

**Evaluación del efecto citotóxico y sobre el ciclo celular de extractos de *Lycium barbarum* y *Lycopersicum esculentum* en queratinocitos orales tumorales.**

**Alejandra Torres Bohórquez  
Patricia Vargas Uribe**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE  
PROGRAMA DE ODONTOLOGÍA- FACULTAD ODONTOLOGÍA  
BOGOTÁ D.C. - DICIEMBRE DE 2019**

## HOJA DE IDENTIFICACION

<b>Universidad</b>	El Bosque
<b>Facultad</b>	Odontología
<b>Programa</b>	Odontología
<b>Título:</b>	Evaluación del efecto citotóxico y sobre el ciclo celular de extractos de <i>Lycium barbarum</i> y <i>Lycopersicum esculentum</i> en queratinocitos orales tumorales.
<b>Grupo de investigación</b>	Grupo de Inmunología Celular y Molecular- INMUBO
<b>Institución participante:</b>	Facultad de Odontología - Universidad El Bosque
<b>Tipo de investigación:</b>	Pregrado/Grupo
<b>Estudiantes:</b>	Alejandra Torres Bohórquez Patricia Vargas Uribe
<b>Director(a)</b>	Dr. Andrés Felipe Cardona Mendoza
<b>Codirector(a)</b>	Dra. Sandra Janneth Perdomo Lara
<b>Asesor estadístico</b>	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil

## **DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE**

<b>HERNANDO MATIZ CAMACHO</b>	Presidente del claustro
<b>JUAN CARLOS LÓPEZ TRUJILLO</b>	Presidente consejo directivo
<b>MARIA CLARA RANGEL G.</b>	Rector (a)
<b>RITA CECILIA PLATA DE SILVA</b>	Vicerrector (a) Académico
<b>FRANCISCO FALLA</b>	Vicerrector Administrativo
<b>MIGUEL OTERO CADENA</b>	Vicerrectoría de Investigación
<b>LUIS ARTURO RODRIGUEZ</b>	Secretario General
<b>JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS</b>	División Postgrado
<b>MARIA ROSA BUENAHORA</b>	Decana Facultad de Odontología
<b>MARTHA LILIANA GOMEZ RANGEL</b>	Secretaría Académica
<b>DIANA ESCOBAR</b>	Directora Área Bioclínica
<b>MARIA CLARA GONZALEZ</b>	Director Área Comunitaria
<b>FRANCISCO PEREIRA</b>	Coordinador Área Psicosocial
<b>INGRID ISABEL MORA DIAZ</b>	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
<b>IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVEZ</b>	Coordinador Postgrado Facultad de Odontología

**“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.**

## GUÍA DE CONTENIDO

	Pág
<b>Resumen</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Marco teórico</b>	<b>3</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Objetivo general</b>	<b>12</b>
<b>3.2 Objetivos generales</b>	<b>12</b>
<b>4. Metodología del proyecto</b>	<b>13</b>
<b>4.1 Tipo de estudio</b>	<b>13</b>
<b>4.2 Muestra</b>	<b>13</b>
<b>5. Materiales y métodos</b>	<b>14</b>
<b>6. Resultados</b>	<b>16</b>
<b>7. Discusión y conclusión</b>	<b>22</b>
<b>8. Propiedad intelectual</b>	<b>26</b>
<b>9. Referencias bibliográficas</b>	<b>28</b>

## RESUMEN

### **Evaluación del efecto citotóxico y sobre el ciclo celular de extractos de *Lycium barbarum* y *Lycopersicum esculentum* en queratinocitos orales tumorales**

**Antecedentes:** El cáncer oral (CO) es una neoplasia maligna que se desarrolla por la sobreexpresión de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores catalogado como el séptimo tipo de cáncer con 630.000 casos diagnosticados anualmente a nivel mundial. Dentro de los tipos de cáncer que se desarrollan en la cavidad oral el 90% es el carcinoma de células escamosas, catalogado a nivel mundial como el octavo cáncer más frecuente en los hombres. Dentro de los principales factores de riesgo para el desarrollo de CO se encuentra el cigarrillo, alcohol y la infección por el virus del papiloma humano (VPH). Los productos naturales derivados de plantas han mostrado ser una potencial alternativa para el tratamiento contra el cáncer como por ejemplo los extractos de *Lycopersicum esculentum* que se evidenció que tiene efectos antitumorales en el cáncer de próstata, cáncer de seno y cáncer endometrial, así como el extracto de *Lycium barbarum* que ha mostrado actividad anticarcinogénica en cáncer de seno, cáncer cervical, colono-rectal, gástrico, hígado y de próstata. **Objetivo:** Evaluar el efecto citotóxico y sobre el ciclo celular de los extractos de *Lycium barbarum* y *Lycopersicum esculentum* en queratinocitos orales tumorales. **Materiales y métodos:** Se utilizó la línea SCC090 de queratinocitos orales tumorales y se sembraron 5000 células/pozo en placas de 96 pozos estimuladas con los extractos etanólicos de *Lycopersicum esculentum* y *Lycium barbarum* durante 48 horas con el fin de evaluar concentración citotóxica (CC50). Seguidamente se evaluó ciclo celular en concentraciones subletales de 1, 10 y 100 ug/ml durante 24 horas comparadas con un grupo control de células sin estímulo y se extrajo el ARN con el fin de evaluar expresión génica de p53. **Resultados:** El extracto natural *L. barbarum* demostró tener una concentración citotóxica 50 (CC50) menor y a altas concentraciones, sin embargo demostró en experimentos de ciclo celular a concentración de 1 y 100 ug/ml un arresto de células SCC090 entre un 60-70% en fase G0/G1 respecto al control (40%) respectivamente, mientras que a 10 ug/ml mostró un acúmulo de estas células en un 58% en fase S del ciclo celular respecto al control (25%). Así mismo, *L. barbarum* obtuvo un aumento de expresión del gen supresor de tumores p53 a concentración de 10 ug/ml lo cual es un importante potencial en la detención del ciclo celular. Por otro lado, *L. esculentum* no disminuyó la viabilidad de las células SCC090; sin embargo en el experimento con ciclo celular demostró un arresto celular del 60% en fase G0/G1 a concentración de 100 ug/ml respecto al control (40%). Para el experimento de expresión del gen supresor p53 obtuvo mayor expresión de este a concentraciones de 1 y 10 ug/ml punto importante para la detención del ciclo celular. **Conclusión:** En los extractos de *L. barbarum* y *L. esculentum* se encontró resultados favorables en la detención del ciclo celular y relación con P53. Posiblemente este proceso de detención en el ciclo celular se obtiene encaminado por medio de la vía de P53; esto nos lleva a plantear que es importante seguir ampliando conocimientos en los extractos de *L. barbarum* y *L. esculentum* para encontrar nuevas aplicaciones.

**Palabras clave:** Cáncer oral, cáncer de faringe, labio, lengua, cáncer de cabeza y cuello, virus del papiloma humano, extracto natural, *Lycopersicum esculentum*, *Lycium barbarum*, BCL, E2F, ciclo celular.

**Evaluation of the Cytotoxic Effect and Cellular Cycle of *Lycium barbarum* and *Lycopersicum esculentum* on Oral Tumour Keratinocytes.**

**Background:** Oral cancer (OC) is a malign neoplasia which develops due to the overexpression of oncogenes and inactivity of tumour suppressor genes catalogued as the seventh type of cancer with 630 000 diagnosed cases worldwide annually. Squamous cells carcinoma represents 90% of the cancers developed in the mouth and the eight most common among males. The main risk factors include cigarettes, alcohol and the human papillomavirus (HPV). Plant-derived products have proven to be a potential treatment alternative, such as extracts from *Lycopersicum esculentum* with prostate anti-tumour effects and *Lycium barbarum* with effects on breast, cervical, colon-rectal, gastric, liver and prostate cancers. Objective: to evaluate the cytotoxic effect and cellular cycle of *Lycium barbarum* and *Lycopersicum esculentum* on oral tumour keratinocytes. **Materials and methods:** The SCC090 line of oral tumour keratinocytes was selected, 500 cells were planted on plates of 96 cultures and stimulated with ethanolic *Lycopersicum esculentum* and *Lycium barbarum* for 48 hours in order to evaluate the cytotoxic concentration (CC50). The cellular cycle was evaluated in sub-lethal concentrations of 1, 10 and 100 ug/ml, compared during 24 hours with a control group of unstimulated cells and the RNA was extracted so the genetic expression of p53 could be evaluated. **Results:** The extract of *L. barbarum* showed a cytotoxic concentration of 50 (CC50) less and at high concentrations; however, it presented in cellular cycle experiments in concentrations of 1 and 100 ug/ml an arrest of SCC090 cells between 60% and 70% in the G0/G1 phase with respect to the control (40%) respectively. The 10 ug/ml showed a 58% accumulation of these cells in the S phase of the cycle with respect to the control (25%). *L. barbarum* had an expression increment of the p53 gene suppressor at a 10 ug/ml concentration which is an important potential for cellular cycle detection. *L. esculentum* did not decrease SCC090 viability; it did show a 60% cellular arrest in the cycle experiment during the G0/G1 phase with a 100 ug/ml concentration with respect to the control (40%). Additionally, it had higher expression in the p53 suppressor gene experiment in concentrations of 1 and 10 ug/ml which is important for said cycle detection. **Conclusions:** Extracts of *L. barbarum* and *L. esculentum* presented favourable results for the detection of cellular cycle and relation to p53. This process might be obtained by means of the p53 and suggests further knowledge of these extracts for new applications.

**Key words:** oral cancer, pharynx cancer, lip, tongue, head and neck cancer, human papillomavirus, natural extract, *Lycopersicum esculentum*, *Lycium barbarum*, BCL, E2F, cellular cycle.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de cabeza y cuello (CCC) es un grupo de tumores malignos muy invasivos que destruye rápidamente los órganos y tejidos del individuo que lo presenta. El carcinoma escamocelular es el tipo histológico más frecuente que genera alto impacto por su alta agresividad siendo el más prevalente es el carcinoma escamocelular oral. (Galbiatti *et al.*, 2013).

El cáncer oral (CO) es el sexto tipo de cáncer a nivel mundial, se manifiesta con lesiones precancerosas tipo leucoplasia y/o eritroplasia principalmente en la base de la lengua que van progresando hasta desarrollar cáncer debido a la exposición a factores de riesgo; consumo tanto de cigarrillo como de alcohol y la infección persistente por el VPH (virus de papiloma humano) con genotipos de alto riesgo (VPH-16 y VPH-18) (Galbiatti *et al.* 2013, Lafaurie G *et al.* 2018).

Los efectos adversos que causan los tratamientos actuales para el CO como la radioterapia, quimioterapia y la cirugía no contribuyen a la calidad de vida de los pacientes, debido a que producen dificultad del habla, deglución, sepsis, pérdida total de la estructura anatómica donde se ubica la lesión, pérdida de la percepción nerviosa, disfuncionalidad muscular, problemas renales y de fertilidad que conllevan a padecer problemas psicológicos y emocionales (De la torre F *et al.*, 2016).

A raíz de esto, se ha reflejado una gran necesidad de plantear nuevas estrategias o alternativas que puedan llegar a reducir parcial o totalmente los efectos secundarios que causan los tratamientos actuales contra este tipo de cáncer. Es por ello que se ha ido estudiando e implementando la medicina alternativa con extractos naturales, los cuales han demostrado tener acción contra varias líneas celulares tumorales. Dentro de los extractos naturales que han sido estudiados se encuentran *Lycopersicum esculentum* conocido como el tomate, específicamente el licopeno (pigmento rojo que posee la zanahoria roja, la papaya, la sandía y el propio tomate) posee efectos antioxidantes y quimiopreventivos contra el cáncer de próstata, cáncer de seno y cáncer endometrial, inhibiendo la proliferación de las células precursoras de estos tipos de cáncer (Wang *et al.*, 2012). De igual manera, *Lycium barbarum* ha registrado ser un antioxidante,



antienvejecimiento y, por su alto contenido de polisacáridos tiene efecto anticarcinogénico para cáncer de seno inhibiendo la proliferación de células de manera dependiente de tiempo y dosis, aumentando la apoptosis (Wawruszak *et al.*; 2015); cáncer cervical, cáncer gástrico, cáncer de colon, hígado y próstata (Cheng *et al.*,2014). Sin embargo, el efecto de *Lycium barbarum* y *Lycopersicum esculentum* no se ha evaluado en células de carcinoma escamocelular oral, por ello, en este trabajo se planteó la pregunta de investigación ¿Cuál es el efecto citotóxico y sobre el ciclo celular de *Lycopersicum esculentum* y *Lycium barbarum* en células de tumores escamocelulares orales? Por tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la citotoxicidad, ciclo celular y expresión génica de p53 en células SCC090 tratados con *Lycium Barbarum* Y *Lycopersicum esculentum* con el fin de buscar y aportar nuevas y posibles alternativas para la terapia contra el cáncer en un futuro y que de esta manera se pueda brindar una mejor calidad y estilo de vida a las personas que desafortunadamente presentan este tipo de patología.

## 2. MARCO TEÓRICO

### **Cáncer oral: Epidemiología y aspectos generales:**

La prevalencia del CO y de faringe se ha reportado con un 3.8% a nivel mundial de los casos de cáncer más común, el 3.6% de los pacientes mueren por esta patología (Ferlay *et al.*, 2015). Éste cáncer puede presentar diversidad de etiologías dependiendo la ubicación geográfica en el que se encuentre el individuo; en los países desarrollados se atribuye el 75% de cáncer oral al tabaco y alcohol, mientras que en los países en vía de desarrollos se atribuye al uso de pipas para fumar tabaco, consumir alimentos que contengan nitrosamina en gran cantidad, además de la infección por el VPH genotipos de alto riesgo VPH 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 56, 58, 59, 68, 73 y 82, de los cuales el VPH 16 y 18 están más asociados al desarrollo de cáncer oral y orofaríngeo (Lafaurie Gl *et al.*, 2018).

A nivel mundial, el (COCE) es el octavo cáncer más frecuente en hombres, siendo esto de gran diferencia con las mujeres, ya que no se presenta con facilidad y no ha sido clasificado entre los cánceres más frecuentes de relación sexual; la tasa de incidencia y mortalidad ha presentado variaciones dependiendo de las poblaciones en que se encuentran, siendo frecuente en los países subdesarrollados como India, Taiwán, Pakistán y Hungría. Según un reporte de GLOBOCAN 2008 se presentaron en total 263.900 casos nuevos de los cuales se produjo la muerte en 128.000; al analizar estos datos se observa el aumento en las tasas de incidencia y mortalidad en los últimos años. Se ha realizado estudios entre los posibles factores de riesgo que dan inicio a la asociación a cáncer oral y el virus del papiloma humano (VPH) entre ellos encontramos el tabaco catalogado como la principal causa de diferentes tipos de cáncer donde se incluye la cavidad oral, según la cifras el 43% de los cánceres son causados por el tabaco; encontramos el alcohol que ha sido de gran debate entre los efecto carcinogénicos teniendo como característica ser más susceptibles a presentar OSCC los consumidores que los no consumidores, además del aumento de malignidad en cavidad oral cuando se mezcla con tabaco (Malik *et al.*, 2016).

El carcinoma de las células escamosas de cabeza y cuello es un tipo de cáncer agresivo catalogado como la séptima enfermedad maligna donde se diagnostican aproximadamente 630.000 personas anualmente a nivel mundial, y se estima que el número de casos en los países en desarrollo irá en aumento (Perdomo *et al.*, 2018, Cárcamo *et al.*, 2018). Este carcinoma se dice que es de etiología multifactorial ya que deriva de factores genéticos y ambientales y consumo de cigarrillo y alcohol (Galbiatti *et al.*, 2013). Se presenta en la mayoría de los casos en orofaringe, laringe y cavidad oral (lengua) en pacientes masculinos en mayor porcentaje respecto a las mujeres y con una incidencia que aumenta hacia la mediana edad (50-60 años) (Cárcamo *et al.*, 2018). Desafortunadamente, este tipo de cáncer es diagnosticado cuando se encuentra en estadio III o IV, y la esperanza de vida es de 5 años aún así hayan recibido tratamiento de cirugía, quimioterapia y/o radioterapia. (Galbiatti *et al.*, 2013)

En cavidad oral, esta neoplasia maligna se manifiesta como una lesión tipo leucoplasia y/o eritroplasia que se promueve a cancerígena por sobreexpresión de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores como p53 y múltiples factores de riesgo como la higiene oral, acúmulo de placa bacteriana e irritación del revestimiento de la mucosa oral debido a que se altera la flora bacteriana normal. (Rivera *et al.*, 2015). Otro factor de riesgo es el VPH (virus de papiloma virus) de alto riesgo, específicamente VPH 16 y VPH 18 para el desarrollo de cáncer de orofaringe y cavidad oral (base de lengua) promovido por las proteínas E6 y E7 codificadas por estos virus, las cuales generan desregulación en el ciclo celular e inactivación de genes supresores de tumores. (Galbiatti *et al.*, 2013).

## **Interacción de la maquinaria del ciclo celular con el VPH:**

El ciclo celular es una serie de eventos moleculares de una célula en el proceso de duplicación, se compone de 5 fases: G0, G1, S, G2 y M. Este proceso inicia con la fase G0 que es el momento donde las células se encuentra en reposo, en la fase G1 las células son estimuladas por factores de crecimiento para así poder iniciar el ciclo celular, en este punto encontramos un punto de restricción (R) que realiza la reparación de ADN en caso de presentar daño si no lo hay el proceso sigue a la fase siguiente, en la fase S se prepara la célula para un periodo de síntesis de ADN, en el momento en que se duplican los cromosomas la célula entra en su segundo periodo de crecimiento que es la fase G2, después de esto la célula se prepara para entrar en proceso de división de dos células hijas llamado el periodo de mitosis o fase M, durante esta fase se divide en una serie de pasos que da inicio con la profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis que es la encargada de dividir las células en dos iguales (Lagunas *et al.*, 2014).

A su vez, encontramos dentro del ciclo celular unas fases denominadas gap las cuales ayudan a que se dé un mejor crecimiento celular. La fase G1 se encuentra entre la fase M y la fase S, y la fase G2 se encuentra entre las fase S y la fase M. Dentro del ciclo celular encontramos genes, proteínas y factores de transcripción que van a ayudar a controlar que este ciclo se dé de la manera correcta, los cuales son p53, Bcl-2, Bax y E2F. El gen P53 no sólo está encargado de dar control en el ciclo celular, sino que interviene en el ADN cuando se ha presentado células que dañan la integridad de este. p53 actúa en el paso de G1 a Fase S, donde se encarga de bloquear la progresión del ciclo celular cuando el ADN se ve afectado. La activación del gen supresor de tumor (P53) se da cuando el ADN de la célula envía una proteína sensorial donde inmediatamente se activa y detiene el ciclo celular en su fase G1, lo que hace que el ADN tenga el tiempo necesario para poder repararse. Si el daño es reparado, P53 permite la liberación de la célula y continuará el ciclo celular, de no ser así p53 induce apoptosis (López *et al.*, 2001). E2F se encarga de papeles distintos en la regulación de la transcripción y función de las células, se conocen por tener la capacidad para regular la progresión del ciclo celular mediante la coordinación de genes que se encuentran en la regulación del paso celular

en la fase G1 y S (Lagunas *et al.*, 2014), E2F se encuentra regulada por la proteína supresora de tumores retinoblastoma (Rb) que se encargan de convertirlo de un activador de transcripción a un represor de la transcripción, p53 también se ve involucrado en la regulación de E2F; cuando los genes de E2F se alteran se induce entrada del ADN a la fase S de una manera inadecuada y entran en apoptosis.( Johnson D *et al.*, 1998)

### **Virus de Papiloma Humano:**

El VPH (virus de papiloma humano) pertenece a la familia *papillomaviridae* y produce una de las infecciones más comunes de transmisión sexual en población joven (<25 años), principalmente por actividad sexual horizontal (vaginal) y sexo oral. Este virus afecta células epiteliales basales del epitelio escamoso estratificado en mucosa y piel, generando lesiones como verrugas y/o neoplasias invasivas. El VPH inicialmente es una infección transitoria, lo que quiere decir que el sistema inmune puede resolverlo en un 90% al cabo de 2 años. Sin embargo, la persistencia de este virus hace que se generen lesiones precancerosas o en el peor de los casos, cáncer de cuello uterino (Lafaurie G. *et al.*, 2018).

Hasta el día de hoy, se han descrito 100 tipos de VPH que tienen afinidad por el epitelio escamoso estratificado, mucosas, tracto ano-genital e infecciones en piel. Estos genotipos son clasificados en VPH de bajo riesgo y de alto riesgo, donde estos últimos son denominados oncogénicos porque están asociados al desarrollo de cáncer. Estos genotipos son: VPH 16, 18, 31, 33, 35,45, 51, 56, 58, 59, 68, 73 y 82; de los cuales el VPH 16 y 18, están asociados al desarrollo de cáncer cervical, neoplasias anogenitales y lesiones orofaríngeas (Lafaurie G. *et al.*, 2018).

Estos genotipos poseen un diámetro de 52-55 nm y un genoma de 8.000 pb el cual codifica entre 8-9 ORF (marco de lectura abierta) aproximadamente, y cada uno tendrá 3 partes funcionales: región temprana (E), región tardía (L) y región de control largo (LCR). La región temprana codifica 7 proteínas E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7 que son necesarias para los procesos de replicación, transcripción y transformación viral. E1 es encargada de replicar el ADN viral, E2 transcribe el genoma viral y lo replica, E4 promueve el ensamblaje y liberación del virus al citoesqueleto, E5 estimula la

proliferación celular e inhibe el proceso de apoptosis y, E6 y E7, inducen la síntesis de ADN, previenen la diferenciación celular, inhibe el complejo Rb/E2F del ciclo celular, e interactúan con supresores de tumores como p53 y Bax para inducir la degradación de estos. (Lafaurie G *et al.*, 2018)

Específicamente la oncoproteína E6 promueve la proliferación celular y así estimula la degradación de p53 a través de la ruta ubiquitina-proteasoma la cual ayuda al intercambio celular, regulación del ciclo celular y degradación de proteínas. Esta ruta consiste en que las moléculas de la ubiquitina van a unirse covalentemente a la proteína E3-ligasa a p53 donde se va a dar la transferencia de péptidos de ubiquitina E6AP a p53 y se induce la poliubiquitinación (señal de degradación) marcando a p53 y transportándolo al proteasoma 26s quien induce la degradación de p53 (Yim E *et al.*, 2005).

Por otra parte, la acción de la oncoproteína E7 consiste en inhibir el complejo Rb/E2F. En condiciones normales, el retinoblastoma (Rb) tiene como función regular el ciclo celular y reprimir la liberación y activación de E2F1 antes del tiempo estipulado durante el ciclo celular; es por ello que debe formarse el complejo Rb/E2F1. Este complejo lo que hace es retener a E2F1 hasta llegar al traspaso de fase G1 a fase S, donde es fundamental la acción y liberación de genes por parte de E2F1 para que se active el ciclo celular. Para que esta activación se dé, el retinoblastoma necesita fosforilarse para poder liberar a E2F1 y lo hace a través de la activación por parte de las cinasas dependientes de ciclina 2 (CDK2). Cuando el Rb se haya fosforilado, liberará a E2F1 para que este se trasloque al núcleo y se active la transcripción de ciclinas A y E que son reguladoras de la transición entre la fase G1 y la fase S y así se pueda continuar el ciclo celular normal (Yim E *et al.*, 2005). Por tanto, lo que va a hacer E7 sobre el complejo Rb/E2F es impedir su unión, ubicándose en un sector del retinoblastoma denominado “los dominios de bolsillo”, donde se encuentra la acción supresora tumoral e induce la degradación de retinoblastoma. De esta manera, E2F queda libre antes de tiempo y libera genes y se activa sin un control ( Yim E *et al.*, 2005).

## **Extractos Naturales como coadyuvantes al tratamiento de cáncer:**

Recientemente se ha implementado la medicina alternativa con el fin de disminuir efectos adversos o reducir un poco los tratamientos actuales que son tan tóxicos como la quimioterapia sobre el individuo que padece esta enfermedad. Dentro de las plantas utilizadas como posibles tratamientos del cáncer encontramos a *Ficus Religiosa*, árbol proveniente de la familia *Lauraceae*, la cual ha sido utilizada en múltiples trastornos, curación de heridas, anticonvulsivo, antidiabético, antiinflamatorio, ansiolítico e inhibidor de acetilcolinesterasa. A su vez, se ha encontrado que esta planta puede inducir la apoptosis en líneas celulares de cáncer de seno por su función antioxidante y citotóxica que posee la corteza de esta planta. Se cree que podría llegar a inhibir líneas celulares del cáncer de cuello uterino (HeLa y SiHa) ( Choudhari A *et al.*, 2013).

Dentro de la variedad de extractos naturales reportados en la literatura que han demostrado tener efectos antitumorales encontramos el té verde, el cual actúa como un quimiopreventivo por la evidencia obtenida a través de estudio in vitro - in vivo; dentro de los componentes del té verde se encuentran a los polifenoles y el galato de epigallocatequina que se encargan de inhibir la carcinogénesis. Estos estudios los han reportado en cáncer de cérvix, duodeno, esófago, glándulas mamarias, etc. Los componentes anteriormente mencionados han mostrado una inhibición de proliferación celular en VPH por medio del ciclo celular en las fases G0 Y G1. (Zou *et al.*, 2010). Estudios también reportan el extracto natural *Trametes versicolor*, el cual es una especie de hongo ha tenido variedad de usos en la medicina asiática. En distintas partes del mundo se ha utilizado este extracto en mujeres con cáncer de seno; se reporta que este hongo actúa mejorando la respuesta inmune innata y adaptativa. En varios reportes afirman que este hongo actúa como un coadyuvante de inmunoterapias, además aumenta los linfocitos postradioterapia. (Torkelson *et al.*, 2012). Dentro de la variedad de extractos naturales encontramos también al *Genus phellinus* demostrado en estudios que tiene efectos antitumorales, desempeñando un papel de prevención del cáncer induciendo a la apoptosis de las células cancerosas, reportado en vejiga y cáncer de mama. El Genus *Pleurotus* reportaron que tienen efecto anti proliferativo y pro apoptótico en células de cáncer de colon (Patel S *et al.*, 2012).

### ***Lycium barbarum***

Es un arbusto de aproximadamente 3 metros de altura perteneciente a la familia de solanáceos denominado *Goji* y/o *Wolfberry* en China, *Kuku* en Japón y *Gugija* en Corea (Potterat *et al* 2010, Gao *et al* 2017). Su origen no se conoce con exactitud pero se dice que proviene de la cuenca mediterránea y es distribuido y cultivado en el suroeste y centro de Asia, sur de China, Corea, Japón, Norteamérica y Australia (Potterat *et al.*, 2010, Gao *et al.*, 2017). *Lycium barbarum* ha sido utilizado por más de 2.000 años en la medicina tradicional tanto las hojas, la corteza y principalmente las bayas (sus frutos). Las bayas de *Lycium barbarum* tienen forma fusiforme de color naranja o rojo oscuro con la piel de apariencia encogida con una longitud aproximada entre 6-20mm y un diámetro entre 3-10mm. La pulpa de esta baya es carnosa y de sabor amargo-dulce que es consumida cruda, en jugo o se agrega al té y al vino. Esta baya es utilizada como consumo alimenticio entre 5-12 gr, tinturas, polvos y como planta medicinal en tratamiento como visión borrosa, dolor abdominal, infertilidad, tos seca, mareos, dolor de cabeza, antienvejecimiento y anticarcinogénico (Gao *et al.*, 2017). A su vez, se ha reportado que las bayas de *Lycium barbarum* tienen capacidad de fortalecer la actividad del hígado, los riñones y los pulmones mediante el equilibrio entre el “Yin” y el “Yang”(Cheng *et al.*,2014).

El componente principal y de gran estudio de *Lycium barbarum* son los polisacáridos, que corresponden entre el 5-8% de los frutos secos, compuestos por monosacáridos y 17 aminoácidos como ramnosa, galactosa, glucosa, arabinosa, manosa y xilosa siendo atractivos para los estudios de tratamientos antienvejecimiento, modulación inmune y efectos anticarcinogénicos (Gao *et al.*, 2017). Dentro de las actividades farmacológicas se encuentra que actúa sobre el envejecimiento contrarrestando la presencia de canas tempranas, actúa sobre la fatiga, la colitis, accidente cerebrovascular, diabetes, alzheimer y el cáncer (Cheng *et al.*,2014, Gao *et al.*, 2017).

En cáncer, *Lycium barbarum* ha mostrado actividad anticarcinogénica para cáncer de seno, cáncer cervical, colono-rectal, gástrico, hígado y próstata promoviendo la inducción de apoptosis y detención del ciclo celular (Cheng *et al.*,2015). En cáncer de seno, la acción de los polisacáridos de *Lycium barbarum* es la inhibición de la proliferación de la línea celular MCF-7 deteniendo el ciclo celular en la fase S (Li *et al* 2009, Shen *et al* 2012). En cáncer cervical, se investigó la actividad de los polisacáridos en células HeLa de cáncer cervical humano, donde encontraron que inhibe el



crecimiento de estas células en un 35% en 4 días de estudio donde el arresto celular HeLa ocurrió en un 46.9% -59-4% en fase S, 3.1% -5.0% en fase G1 acompañado de apoptosis celular (Zhu *et al.*, 2012). Para el cáncer colono-rectal, la acción de los polisacáridos de *Lycium barbarum* fue inhibición de la proliferación celular de la línea SW480 deteniendo el ciclo celular y reduciendo el número de células cancerígenas en las fases G0/G1 (Cheng *et al.*,2014). En cáncer gástrico, el efecto que genera los polisacáridos es inhibición de crecimiento de la línea celular MGC-803 y SGC-7901 deteniendo el ciclo celular y reduciendo el número de estas células en fase S, G0/G1 (Cheng *et al.*,2014).

### ***Lycopersicum esculentum***

*Lycopersicum esculentum* conocido como el tomate es una planta herbácea perteneciente a la familia *Solanaceae* que se puede encontrar en América, sur de Europa, medio Oriente, India, China, Japón y el sudeste asiático que se consume generalmente sin cocer (Eck J *et al.*, 2006). Recientemente ha habido un amplio interés por uno de sus componentes, el licopeno, el cual es un pigmento de la familia de los pigmentos vegetales llamados carotenoides los cuales son los encargados de dar el color amarillo o naranja a las calabazas y el color rojo a las zanahorias rojas, sandías, papayas, guayabas y el tomate (Story *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2012). El licopeno ha demostrado tener efectos antioxidantes y quimiopreventivos contra el cáncer de próstata, cáncer de seno, cáncer endometrial y cáncer de pulmón, inhibiendo la proliferación de las células precursoras de estos tipos de cáncer como por ejemplo en la fase G1 del ciclo celular (Wang *et al.*, 2012, Palozza *et al.*, 2011). A su vez, se ha registrado que el licopeno posee otros mecanismos como la regulación de la conexina 43 y la posterior mejora de comunicación intercelular tipo gap a través de los cuales puede reducir el riesgo de cáncer (Palozza *et al.*, 2010). El licopeno y el  $\beta$ -caroteno se ha reportado que por su actividad antioxidante contribuye a una acción moduladora y quimio preventiva como mecanismo de defensa pulmonar, y también actúa como inhibidor de la progresión de hiperplasia prostática benigna, un importante factor de riesgo para el posterior desarrollo de cáncer de próstata el cual ha registrado que en EE.UU llegaría a representar el 33% de casos nuevos de cáncer y el 9% de las muertes en para el año 2006 (Palozza *et al.*, 2010-2011, Adams *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha reportado que el consumo de tomate ocurre a

una velocidad entre 5 y 7 porciones semanalmente y podría asociarse a una reducción entre 30-40% de riesgo de presentar cáncer de próstata (Adams *et al.*, 2007).

En cáncer de seno, el licopeno ha demostrado actividad sobre la línea celular MCF-7 inhibiendo a principios de la fase G1 del ciclo celular y por ende retrasando la continuación del ciclo celular (Nahum *et al.*, 2001).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general:

Evaluar el efecto citotóxico y sobre el ciclo celular de los extractos de *Lycium barbarum* y *Lycopersicum esculentum* en queratinocitos orales tumorales.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto citotóxico de los extractos de *Lycium barbarum* y *Lycopersicum esculentum* en queratinocitos orales tumorales.
2. Evaluar el efecto sobre el ciclo celular de los extractos de *Lycium barbarum* y *Lycopersicum esculentum* en queratinocitos orales tumorales.
3. Evaluar la expresión génica de p53 en queratinocitos orales tumorales tratados con los extractos de *Lycium barbarum* y *Lycopersicum esculentum*.

## **4. METODOLOGÍA DEL PROYECTO**

**4.1 Tipo de estudio:** Experimental *in vitro*.

**4.2 Muestra:** Línea SCC090 de queratinocitos orales tumorales transformados por VPH-16.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Evaluación de citotoxicidad y cálculo de concentración letal 50**

El efecto citotóxico de los extractos naturales de *Lycopersicum esculentum* y *Lycium barbarum* se evaluó sobre la línea celular SCC-090 a través del método de resazurina con el fin de cuantificar la viabilidad celular después de recibido el tratamiento con los extractos naturales por 24 horas. Posterior al tratamiento, se retiraron los extractos haciendo un lavado con solución de PBS y se adicionaron 100  $\mu$ L de solución de resazurina a 0,44  $\mu$ M preparada en DMEM sin suplementar. Las placas se incubaron a 37°C durante 4 horas y la fluorescencia fue leída a 570 nm con filtro diferencial 630 nm en un lector de placas (TECAN). Los valores obtenidos de la fluorescencia fueron llevados a porcentajes de supervivencia y graficados en función de logaritmo de la concentración del tratamiento. Finalmente, las zonas con con tendencia lineal fueron seleccionadas en gráficas empleando el paquete estadístico GraphPad-Prims5® la CL<sub>50</sub> (concentración que causa muerte al 50% de la población celular)

### **Evaluación del contenido de ADN por citometría de flujo**

El ciclo celular se evaluó con 7AAD se determinó el porcentaje de células que se encuentre en cada una de las fases. El contenido de ADN y la proliferación celular fue evaluado por citometría de flujo en equipo BD Accuri C6, los datos fueron analizados utilizando el software FCS Express 5 Plus Research Multicycle. Se evaluó si el tratamiento con los extractos naturales de *Lycopersicum esculentum* y *Lycium barbarum* y Té verde producían cambios en el contenido de ADN durante las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular y se determinó el porcentaje de células que estaban en proliferación. Para ello, se usó el kit Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 (Invitrogen)

Aproximadamente 20.000 células fueron sembradas por triplicado en cajas de 24 pozos pre-incubadas por 24 horas para garantizar su adherencia. Pasado el tiempo de pre-incubación, el medio de cultivo fue retirado y las células fueron tratadas a diferentes concentraciones (0.1, 1 y 10  $\mu$ g/mL) de los extractos naturales durante un periodo de incubación de 24 y 48 horas. Pasado cada uno de los tiempos escogidos el tratamiento se retiró, se lavó las células durante 30 segundos con PBS, se adiciona medio DMEM

suplementado fresco, y fueron incubadas durante 24 horas para garantizar una recuperación celular y que de esta manera las células entrarían en ciclo con el objetivo de evaluar la fase exacta del ciclo post tratamiento. Pasadas las 48 horas de incubación, y directamente sobre las cajas con las células adheridas, se adicionó el componente “Edu” a una concentración de 10  $\mu$ M, seguidamente las células con el tratamiento fueron incubadas por dos horas a 37°C al 5 % de CO<sub>2</sub>, se lavaron con PBS y fueron tratadas con tripsina al 0.025% v/v-EDTA 0.03% v/v a 37°C por 5 minutos y lavadas con PBS/BSA al 1%. Las células fueron resuspendidas y centrifugadas a 1.800 rpm durante 5 minutos.

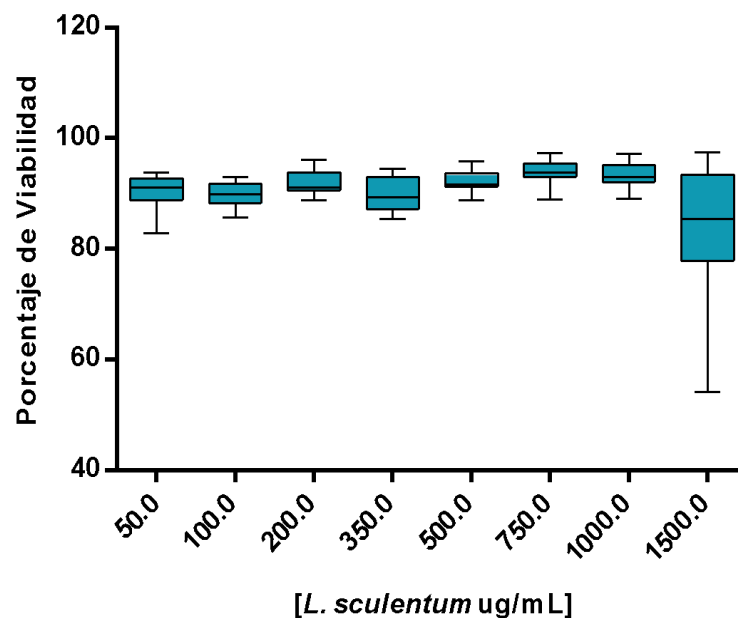
### **Expresión génica de P53 por PCR en tiempo real**

Se evaluó la expresión de p53 por PCR en tiempo real, se utilizó Sybr Green y el kit “RT Luna universal master mix” de NEB. Para llevar a cabo esto, se sembró 500.000 células en cajas de y los tratamientos con los extractos naturales de *Lycopersicum esculentum* y *Lycium barbarum* se realizaron a las concentraciones previamente establecidas. Cumplido el tiempo de cada tratamiento, se extrajo RNA utilizando el kit Zymo Research y, finalmente, los cambios en la expresión génica fueron calculados empleando el método de cuantificación relativa de doble delta de Ct ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) utilizando la fórmula de Pfaffl; la eficiencia de las reacciones se estimará utilizando el programa LinReg.

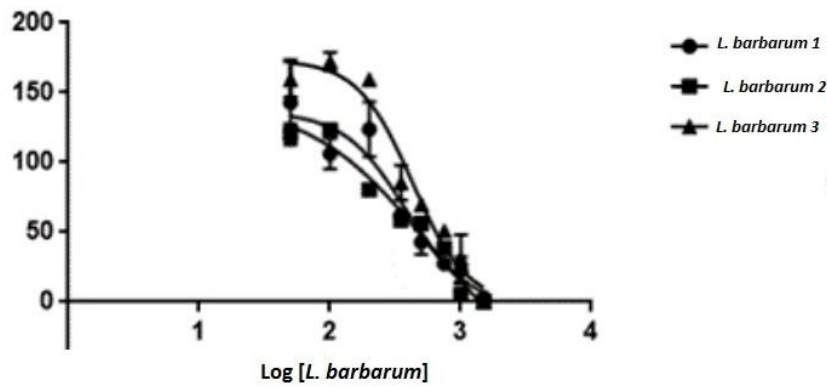
## 6. RESULTADOS

### Evaluación del efecto citotóxico de los extractos *Lycium barbarum* y *Lycopersicum esculentum* en la línea celular SCC 090.

Las células SCC090 fueron estimuladas con los extractos *L. barbarum* y *L. esculentum* en un rango de concentración de 50, 100, 200, 350, 500, 750, 1.000 y 1.500 ug/ml durante 48 horas para evaluar su citotoxicidad. El extracto de *Lycium barbarum* mostró una concentración citotóxica 50 (CC50) de 454,6 mientras que la CC50 del extracto de *Lycopersicum esculentum* no se pudo calcular debido a que fue muy alta. Esto nos indica que el extracto *L. barbarum* tiene efecto citotóxico pero altas concentraciones; sin embargo a pesar de que la disminución de la viabilidad celular dada por *L. barbarum* es mínimo, se decidió continuar con el desarrollo de los experimentos.



**Figura 1: Evaluación de concentración citotóxica 50 (CC50) de células SCC090 estimuladas con *L. esculentum* por 48 horas mediante el método de resazurina.** El extracto no disminuyó la viabilidad de las células SCC-090 a las diferentes concentraciones evaluadas. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes por duplicado.



Extracto en SCC090	Rango CI <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>	R square	coeficiente
<i>Lycium barbarum</i>	304 – 679	454,6	0,94	16,71

**Figura 2: Evaluación de concentración citotóxica 50 (CC50) de células SCC090 estimuladas con *L. barbarum* por 48 horas mediante el método de resazurina.** El extracto disminuyó la viabilidad de las células SCC-090 mostrando una CC50 de 454.6 µg/ml. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes por duplicado.

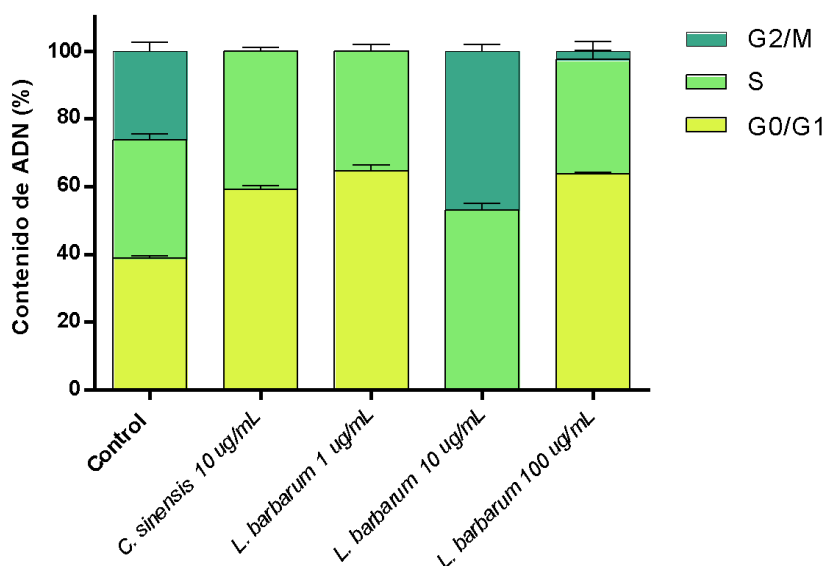
**Evaluación del ciclo celular de los extractos *Lycium barbarum* y *Lycopersicum esculentum* en la línea celular SCC090**

La alteración en el ciclo celular es la característica más importante de las células tumorales mostrando así una capacidad proliferativa aumentada. Por tanto, evaluamos el efecto de los extractos a 1, 10 y 100 µg/ml sobre el ciclo celular de las células SCC090 utilizando 7AAD y leído por citometría de flujo. Las SCC090 tratadas con *L. barbarum* a 1 µg/ml acumularon un 70% de las células en la fase G0/G1 respecto al control sin estímulo, siendo incluso mayor la acumulación mostrada respecto a las células tratadas con *C. sinensis* (58%). Por otra parte, las células tratadas con este mismo extracto a 10 µg/ml mostró una mayor acumulación de células SCC090 en la fase S del ciclo celular del 58% respecto a concentraciones de 1 y 100 µg/ml, células control y al estímulo con *C. sinensis* respectivamente. Por otra parte, la concentración de 100 µg/ml de *L. barbarum*



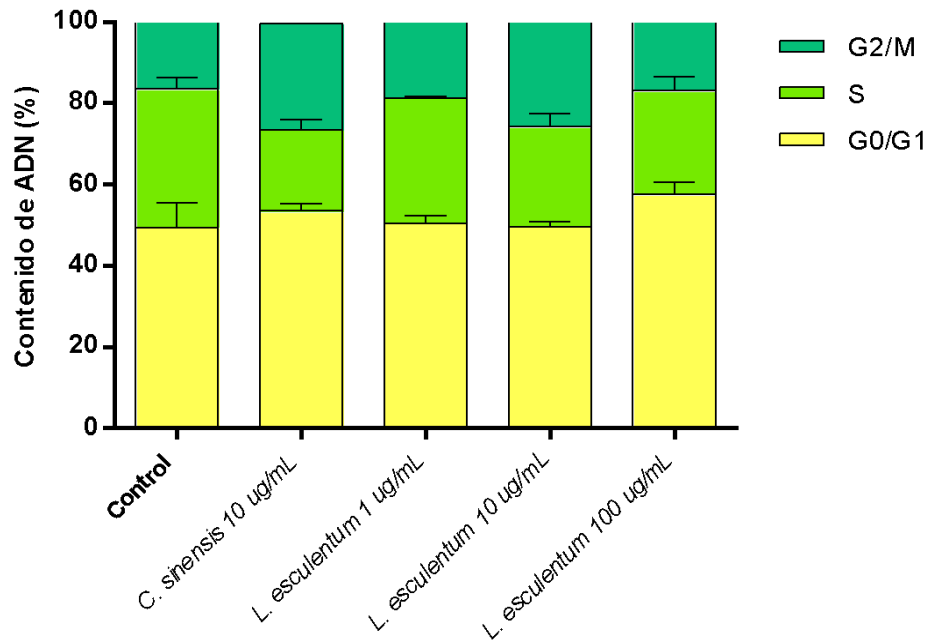
refleja un mayor acúmulo de células SCC090 en fase G0/G1 que corresponde al 60% respecto al control (40%). Sin embargo, al estímulo con *C. sinensis* no hay diferencias significativas, pues este extracto reporta un acúmulo de células del 58% en la fase G0/G1 respectivamente (Figura 3).

Las células SCC090 estimuladas con *L. esculentum* a concentración de 1ug/ml reflejaron mayor acúmulo de células en fase G0/G1 (48%), sin embargo no se observa acumulación comparativa respecto al control. La concentración 10 µg/ml reflejó mayor acúmulo de células (30%) en la fase G2/M respecto al control de células sin estímulo (18%). Por otro lado, la concentración a 100 ug/ml de *L. esculentum* reflejó mayor acumulación de celular en fase G0/G1 (60%) del ciclo celular respecto al control de células sin estímulo (48%). Se observa que el estímulo con *C. sinensis* se presenta mayor acúmulo celular en la fase G2/M (30%) respecto al control (18%) (Figura 4).



**Figura 3: Evaluación de ciclo celular en células SCC090 estimuladas con *L. barbarum* a concentración de 1, 10 y 100 ug/ml durante 24 horas comparadas con células sin estímulo y *C. sinensis* a concentración de 10 ug/ml en réplicas biológicas por triplicado analizadas por citometría de flujo. El extracto de *L. barbarum* a concentración de 1 ug/ml indujo mayor acumulación en la fase G0/G1 (70%) respecto al control de células sin estímulo (40%) y al estímulo con *C. sinensis* (58%). Las células estimuladas con este mismo extracto a 10 ug/ml mostró mayor**

acumulación de células en la fase S (58%) respecto a células control (15%) y al estímulo con *C. sinensis* (20%). Por otra parte, la concentración a 100 ug/ml de *L. barbarum* indujo un mayor acúmulo de células en fase G0/G1 (60%) respecto al control (40%), sin embargo, al estímulo con *C. sinensis* no hay diferencias significativas, pues este extracto reporta un acúmulo de células del 58% en la fase G0/G1 respectivamente.

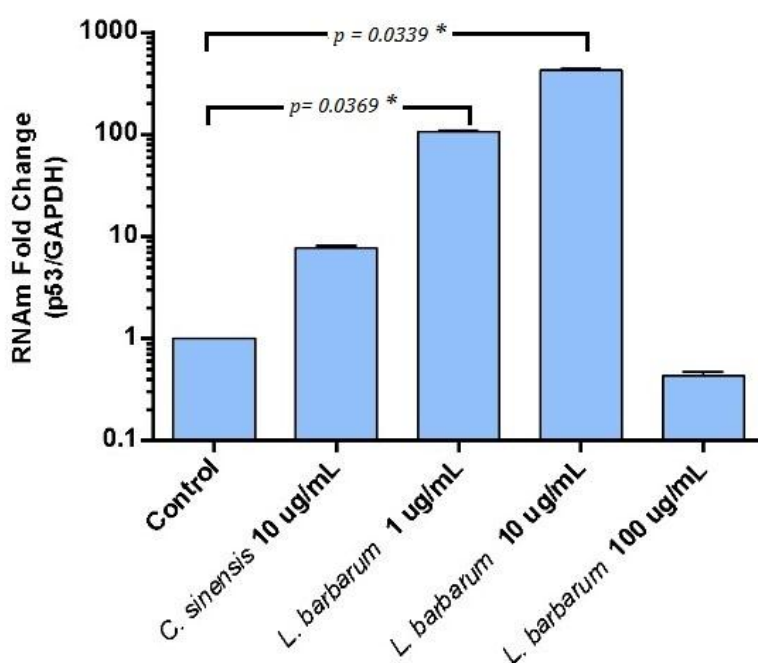


**Figura 4: Evaluación de ciclo celular en células SCC090 estimuladas con *L. esculentum* a concentración de 1, 10 y 100 ug/ml durante 24 horas comparadas con células sin estímulo y *C. sinensis* a concentración de 10 ug/ml en réplicas biológicas por triplicado analizadas por citometría de flujo.** El extracto de *L. esculentum* a 1ug/ml indujo mayor acumulación de células en fase G0/G1 (48%), sin embargo no hay diferencias significativas respecto al control de células sin estímulo (48%). Este mismo extracto a 10 ug/ml indujo mayor acúmulo de células en fase G2/M (30%) respecto al control (18%). Por otra parte, la concentración 100ug/ml presentó mayor acúmulo celular en fase G0/G1 (60%) respecto al control (48%). Se observa que el extracto *C. sinensis* a 10 ug/ml induce mayor acúmulo celular en fase G2/M (30%) respecto al control (18%) y el extracto *L. esculentum* en sus distintas concentraciones.

## Expresión génica de p53 por PCR en tiempo real

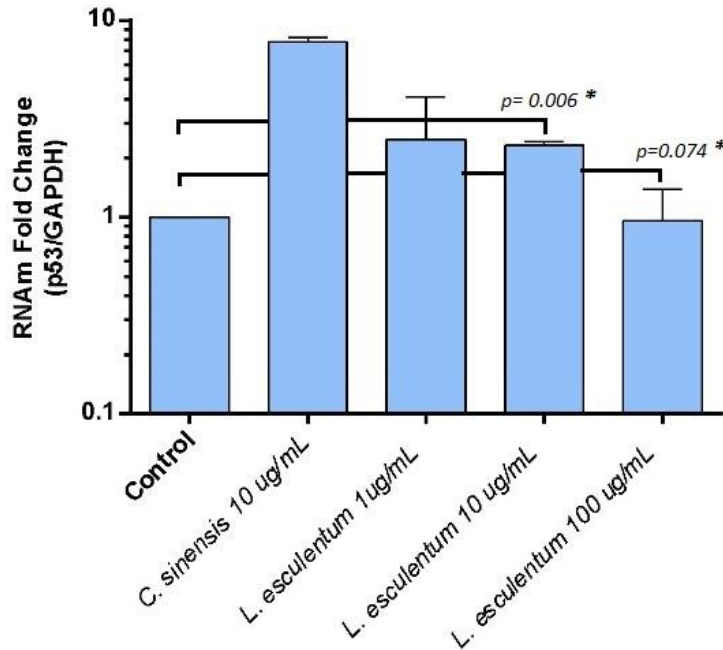
La alteración en el ciclo celular es la característica más importante de las células tumorales mostrando así una capacidad proliferativa aumentada

El gen supresor de tumores (p53) tiene como función el control del ciclo celular y la intervención cuando el ADN de las células se encuentra alterado. Sin embargo, este gen es el más inhibido por células tumorales promoviendo así el desarrollo del mismo. Por tanto el objetivo fue evaluar el nivel de expresión del gen p53 en la línea celular SCC090 estimuladas previamente con los extractos de *L. barbarum* y *L. esculentum* en un rango de concentración de 1, 10 y 100 ug/ml respectivamente. Se observó que la concentración de 10 ug/ml de células SCC090 tratadas con el extracto *L. barbarum* aumenta la expresión del gen p53 respecto al control de células sin estímulo y al extracto *C. sinensis* (Figura 5). El extracto de *L. esculentum* a concentración de 1 y 10 ug/ml se observa aumento de la expresión de p53 respecto al control de células sin estímulo; sin embargo es más bajo respecto al extracto de *C. sinensis* (Figura 6).



**Figura 5: Expresión génica de p53 en células SCC090 estimuladas con *Lycium barbarum* a 1, 10 y 100 ug/ml comparadas con el extracto *C. sinensis* y control de células sin estímulo mediante PCR en tiempo real durante 24 horas en réplicas biológicas por triplicado.** La concentración de 1 ug/ml aumentó significativamente la expresión del gen p53 respecto al control ( $p=0.0369$ ). Por otro lado, la concentración de este mismo extracto a 10 ug/ml aumentó significativamente la expresión de p53

respecto al control de células sin estímulo ( $p = 0.0339$ ) y al extracto *C. sinensis*, lo cual indica que el extracto de *L. barbarum* a 1 ug/ml y 10 ug/ml posee un importante potencial en la detención del ciclo celular.



**Figura 6: Expresión génica de p53 en células SCC090 estimuladas con *Lycopersicum esculentum* a concentraciones de 1, 10 y 100 ug/ml comparadas con el extracto *C. sinensis* y control de células sin estímulo mediante PCR en tiempo real durante 24 horas en réplicas biológicas por triplicado.** La concentración de 10 ug/ml presentó mayor expresión del gen p53 respecto al control de células sin estímulo ( $p= 0.006$ ). Así mismo la concentración de 10 ug/ml aumentó la expresión de p53 significativamente respecto al control ( $p= 0.074$ ), lo cual indica que este *L. esculentum* posee un importante potencial en la detención del ciclo celular en estas concentraciones. Sin embargo, la expresión de p53 con el estímulo de *L. esculentum* es más bajo respecto al extracto de *C. sinensis* respectivamente.

## 7. DISCUSIÓN

Los extractos naturales son claves en el tratamiento contra el cáncer ya que los fármacos actuales para el tratamiento han creado resistencia y poco resultado de efectividad. De esta forma los compuestos de los extractos naturales han revolucionado las investigaciones en estudios *in vitro* e *in vivo* por sus resultados alentadores en el proceso, siendo tal el alcance que a la fecha más del 60% de los medicamentos en desarrollo y aprobados para el cáncer y enfermedades infecciosas son de origen natural (Herranz-López M *et al*, 2018). Algunos de los compuestos naturales inducen las vías apoptóticas que bloquean las células cancerosas a través de diversos mecanismos, componentes como alcaloides de la vinca, los tejanos, la fitotoxina y las camptotecinas se han utilizado como agentes anticancerígenos que son derivados de las plantas (Safarzade *et al*, 2014), por tanto es de suma importancia seguir y mejorar investigación con extractos naturales prometedores como lo son *L. barbarum* y *L. esculentum*. *L. barbarum* es un arbusto de aproximadamente 3 metros de altura perteneciente a la familia de solanáceos denominado *Goji* y/o *Wolfberry* en China, *Kuku* en Japón y *Guija* en Corea (Potterat *et al* 2010, Gao *et al* 2017). Éste extracto ha sido utilizado por más de 2.000 años en la medicina tradicional, como planta medicinal en tratamiento como visión borrosa, dolor abdominal, infertilidad, tos seca, mareos, dolor de cabeza, antienvjecimiento y anticarcinogénico, *Lycium barbarum* ha mostrado actividad anticarcinogénica para cáncer de seno, cáncer cervical, colono-rectal, gástrico, hígado y próstata promoviendo la inducción de apoptosis y detención del ciclo celular (Cheng *et al*, 2015). Por otra parte, *L. esculentum* conocido como el tomate es una planta herbácea perteneciente a la familia *Solanaceae*, El licopeno uno de sus componentes ha demostrado tener efectos antioxidantes y quimiopreventivos contra el cáncer de próstata, cáncer de seno, cáncer endometrial y cáncer de pulmón, inhibiendo la proliferación de las células precursoras de estos tipos de cáncer como por ejemplo en la fase G1 del ciclo celular (Wang *et al*, 2012, Palozza *et al*, 2011).

Los resultados de este trabajo mostraron que el ciclo celular de las células SCC090 tratadas con *L. barbarum* tratadas a 1 ug/ml y 100 ug/ml indujeron un arresto del 60-70% en la fase G0/G1, siendo esto relacionado con los resultados obtenidos en el estudio de Mao F y colaboradores (Mao *et al*, 2011,) donde fueron tratadas células con cáncer colorrectal con *L. barbarum* donde se evidencio que el cristal violeta mostró que tenía un efecto antiproliferativo a largo plazo y que las células fueron arrestadas en la fase

G0/G1, siendo esto concordante con los resultados obtenidos en el experimento que realizamos en las diferentes concentraciones. En otro estudio realizada por Ying Miao y colaboradores (Miao *et al.*, 2009) donde el propósito era evaluar el efecto anticancerígeno en el cáncer gástrico humano y sus posibles mecanismos, en células MGC-803 y SGC-7901 de cáncer gástrico humano que se trataron con *L. barbarum* diversas concentraciones, analizadas por citometría de flujo, encontrándose relación estrecha con los resultados obtenidos en nuestro experimento donde el tratamiento con LBP inhibió el crecimiento de las células MGC-803 y SGC-7901, con detención del ciclo celular en las fases G0 / G1 y S, respectivamente, esto lo relacionamos con los resultados ya que como se mencionó anteriormente en las concentraciones 1 ug/ml y 100 ug/ml el arresto celular se llevó a cabo en fase G0/G1 mientras que en concentración 10 ug/ml mostró un mayor acúmulo de células SCC090 en la fase S del ciclo celular, dando similitud con los estudios realizados por Mao F y colaboradores (Mao *et al.*, 2011,) y Ying Miao y colaboradores (Miao *et al.*, 2009) en los arrestos celulares en la fase G0/G1 y S, esto llevando a un resultado entre el estudio realizado que si se realiza el arresto celular en esas fases dependiendo la concentración que se utiliza, pero dando similitud en las fases correspondientes siendo esto en diferentes tipos de cáncer, dando esto el resultado que tiene resultado no dependiente del tipo del cáncer sino que es por el extracto y sus composiciones.

Las células SCC090 estimuladas con *L. esculentum* fueron tratadas a 3 diferentes concentraciones 1 - 10 y 100 ug/ml; en la concentración 1ug/ml, 10 ug/ml presentaron mayor acúmulo de células en fase G2/M, mientras que en la concentración 100 ug 7 ml presentó mayor acumulación de células en fase G0/G1 del ciclo celular, en comparación con el estudio realizado por Nikita I. Ivanov y colaboradores (Ivanov N *et al.*, 2007) basado en células de cáncer de próstata donde se obtuvo como resultados El extracto de hexano en pasta de tomate a 5 microM de licopeno aumentó la fase G2 / M del ciclo celular, disminuyó las células de la fase S del 45 al 29%, donde como resultado se evidenció que *L. esculentum* es un agente quimiopreventivo. En otro estudio realizado por Gao, L y colaboradores (Gao L, *et al.*, 2014) basado en líneas celulares de cáncer de colon SW480 y HT-29 en la inhibición del crecimiento celular donde se indujeron la detención del ciclo celular en las fases G0-G1 y G2 / M; estos resultados obtenidos en los

dos estudios anteriormente mencionados tiene amplia relación con los resultado que se obtuvo en nuestro experimento ya que en las diferentes concentraciones se realizó con similitud en el arresto celular en las fases, a pesar que en el estudio de Eun-Sun Hwang y colaboradores tuvo mayor arresto e fase S en Menor cantidad mientras que en el realizado en este proyecto no tuvo arrestó en dicha fase; dando como resultado después de analizar y comparar estudios del mismo extracto si tiene efecto sobre el ciclo celular a pesar de ser tratadas de diferentes tipos de cáncer.

En la evaluación del nivel de expresión del gen p53 en la línea celular SCC090 tratadas previamente con los extractos de *Lycium barbarum* y *Lycopersicum esculentum*, se obtuvo que la concentración de 10 ug/ml de células SCC090 tratadas con el extracto *Lycium barbarum* aumenta la expresión del gen p53 control de células sin estímulo y al extracto *C. sinensis*, en *Lycopersicum esculentum* concentración de 1 y 10 ug/ml se observa aumento de la expresión de p53 respecto al control de células sin estímulo; sin embargo es más bajo respecto al extracto de *C. sinensis*; Según estudios realizados por Guangqin Xia y colaboradores (Xia *et al*, 2014) en su experimento El efecto inhibitorio de los polisacáridos de *Lycium barbarum* sobre la apoptosis y la senescencia celular está potencialmente mediado por la vía de señalización de p53, tiene como resultado que el gen tiene una reducción en el nivel de expresión de los genes p53. En otro estudio de Gao y colaboradores (Gao, *et al*, 2017) que se basa en la Supresión selectiva de las células Hela del cáncer cervical por el ácido 2-O-β-D-glucopiranosil-L-ascórbico aislado del fruto de *Lycium barbarum* , nos evidencia muerte celular inducida selectivamente por AA-2βG reprimió la proliferación de células Hela por el mecanismo de apoptosis celular y la detención del ciclo celular inducida por AA-2βG a través de un mecanismo de estabilización de la proteína p53.

Los resultados obtenidos en nuestra investigación tuvieron concordancia con estudios mencionados anteriormente, se realizó evaluación de citotoxicidad de los extractos demostrando que extracto de *Lycopersicum esculentum* tuvo citotoxicidad en altos niveles y por eso se decidió continuar con los experimentos. Dando una aprobación a que los extractos naturales si han sido utilizados como tratamientos coadyuvantes en terapias de cáncer demostrando un arresto celular en las fases del ciclo G0/G1 con *L. barbarum* como se mencionó anteriormente con Mao y colaboradores (Mao *et al.*, 2011,) teniendo arresto en G0/G1 y Miao y colaboradores (Miao *et al*, 2009) demostrado

arresto en fase S, mostrándonos que puede ser un candidato para detener el ciclo celular . En el extracto de *L. esculentum* en los dos artículos de discusión con nuestros resultados se obtuvo que mientras en los resultados de este experimento hubo arresto sólo en las fases G0/G1/G2/ M, en el estudio de Nikita I. Ivanov y colaboradores ( Ivanov *et al.*, 2007) aumentó la proliferación en la fase G2/M y tuvo arresto en la fase S donde no se muestra concordancia con los resultados obtenidos; en el estudio Gao, L y colaboradores (Gao L, *et al.*, 2014) si tuvo concordancia y similitud con los resultados obtenidos ya que el arresto se produjo en las fases G0/G1/G2 Y M, mostrando o dando un posible análisis de discusión que en este extracto el arresto celular posiblemente dependa de distintas variables como puede ser el tipo de cáncer, la concentración, tiempo de evolución.

Como conclusión en los extractos de *L. barbarum* y *L. esculentum* se encontró resultados favorables en la detención del ciclo celular y relación con P53. Posiblemente este proceso de detención en el ciclo celular se obtiene encaminado por medio de la vía de P53; esto nos lleva a plantear que es importante seguir ampliando conocimientos en los extractos de *L. barbarum* y *L. esculentum* para encontrar nuevas aplicaciones



## 8. PROPIEDAD INTELECTUAL

### Derecho de autor

Según lo estipulado por la ley 1915 del 12 de Julio de 2018. Cap. 1 “disposiciones relativas al derecho de autor y los derechos conexos” Art. 1; En todo proceso relativo al derecho de autor ante cualquier jurisdicción nacional se presumirá, salvo prueba en contrario, que la persona bajo cuyo nombre, seudónimo se haya divulgado la obra será el titular de los derechos de autor. También se presumirá, salvo lo contrario que la obra se encuentra protegida.

Art. 12; El autor tiene sobre la obra literaria derecho exclusivo a autorizar o prohibir, la reproducción de la obra bajo cualquier manera o forma permanente o temporal, mediante cualquier procedimiento incluyendo el almacenamiento electrónico, la comunicación al público de la obra, incluyendo su disposición para el público, la distribución pública de la obra original y copias, mediante venta o cualquier forma o transferencia de propiedad, realización de copias, alquiler comercial y **la traducción, adaptación, arreglo u otra transformación de la obra.**

Medidas tecnológicas e información sobre gestión de derechos. Se incurrirá en una responsabilidad civil a quien realice cualquiera de las siguientes conductas: Sin autorización eluda las medidas tecnológicas efectivas impuestas para controlar el acceso a una obra protegida o que protegen derechos de autor frente a usos no autorizados, suprima altere cualquier información sobre los derechos de la obra, distribuya o importe la información de la obra, copias o trabajos derivados de la misma sin autorización. Se entenderá por información sobre la gestión de derechos la información que identifica la obra, interpretación o ejecución.

Art. 16; Limitaciones y excepciones al derecho de autor y a los derechos conexos. El préstamo sin ánimo de lucro, por una biblioteca, archivo o centro de documentación de copias, siempre que figuren en las colecciones permanentes de esta o hagan parte de un programa de cooperación bibliotecaria y hubiesen sido lícitamente adquiridas. La puesta a disposición por parte de bibliotecas, archivos o centro de documentación, para fines investigativos o estudio personal de los usuarios, lícitamente adquiridas y que no estén sujetas a condiciones de adquisición o licencia. Se permitirá la reproducción para enseñanza o para la realización de exámenes por instituciones de todos los niveles

educativos, en la medida justificada por el fin que se persiga, a condición que se haga conforme a los usos honrados y que la misma no sea objeto de venta u otra transacción de título, ni tenga directa o indirectamente fines de lucro. Lo anterior siempre que se incluya el nombre del autor y la fuente.

## 9. REFERENCIAS

- (1) Adams KC, Lindshield BL, Wang S, Jeffery EH, Clinton SK, Erdman JW. Combinations of tomato and broccoli enhance antitumor activity in dunning r3327-h prostate adenocarcinomas. *Cancer Res* 2007 Jan 15;;67(2):836-843.
- (2) Barnum KJ, O'Connell MJ. Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol Biol.* 2014 ; 1170: 29–40.
- (3) Braaten KP, Laufer MR. Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. *Reviews in obstetrics & gynecology* 2008;1(1):2.
- (4) Candotto V, Lauritano D, Nardone M, Baggi L, Arcuri C, Gatto R, et al. HPV infection in the oral cavity: epidemiology, clinical manifestations and relationship with oral cancer. *ORAL & implantology* 2017 Jul;10(3):209.
- (5) Cárcamo, M. (2018). *EPIDEMIOLOGÍA Y GENERALIDADES DEL TUMOR DE CABEZA Y CUELLO. Revista Médica Clínica Las Condes, 29(4), 388–396.*
- (6) Cheng J, Zhou Z, Sheng H, He L, Fan X, He Z, et al. An evidence-based update on the pharmacological activities and possible molecular targets of Lycium barbarum polysaccharides. *Drug Des Devel Ther* 2014 -12-17;9:33-78.
- (7) Choudhari AS, Suryavanshi SA, Kaul-Ghanekar R. The Aqueous Extract of *Ficus religiosa* Induces Cell Cycle Arrest in Human Cervical Cancer Cell Lines SiHa (HPV-16 Positive) and Apoptosis in HeLa (HPV-18 Positive). *PLoS ONE* 2013; 8(7): e70127.
- (8) De la torre F. , Alfaro C, Low-power laser therapy in oral mucositis, *Rev Estomatol Herediana.* 2016 Ene-Mar;26(1):47-55.
- (9) Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015 Mar 01;;136(5):359.

- (10) Fritz H, Kennedy DA, Ishii M, Fergusson D, Fernandes R, Cooley K, et al. Polysaccharide K and *Coriolus versicolor* extracts for lung cancer: a systematic review. *Integr Cancer Ther* 2015 May;14(3):201-211.
- (11) Galbiatti AL, Padovani-Junior JA, Maniglia JV, Rodríguez CD, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2013;79(2):239-47.
- (12) Gao L, Shen L, Yu M, Ni J, Dong X, Zhou Y, Wu S. Colon cancer cells treated with 5-fluoracil exhibit changes in poly(lactosamine)-type N-glycans. *Molecular Medicine Reports*. 2014, 9, 1697-1702.
- (13) Gao, Y., Wei, Y., Wang, Y., Gao, F., & Chen, Z. (2017). *Lycium Barbarum: A Traditional Chinese Herb and A Promising Anti-Aging Agent*. *Aging and Disease*, 8(6), 778.
- (14) Gupta P1, Bansal MP, Koul A. Evaluating the effect of lycopene from *Lycopersicon esculentum* on apoptosis during NDEA induced hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 May 10;434(3):479-85.
- (15) Herranz-López M, Losada-Echeberría M, Barrajon-Catalán E. The Multitarget Activity of Natural Extracts on Cancer: Synergy and Xenohormesis. *Medicines (Basel)*. 2018;6(1):6. Published 2018 Dec 28. doi:10.3390/medicines6010006
- (16) Inanov N, Cowell S, Brown P, Rennie P, Guns E, Cox M. Lycopene differentially induces quiescence and apoptosis in androgen-responsive and-independent prostate cancer cell lines. *Clinical Nutrition* (2007). 26, 252-263
- (17) Johnson DG, Schneider-Broussard R. Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Front Biosci* 1998 Apr 27;;3:447.
- (18) Lafaurie GI, Perdomo SJ, Buenahora MR, Amaya S, Díaz-Báez D. Human papilloma virus: An etiological and prognostic factor for oral cancer? *J Investig Clin Dent* 2018 May;9(2):e12313.

- (19) Lagunas M, Mendiola A, Soto I. Ciclo celular: Mecanismo de regulación. VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud, 17(2):98-107, 2014
- (20) Lee KH, Morris-Natschke SL, Yang X, Huang R, Zhou T, Wu SF, et al. Recent progress of research on medicinal mushrooms, foods, and other herbal products used in traditional Chinese medicine. J Tradit Complement Med. 2012 Apr-Jun; 2(2): 84–95.
- (21) Li, G., Sepkovic, D. W., Bradlow, H. L., Telang, N. T., & Wong, G. Y. C. (2009). *Lycium Barbarum* Inhibits Growth of Estrogen Receptor Positive Human Breast Cancer Cells by Favorably Altering Estradiol Metabolism. *Nutrition and Cancer*, 61(3), 408–414.
- (22) Lo Nigro C, Denaro N, Merlotti A, Merlano M. Head and neck cancer: improving outcomes with a multidisciplinary approach. *Cancer Management and Research* 2017 Aug 1;;9:363-371.
- (23) Lopez J, Dillon, E., Magyar Z., Khan S., Hazeldine S., de Jager S. M., ... Shanahan, H. (2008). *Distinct Light-Initiated Gene Expression and Cell Cycle Programs in the Shoot Apex and Cotyledons of Arabidopsis*. *THE PLANT CELL ONLINE*, 20(4), 947–968.
- (24) Malik UU, Zarina S, Pennington SR. Oral squamous cell carcinoma: Key clinical questions, biomarker discovery, and the role of proteomics. *Arch Oral Biol* 2016 Mar;63:53-65.
- (25) Mao F, Xiao B, Jiang Z, Zhao J, Huang X, Guo J. Anticancer effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on colon cancer cells involves G0/G1 phase arrest. *Medical Oncology* 2011 March, 1357-0560.
- (26) Miao, Y., Xiao, B., Jiang, Z. *et al*. Growth inhibition and cell-cycle arrest of human gastric cancer cells by *Lycium barbarum* polysaccharide. *Med Oncol* 27, 785–790, 20010 August 11;
- (27) Mukherjee S, Debata PR, Hussaini R, Chatterjee K, Baidoo JNE, Sampat S, et al. Unique synergistic formulation of curcumin, epicatechin gallate and resveratrol, tricurin,

suppresses HPV E6, eliminates HPV+ cancer cells, and inhibits tumor progression. *Oncotarget* 2017 -3-29;8(37):60904-60916.

(28) Muñoz N, Bravo LE. Epidemiology of cervical cancer in Colombia. *Colomb Med* 2012 Oct;43(4):298-304

(29) Murugan RS, Mohan KV, Uchida K, Hara Y, Prathiba D, Nagini S. Modulatory effects of black tea polyphenols on oxidant-antioxidant profile and expression of proliferation, apoptosis, and angiogenesis-associated proteins in the rat forestomach carcinogenesis model. *J Gastroenterol* 2007 May;42(5):352-61.

(30) Nahum A, Hirsch K, Danilenko M, Watts CK, Prall OW, Levy J, et al. Lycopene inhibition of cell cycle progression in breast and endometrial cancer cells is associated with reduction in cyclin D levels and retention of p27(Kip1) in the cyclin E-cdk2 complexes. *Oncogene* 2001 Jun 07;20(26):3428-3436.

(31) Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel)*. 2011 Mar; 3(1): 994–1013.

(32) Palozza P, Parrone N, Catalano A, Simone R. Tomato Lycopene and Inflammatory Cascade: Basic Interactions and Clinical Implications. *Curr Med Chem* 2010;17(23):2547-2563.

(33) Palozza P, Simone R, Catalano A, Mele M. Tomato Lycopene and Lung Cancer Prevention: From Experimental to Human Studies. *Cancers (Basel)* 2011; 3(2): 2333–2357.

(34) Palozza, P., Colangelo, M., Simone, R., Catalano, A., Boninsegna, A., Lanza, P., ... Ranelletti, F. O. (2010). *Lycopene induces cell growth inhibition by altering mevalonate pathway and Ras signaling in cancer cell lines. Carcinogenesis, 31(10), 1813–1821.*

(35) Patel S, Goyal A. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech* 2012 Mar;2(1):1-15.

- (36) Perdomo, S., Anantharaman, D., Foll, M., Abedi-Ardekani, B., Durand, G., Reis Rosa, L. A., ... Brennan, P. (2018). *Genomic analysis of head and neck cancer cases from two high incidence regions. PLOS ONE, 13(1), e0191701*
- (37) Perveen R, Suleria HAR, Anjum FM, Butt MS, Pasha I, Ahmad S. Tomato (*Solanum lycopersicum*) Carotenoids and Lycopenes Chemistry; Metabolism, Absorption, Nutrition, and Allied Health Claims--A Comprehensive Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2015;55(7):919-929.
- (38) Piao L, Mukherjee S, Chang Q, Xie X, Li H, Castellanos MR, et al. TriCurin, a novel formulation of curcumin, epicatechin gallate, and resveratrol, inhibits the tumorigenicity of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Jul 16;8(36):60025-60035.
- (39)Potterat, O. (2009). *Goji (Lycium barbarum and L. chinense): Phytochemistry, Pharmacology and Safety in the Perspective of Traditional Uses and Recent Popularity. Planta Medica, 76(01), 7–19.*
- (40) Rivera C. Essentials of oral cancer. *International journal of clinical and experimental pathology* 2015;8(9):11884.
- (41) Safarzadeh E, Sandoghchian S, Baradaran B. Herbal Medicine as Inducers of Apoptosis in Cancer Treatment. Safarzadeh, Elham et al. "Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment." *Advanced pharmaceutical bulletin* vol. 4, Suppl 1 (2014): 421-7.
- (42) Schafer, K. A. . *The Cell Cycle: A Review. Veterinary Pathology.* (1998)35(6), 461–478.
- (43) Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma KK. VARIOUS TYPES AND MANAGEMENT OF BREAST CANCER: AN OVERVIEW. *J Adv Pharm Technol Res.* 2010 Apr-Jun; 1(2): 109–126.

- (44) Shen, L., & Du, G. (2012). *Lycium barbarum polysaccharide stimulates proliferation of MCF-7 cells by the ERK pathway. Life Sciences, 91(9-10), 353–357.*
- (45) Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*. 1999 Nov 1;18(45):6145-57.
- (46) Standish LJ, Wenner CA, Sweet ES, Bridge C, Nelson A, Martzen M, et al. Trametes versicolor mushroom immune therapy in breast cancer. *Journal of the Society for Integrative Oncology* 2008;6(3):122.
- (47) Story, E. N., Kopec, R. E., Schwartz, S. J., & Harris, G. K. (2010). *An Update on the Health Effects of Tomato Lycopene. Annual Review of Food Science and Technology, 1(1), 189–210.*
- (48) Szeto MO. Coriolus versicolor extracts: clinical relevance in cancer management. *Current Oncology* 2008 Apr 21;15(2):79.
- (49) Torkelson CJ, Sweet E, Martzen MR, Sasagawa M, Wenner CA, Gay J, et al. Phase 1 Clinical Trial of Trametes versicolor in Women with Breast Cancer. *ISRN oncology* 2012;2012:251632.
- (50) Van Eck, J., Kirk, D. D., & Walmsley, A. M. (n.d.). Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Agrobacterium Protocols*, 459–474.
- (51) Wang, Q., Ma, X., Zhang, W., Pei, H., & Chen, Y. (2012). *The impact of cerium oxide nanoparticles on tomato (Solanum lycopersicum L.) and its implications for food safety. Metallomics, 4(10), 1105.*
- (52) Wawruszak, A., Czerwonka, A., Okła, K., & Rzeski, W. (2015). *Anticancer effect of ethanollycium barbarum(Goji berry) extract on human breast cancer T47D cell line. Natural Product Research, 30(17), 1993–1996.*



- (53) Xia G, Xin N, Liu W, Yao H, Hou Y, Qi J. Inhibitory effect of Lycium barbarum polysaccharides on cell apoptosis and senescence is potentially mediated by the p53 signaling pathway. *Molecular medicine Reports*.2014 February 19, 1237-1241.
- (54) Ye M, Wu Q, Zhang M, Huang J. Lycopene inhibits the cell proliferation and invasion of human head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports* 2016 Oct;14(4):2953-2958.
- (55) Yim E, Park J. The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. *Cancer Research and Treatment* 2005 Dec 1;;37(6):319-324.
- (56) Zhu, C.-P., & Zhang, S.-H. (2012). *Lycium barbarum polysaccharide inhibits the proliferation of HeLa cells by inducing apoptosis. Journal of the Science of Food and Agriculture, 93(1), 149–156.*
- (57) Zou C, Liu H, Feugang JM, Hao Z, Chow HS, Garcia F. Green Tea Compound in Chemoprevention of Cervical Cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2010 -5;20(4):617-624.
- (58) Zou C, Vlastos A, Yang L, Wang J, Nishioka K, Follen M. Effects of difluoromethylornithine on growth inhibition and apoptosis in human cervical epithelial and cancerous cell lines. *Gynecol Oncol* 2002 May;85(2):266-273.