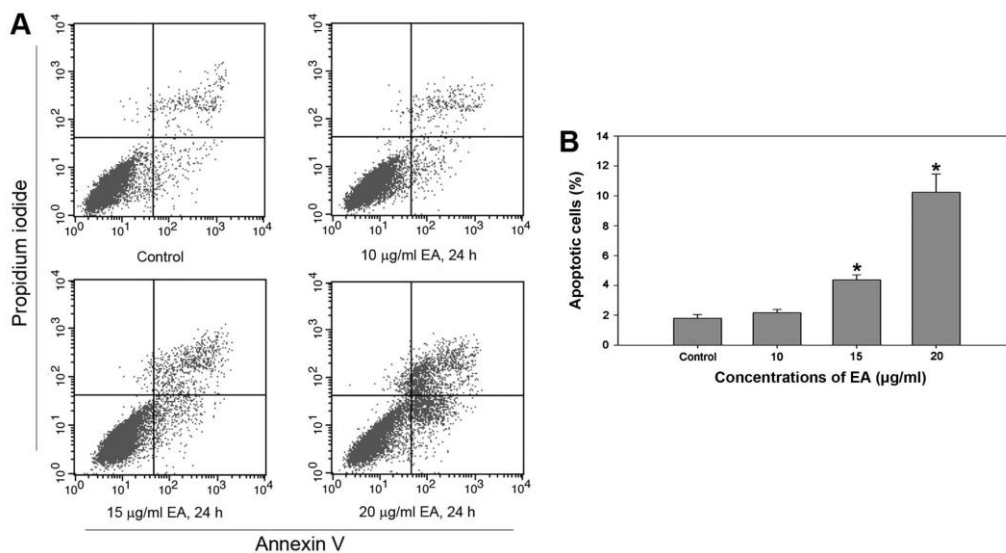
Se ha demostrado que el ácido elágico ejerce actividad antitumoral sobre distintos tipos de cáncer. En 2019, Wang y colaboradores mediante análisis bioinformático identificaron a PIK3CA y PIK3R como objetivos principales del ácido elágico. Además, se demostró que el ácido elágico (20  $\mu$ M) ejerce supresión sobre la proliferación, inhibición en la invasión y migración de células KLE y AN3CA de cáncer endometrial, así como detención del ciclo celular e inducción de la apoptosis al verse inhibida la vía de señalización PI3K. También logró inhibir la metástasis pulmonar in vivo. Por lo que se señala que el ácido elágico muestra efectos antitumorales en el cáncer de endometrio al atacar la vía de señalización PI3K in vitro e in vivo.



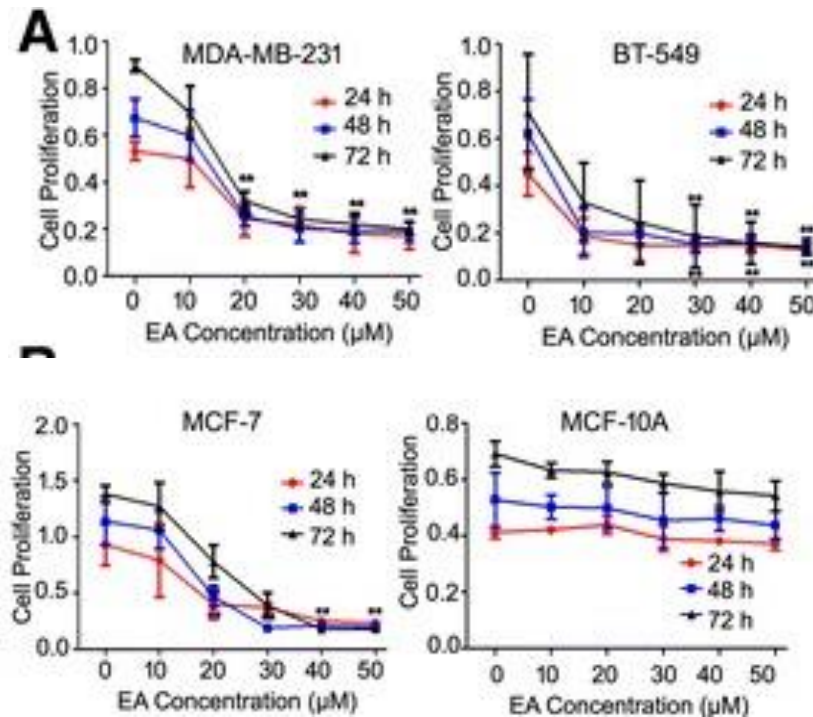
**Figura 6. Relación del ácido elágico y cáncer de endometrio.** A) El ácido elágico inhibe la proliferación de células KLE y AN3CA dependiente del tiempo. B) El ácido elágico induce la detención del ciclo celular en G1 en células de cáncer de endometrio (Tomado de Wang et al., 2019).

En cáncer de mama se han analizado sus efectos y mecanismos antiangiogénesis donde logró inhibir significativamente la proliferación y migración celular, como la actividad de la tirosina quinasa VEGFR-2 y la vía MAPK y PI3K/Akt en las células endoteliales, además de inhibir la formación de neovasos in vivo. También inhibió el crecimiento y expresión de P-VEGFR2 en células MDA-MB-231 con

concentraciones entre 2.5 y 20  $\mu\text{M}$  de ácido elágico por 24 y 48 horas (Wang et al., 2012). Adicionalmente, se han investigado sus efectos sobre la línea celular MCF-7 donde el ácido elágico inhibió la proliferación de las células mediada por la detención del ciclo celular en la fase G0/G1 y se demostró la participación de la vía de señalización TGF- $\beta$ /Smads como el mecanismo molecular potencial del ácido elágico para regular la detención del ciclo celular del cáncer de mama in vitro usando dosis crecientes de hasta 40  $\mu\text{M}$  por entre 24 y 72 horas (Chen et al., 2015). De la misma forma, también inhibió el crecimiento y la metástasis al atacar directamente a la alfa-actinina-4 (ACTN4) in vitro e in vivo usando 50 mg/kg/d y de 10 a 50 M de ácido elágico por 24 y 48 horas. Ya que ACTN4 se identificó como el objetivo directo del ácido elágico, obtuvieron que la interrupción de la interacción ACTN4/ $\beta$ -catenina lleva a la activación de la degradación del proteosoma de  $\beta$ -catenina, así como un aumento en la expresión de ACTN4 se asoció con el estadio avanzado del cáncer de mama, mayor incidencia de metástasis y un periodo de supervivencia deficiente (Wang et al., 2017).



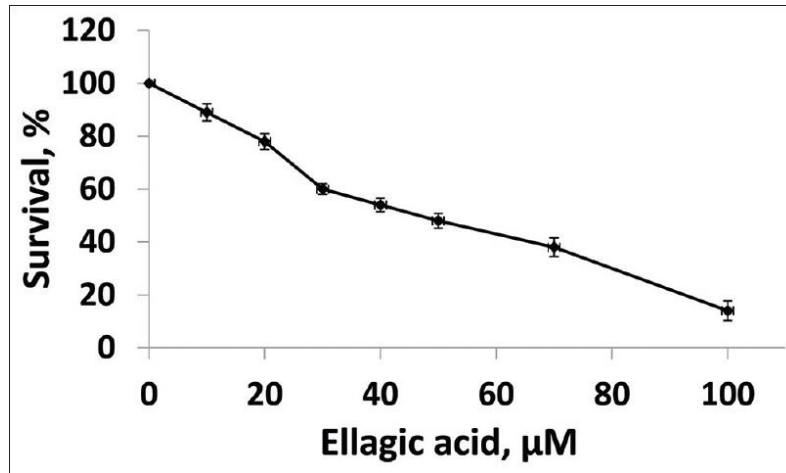
**Figura 7. Efecto del ácido elágico sobre la apoptosis en células MCF-7.** El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante tinción con Anexina V y Yoduro de propidio (Tomada de Chen et al., 2015).



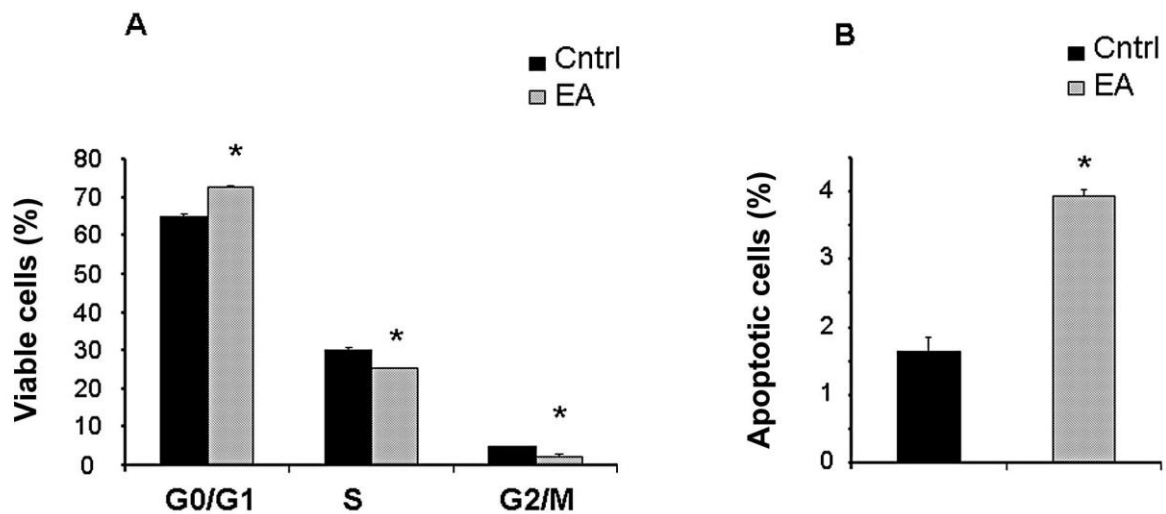
**Figura 8. Efecto sobre la proliferación de células de cáncer de mama.** El ácido eláxico suprimió la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, BT-549 y MCF-7, mientras que tuvo poco efecto inhibitor sobre las células epiteliales mamarias normales humanas MCF-10A (Tomada de Wang et al., 2017).

Por otro lado, también puede producir efectos antiproliferativos en el cáncer de próstata mediante la inhibición de mTOR y reducir los niveles intracelulares de  $\beta$ -catenina, inducir la apoptosis por regulación negativa de las proteínas antiapoptóticas, también modular la expresión del factor inductor de la apoptosis (AIF) que llevó a un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de caspasa-3, así como reducción en los niveles del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) y de IL-6; así que un tratamiento de 25 y 50  $\mu$ M de ácido eláxico por 48 horas sobre las células de cáncer de próstata LNCaP resulta en una mayor expresión de p21 y aumento de células apoptóticas (Vanella et al., 2013.) Asimismo, el ácido eláxico puede tener efectos sobre la línea celular PC3 de cáncer de próstata al reducir la viabilidad células y las proteínas de señalización STAT3, ERK y AKT fosforiladas, así como aumento en la expresión de IL-6 de una manera dependiente de la dosis (0-100  $\mu$ M) durante 72 horas (Eskandari et al., 2016). También el ácido eláxico puede regular negativamente MDM2

(regulador negativo de p53) y aumentar la expresión de p53 como la expresión sus proteínas diana p21 y PUMA, además de inducir la apoptosis en ausencia de p53 mediante regulación negativa de las expresiones de MDM2 y de XIAP, por lo que se ha determinado que el ácido eláxico suprime las células de cáncer de próstata en parte mediante la regulación negativa de MDM2 con concentraciones entre 0-160  $\mu\text{M}$  por 24 y 48 horas (Mohammed Saleem et al., 2020).

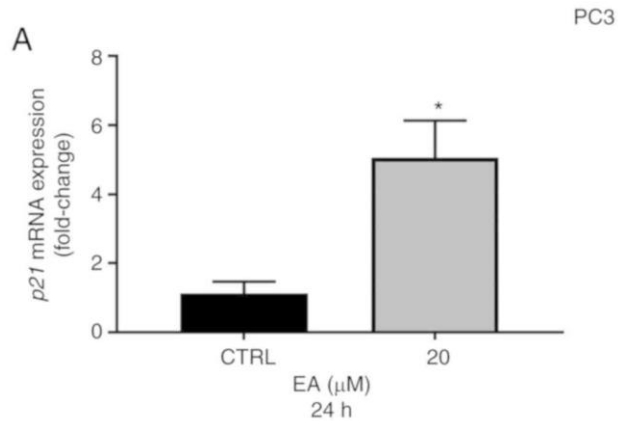


**Figura 9. Inhibición de la proliferación de células PC3 de cáncer de próstata por el ácido eláxico.** El ácido eláxico ejerce un efecto dependiente de la dosis sobre la supervivencia de las células PC3 (Tomada de Eskandari et al., 2016).



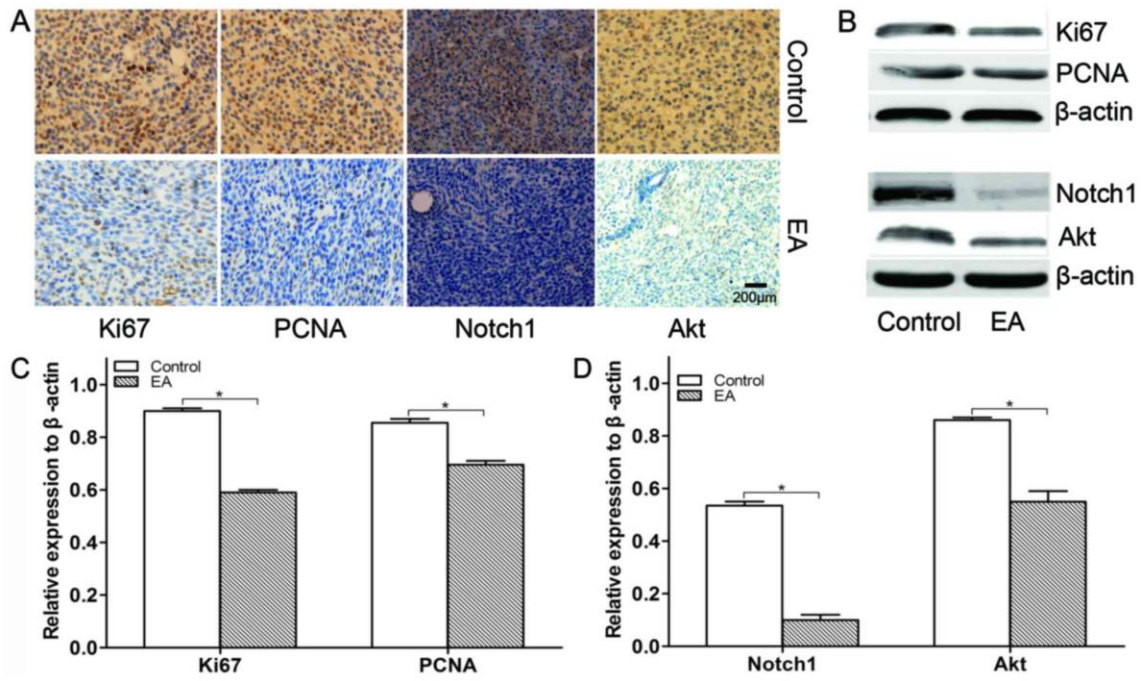
**Figura 10. Efecto del ácido eláxico en el cáncer de próstata.** El ácido eláxico (50  $\mu\text{M}$ ) tiene un efecto sobre la distribución del ciclo celular según análisis de citometría de flujo, se muestran las células viables y las apoptóticas en la línea celular LNCaP (Tomada de Vanella et al., 2013).



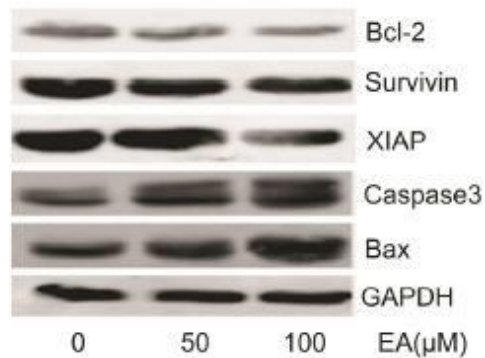


**Figura 11. Nivel de expresión de p21 después del tratamiento con ácido elágico.** El ácido elágico aumentó los niveles de ARNm de p21 en células PC3 (Tomada de Mohammed Saleem et al., 2020).

De forma similar se ha demostrado que el ácido elágico es beneficioso para el tratamiento del glioblastoma. Wang y colaboradores en 2016 establecieron que concentraciones de 50-100  $\mu\text{M}$  de ácido elágico por 48 horas reducen la viabilidad celular y la proliferación de las células de glioblastoma U251, causaron apoptosis, disminuyeron la proporción en las fases G0/G1 del ciclo celular y aumentando las poblaciones en la fase S, así como reducción en las expresiones de proteínas antiapoptóticas con respecto al control. De la misma forma, Wang y colaboradores en el mismo año publicaron otro artículo que señala que el tratamiento con ácido elágico en ratones xenoinjertados condujo a una supresión del crecimiento tumoral, reguló positivamente la expresión de E-cadherina e inhibió la expresión de Snail, MMP-2, MMP-9, Bcl-2, ciclina D1, CDK2 y CDK6, así como como supresión de Akt y Notch en tejidos de xenoinjerto U87.



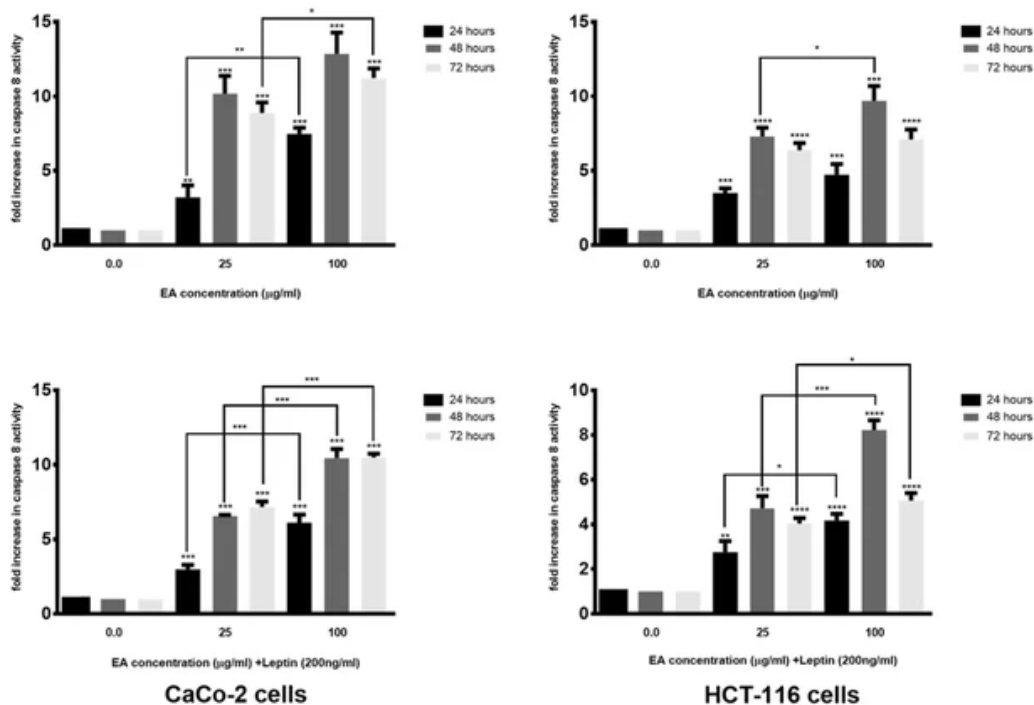
**Figura 12. Efecto del ácido elálgico en glioblastoma.** A) Inmunohistoquímica de la expresión de PCNA, Ki67, Akt y Notch1 en tumores xenoinjertados U87 en ratones desnudos Balb/c. B-D) Niveles de expresión de proteínas PCNA, Ki67, Akt y Notch1 (Tomada de Wang et al., 2016).



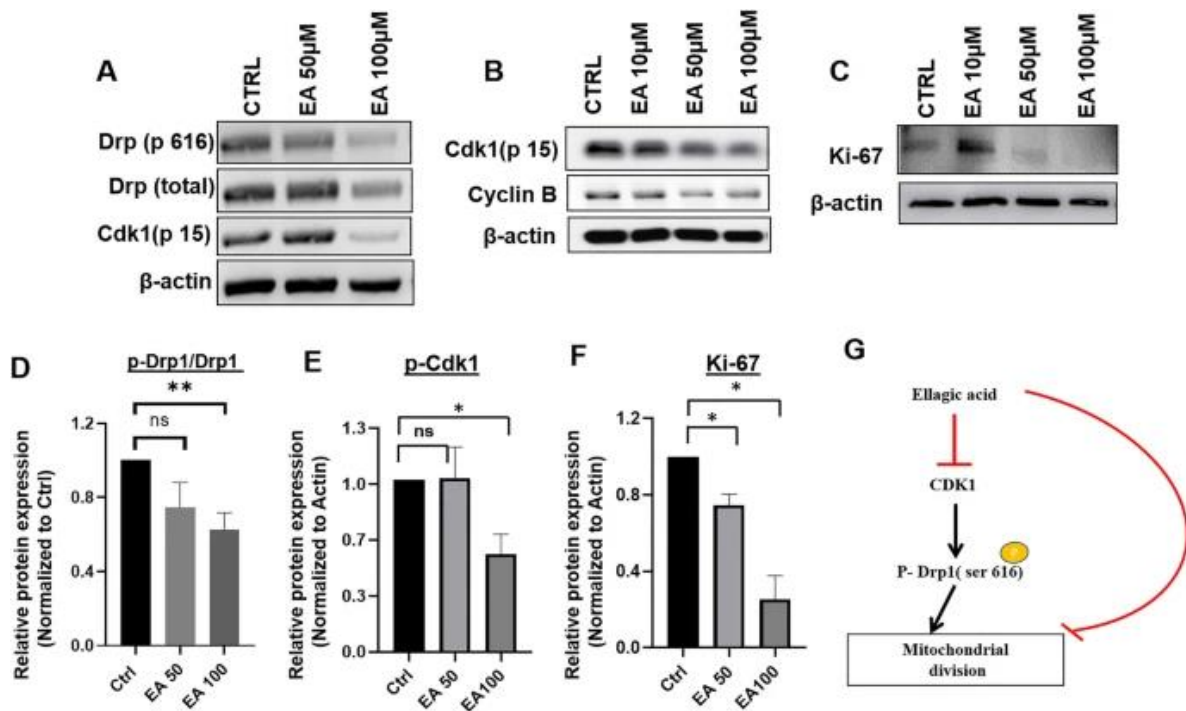
**Figura 13. El ácido elálgico regula la expresión de proteínas apoptóticas en glioblastoma.** El ácido elálgico promueve una regulación positiva de caspasa-3 y Bax, mientras que Bcl-2, Survivina y Bax se regularon negativamente (Tomada de Wang et al., 2016).

Igualmente, el ácido elálgico es un agente contra el cáncer colorrectal. Se ha evaluado su efecto antitumoral en un microambiente enriquecido con leptina para relacionarlo con la obesidad, donde su tratamiento (25-100  $\mu$ g/ml) durante 48 horas inhibió la proliferación celular de las líneas celulares HCT-116 y CaCo-2, moduló el

ciclo celular, translocó Bax a la fracción mitocondrial de las células, activó la caspasa-8 y redujo la expresión de PCNA (Yousef et al., 2016). Además, se ha mostrado que el ácido elágico (10 a 200  $\mu\text{M}$  por 48 horas) reduce la proliferación en células de cáncer colorrectal HCT116 e induce la salida del ciclo celular mediante la inhibición de la proteína Drp-1 de la dinámica mitocondrial, así como una morfología mitocondrial hiperfundida, pérdida del potencial de membrana mitocondrial y deterioro de la capacidad respiratoria, más la reducción de marcadores como CDK1, Ki67 y ciclina B. También el ácido elágico puede reducir la dosis efectiva de Doxorrubicina para promover la muerte celular, lo que es beneficioso para reducir la cardiotoxicidad en pacientes que son tratados con este fármaco (Yakobov et al., 2023). Adicionalmente, concentraciones de 10 a 40  $\mu\text{M}$  de ácido elágico promueven la apoptosis de las células HCT116, así como pueden reducir la fosforilación de mTOR, promover la fosforilación de AMPK e inducir la autofagia, por lo que se sugiere que el ácido elágico inhibe el crecimiento del cáncer colorrectal a través de la vía AMPK/mTOR (Ni et al., 2023).



**Figura 14. Efecto del ácido elágico en el cáncer colorrectal relacionado con la obesidad.** La incubación de células HCT-116 y CaCo-2 con ácido elágico  $\pm$  Leptina deriva en un aumento significativo de la actividad de caspasa-8 en comparación con el control. El efecto del ácido elágico no fue abolido por leptina (Tomada de Yousef et al., 2016).

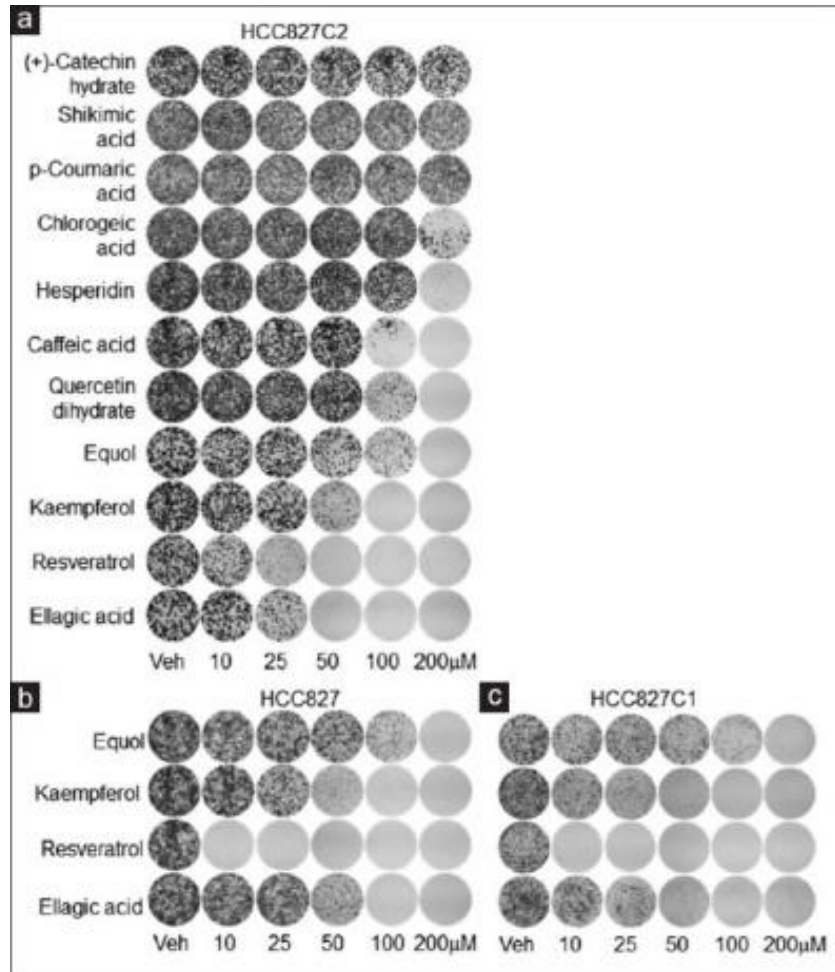


**Figura 15. El ácido elágico ejerce efectos sobre el cáncer colorrectal.** A-D) El tratamiento con ácido elágico suprime la dinámica mitocondrial y las proteínas marcadoras de proliferación celular en células de cáncer de colon. Se evaluó la expresión de proteína de dinámica mitocondrial Drp-1, Cdk1, ciclina B y Ki67. G) Histograma que muestra los datos obtenidos (Tomada de Yakobov et al., 2023).

#### 4.5.2 Ácido elágico y cáncer de pulmón

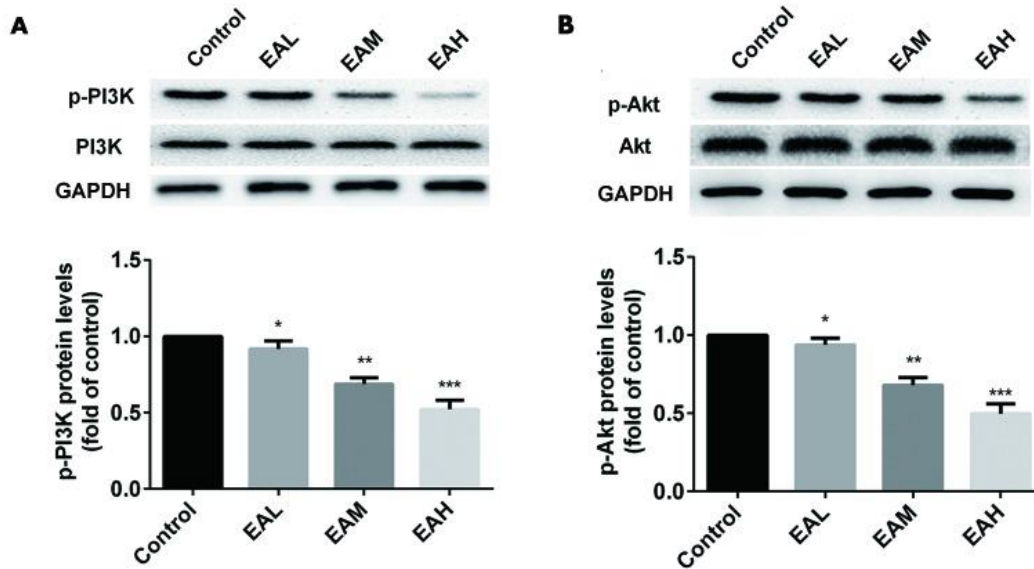
El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo. A pesar de la terapia estándar se ha planteado la utilización de fitoquímicos polifenólicos como adyuvantes que han mostrado efectos anticancerígenos en otros tipos de cáncer.

Por lo que, en 2017, Jeong y colaboradores detectaron compuestos polifenólicos como posibles adyuvantes anticancerígenos que suprimen el cáncer de pulmón con resistencia al inhibidor del receptor de tirosina quinasa del factor de crecimiento epidérmico (TKI), entre ellos el ácido elágico (10-200 µM) sensibilizó fuertemente las células de cáncer de pulmón HCC827 sensibles a TKI y las H1993 resistentes a los TKI.



**Figura 16. Efecto terapéutico de los polifenoles sobre las células de cáncer de pulmón.** Las células HCC827 son sensibles al inhibidor de tirosina quinasa, mientras que HCC827C2 y HCC827C1 son resistentes a inhibidores de tirosina quinasa (Tomada de Jeong et al., 2017).

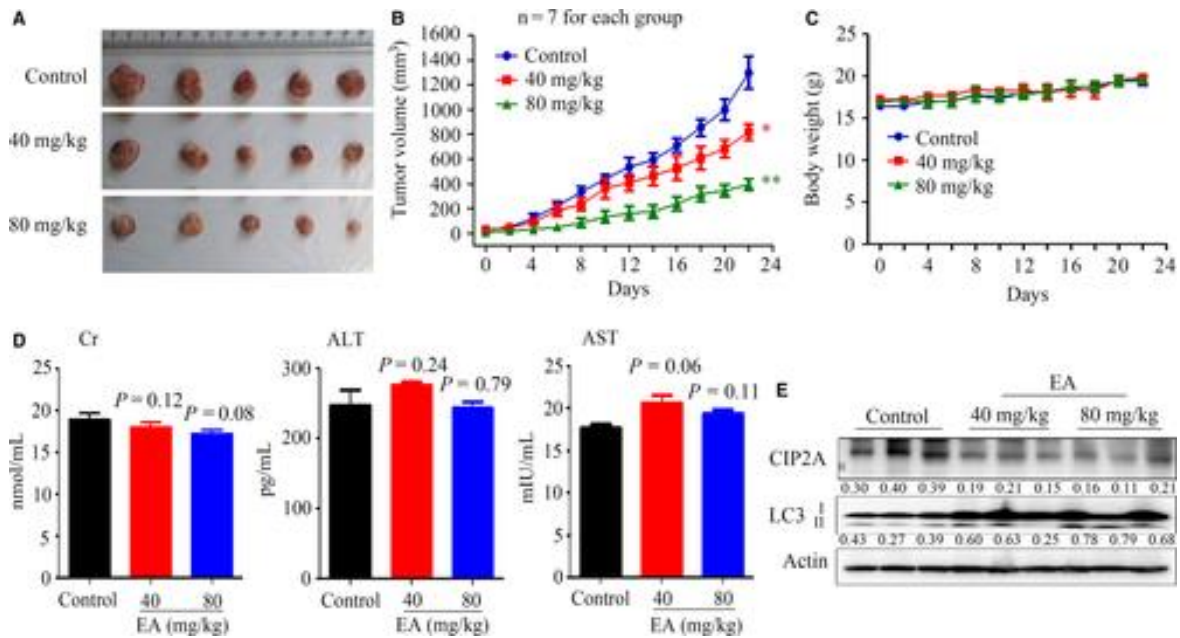
Asimismo, hay evidencia de que el tratamiento de ácido elágico de 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$  durante 48 horas ejerce un efecto inhibitor en la proliferación de las células de cáncer de pulmón A549, se ha demostrado que favorece la retención de la fase G1, aumento de apoptosis, regulación positiva de p21, Bax y caspasa 3, y regulación negativa de ciclina D1 y Bcl-2, así como una disminución de la fosforilación de PI3K y Akt como se ha reportado para otros tipos de cáncer (Liu et al., 2018).



**Figura 17. Efecto del ácido elálgico sobre la vía de señalización PI3K/Akt en el cáncer pulmonar.** El ácido elálgico reguló negativamente la fosforilación de PI3K y Akt dependiente de la dosis en células A549 (Liu et al., 2018).

Paralelamente en 2019, Duan y colaboradores probaron la actividad de 11 componentes del vino tinto contra el cáncer de pulmón, destacando el ácido elálgico (10-50  $\mu\text{mol/L}$  durante un lapso de 24-72 horas) por inhibir la proliferación de células de cáncer de pulmón HOP62 y H1975. También señalaron el aumento de la expresión del marcador autofagosómico LC3-II y de la muerte celular asociada a la autofagia al regular a la baja la expresión del inhibidor canceroso de la proteína fosfatasa 2A (CIP2A) y la sobreexpresión de CIP2A atenuó la autofagia inducida por ácido elálgico de las células de cáncer de pulmón. Mientras que en el modelo in vivo se demostró la inhibición del crecimiento tumoral con supresión de los niveles de CIP2A y aumento de la autofagia.





**Figura 18. Eficacia del ácido elágico contra el cáncer de pulmón in vivo.** A) Tumores de xenoinjertos de células HOP62 tratados con distintas concentraciones de ácido elágico. B) Eficacia del tratamiento sobre el crecimiento tumoral en ratones desnudos inyectados con células HOP62. C) Peso corporal de los ratones. D) Niveles séricos de creatinina, alanina aminotransferasa y aspartato transaminasa para evaluar el daño hepático y renal. E) Expresión de proteínas asociadas a la autofagia CIP2A y LC3 usando lisados de tumores aislados (Tomada de Duan et al., 2018).

Es por la anterior evidencia que demuestra los efectos anticancerígenos del ácido elágico que planteamos la necesidad de un estudio más profundo de los mecanismos moleculares que hacen del ácido elágico un prometedor compuesto terapéutico adyuvante.

## 5. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un grupo amplio de enfermedades en el que las células normales evolucionan hacia un estado neoplásico adquiriendo capacidades distintivas que les permiten volverse malignos que representa un desafío significativo para la salud a nivel mundial. En particular, el cáncer de pulmón se clasifica en cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) siendo el primero el que representa el 85% de todos los casos. De acuerdo con la IARC en 2020, el cáncer de pulmón es más común entre los varones, así como el segundo más común referente a nuevos casos (11.4%) y el primero en llevar a la muerte a nivel mundial (18%). En México su incidencia es del 3.9% y su mortalidad del 7.9% del total de todos los tipos de cáncer. Adicionalmente, presenta resistencia a la mayoría de los tratamientos convencionales.

Unas de las características distintivas del cáncer son el mantenimiento de la señalización proliferativa y la resistencia a la muerte celular que permiten el crecimiento tumoral, por lo que alteraciones en el ciclo celular son clave para la comprensión de los mecanismos básicos durante el desarrollo del cáncer.

La desregulación del ciclo celular y la apoptosis en las células cancerosas lleva a una proliferación descontrolada y evasión de la muerte celular. Dicha desregulación implica alteraciones en la expresión y actividad de diversos marcadores y proteínas involucradas en el ciclo celular, como las ciclinas. Además, el funcionamiento anormal de las vías apoptóticas, incluyendo las vías intrínsecas y extrínsecas, contribuye a la supervivencia y crecimiento de las células cancerosas.

Los fitoquímicos son un enfoque rentable y prometedor ante la resistencia del tratamiento del cáncer de pulmón que actúe como adyuvante a la terapia convencional. El estudio del ácido elágico es un recurso alentador al haberse demostrado su actividad antitumoral, por lo que comprender los mecanismos moleculares subyacentes a estas desregulaciones es crucial para desarrollar terapias efectivas contra el cáncer de pulmón.



## **6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El cáncer de pulmón un problema de salud global significativo, con altas tasas de incidencia y mortalidad; conjuntamente, la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la patogénesis del cáncer aún es incompleta, y es necesario explorar enfoques terapéuticos alternativos que puedan dirigirse de manera efectiva a las células cancerosas. Asimismo, la desregulación del ciclo celular y las vías apoptóticas desempeñan un papel crucial en el desarrollo y la progresión del cáncer, lo que destaca la necesidad de más investigaciones en estas áreas para identificar posibles blancos terapéuticos y mejorar los resultados para los pacientes.

## **7. HIPÓTESIS**

El ácido elágico disminuye el tamaño de la población de la línea tumoral A549, afectando su capacidad replicativa y/o apoptótica.

## **8. OBJETIVOS**

### **8.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la presencia de ácido elágico disminuye el tamaño de la población de la línea tumoral A549, afectando su capacidad replicativa y/o apoptótica.

### **8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a. Evaluar el efecto que ejerce el ácido elágico sobre el tamaño de la población de la línea celular A549.

- b. Determinar si el efecto del ácido elálgico incide sobre la expresión de marcadores moleculares relacionados con el ciclo celular en las células A549.
- c. Investigar si la presencia de ácido elálgico regula la expresión de marcadores moleculares pro-apoptóticos y anti-apoptóticos en las células A549.

## **9. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **9.1 Cultivo celular**

Inicialmente se descongeló el criovial madre de la línea celular A549 a baño maría por 90 segundos a 37°C y el contenido celular se sembró en matraces de cultivo de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup> de superficie con medio de cultivo Advanced DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-Glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico (25 µg/ml de anfotericina B, 10000 µg/ml de estreptomicina y 10000 unidades/ml de penicilina) en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar. Se mantuvieron en incubación a 37° C con una atmósfera húmeda del 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. El medio de cultivo fue renovado cada 48 horas y al cuarto día las células se tripsinizaron.

La tripsinización consistió en retirar el medio de cultivo y lavar dos veces el matraz con 5 ml de PBS 1X estéril, se agregaron 2 ml de tripsina y reposó por 5 minutos, luego se resuspendió con 4 ml de medio de cultivo. Seguido la suspensión celular se transfirió a un tubo cónico y se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y la pastilla celular en el fondo del tubo se resuspendió con 4 ml de medio de cultivo fresco; a partir del cual se tomaron alícuotas para regenerar el cultivo madre y se sembraron las células que se utilizaron para experimentos posteriores

Para los ensayos de proliferación y expresión génica se utilizaron cultivos en cajas Petri adicionadas con 1.5 ml de medio de cultivo y 50 µL de suspensión celular. Las células crecieron formando una monocapa y al iniciar la confluencia deseada se

iniciaron los tratamientos por 72 horas. En la caja 1 no se adicionó tratamiento por lo que actuó como control, en la caja 2 se agregaron 20  $\mu\text{M}$  de tratamiento y la caja 3 se trató con 50  $\mu\text{M}$  de ácido elágico.

## **9.2 Ensayo de conteo celular**

Con el fin de evaluar el efecto en la proliferación celular después del tratamiento con ácido elágico se empleó la cámara de recuento celular Neubauer.

Se realizó el cultivo celular en cajas Petri. Una vez alcanzada una confluencia del 70% se inició el tratamiento de EA a concentraciones de 20  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  por 72 horas. A las cajas se les retiró el medio de cultivo, seguido fueron lavadas con 2 ml de PBS al 1X, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de tripsina a cada una y se incubaron en agitación por 5 minutos. Luego se adicionaron 750  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo por caja. La suspensión celular se colocó en tubos para su centrifugación por 5 minutos a 3000 rpm. Posteriormente se homogeneizó la suspensión y se tomaron 20  $\mu\text{L}$  que fueron resuspendidos con 80  $\mu\text{L}$  de azul de tripano al 0.4%. Después se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla en cada cámara del hemocitómetro. Se colocó al microscopio y se contaron las células contemplando las azules como muertas y las blancas como vivas. Se consideró la siguiente fórmula para obtener la concentración celular de cada condición:

$$\text{Concentración} = (\text{Células vivas}/8) (4 \times 10^4)$$

## **9.3 Ensayo de expresión génica**

### **9.3.1 Extracción de ARN total**

Se sembraron células A549 en cajas Petri, al alcanzar la confluencia deseada, se cambió el medio de cultivo y se trataron con EA por 72 horas.

La extracción de ARN total se realizó con el kit FavorPrep TM, Tissue Total RNA Mini (Favorgene, Bioetech Corp., China) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Primero se aspiró el medio de cultivo y se realizó el lavado con 2 ml de PBS 1X, se agregaron 500  $\mu$ L de tripsina, se mantuvo en agitación por 5 minutos; enseguida se adicionaron 750  $\mu$ L de medio de cultivo y se tomó la muestra para ser centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm.

Posteriormente se retiró el medio y la pastilla fue homogenizada con 350  $\mu$ L buffer de lisis suplementado con 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol. El homogenado celular se transfirió a la columna con filtro blanco del kit y fue centrifugada a 13200 rpm por 2 minutos. Luego lo que quedó en el tubo colector se transfirió a tubos eppendorf y se añadieron 350  $\mu$ L de etanol al 70% en cada tubo. Seguido se colocó el contenido en la columna con filtro rojo y se centrifugó a 13200 rpm por 2 minutos, se retiró el sobrenadante, sobre el filtro rojo se agregaron 500  $\mu$ L de buffer de lavado 1 y se centrifugó a 13200 rpm por 2 minutos. Se decantó lo que quedó en la columna y sobre el filtro rojo se añadieron 400  $\mu$ L de buffer de lavado 2 por tubo y se centrifugó a 13200 rpm por 2 minutos. Este último paso se repitió nuevamente y luego se centrifugó en seco el filtro rojo. Finalmente, se transfirió el filtro rojo a un rubo de 1.5 ml estéril y se agregaron 30  $\mu$ L de agua libre de RNAsas, reposaron por 3 minutos a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó cada tubo a 13200 rpm por 5 minutos para obtener el RNA total.

### **9.3.2 Cuantificación de ARN total**

Se realizó la cuantificación de la concentración de ARN extraído por espectrofotometría con el equipo BioPhotometer D30 (Eppendorf). Se requirió una dilución con 4  $\mu$ L de muestra de RNA y 196  $\mu$ L de agua inyectable. La concentración se evaluó a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm. El cociente debió ubicarse en un rango de 1.8-2.0 para considerarse como una muestra de ARN de buena calidad y utilizarse para ensayos posteriores.

### 9.3.3 Síntesis de ADN complementario (Transcripción reversa)

Para la síntesis de ADNc se empleó el kit High Capacity Cdna Reverse Transcription (Applied Biosystem, EUA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se hizo un Master Mix (mezcla de componentes) en el que se añadieron 6  $\mu\text{L}$  por muestra para la retrotranscripción; en el que cada tubo de reacción contenía:

Reactivo	Volumen
Buffer RT	4 $\mu\text{L}$
dNTP's	1 $\mu\text{L}$
Random	0.5 $\mu\text{L}$
Mull	0.5 $\mu\text{L}$

El volumen final de cada tubo de reacción fue de 20  $\mu\text{L}$  por lo que el volumen restante (14  $\mu\text{L}$ ) se complementó con la muestra de ARN más agua.

Se efectuaron los cálculos para obtener el volumen final de la muestra de ARN que era requerida por cada tubo de reacción mediante regla de tres de manera que cada uno tuviera 4  $\mu\text{g}$  de ARN por  $\mu\text{L}$ .

Condición	Concentración de ARN
X	X $\mu\text{g}$ _____ 1000 $\mu\text{L}$
	4 $\mu\text{g}$ _____ X $\rightarrow$ Volumen de muestra requerido

Al tener cada tubo de reacción por condición, se empleó el termociclador Mastercycler X50s (Eppendorf) para realizar el siguiente protocolo: 10 minutos a 25  $^{\circ}\text{C}$ , 2 horas a 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5 minutos a 85  $^{\circ}\text{C}$  y finalmente a 4  $^{\circ}\text{C}$  para ser almacenados en congelación hasta su uso.

### 9.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir del ADNc obtenido en la retrotranscripción se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) semicuantitativa con la finalidad de evaluar los niveles de expresión de ARNm que codifica los diversos elementos de interés utilizando oligonucleótidos específicos para cada uno de ellos. Se empleó el kit comercial DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific, EUA) siguiendo las indicaciones del fabricante, se prepararon tubos de reacción con un volumen final de 20  $\mu$ L como se indica a continuación:

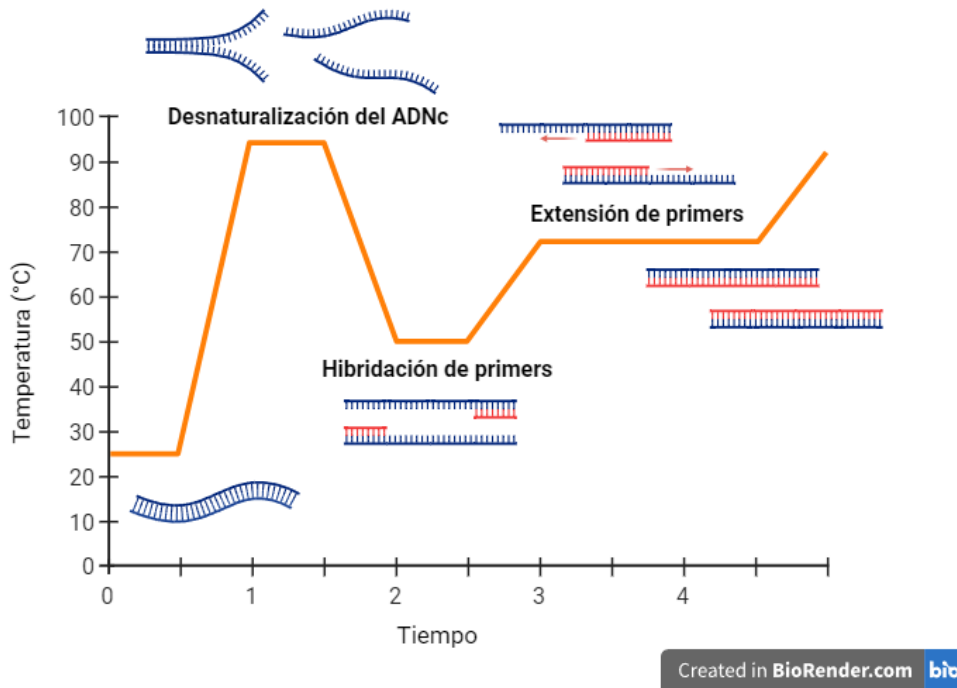
Reactivo	Volumen
Green Dream Taq	10 $\mu$ L
Primer Forward	1 $\mu$ L
Primer Reverse	1 $\mu$ L
Agua	6 $\mu$ L
ADNc	2 $\mu$ L

Los oligonucleótidos empleados fueron:

Oligonucleótidos/ Primers	Sentido	Secuencia	Tamaño del amplicón	Tm (°C)
Control interno				
$\beta$ -actina	Forward	CAAGAGATGGCCACGGCTGCT	275 pb	73.1
	Reverse	TCCTTCTGCATCCTGTCCGGCA		72.7
Marcador nuclear de proliferación				
Ki67	Forward	AGTACCAGGAGGTGAGGATAAA	415 pb	60.9
	Reverse	CTGCACTGGAGTTCCCATAAA		64.3
Marcadores relacionados con el ciclo celular				
Ciclina E1	Forward	CGTTCTCTTCTGTCTGTTGCA	317 pb	64.2
	Reverse	CGTTCTCTTCTGTCTGTTGCA		64.2
Ciclina B1	Forward	TTGGTGTCACTGCCATGTTT	314 pb	63.6
	Reverse	TAAGCAAAAAGCTCCTGCTG		63.6
Marcadores anti-apoptóticos				
Bcl-2	Forward	GCTTTCACCTCCAGGATCTATT	551 pb	62.7
	Reverse	CCCAATACAGGTCCTTCATACC		63.5
BIRC3	Forward	CACTCATTACTTCCGGGTACAG	420 pb	62.7
	Reverse	AACACTAGAGGGCCAGTTAAAG		60.7

Marcador pro-apoptótico				
Bax	Forward	GGGCTGGACATTGGACTTCC	201 pb	68.2
	Reverse	AGATGGTGAGTGAGGCGGTG		68.1

Se utilizó un termociclador Mastercycler X50s (Eppendorf) para realizar el protocolo que se muestra a continuación:



**Figura 19. Protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa.** Se inició la reacción hasta una temperatura de 94 °C por 5 minutos, se desnaturalizó el ADNc a 94°C durante 30 segundos. Luego se realizó la alineación al extremo 3' e hibridó con su secuencia complementaria a la temperatura específica de cada oligonucleótido por 30 segundos. Posteriormente en la extensión, la temperatura aumentó hasta 72°C por un minuto, para permitir que la enzima Taq polimerasa se uniera a cada iniciador y así se sintetizó una cadena de ADNc nueva. Para la elongación final en esta etapa se aseguró que el ADN de cadena simple restante haya sido totalmente amplificado a una temperatura de 72°C por 10 minutos. Todo lo anterior por 30 ciclos. Para la conservación de los productos de reacción, se llevó a una temperatura de 4°C. Figura realizada con BioRender.

### 9.3.5 Electroforesis

Se realizó la separación electroforética a partir de los productos de PCR utilizando geles de agarosa al 1.2% teñidos con bromuro de etidio.

Primero se realizó la preparación del gel disolviendo por calor 0.6 gramos de agarosa en 50 ml de buffer TAE 1X, luego se añadieron 4  $\mu$ L de bromuro de etidio y se vertió en la cámara de electroforesis dejando gelificar por 25 minutos a temperatura ambiente.

Después el gel fue cargado con 9  $\mu$ L de cada muestra y, como marcador de peso molecular se usó el patrón de ADN comercial Gene Ruler 100 pb DNA Laddery junto con el buffer 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific, EUA).

Se realizó la separación electroforética en buffer TAE 1X a 65 voltios por 80 minutos. Al finalizar, se obtuvo el triplicado de micrografías de cada uno de los geles en el fotodocumentador de geles AXYGEN.

### **9.3 Densitometría**

Se realizó el análisis densitométrico de las bandas presentes en las imágenes obtenidas usando el software ImageJ, proporcionado gratuitamente por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos de América.

### **9.4 Análisis de datos**

Al concluir la fase experimental, se realizó el análisis e interpretación de los resultados obtenidos por medio del software SigmaPlot 12.5 (Jandel Corporation, EUA).

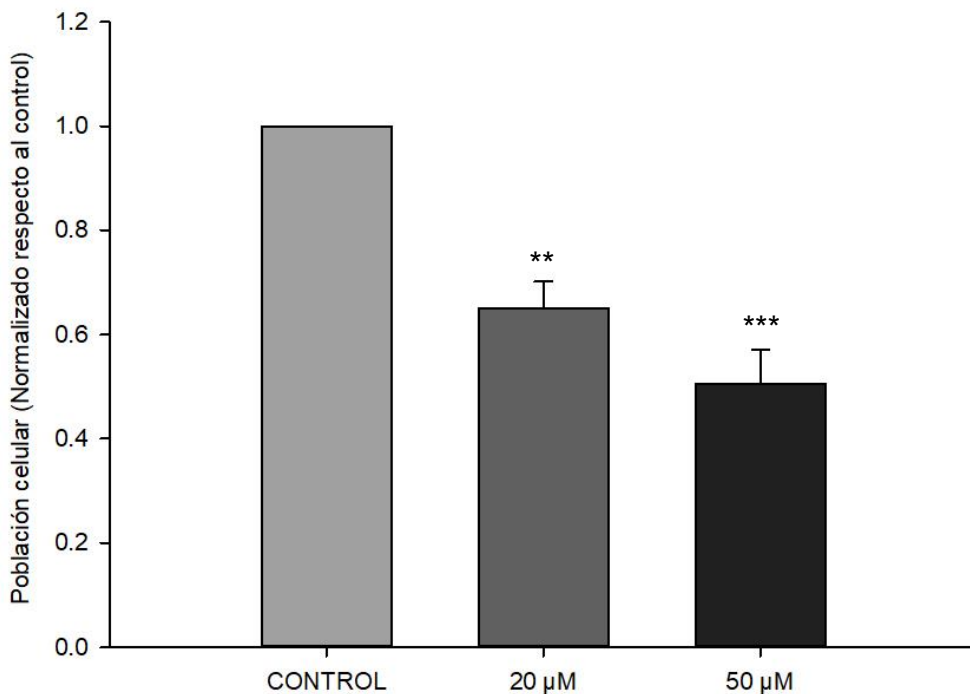
Se empleó la prueba *t* de Student para evaluar la diferencia entre los grupos que fueron tratados con respecto al grupo control. Se consideró un valor estadísticamente significativo \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ . Las gráficas representativas de cada experimento muestran el promedio del triplicado de ensayos realizados de manera independiente.



## 10.RESULTADOS

### 10.1 El ácido elágico reduce el tamaño de la población celular A549 de manera dependiente de la dosis.

Inicialmente, se decidió evaluar si la presencia de ácido elágico afecta el tamaño de la población celular A549, y si este efecto es dependiente de la concentración. Las células fueron tratadas durante 72 horas en presencia de 20 y 50  $\mu\text{M}$  de ácido elágico, recambiándose el medio de cultivo suplementado cada 24 horas. El conteo celular realizado en una cámara de Neubauer mostró que el ácido elágico reduce de manera significativa la población de células A549, observándose una reducción del 35% en presencia de 20  $\mu\text{M}$  y casi del 50% en presencia de 50  $\mu\text{M}$  del fitoquímico (Figura 20). Este resultado coincide con el efecto antitumoral reportado previamente para el ácido elágico.

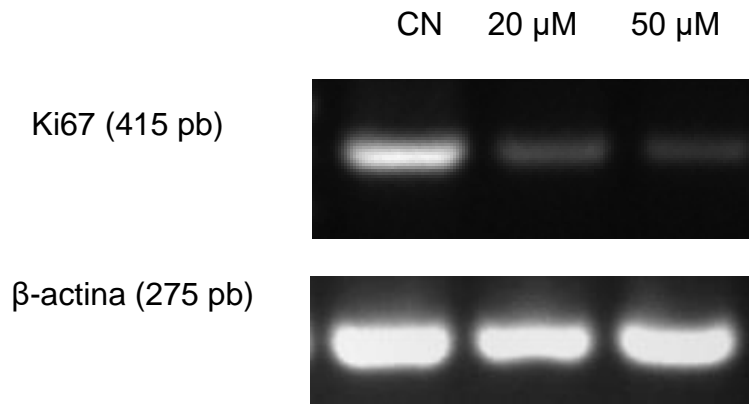


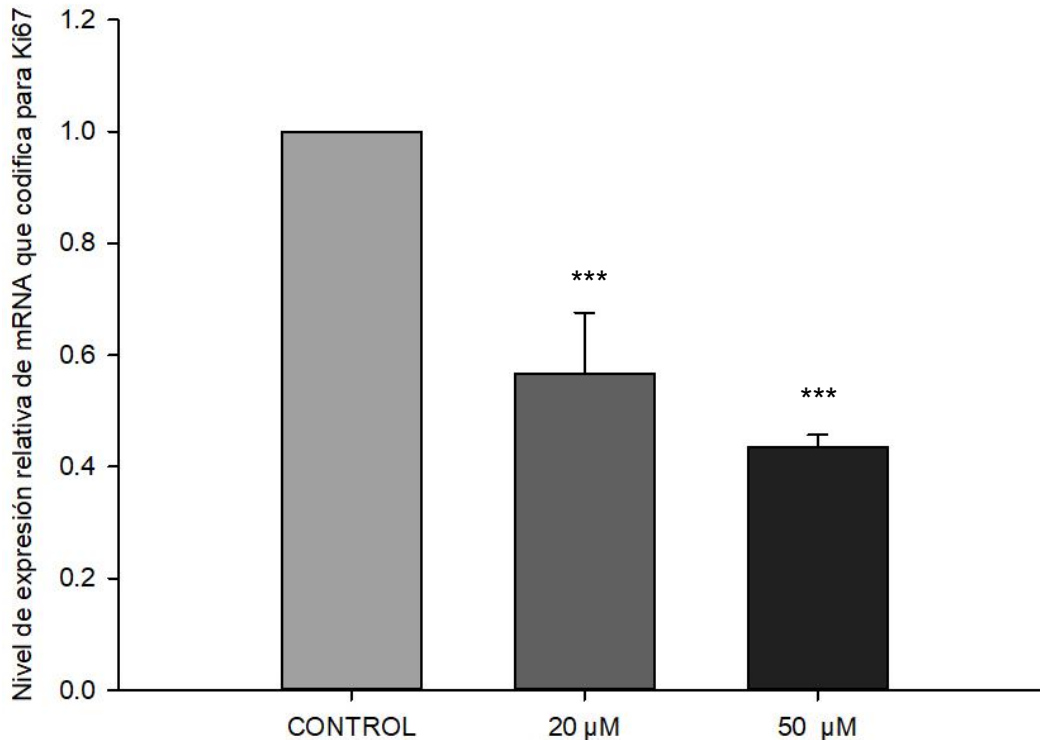
**Figura 20. Efecto del ácido elágico sobre la población celular en las células A549.** Las células A549 fueron tratadas con 20  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  de ácido elágico por 72 horas y, posteriormente se evaluó su efecto en la proliferación realizando el recuento celular Neubauer observando una disminución en

la población celular dependiente de la dosis. Con un tratamiento de ácido elágico 20  $\mu\text{M}$  se obtuvo un valor de  $p=0.00120$ , mientras con una concentración de 50  $\mu\text{M}$  el valor de  $p=0.000885$ . Los valores graficados se expresan normalizados respecto al control, así como el error estándar,  $N=3$  experimentos independientes.  $**p<0.01$  y  $***p<0.001$ .

## 10.2 El ácido elágico reduce los niveles de expresión del ARNm que codifica para Ki67.

Para darle sustento a los resultados mostrados del ácido elágico sobre la población de células A549, evaluamos de manera complementaria, los niveles de expresión del ARNm que codifica para Ki67, el cual es considerado un marcador nuclear de proliferación celular. Se observó una drástica disminución de este marcador con respecto a la condición control, tanto a los 20 como a los 50  $\mu\text{M}$  de ácido elágico, 43% y 55%, respectivamente (Figura 21).



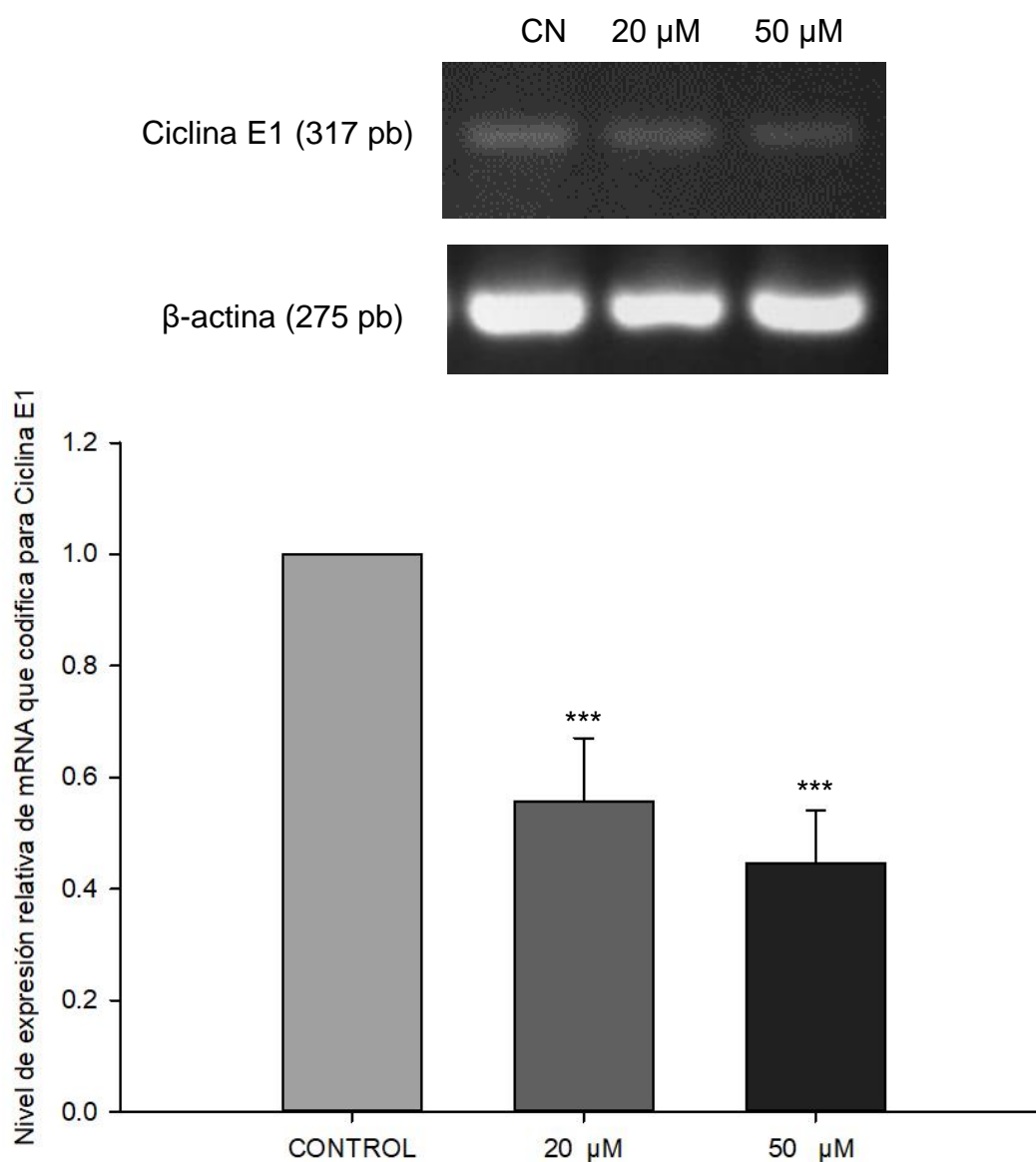


**Figura 21. El efecto del ácido elágico en la proliferación celular sobre la línea A549 es dosis-dependiente.** Las células de cáncer de pulmón A549 fueron tratadas por 72 horas con ácido elágico 20  $\mu$ M y 50  $\mu$ M y posteriormente se evaluó el nivel de expresión de mRNA que codifica para Ki67 por RT-PCR en el que las células mostraron una disminución del marcador de proliferación celular dependiente de la dosis. Con un tratamiento de ácido elágico 20  $\mu$ M se obtuvo un valor de  $p=0.00831$ , mientras con una concentración de 50  $\mu$ M el valor de  $p= 0.00000798$ . Los valores graficados se expresan normalizados respecto al control, así como el error estándar, N=3 experimentos independientes. \*\*\* $p<0.001$ .

### 10.3 El ácido elágico afecta negativamente la capacidad replicativa de las células A549.

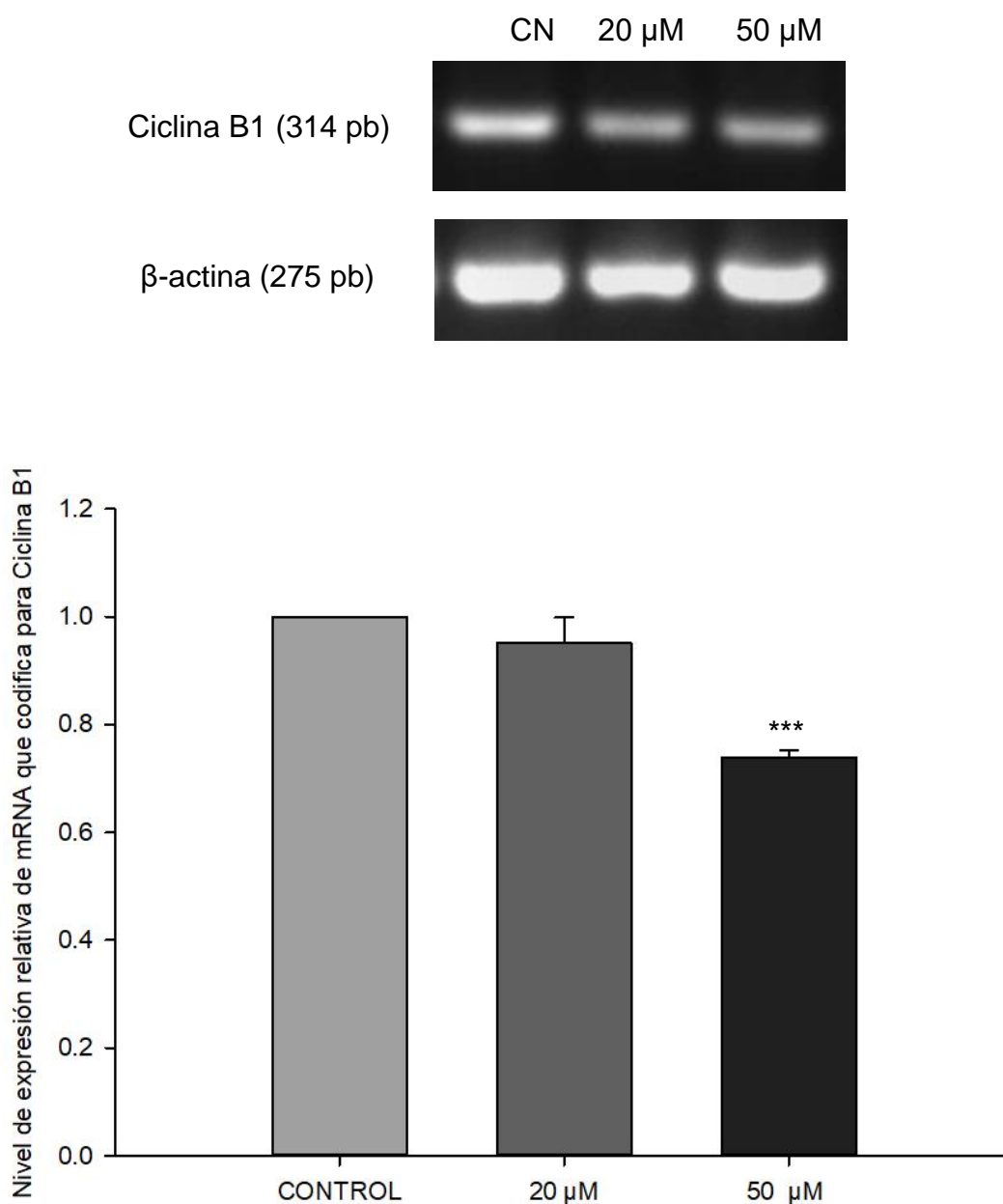
El ácido elágico reduce la población celular A549, desconociéndose si este efecto, se debe a una reducción en su tasa replicativa o a un incremento en su tasa apoptótica, por lo que se decidió evaluar de manera inicial, si la presencia de ácido elágico inhibe la tasa replicativa de las células A549, para lo cual se evaluó cambios en los niveles de expresión del ARNm que codifica para las ciclinas B1 y E1, proteínas que regulan el ciclo celular. Los resultados obtenidos muestran que el ácido elágico reduce de manera significativa el ARNm que codifica para la ciclina

E1 en las dos concentraciones probadas de ácido elágico (20 y 50  $\mu\text{M}$ , Figura 22), mientras que para el caso de la expresión de la ciclina B1, solamente se observa un efecto inhibitorio cuando se emplea la concentración más alta de ácido elágico (50  $\mu\text{M}$ , Figura 23). Estos resultados muestran con claridad, que el ácido elágico ejerce parte de su efecto antitumoral, evitando que las células entren a la fase M de su ciclo celular, y con ello inhibir su capacidad replicativa.



**Figura 22. El ácido elágico ejerce un efecto dosis-dependiente sobre células de cáncer de pulmón.** El tratamiento de ácido elágico por 72 horas disminuyó el nivel de expresión de mRNA que

codifica para Ciclina E1, que. La expresión de la ciclina que regula la transición de la fase G1 a S en el ciclo celular se evaluó por RT-PCR observándose una disminución dependiente de la dosis. Con un tratamiento de ácido elágico 20  $\mu\text{M}$  se obtuvo un valor de  $p= 0.00882$ , mientras con una concentración de 50  $\mu\text{M}$  el valor de  $p= 0.00222$ . Los valores graficados se expresan normalizados respecto al control, así como el error estándar,  $N=3$  experimentos independientes.  $***p<0.001$ .

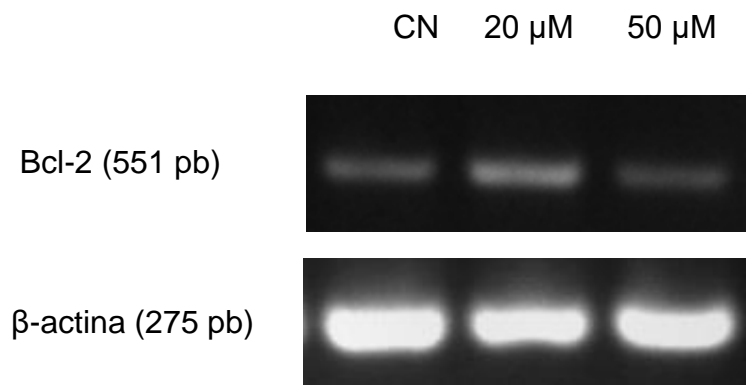


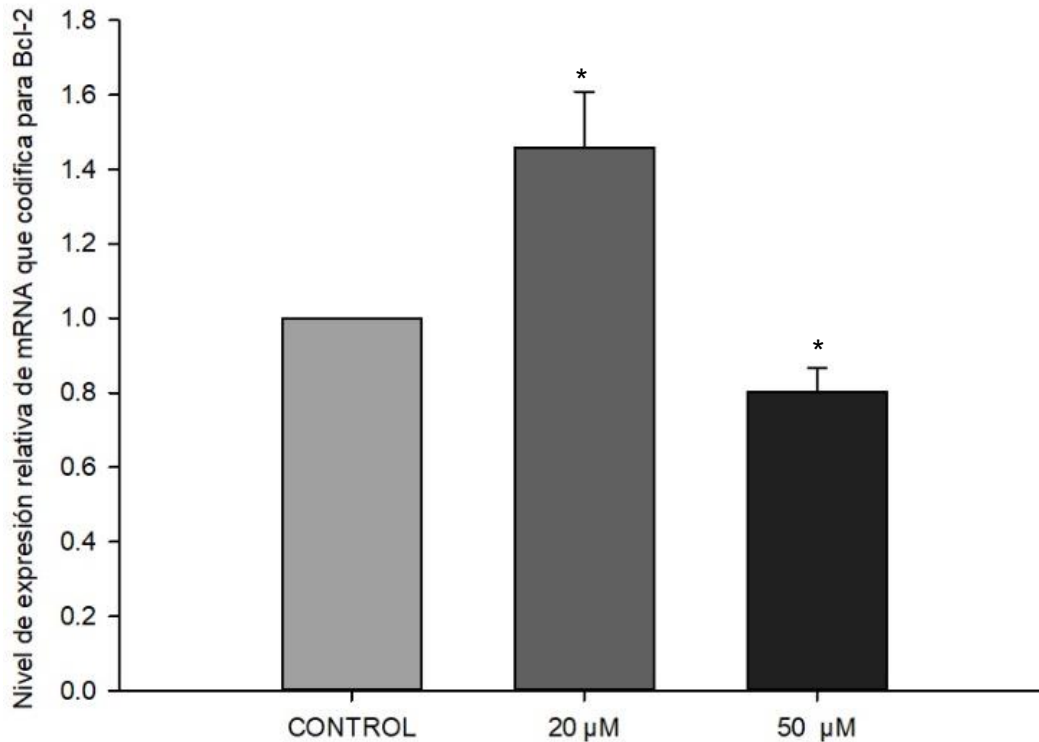
**Figura 23. Alta concentración de ácido elágico disminuye los niveles de expresión de Ciclina B1.** Las células de cáncer de pulmón tratadas con altas concentraciones de ácido elágico (50  $\mu\text{M}$ ) muestran una disminución en el nivel de expresión de Ciclina B1. La expresión de Ciclina B1 que regula la transición de la fase G2 a M en el ciclo celular se realizó por RT-PCR donde con un

tratamiento de ácido elágico 20  $\mu\text{M}$  se obtuvo un valor de  $p= 0.183$ , mientras con una concentración de 50  $\mu\text{M}$  el valor de  $p= 0.0000260$ . Los valores graficados se expresan normalizados respecto al control, así como el error estándar,  $N=3$  experimentos independientes. **\*\*\* $p<0.001$** .

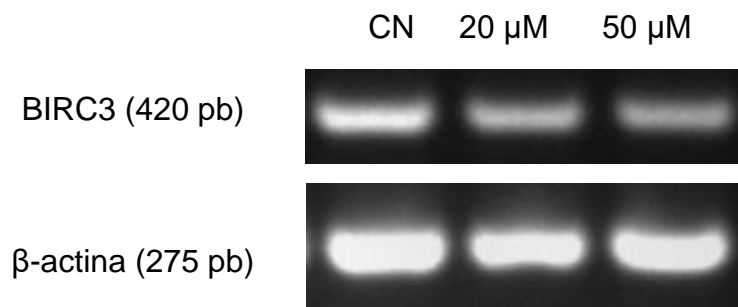
#### **10.4 El ácido elágico favorece la capacidad apoptótica de las células A549.**

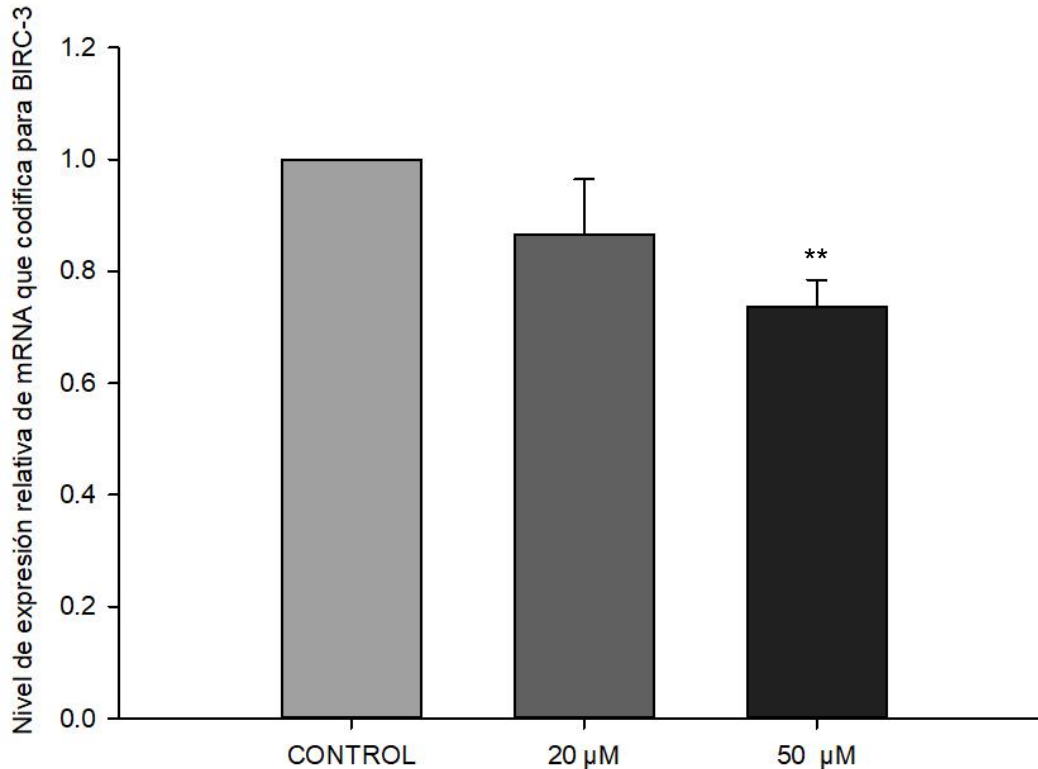
La apoptosis, muerte celular programada, es un mecanismo fisiológico que regula el tamaño de una población celular, observándose en las células tumorales, una desregulación negativa, lo cual aseguraría el aumento en el tamaño del tumor. Diferentes agentes antitumorales, ejercen su efecto, incrementando la capacidad apoptótica de las células tumorales, ya sea favoreciendo la expresión de genes pro-apoptóticos o inhibiendo la expresión de genes anti-apoptóticos. De manera inicial, se decidió investigar, si la presencia de ácido elágico, altera los niveles de expresión del ARNm que codifica para Bcl-2 y BIRC3, los cuales codifican para proteínas antiapoptóticas. Para el caso de Bcl-2, se observó un efecto bimodal, a una baja concentración de ácido elágico (20  $\mu\text{M}$ ), hay un incremento del 42%, mientras, que a una alta concentración (50  $\mu\text{M}$ ), se presenta una reducción del 18%, con respecto a la condición control (Figura 24). Por su parte, solamente una alta concentración de ácido elágico es capaz de reducir los niveles de ARNm que codifica para BIRC3 (Figura 25). Estos resultados sugieren, al menos parcialmente, que el ácido elágico inhibe la expresión de proteínas que inhiben la apoptosis, favoreciendo con ello la supervivencia celular.





**Figura 24. El efecto del ácido elágico en la expresión de mRNA que codifica para Bcl-2 sobre la línea A549 es variable.** Las células de cáncer de pulmón A549 fueron tratadas por 72 horas con ácido elágico 20  $\mu$ M y 50  $\mu$ M y a continuación se evaluó el nivel de expresión de mRNA que codifica para Bcl-2, un marcador anti-apoptótico, por RT-PCR en el que las células mostraron efecto variable del marcador anti-apoptótico. Con un tratamiento de ácido elágico 20  $\mu$ M se obtuvo un valor de  $p=0.0190$ , mientras con una concentración de 50  $\mu$ M el valor de  $p=0.0198$ . Los valores graficados se expresan normalizados respecto al control, así como el error estándar, N=3 experimentos independientes. \* $p<0.05$ .





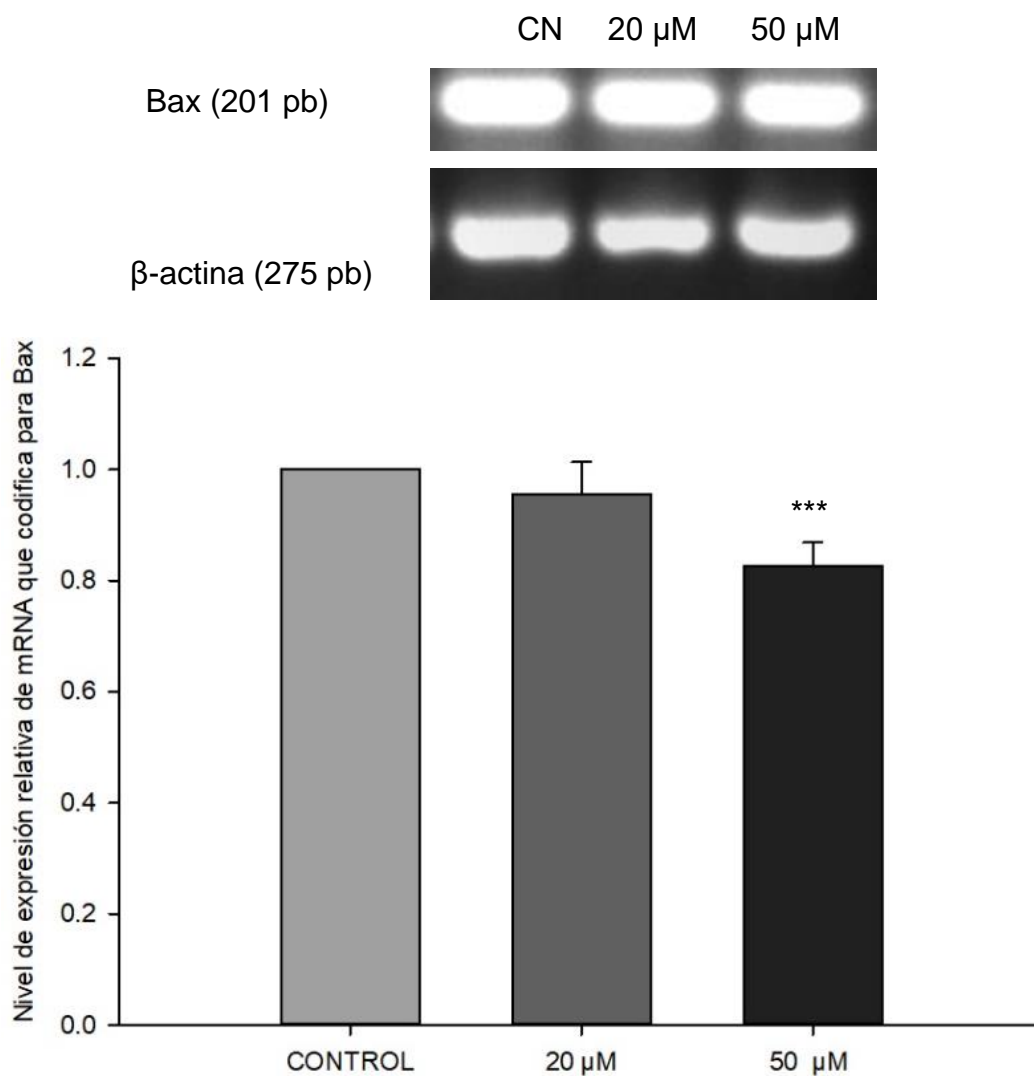
**Figura 25. El efecto del ácido elágico en la línea A549 sobre BIRC-3, un marcador anti apoptótico, es dependiente de la dosis.** La presencia de ácido elágico a concentraciones de 20  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  mostró una disminución en el nivel de expresión de mRNA que codifica para BIRC-3 dependiente de la dosis por 72 horas en las células de cáncer de pulmón A549. La expresión del marcador anti-apoptótico se realizó por RT-PCR donde con un tratamiento de ácido elágico 20  $\mu\text{M}$  se obtuvo un valor de  $p= 0.122$ , mientras con una concentración de 50  $\mu\text{M}$  el valor de  $p= 0.00295$ . Los valores graficados se expresan normalizados respecto al control, así como el error estándar,  $N=3$  experimentos independientes. **\*\* $p<0.01$ .**

En correspondencia con la búsqueda de evaluar el efecto del ácido elágico sobre los marcadores anti-apoptóticos en la línea celular A549, se midió el nivel de expresión de ARNm que codifica una proteína que actúa de forma inversa en el proceso de apoptosis, es decir, una proteína proapoptótica, para este caso, se evaluó la expresión del ARNm que codifica para Bax en presencia de ácido elágico.

Bax, es una proteína que induce la apoptosis, al inducir la formación de poros en la membrana mitocondrial, favoreciendo con ello la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la fuga del citocromo c. De manera contraria a lo esperado, se



encontró que las células A549 tratadas con ácido elágico 50  $\mu\text{M}$ , reducen los niveles de expresión del ARNm para Bax (Figura 26).



**Figura 26. El ácido elágico disminuye los niveles de expresión de Bax.** Una concentración más elevada de ácido elágico (50  $\mu\text{M}$ ) disminuye los niveles de mRNA que codifica para Bax, un marcador pro-apoptótico en la línea celular A549. Con un tratamiento de ácido elágico 20  $\mu\text{M}$  se obtuvo un valor de  $p= 0.243$ , mientras con una concentración de 50  $\mu\text{M}$  el valor de  $p= 0.00724$ . Los valores graficados se expresan normalizados respecto al control, así como el error estándar,  $N=3$  experimentos independientes. \*\*\* $p<0.001$ .

## 11 DISCUSIÓN

Las características del cáncer, originalmente propuestas por Hanahan y Weinberg en el 2000 proponen un conjunto de capacidades funcionales que son adquiridas por las células al pasar de un estado de normalidad a un crecimiento neoplásico, características en común en todos los tipos de células cancerosas a nivel de fenotipo celular. Las características distintivas comprenden mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir o acceder a la vasculatura, activar la invasión y metástasis. Además, como características emergentes se considera la desregulación del metabolismo celular y evitar la destrucción inmune, mientras que, como características habilitadoras la inflamación promotora de tumores y la inestabilidad y mutación del genoma. Así, como la propuesta de incorporar el desbloqueo de la plasticidad fenotípica, la reprogramación epigenética no mutacional, los microbiomas polimórficos y las células senescentes (Hanahan, 2022).

El cáncer de pulmón es el segundo tipo de cáncer más común y la primera causa de muerte por cáncer a nivel mundial. En 2020 se atribuyó el 18% de toda la mortalidad por cáncer y su tasa de supervivencia a 5 años fue del 7-25%, mucho menor que otros tipos de cáncer. Además, se ha reportado una tendencia general creciente en las mujeres y decreciente en los hombres para el cáncer de pulmón, así como un aumento en la incidencia en las personas de 50 años o más (Huang et al., 2022). Por lo que el tratamiento de la enfermedad sigue siendo un reto y tendencioso a progresos que mejoren la supervivencia de los pacientes.

Un tratamiento anticancerígeno ideal debería tener una actividad citotóxica selectiva contra las células tumorales sin dañar a las células normales, por lo que se requieren estrategias que mitiguen los efectos secundarios.

El ácido elálgico es un compuesto polifenólico presente en alimentos como la fresas, frambuesa, uva, granada, té verde y el vino. Cuenta con actividades biológicas importantes como antiobesidad, antimicrobiana, antiviral, antioxidante,

cardioprotectoras y anticancerígenas. Sus actividades anticancerígenas son exhibidas in vitro e in vivo al detener el ciclo celular, inhibir la proliferación de células tumorales, inducir la apoptosis e inhibir la angiogénesis (Shakeri et al., 2018; Duan et al., 2019).

Estudios anteriores demuestran que el ácido eláxico posee dichas actividades con poca citotoxicidad en tejidos normales, apuntando a ser un buen candidato para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Weisburg y colaboradores en 2013 estudiaron el efecto selectivamente citotóxico del ácido eláxico para las células del carcinoma oral HSC-2 en donde obtuvieron toxicidad hacia las células HSC-2, pero no hacia los fibroblastos gingivales normales HF-1 después de 3 días de exposición. Para las células HSC-2 los valores medios de citotoxicidad se estimaron en 142  $\mu\text{M}$  y las células HF-1 fueron resistentes al ácido eláxico 200  $\mu\text{M}$ . También, en 2016 evaluaron la actividad antitumoral in vivo usando tumores xenoinjertados de glioblastoma U87 en ratones desnudos Balb/c y observaron que no había diferencias en el hígado, riñón, intestino y cerebro de los ratones con tumores en comparación con el grupo control, llegando a la conclusión de que es un producto seguro y no tóxico. Conjuntamente, Duan y colaboradores en 2019 evaluaron la actividad anticancerígena del ácido eláxico contra el cáncer de pulmón donde obtuvieron que los ratones tratados con ácido eláxico tuvieron concentraciones séricas normales de alanina aminotransferasa (ALT), creatina (Cr) y aspartato aminotransferasa (AST), además de no producir una reducción del peso corporal en comparación con los ratones control; lo que indica que el ácido eláxico no provocó toxicidad hepática o renal.

En este estudio nos centramos en el efecto del ácido eláxico sobre las características distintivas de evasión de los supresores del crecimiento y la resistencia a la muerte celular descritas por Hanahan y Weinberg. Sobre sus efectos anticancerígenos, los resultados obtenidos del estudio indican que el ácido eláxico tiene un efecto dependiente de la dosis sobre la población celular de las células de cáncer de pulmón A549. La evaluación del ácido eláxico a diferentes concentraciones mostró una disminución estadísticamente significativa en la

población celular, como se observó en el recuento de células de Neubauer. Estos hallazgos son consistentes con informes previos sobre los efectos quimiopreventivos y terapéuticos del ácido elágico. Además de concordar con Jeong y colaboradores que en 2017 realizaron un estudio en el que detectaron compuestos polifenólicos como posibles adyuvantes anticancerígenos que suprimen el cáncer de pulmón TKIR (resistente al inhibidor de la tirosina quinasa) donde obtuvieron por ensayo de formación de colonias que el ácido elágico suprimió drásticamente el crecimiento de células HCC82C2 con un efecto dosis-dependiente (10-200  $\mu\text{M}$ ). También, Duan y colaboradores en 2019 evaluaron el efecto del ácido elágico en las líneas celulares HOP62 y H1975 de cáncer de pulmón mostrando que el ácido elágico inhibió la proliferación y el crecimiento de las células cancerosas de una manera dependiente del tiempo y de la dosis (0-50  $\mu\text{M}$  y 0-48 horas).

La disminución en la población celular tratada con ácido elágico se correlacionó aún más con el nivel de expresión de Ki67, un marcador de proliferación celular en tumores malignos como el cáncer de pulmón. El análisis de expresión de ARNm reveló una disminución significativa en la expresión de Ki67 incluso a bajas dosis de ácido elágico, indicando su potencial para inhibir la proliferación de las células de cáncer de pulmón. Así como en un estudio que encontró que el ácido elágico (40  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal) inhibió la proliferación de células de xenoinjerto de glioblastoma U87 en ratones desnudos Balb/c en comparación con el grupo control mediante la supresión de Ki67 (Wang et al., 2017). Por su parte, Yakobov y colaboradores en 2023 demostraron una regulación negativa para la proteína Ki67 en células cancerosas de colon HCT116 tratadas con ácido elágico (50-100  $\mu\text{M}$ ).

Para proporcionar evidencia adicional de los efectos antitumorales del ácido elágico, el estudio examinó los niveles de expresión de ciclinas, que son reguladores clave del ciclo celular, ya que los puntos de control G1/S y G2/M son claves para modular el paso de las células a través del ciclo celular y alteraciones en estos son críticos ya que podrían conducir al proceso de carcinogénesis. Srigopalram y colaboradores en 2014, demostraron que la Ciclina E1 aumentó en un grupo tratado con Dimetilnitrosamina 0.01% (carcinógeno ambiental) contrario a la administración de

ácido eláxico (30 mg/kg de peso corporal) que redujo significativamente la expresión de Ciclina E1, obstaculizando la transformación oncogénica, confirmando su actividad antiproliferativa del ácido eláxico en el cáncer de hígado experimental in vivo. Por su parte, se ha señalado que concentraciones de 15, 30 y 45  $\mu\text{M/L}$  de ácido eláxico por 72 horas indujeron una disminución de la expresión de Ciclina B1 en la línea celular DU-145 de cáncer de próstata (Vicinanza et al., 2013).

Lo anterior corresponde con los resultados que obtuvimos, ya que el tratamiento con ácido eláxico condujo a una disminución dependiente de la dosis en la expresión de ciclina E y ciclina B, ambas desempeñan roles cruciales en la división celular. Estos resultados respaldan la noción de que el ácido eláxico interrumpe la progresión del ciclo celular de las células de cáncer de pulmón, lo que potencialmente contribuye a sus propiedades antitumorales. Asimismo, Park y colaboradores en 2022, publicaron el análisis de la expresión de ARNm de ciclina E1 y los niveles de proteína de ciclina B1 después del tratamiento con ácido eláxico (6.3 y 12.5  $\mu\text{M}$ ), el cual los reguló negativamente en comparación con el tratamiento con TP (propionato de testosterona que inducía hiperplasia benigna de próstata) en la línea celular epitelial de próstata humana normal RWPE-1.

Por otro lado, nuestro trabajo investigó el impacto del ácido eláxico en la apoptosis sobre células de cáncer de pulmón A549. El proceso apoptótico, caracterizado por la muerte celular programada, es un mecanismo esencial para mantener la fidelidad y calidad de la proliferación celular.

La proteína Bcl-2 es un factor clave en la inhibición de la apoptosis y su sobreexpresión puede prevenir eficazmente la apoptosis. Bcl-2 interviene río abajo de la activación de la caspasa-3 que tiene un papel central de la apoptosis. Se ha justificado que la intervención de ácido eláxico regula de forma negativa la expresión de la proteína Bcl-2 significativamente en un modelo de rata inyectada con D-galactosa (inductor del envejecimiento) exhibiendo efectos hepatoprotectores y cerebroprotectores del ácido eláxico (Chen et al., 2018). Mientras que otro factor anti-apoptótico como BIRC3, miembro de la familia IAP suprime la muerte celular al interferir con la activación de caspasa, suele estar al alza en varios tipos de

cánceres, siendo un indicador de mal pronóstico. BIRC3 influye en la vía de la apoptosis intrínseca mediante la regulación de las caspasas. Hu y colaboradores en 2015 comprobaron la regulación negativa de la proteína cIAP2 (o BIRC3), la liberación de caspasa-9 y activación de caspasa-3 por GDC-0152 (inhibidor de IAP) en células K562 (línea celular de leucemia mieloide crónica) y HL60 (línea celular de leucemia promielocítica aguda) durante 24 horas, mostrando una inhibición en la expresión de cIAP2 y esta regulación negativa se ha demostrado que induce la apoptosis.

Los resultados mostraron que el tratamiento con ácido elágico conducía a una disminución en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, así como la proteína antiapoptótica BIRC3. Estos hallazgos sugieren que el ácido elágico puede inducir un efecto negativo en las proteínas que promueven la supervivencia celular, lo que respalda aún más su potencial como agente anticancerígeno. Afín con estudios que señalan que un tratamiento con ácido elágico (50 y 100  $\mu$ M) en la línea celular U251 de glioblastoma inhibe significativamente la expresión de la proteína Bcl-2 (Wang et al., 2016). Además, se ha demostrado que apuntar a BIRC3 como objetivo terapéutico es prometedor en la terapia del cáncer. Fu y colaboradores en 2019 usaron AT406 (antagonista de las proteínas de la familia IAP) incluida BIRC3. Obtuvieron por xenoinjerto de carcinoma hepatocelular in vivo mostraron una inhibición de la proliferación celular y redujo la metástasis.

En adición, varios estudios han reportado una regulación positiva de Bax que induce la apoptosis en células cancerosas mediante la activación de caspasas después del tratamiento con ácido elágico en células AGS de cáncer gástrico (Cheshomi et al., 2022), células U251 de glioblastoma (Wang et al., 2016) y células MCF-7 de cáncer de mama (Ahire et al., 2017).

Curiosamente, el estudio también reveló una disminución en los niveles de expresión de la proteína proapoptótica Bax en concentraciones más altas de tratamiento con ácido elágico. Se sabe que Bax desempeña un papel crítico en las vías de muerte celular mediadas por las mitocondrias. Por lo tanto, la disminución

en la expresión de Bax sugiere una posible modulación de la apoptosis por parte del ácido elálgico en las células de cáncer de pulmón A549.

Los microARN son una familia de pequeños ARN monocatenarios no codificantes que actúan como reguladores negativos de la expresión génica a nivel postranscripcional. Pueden suprimir la traducción del mRNA o degradar los mRNA diana por el emparejamiento de bases con la región 3' no traducida (3'-UTR) del mRNA objetivo. Se ha demostrado que los microARN regulan la expresión de genes diana relacionados con tumorigénesis incluida la apoptosis e invasión del ciclo celular, por lo que pueden tener características oncogénicas y otros aparecen como supresores de tumores (Li et al., 2013).

Un estudio realizado por Kwon y colaboradores en 2018 mostró que BRM270 inhibe el mantenimiento de células madre cancerosas mediante la regulación de microARN-128 (miR-128) en células de adenocarcinoma de pulmón A549 quimiorresistentes. BRM270 es un extracto formulado a partir de 7 plantas medicinales utilizadas en la medicina asiática: *Saururus chinensis*, *Citrus unshiu* Markovich, *Aloe vera*, *Arnebia euchroma*, *Portulaca oleracea*, *Prunella vulgaris* var. *lilacina* y *Scutellaria baccalensis* (Chandimali et al., 2020) y se identificó en *Saururus chinensis* la presencia de ácido elálgico en esta planta (Li et al., 1999).

Anteriormente se informó que el miR-128 estaba regulado negativamente en tejido tumoral de pulmón (Hu et al., 2014), pero BRM270 induce la expresión significativa de este en células A549, por lo que BRM270 puede suprimir la proliferación mediante la modulación de la vía de señalización VEGF/PI3K/AKT a través de miR-128 (Kwon et al., 2018).

En contrapuesta, se identificaron *in silico* los objetivos conservados de miR-128, incluido Bax con una tasa de predicción del 94%. Luego se realizó la cuantificación de proteína Bax en células JHU-22 (células de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello) transfectadas con miR-128 en comparación con células de control vector y se obtuvo una disminución del 70% en los niveles de Bax (Hauser et al., 2015). Así como Ji y colaboradores en 2013 muestran una regulación positiva de miR-128 en cáncer de mama, siendo las muestras de cáncer de mama

quimiorresistentes los que tienen niveles de expresión de miR-128 elevados y señalaron a Bax como objetivo del miR-128 y aclararon que la sobreexpresión de miR-128 en células MDA-MB-231 disminuyó la quimiosensibilidad luego de una marcada regulación negativa de Bax tanto a nivel de mRNA como de proteína, por lo que el papel de miR-128 en la resistencia a los medicamentos se debe a su represión de Bax.

Por lo que especulamos que, a pesar de que el tratamiento con ácido elágico muestra marcados efectos anticancerígenos al disminuir la población celular, regular negativamente la expresión de Ki67, inhibir a ciclina E1 y B1, así como disminuir la expresión de marcadores anti-apoptóticos; el tratamiento con ácido elágico podría posibilitar la expresión de miR-128, ejerciendo regulación negativa sobre Bax. Pero los mecanismos moleculares en los que interactúan todos estos factores aún no están del todo claros en células de cáncer de pulmón de células no pequeñas A549, por lo que se sugieren estudios posteriores sobre esta correlación y las posibles alteraciones que se pueden desencadenar sobre la apoptosis.

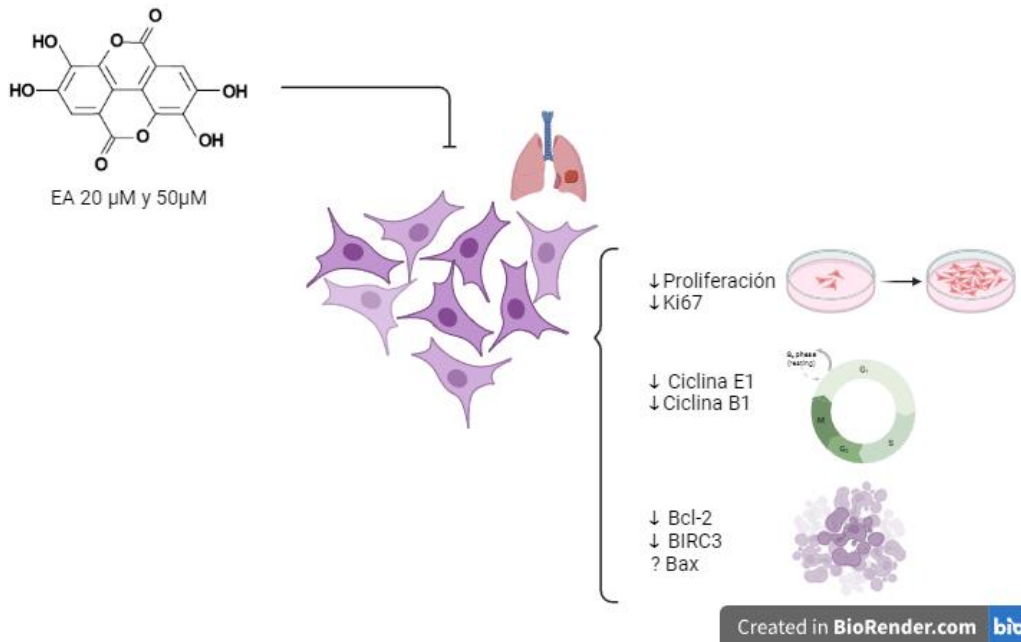
Los hallazgos de este estudio se alinean con investigaciones previas que destacan los efectos quimiopreventivos y terapéuticos del ácido elágico en diversos tipos de cáncer. Se ha demostrado que el ácido elágico exhibe propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiproliferativas, lo que lo convierte en un candidato prometedor para el tratamiento del cáncer. Los mecanismos subyacentes a los efectos del ácido elágico en la proliferación celular y la apoptosis implican la modulación de vías de señalización clave involucradas en el control del ciclo celular y la regulación de la apoptosis.

Sin embargo, es importante reconocer las limitaciones de este estudio. La investigación se realizó *in vitro* utilizando una línea celular específica, y se necesitan más estudios, incluidos experimentos *in vivo* y ensayos clínicos, para validar los hallazgos y determinar el potencial del ácido elágico como agente terapéutico para el cáncer de pulmón. Además, los mecanismos moleculares específicos mediante los cuales el ácido elágico ejerce sus efectos en la proliferación celular, la regulación del ciclo celular y la apoptosis requieren más investigación.



## 12 CONCLUSIONES

- El ácido elágico disminuye la población celular de una forma dependiente de la dosis en células de cáncer de pulmón A549.
- Existe una correlación proporcional entre la disminución de la población celular de la línea A549 tratada con ácido elágico y la disminución en el nivel de expresión de mRNA que codifica para Ki67.
- Hay una regulación negativa en el nivel de expresión de mRNA de ciclinas E1 y B1 en células de cáncer de pulmón A549 tratadas con ácido elágico.
- El ácido elágico disminuye la expresión de factores anti-apoptóticos en las células de cáncer de pulmón A549 tratadas con ácido elágico a nivel de mRNA.
- El ácido elágico genera un efecto sobre los niveles de expresión de mRNA que codifica para Bax a más altas concentraciones en células de cáncer de pulmón A549.



**Figura 27. Efecto que ejerce el tratamiento de ácido elágico sobre la línea celular de cáncer de pulmón A549 en la proliferación, el control del ciclo celular y la apoptosis.** Figura realizada con BioRender.

## 13 BIBLIOGRAFÍA

1. Bhadra, K. (2022). A Mini Review on Molecules Inducing Caspase-Independent Cell Death: A New Route to Cancer Therapy. *Molecules*, 27(19), 6401.
2. Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 17(7), 395-417.
3. Chen, H. S., Bai, M. H., Zhang, T., Li, G. D., & Liu, M. (2015). Ellagic acid induces cell cycle arrest and apoptosis through TGF- $\beta$ /Smad3 signaling pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *International journal of oncology*, 46(4), 1730-1738.
4. Chu, C., Geng, Y., Zhou, Y., & Sicinski, P. (2021). Cyclin E in normal physiology and disease states. *Trends in cell biology*, 31(9), 732-746.
5. Cossu, F., Milani, M., Mastrangelo, E., & Lecis, D. (2019). Targeting the BIR domains of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins in cancer treatment. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 142-150.
6. Derosa, G., Maffioli, P., & Sahebkar, A. (2016). Ellagic acid and its role in chronic diseases. *Anti-Inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases*, 473-479.
7. Duan, J., Zhan, J. C., Wang, G. Z., Zhao, X. C., Huang, W. D., & Zhou, G. B. (2019). The red wine component ellagic acid induces autophagy and exhibits anti-lung cancer activity in vitro and in vivo. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(1), 143-154.
8. Duma, N., Santana-Davila, R., & Molina, J. R. (2019, August). Non-small cell lung cancer: epidemiology, screening, diagnosis, and treatment. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 94, No. 8, pp. 1623-1640). Elsevier.
9. Dutta, S., Mahalanobish, S., Saha, S., Ghosh, S., & Sil, P. C. (2019). Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer. *Food and Chemical Toxicology*, 128, 240-255.
10. Eskandari, E., Heidarian, E., Amini, S. A., & Saffari-Chaleshtori, J. (2016). Evaluating the effects of ellagic acid on pSTAT3, pAKT, and pERK1/2

- signaling pathways in prostate cancer PC3 cells. *Journal of cancer research and therapeutics*, 12(4), 1266-1271.
11. Farghadani, R., & Naidu, R. (2023). The anticancer mechanism of action of selected polyphenols in triple-negative breast cancer (TNBC). *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 165, 115170.
  12. Frazzi, R. (2021). BIRC3 and BIRC5: multi-faceted inhibitors in cancer. *Cell & bioscience*, 11(1), 1-14.
  13. Galano, A., Francisco Marquez, M., & Pérez-González, A. (2014). Ellagic acid: an unusually versatile protector against oxidative stress. *Chemical research in toxicology*, 27(5), 904-918.
  14. Gridelli, C., Rossi, A., Carbone, D. P., Guarize, J., Karachaliou, N., Mok, T., ... & Rosell, R. (2015). Non-small-cell lung cancer. *Nature reviews Disease primers*, 1(1), 1-16.
  15. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31-46.
  16. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
  17. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
  18. Herbst, R. S., Morgensztern, D., & Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, 553(7689), 446-454
  19. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2023). Estadísticas “A Propósito Del Día Mundial Contra El Cáncer (4 de febrero).
  20. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2023). Estadísticas de Defunciones Registradas (EDR).
  21. International Agency for Research on Cancer. Cancer Today. Global Cancer Observatory 2020. IARC, WHO, 2020.
  22. International Agency for Research on Cancer. Cancer Today. México. Global Cancer Observatory 2020. IARC, WHO, 2020.
  23. Jeong, H., Phan, A. N., & Choi, J. W. (2017). Anti-cancer effects of polyphenolic compounds in epidermal growth factor receptor tyrosine kinase

- inhibitor-resistant non-small cell lung cancer. *Pharmacognosy Magazine*, 13(52), 595.
24. Kale, J., Osterlund, E. J., & Andrews, D. W. (2018). BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death & Differentiation*, 25(1), 65-80.
25. Li, L. T., Jiang, G., Chen, Q., & Zheng, J. N. (2015). Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer. *Molecular medicine reports*, 11(3), 1566-1572.
26. Liang, J., Zhao, W., Tong, P., Li, P., Zhao, Y., Li, H., & Liang, J. (2020). Comprehensive molecular characterization of inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) for therapeutic targeting in cancer. *BMC Medical Genomics*, 13(1), 1-13.
27. Liu, J., Peng, Y., & Wei, W. (2022). Cell cycle on the crossroad of tumorigenesis and cancer therapy. *Trends in cell biology*, 32(1), 30-44.
28. Liu, K., Zheng, M., Lu, R., Du, J., Zhao, Q., Li, Z., ... & Zhang, S. (2020). The role of CDC25C in cell cycle regulation and clinical cancer therapy: A systematic review. *Cancer Cell International*, 20(1), 1-16.
29. Lu, G., Wang, X., Cheng, M., Wang, S., & Ma, K. (2023). The multifaceted mechanisms of ellagic acid in the treatment of tumors: State-of-the-art. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 165, 115132.
30. Martínez-Alonso, D., & Malumbres, M. (2020). Mammalian cell cycle cyclins. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 107, pp. 28-35). Academic Press.
31. Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 74-88.
32. Menon, S. S., Guruvayoorappan, C., Sakthivel, K. M., & Rasmi, R. R. (2019). Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clinica chimica acta*, 491, 39-45.
33. Mohammed Saleem, Y. I., & Selim, M. I. (2020). MDM2 as a target for ellagic acid-mediated suppression of prostate cancer cells in vitro. *Oncology Reports*, 44(3), 1255-1265.

34. Morana, O., Wood, W., & Gregory, C. D. (2022). The apoptosis paradox in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1328.
35. Mushtaq, A. U., Ádén, J., Ali, K., & Gröbner, G. (2022). Domain-specific insight into the recognition of BH3-death motifs by the pro-survival Bcl-2 protein. *Biophysical Journal*, 121(23), 4517-4525.
36. Ni, X., Shang, F. S., Wang, T. F., Wu, D. J., Chen, D. G., & Zhuang, B. (2023). Ellagic acid induces apoptosis and autophagy in colon cancer through the AMPK/mTOR pathway. *Tissue and Cell*, 81, 102032.
37. Organización Mundial de la Salud. (2023). Cáncer. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
38. Quandt, E., Ribeiro, M. P., & Clotet, J. (2020). Atypical cyclins: the extended family portrait. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(2), 231-242.
39. Sainz de Aja, J., Dost, A. F. M., & Kim, C. F. (2021). Alveolar progenitor cells and the origin of lung cancer. *Journal of internal medicine*, 289(5), 629-635.
40. Schabath, M. B., & Cote, M. L. (2019). Cancer progress and priorities: lung cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 28(10), 1563-1579.
41. Senichkin, V. V., Pervushin, N. V., Zuev, A. P., Zhivotovsky, B., & Kopeina, G. S. (2020). Targeting Bcl-2 family proteins: what, where, when?. *Biochemistry (Moscow)*, 85, 1210-1226.
42. Sharifi-Rad, J., Quispe, C., Castillo, C. M. S., Caroca, R., Lazo-Vélez, M. A., Antonyak, H., ... & Cho, W. C. (2022). Ellagic acid: A review on its natural sources, chemical stability, and therapeutic potential. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2022.
43. Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(3), 175-193.
44. Sofi, S., Mehraj, U., Qayoom, H., Aisha, S., Asdaq, S. M. B., Almilaibary, A., & Mir, M. A. (2022). Cyclin-dependent kinases in breast cancer: expression pattern and therapeutic implications. *Medical Oncology*, 39(6), 106.

45. Srinivasan, P., Vadhanam, M. V., Arif, J. M., & Gupta, R. C. (2002). A rapid screening assay for antioxidant potential of natural and synthetic agents in vitro. *International journal of oncology*, 20(5), 983-986.
46. Sun, X., & Kaufman, P. D. (2018). Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127, 175-186.
47. Vanella, L., Di Giacomo, C., Acquaviva, R., Barbagallo, I., Cardile, V., Kim, D. H., ... & Sorrenti, V. (2013). Apoptotic markers in a prostate cancer cell line: Effect of ellagic acid. *Oncology Reports*, 30(6), 2804-2810.
48. Wang, D., Chen, Q., Liu, B., Li, Y., Tan, Y., & Yang, B. (2016). Ellagic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in human glioblastoma cells. *Acta Cirurgica Brasileira*, 31, 143-149.
49. Wang, D., Chen, Q., Tan, Y., Liu, B., & Liu, C. (2017). Ellagic acid inhibits human glioblastoma growth in vitro and in vivo. *Oncology Reports*, 37(2), 1084-1092.
50. Wang, N., Wang, Q., Tang, H., Zhang, F., Zheng, Y., Wang, S., ... & Xie, X. (2017). Direct inhibition of ACTN4 by ellagic acid limits breast cancer metastasis via regulation of  $\beta$ -catenin stabilization in cancer stem cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 36(1), 1-19.
51. Wang, N., Wang, Z. Y., Mo, S. L., Loo, T. Y., Wang, D. M., Luo, H. B., ... & Chen, J. P. (2012). Ellagic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenesis effects via VEGFR-2 signaling pathway in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 134, 943-955.
52. Wang, Y., Ren, F., Li, B., Song, Z., Chen, P., & Ouyang, L. (2019). Ellagic acid exerts antitumor effects via the PI3K signaling pathway in endometrial cancer. *Journal of Cancer*, 10(15), 3303.
53. Wei, Z., Chen, J., Zuo, F., Guo, J., Sun, X., Liu, D., & Liu, C. (2022). Traditional Chinese Medicine has great potential as candidate drugs for lung cancer: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 115748.
54. Xu, X., Lai, Y., & Hua, Z. C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience reports*, 39(1), BSR20180992.

55. Yakobov, S., Dhingra, R., Margulets, V., Dhingra, A., Crandall, M., & Kirshenbaum, L. A. (2023). Ellagic acid inhibits mitochondrial fission protein Drp-1 and cell proliferation in cancer. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1-12.
56. Yousef, A. I., El-Masry, O. S., & Yassin, E. H. (2016). The anti-oncogenic influence of ellagic acid on colon cancer cells in leptin-enriched microenvironment. *Tumor Biology*, 37, 13345-13353.
57. Yousuf, M., Shamsi, A., Khan, P., Shahbaaz, M., AlAjmi, M. F., Hussain, A., ... & Hassan, M. I. (2020). Ellagic acid controls cell proliferation and induces apoptosis in breast cancer cells via inhibition of cyclin-dependent kinase 6. *International journal of molecular sciences*, 21(10), 3526.