



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Evaluación de tumor primario y metástasis en ratones isotrasplantados con
cáncer de mama y tratados con el extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga*.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA

MVZ Julia Díaz Cortés

TUTORA PRINCIPAL

Dra. Laura Cobos Marín – Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM

COMITÉ TUTOR

M en C María Isabel Gracia Mora - Facultad de Química. UNAM

Dr. Heriberto Prado García - Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Marzo 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue elaborado en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM en colaboración con la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) de la Facultad de Química de la UNAM. El análisis histopatológico fue realizado en colaboración con el MVZ EDVA Ramón Sebastián León Zetina.

El que es bueno en la familia es también un buen ciudadano
Sófocles

Dedico el presente trabajo a mi hijo Yunuen, príncipe del agua, por ser el motor de mi vida y mi inspiración diaria. A toda mi familia y amigos por su compañía y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos y todas quienes colaboraron en mi crecimiento durante esta etapa, la cual me ha dejado conocimiento, empatía y mayor responsabilidad y sensibilidad social, conocí personas a las que admiro y de las que aprendí todos los días, conté con personas que durante toda mi vida o parte de mi vida me han apoyado, por esto y más doy gracias a la vida por permitirme empezar y culminar este ciclo.

A mi Comité Tutor y Jurado de Tesis por los consejos, revisiones, paciencia y tiempo para la realización de este trabajo.

A la Dra. Laura Cobos Marín y la Dra. Isabel Gracia Mora por todo su apoyo y confianza, por ser mujeres fuertes, honestas y solidarias. Gracias por su preocupación a la generación de cambios y por su empatía con la sociedad.

A todo el equipo de UNIPREC/UNEXA fueron fundamentales para este trabajo

A Luis Romero, Francisco Bartz, Mabel Tinoco, Héctor Rico por su apoyo y enseñanzas.

A Lucía Macías Rosales por su apoyo, gracias por compartir conmigo tus conocimientos, en especial el sondeo esofágico, por tu tiempo y por ser siempre cálida y amable.

A Marion, Laurita, Ari, Isa, Erika, Pepe, Lalo, Héctor, Aldo, Hugo y Pablo por el apoyo en el laboratorio, el baile y su amistad.

A Sebastián León Zetina por el apoyo en el análisis histopatológico, por los consejos y por compartir tus conocimientos.

A mi madre Virginia y familia Laura, Paty, Diana, Oscar, Octavio, Panchito, Gaby, Sheila, Ximena, Sofía, Camila, Patricio, Valentina, Manuel, Sofía, Margarita, José Manuel y muchos más por siempre estar presentes, por el apoyo moral, los consejos, paciencia, enseñanzas y fortaleza.

A Jessica Páez, Martha Avila, Martín Nájera y Diana Saavedra por el apoyo y por proporcionarme las facilidades para culminar esta etapa.

A mis amigos y amigas que siempre están ahí Diana, Aidé, Zule, Rodri, Ots, Sonia, Sandra, Mimí, Mariana, Nivia y a mis compañeras de la Colectiva por la sororidad ¡Gracias infinitas!

ÍNDICE

Resumen	14
Introducción	16
1. Fitoterapia y regulación de productos de origen vegetal en México	16
1.1 Fitoterapia en México y el mundo	16
1.2 Regulación de productos naturales en México	17
2. <i>Agave spp</i> y <i>Agave mapisaga</i> en México y su uso en el cáncer	19
2.1 Uso de agaves en medicina tradicional mexicana	19
2.2 Uso de agaves y otras plantas en el cáncer	19
2.3 <i>Agave mapisaga</i>	20
2.4 <i>Agave mapisaga</i> y cáncer	20
2.5 Saponinas y su efecto en el cáncer	21
3. Cáncer	22
3.1 Morbilidad y mortalidad en México y el mundo	22
3.2 ¿Cómo se genera el cáncer?	22
4. Cáncer de mama	24
4.1 Anatomía e histología de la mama	24

4.2 Origen del cáncer de mama	25
4.3 Tumor primario y Microambiente Tumoral	26
4.4 Metástasis en cáncer de mama	28
4.4.1 Invasión	29
4.4.2 Intravasación	31
4.4.3 Supervivencia en la circulación	31
4.4.4 Detención en sitios de órganos distantes	32
4.4.5 Extravasación	33
4.4.6 Formación de micrometástasis	33
4.4.7 Colonización metastásica	34
4.5 Clasificación del cáncer de mama	34
4.6 Diagnóstico del cáncer de mama	35
4.7 Tratamiento del cáncer de mama	37
4.7.1 Cirugía	37
4.7.2 Radioterapia	38
4.7.3 Quimioterapia	38
4.7.4 Terapia dirigida	39
4.8 Efectos secundarios del tratamiento para cáncer de mama	41

5. Modelos de estudio del cáncer <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	42
6. Justificación	43
7. Hipótesis	44
8. Objetivo	45
9. Objetivos específicos	46
10. Material y Métodos	47
10.1 Ensayo <i>in vitro</i> de citotoxicidad del <i>Agave mapisaga</i>	47
10.2 Estandarización del modelo se isotrasplatación murino de cáncer de mama	48
10.3 Efecto <i>in vivo</i> del extracto de <i>Agave mapisaga</i> en el tumor primario y metástasis	50
11. Resultados	53
11.1 Ensayo <i>in vitro</i> de citotoxicidad del <i>Agave mapisaga</i>	53
11.2 Estandarización del modelo se isotrasplatación murino de cáncer de mama	55
11.3 Efecto <i>in vivo</i> del extracto de <i>Agave mapisaga</i> en el tumor primario y metástasis	64
12. Discusión	87
13. Conclusiones	91
14. Perspectivas	92

15. Anexos	93
15.1 Anexo 1	93
15.2 Anexo 2	94
15.3 Anexo 3	95
16. Bibliografía	96

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Viabilidad de células 4T1	54
Gráfica 2. Comportamiento del modelo de isotrasplatación murino	63
Gráfica 3. Volumen tumoral	67
Gráfica 4. Focos de metástasis en pulmón	69
Gráficas 5. Peso del bazo	70
Gráfica 6. Peso del hígado	71
Gráfica 7. Volumen tumoral	75
Gráfica 8. Focos de metástasis en pulmón	77
Gráfica 9. Peso del bazo	78
Gráfica 10. Metástasis en bazo	81
Gráfica 11. Necrosis	84
Gráfica 12. Permeación vascular	88

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Trasplante ortotópico de células 4T1 en glándula mamaria	55
Imagen 2. Crecimiento del tumor en glándula mamaria	56
Imagen 3. Sección histológica de piel y glándula mamaria	58
Imagen 4. Sección histológica de bazo	59
Imagen 5. Sección histológica de hígado	59
Imagen 6. Perfusión con solución de Bouin	63
Imagen 7. Metástasis en bazo	80
Imagen 8. Necrosis en el tumor	83
Imagen 9. Permeación vascular	85

ÍNDICE DE CUADROS Y DIAGRAMAS

Cuadro 1. Tiempo de implantación de tumores de glándula mamaria en ratones BALB/c	61
Cuadro 2. Volumen tumoral en el tiempo	62
Cuadro 3. Volumen tumoral y tiempo de implantación y medición de tumores tratados con <i>Agave mapisaga</i>	65
Cuadro 4. Metástasis en hígado y bazo	72
Cuadro 5. Volumen tumoral y tiempo de implantación y medición de tumores tratados con <i>Agave mapisaga</i>	73
Diagrama 1. Efecto <i>in vivo</i> de <i>Agave mapisaga</i>	52

ABREVIATURAS

UNIPREC	Unidad de Investigación Preclínica
UNEXA	Unidad de Experimentación Animal
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
Hsd:ICR	Cepa de ratón exogámico
M1	Macrófagos activados por la vía clásica
HPLC	Cromatografía líquida de alta definición de masas
PEC-Src	Células murinas de cáncer de próstata
IFNγ	Interferón gama
NOS2	Óxido nítrico sintasa 2
IFNβ	Interferón beta
HIF-1α	Factor inducible por hipoxia 1 alfa
ON	Óxido nítrico
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-23	Interleucina 23
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AES	Modulador amino-terminal potenciador transcripcional Split
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

VEGF-A	Factor de crecimiento endotelial vascular A
VEGF-C	Factor de crecimiento endotelial vascular C
VEGF-D	Factor de crecimiento endotelial vascular D
PI3K	Fosfatidilinositol- 3-kinasa
Akt	Proteína quinasa B
HER2/neu	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
CSF-1	Factor estimulante de colonias 1
Ras	Protooncogén
ATM/ATR	Ataxia telangiectasia mutada/ Relacionada con RAD 3.
p53	Gen de la proteína supresora de tumores de 53 KDa
Rb	Gen de la proteína del retinoblastoma
Bcl-2	Linfoma de células B (protooncogén)
BRCA1	Cáncer de mama 1 (gen supresor de tumores)
BRCA2	Cáncer de mama 2 (gen supresor de tumores)
Vgef	Gen del factor de crecimiento endotelial vascular
TAM	Macrófago asociado a tumores
ECM	Matriz extracelular
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
CXCL5	Quimiocina 5
CXCR2	Receptor de quimiocinas 2
Treg	Linfocito T regulador
DC	Célula dendrítica
NK	Célula asesina natural

CAF	Fibroblastos asociados al cáncer
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
MB	Membrana basal
EMT	Transición epitelio-mesenquimal
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
TrkB	Receptor de tropomiocina quinasa
CTC	Célula tumoral circulante
ANGPT4	Angiopoyetina 4
ANGPT2	Angiopoyetina 2
COX2	Ciclooxigenasa 2
MMP-1	Metaloproteinasa de matriz 1
MMP-2	Metaloproteinasa de matriz 2
MMP-3	Metaloproteinasa de matriz 3
MMP-9	Metaloproteinasa de matriz 9
MMP-10	Metaloproteinasa de matriz 10
LOX	Lisil Oxidasa
VEGFR1	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
$\alpha 4\beta 1$	Antígeno muy tardío 4 (integrina)
TIC	Célula iniciadora de tumor
ASCC	America Joint Commission on Cancer
RE	Receptor de estrógenos
RP	Receptor de progesterona
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa

GDP	Guanosín difosfato0
RPMI	Medio del Instituto Roswell Park Memorial
SRB	Sulforodamina B
PBS	Tampón fosfato salino
ATCC	American Type Culture Collection
IC50%	Concentración inhibitoria máxima media
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas

Evaluación de tumor primario y metástasis en ratones isotrasplantados con cáncer de mama y tratados con el extracto hidrosoluble de *Agave mapisaga*.

El *Agave mapisaga* Trel es un maguey originario del estado de Hidalgo, México, que contiene saponinas esteroidales con actividad antiinflamatoria, antibacterial, citotóxica y anti-tumorigénica. En este trabajo se evaluó el efecto del extracto de *Agave mapisaga*, en el tumor primario y metástasis de ratones isotrasplantados con cáncer de mama, por medio de ensayo de citotoxicidad, tamaño e implantación tumoral, así como, histopatología y conteo de focos metastásicos en pulmón, para conocer si este puede ser un candidato para mayor investigación como coadyuvante en el cáncer de mama. Se pudo determinar que El *Agave mapisaga* modula la permeación vascular y la necrosis en los tumores, además de la metástasis en el pulmón y el bazo, éste es citotóxico en células 4T1 a concentraciones de 0.5 mg/ml, con una IC50% de 1605.121 µg/ml, además que, en ratones BALB/c hembras isotrasplantadas con células 4T1 y tratadas con una dosis de 250 mg/Kg, el agave reduce la permeación vascular, además de disminuir la metástasis en bazo y pulmón.

Evaluation of primary tumor and metastasis in mice isotransplanted with breast cancer and treated with the water-soluble extract of *Agave mapisaga*

Agave mapisaga Trel is a maguey originally from the state of Hidalgo, Mexico, which contains steroidal saponins with anti-inflammatory, antibacterial, cytotoxic and anti-tumorigenic activity. In this work, the effect of the *Agave mapisaga* extract, in the primary tumor and metastasis of isotransplanted mice with breast cancer, was evaluated by means of a cytotoxicity, size and tumor implantation test, as well as histopathology and count of metastatic foci in the lung, to know if this can be a candidate for further research as an adjunct in breast cancer. It was determined that *Agave mapisaga* modulates vascular permeation and necrosis in tumors, in addition to metastasis in the lung and spleen, this is cytotoxic in 4T1 cells at concentrations of 0.5 mg/ml, with an IC50% of 1605.121 µg/ml, in addition to that, in female BALB/c mice isotransplanted with 4T1 cells and treated with a dose of 250 mg/Kg, agave reduces vascular permeation, in addition to decreasing spleen and lung metastases.

INTRODUCCIÓN

1. FITOTERAPIA Y REGULACIÓN DE PRODUCTOS DE ORIGEN VEGETAL EN MÉXICO

1.1 Fitoterapia en México y el mundo

La fitoterapia es una práctica basada en la ciencia que deriva del uso de extractos de plantas

medicinales para prevenir y curar enfermedades¹.

En México se encuentran alrededor de 74 pueblos indígenas con alrededor de 11 millones de habitantes distribuidos en todo el país, los cuales, tradicionalmente utilizan plantas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, dermatológicas (principalmente infecciones y reacciones inflamatorias), respiratorias, ginecológicas y andrológicas, así como, en picaduras y mordeduras de animales venenosos^{2,3}. En el país, la exportación de medicamentos herbolarios va en aumento, la importación también es relevante y se da principalmente de China e India⁴.

A lo largo de la historia el uso de plantas para prevenir y curar enfermedades ha pasado por diferentes civilizaciones, los egipcios las utilizaban como antimicóticos, antibacterianos y antioxidantes, esto puede incluir su habilidad para momificar cuerpos a lo largo de los años. La cultura italiana, tiene gran conocimiento de las plantas, debido a los estudios de los médicos y filósofos griegos, que luego se transmitieron a los romanos. En el siglo XVIII, siglo de la ciencia y la Ilustración,

Philip Miller y Linneo aportaron su contribución al estudio de las plantas reuniendo información y muestras para proponer una clasificación⁵.

Las plantas medicinales fueron durante mucho tiempo nuestra principal fuente de productos terapéuticos. Con la aparición de la industria farmacéutica y los avances en farmacología, las plantas pasaron a ser fuente de principios activos de medicamentos de síntesis, y más tarde, fueron desplazadas por éstos. Hoy en día el uso de productos de origen natural ha ido en aumento en muchos países del mundo desarrollados y en vías de desarrollo y se han dado a la tarea de investigar sus efectos *in vitro* e *in vivo* a partir de extractos, infusiones, tinturas u otros, para poder registrarlos y comercializarlos⁶.

1.2 Regulación de productos naturales en México

La Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) es la responsable de verificar la calidad, eficacia (efecto terapéutico) y seguridad (riesgo/beneficio) del producto con estudios en animales o *in vitro* (estudios preclínicos) y humanos (estudios clínicos)³.

La COFEPRIS también define las características y forma en que se puede comercializar un producto de origen vegetal con efecto terapéutico y esto se define en dos posibilidades:

- a) Remedio herbolario: preparado de plantas medicinales, o sus partes individuales o combinadas, y sus derivados, presentado en forma farmacéutica, al cual se le atribuye por conocimiento popular o tradicional el alivio para algunos síntomas participantes o aislados de una enfermedad. Un

remedio herbolario dentro de su formulación no podrá contener otra sustancia de síntesis química que tenga un efecto terapéutico (fármacos, hormonas, vitaminas, minerales), no podrá ir dirigido al tratamiento de una enfermedad o padecimiento que requiera seguimiento médico. Estos productos son de libre venta, su calidad y seguridad han sido comprobadas, sin embargo, su eficacia es considerada con base en el conocimiento popular de las plantas.

- b) Medicamento herbolario: los productos elaborados con material vegetal o algún derivado de éste, cuyo ingrediente principal es la parte aérea o subterránea de una planta o extractos y tinturas, así como jugos, resinas, aceites grasos y esenciales, presentados en forma farmacéutica, cuya eficacia terapéutica y seguridad ha sido confirmada científicamente en la literatura nacional o internacional. Un medicamento herbolario dentro de su formulación no contendrá sustancias de síntesis química que tengan un efecto terapéutico, van dirigidos al tratamiento de una enfermedad y estos pueden o no ser diagnosticados por un médico tratante, su calidad, seguridad y eficacia han sido comprobadas técnica y científicamente.

Son muchas las plantas medicinales que han sido liberadas por COFEPRIS como son la *Echinacea purpurea*, *Ganoderma lucidum*, *Pasiflora incarnata*, *Valeriana officinalis*, entre otras. Estas son frecuentemente utilizadas en México como estimulantes del sistema inmunológico, contra el cáncer, para la ansiedad o el insomnio. Sin embargo, hay muchas otras plantas medicinales utilizadas desde la

época Prehispánica que se encuentran en investigación, tal es el caso de los agaves^{7,8}.

2. *Agave spp* y *Agave mapisaga* EN MÉXICO Y SU USO EN EL CÁNCER

2.1 Uso de agaves en medicina tradicional mexicana

El género *Agave* es endémico de América y tiene 200 especies. El 75% de ellas (150) se encuentran en México. Además, hay 34 especies que pertenecen a categorías inespecíficas, lo que constituye un total de 186 especies. El 75% de agaves que podemos encontrar en México se encuentran distribuidos en zonas áridas y semiáridas⁹.

Los agaves tienen gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos que lo han utilizado durante siglos como alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras duras extraídas de las hojas (ixtle), abono, construcción de viviendas y elaboración de implementos agrícolas. El uso del agave en México, como fuente de fibras, azúcar, aguamiel y el denominado en náhuatl *mexcalli* (mezcal), surge hace aproximadamente siete mil años⁹. A los agaves se les han atribuido cualidades antiinflamatorias, anti-microbianas y estimulantes del sistema inmunológico, como antiséptico y cicatrizante de heridas; así mismo, las hojas secas o en infusión son utilizadas por sus propiedades protectoras del sistema digestivo y hepático¹⁰.

2.2 Uso de agaves y otras plantas en cáncer

En diversas plantas como *Camellia sinensis*, *Curcuma longa*, *Dillenia sulfruticosa* o mezclas de plantas como el Essiac (*Arctium lappa*, *Rheum palmatum*, *Rumex*

acetosella, *Ulmus fulva*) se ha demostrado efecto citotóxico contra células cancerosas, reducción tumoral, necrosis tumoral e inducción de apoptosis en diferentes tipos de cáncer;¹¹⁻¹⁵ así mismo, en miembros de la familia *Agavaceae*, como *Agave utahensis*, *Agave sisalana*, *Agave salmiana*, y *Agave salmeri* se ha demostrado efecto citotóxico e inducción de muerte en células de leucemia promielocítica, cáncer de mama, pulmón, glioblastoma, cáncer de colon y cervix, debido a la presencia de saponinas esteroidales y triterpénicas, alcaloides esteroidales, compuestos fenólicos y fructanos¹⁶⁻¹⁹. Las moléculas más estudiadas en la familia *Agavaceae* son las saponinas esteroidales, a las que se le han atribuido actividades antifungales, antibacteriales y citotóxicas, además de favorecer la diferenciación de macrófagos hacia un perfil M1²⁰⁻²³.

2.3 *Agave mapisaga*

El *Agave mapisaga* Trel es un maguey originario del estado de Hidalgo, México, que se sabe contiene saponinas. Es una rosetófila con inflorescencia (disposición de sus flores), de cinco metros de altura y 18 ramas, cuya hoja más larga mide 60 cm de largo y con ramificación cuaternaria; posee frutos maduros verdes y es una planta cultivada. Su nombre común es “penca larga”, “maguey blanco” o “maguey bueno”; se utiliza para extracción de aguamiel y obtención de fibras de ixtle y es una especie poco frecuente en las regiones de cultivo de *Agavaceas*²⁰.

2.4 *Agave mapisaga* y cáncer

Actualmente no se cuenta con mucha información sobre los efectos del *Agave mapisaga* en el cáncer; como se mencionó anteriormente, este contiene saponinas. Peralta en 2016²⁰ identificó hecogenina (saponina esteroideal), por cromatografía

líquida de alta definición de masas (HPLC), a partir de un extracto acuoso de *Agave mapisaga*. En el mismo trabajo se reportó efecto citotóxico del extracto acuoso en dosis de 0.125, 0.5, 1 y 2 mg/pozo en células PEC-Src de cáncer de próstata. También se encontró disminución en la implantación tumoral en ratones Hsd:ICR (CD-1®-ratones no consanguíneos ICR-Institute of Cancer Research) isotrasplantados con las células mencionadas anteriormente y tratados con 50 mg/kg del extracto acuoso de *Agave mapisaga*²⁰.

2.5 Saponinas y su efecto en el cáncer

Las saponinas son glucósidos de esteroides o de triterpenoides, llamadas así por sus propiedades semejantes a las del jabón: cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (el esteroide o el triterpenoide) y un elemento soluble en agua (el azúcar). Las saponinas tienen efecto citotóxico debido a que pueden activar macrófagos M1 mediante la regulación de la expresión de IFN γ y la óxido nítrico sintasa 2 o inducible (NOS2). Las saponinas tienen propiedades antiinflamatorias puesto que actúan de manera similar al ácido acético que disminuye la permeabilidad vascular. El perfil M1, la presencia de la NOS2 y el efecto antiinflamatorio pueden tener un papel importante anti-tumorigénico, el cual se ha investigado en glioblastoma y leucemia promielocítica^{24,25}.

Para que los macrófagos se activen hacia un perfil M1 deben estar expuestos a IFN γ , IFN β o LPS (entre otros). Esta activación se caracteriza por la participación de NF κ B, STAT1 e IRF3, la expresión de HIF-1 α y, como consecuencia, la síntesis de NOS2. Las funciones del macrófago M1 están relacionadas con la fagocitosis a través de la producción de enzimas lisosómicas y especies reactivas del oxígeno

como el óxido nítrico (ON), la producción de interleucinas como IL-1, IL-12 e IL-23 que median la inflamación y la síntesis de enzimas que degradan la matriz extracelular (MMP-9)²⁶

3. CÁNCER

3.1 Morbilidad y mortalidad en México y el mundo

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con él. El cáncer de mama es el más frecuente en las mujeres, de acuerdo al GLOBOCAN 2018, se presentaron 2,088,849 nuevos casos y se 627,000 muertes en el mundo²⁷. En México, durante 2013, el cáncer de mama fue la principal causa de morbilidad hospitalaria entre los tumores malignos para la población de 20 años o más, representando el 18.7 por ciento o 3:10 mujeres. El tumor maligno de mama fue la segunda causa de mortalidad por neoplasias en mujeres de 20 años o más, representando el 14.8 por ciento²⁸⁻³⁰

3.2 ¿Cómo se genera el cáncer?

El cáncer se genera por una serie de alteraciones relacionadas en las que se descontrola el proceso de crecimiento, división, envejecimiento y muerte celular; producto de ello, se forman tumores en uno o varios órganos y de estos pueden migrar a otros. Los agentes carcinógenos, como radiación, virus, agentes alquilantes y micotoxinas causan mutaciones en el ADN o generan alteraciones epigenéticas, lo que cambia la expresión de genes supresores de tumor y oncogenes provocando aumento en la proliferación celular, acumulación de daño

en el ADN, así como inhibición de apoptosis y senescencia celular, angiogénesis y metástasis, entre otros³¹⁻³³.

Las deleciones y pérdida de heterocigocidad cromosómica, pérdida y polimorfismo alélico o de nucleótidos; así como la pérdida, ganancia o cambio de bases son alteraciones que modifican oncogenes o genes supresores de tumor y generan cáncer al alterar vías de señalización que modulan el ciclo celular, apoptosis, uniones celulares y angiogénesis^{34,35}.

Las vías de señalización de oncogenes y genes supresores de tumor, son alteradas en el cáncer. La célula cancerosa requiere aumentar su división celular, evitar la apoptosis y senescencia, evadir o suprimir al sistema inmunológico, estimular la angiogénesis y migración celular, entre otros. Algunos ejemplos de vías de señalización y oncogenes o genes supresores de tumor alterados en el cáncer se enlistan a continuación: alteración de respuesta de fase aguda y de ciclo celular PI3K/Akt (gen Her2/neu), Ras, ATM/ATR (gen p53) y Rb, inhibición de apoptosis vía caspasa 9 (gen bcl-2 y p53) para evitar senescencia (genes p53 y/o Rb), permitir daños en el DNA (genes BRCA-1, BRCA-2 o p53) o angiogénesis (gen Vgef^c)^{36,37}.

La inestabilidad genética que caracteriza el proceso de carcinogénesis favorece la aparición de clones celulares resistentes a la actividad del sistema inmunológico, lo que es considerado un proceso de edición tumoral. Este proceso de inmunodición del cáncer está compuesto por tres fases: eliminación o inmunovigilancia, en el cual las células tumorales exponen señales que pueden mediar su eliminación por el sistema inmune antes de ser clínicamente aparentes. La segunda fase de equilibrio,

donde las células tumorales y el sistema inmune están en equilibrio dinámico, y la fase de escape donde las células tumorales tienen inmunogenicidad reducida o mecanismos inmunosupresores para atenuar respuestas³⁸.

4. CÁNCER DE MAMA

4.1 Anatomía e histología de la mama

Para entender el cáncer de mama es necesario revisar un poco de la anatomía e histología de la mama.

La mama abarca, en todos los mamíferos, el contenido de la glándula mamaria y los conductos galactóforos empleados para la lactancia. Los elementos primarios de una glándula mamaria son los alvéolos (estructuras tubulares huecas de unos cuantos milímetros de longitud que representa el 90 % de la estructura de la mama) recubiertos por células epiteliales y rodeados por células mioepiteliales. Estos alvéolos se reúnen formando grupos llamados lóbulos o lobulillos y cada uno de estos lóbulos posee un ducto lactífero que drena en los orificios del pezón^{28,39}.

La glándula mamaria está formada por tres tipos de tejidos: glandular de tipo túbulo-alveolar, conjuntivo que conecta los lóbulos y adiposo que ocupa los espacios interlobulares. El tejido celular subcutáneo rodea la glándula sin que exista una cápsula claramente definida, desde éste se dirigen hacia el interior numerosos tabiques de tejido conectivo. Estos tabiques constituyen los ligamentos suspensorios de la mama o ligamentos de Cooper. Los lóbulos mamarios están constituidos por numerosos lobulillos que se encuentran unidos entre sí por tejido conectivo, vasos sanguíneos y por su sistema excretor: los conductos lactíferos. Los lobulillos están formados por diez a cien alveolos, cada cual con su conducto

excretor denominado conducto terminal. Los alveolos están estructurados por un conjunto de células secretoras (epiteliales) que producen la secreción láctea y conforman una cavidad a la cual vierten esta secreción, están rodeados de células mioepiteliales y capilares sanguíneos de singular importancia en el proceso de secreción y eyección de la leche. Los conductos están revestidos por epitelio cuboideo o cilíndrico. Por fuera de este epitelio, entre él y la membrana basal, existe una capa de células mioepiteliales muy ramificadas que envuelven a los conductos y alveolos. En los conductos de mayor tamaño el epitelio consta de dos o más capas de células que cerca del orificio externo del pezón se transforman en epitelio plano estratificado^{34,40}.

4.2 Origen del cáncer de mama

El cáncer de mama se origina cuando las células de la mama comienzan a crecer en forma descontrolada. Estas células normalmente forman un tumor que a menudo se puede observar en una radiografía o se puede palpar como una protuberancia (masa o bulto). El tumor es maligno (cáncer) si las células pueden crecer penetrando (invadiendo) los tejidos circundantes o propagándose (metástasis) a áreas distantes del cuerpo. El cáncer de mama ocurre casi exclusivamente en las mujeres, pero los hombres también lo pueden padecer. La mayoría de los tipos de cáncer de mama se generan a partir de las células epiteliales de la mama, a lo que se le denomina carcinoma. Este puede comenzar en los conductos que llevan la leche hacia el pezón (cáncer ductal) y otros se originan en las glándulas que producen leche (cáncer lobulillar). Un número muy pequeño de los tipos de cáncer comienzan en otros tejidos de la mama, a estos se les llama sarcomas (células

mesenquimales) y linfomas. En el caso del cáncer de mama inflamatorio, la mama está enrojecida, hinchada y caliente porque las células cancerosas bloquean los vasos linfáticos de la piel. El cáncer de mama se disemina (metástasis) principalmente a pulmón, hígado, nódulos linfáticos y hueso. La metástasis se da dependiendo del tumor primario y su microambiente, el cual se forma de las células transformadas, además de células normales, moléculas y vasos sanguíneos que rodean y alimentan el tumor. Un tumor puede cambiar su microambiente y el microambiente puede afectar la forma en que el tumor crece y se disemina^{27,28,36,41,42}.

4.3 Tumor Primario y Microambiente Tumoral

Tumor primario es el término que se usa para describir el tumor original o primario en el cuerpo. Las células cancerosas de un tumor primario se pueden diseminar a otras partes del cuerpo y formar tumores nuevos o secundarios. Esto se llama metástasis. Estos tumores secundarios son el mismo tipo de cáncer que el tumor primario²⁸.

La comunicación bidireccional entre las células y su microambiente es crítica tanto para la homeostasis tisular normal como para el crecimiento tumoral. En particular, las interacciones entre las células tumorales y el estroma asociado representan una relación de gran alcance que influye en la iniciación de la enfermedad, la progresión y pronóstico del paciente. La relación entre la inflamación crónica y la tumorigénesis se propuso por primera vez por Rudolf Virchow en 1863, después de observar que la infiltración de leucocitos era un sello distintivo de los tumores. Mientras que el cáncer previamente había sido definido como una enfermedad heterogénea que

implicaba mutaciones aberrantes en las células tumorales, ahora es evidente que los tumores son también diversos por la naturaleza de la composición de su microambiente, los estados de activación celular y las proporciones de células estromales^{43,44}.

Después de eludir mecanismos celulares intrínsecos de la apoptosis, las células tumorales están sujetas a presiones de eliminación por el sistema inmune. Los antígenos específicos de células tumorales desempeñan un papel durante este proceso, que son reconocidos por células inmunitarias citotóxicas para su destrucción. Los fibroblastos y macrófagos dentro del microambiente también contribuyen a un estado de crecimiento-supresión. Sin embargo, estas células pueden ser educadas por el tumor para adquirir funciones pro-tumorigénicas. Por ejemplo, los macrófagos asociados a tumores (TAMs) apoyan diversos fenotipos dentro del tumor primario, incluyendo crecimiento, angiogénesis e invasión, al secretar proteasas pro tumorigénicas, citoquinas y factores de crecimiento (por ejemplo, EGF). Los TAM se acumulan en las regiones de hipoxia en tumores en crecimiento y su reclutamiento está mediado por una regulación positiva de factores quimiotácticos de macrófagos como la endotelina-2 y VEGF. La acumulación de TAM en estas regiones se correlaciona con la angiogénesis y la subsiguiente adquisición de un fenotipo invasivo, lo que sugiere que la respuesta hipóxica inicial en tumores en crecimiento puede influir en la polarización de macrófagos. A medida que los tumores crecen, las células inmunosupresoras, incluyendo las supresoras derivadas de células mieloides (MDSCs) y las Treg se movilizan en circulación en respuesta a ejes de citocinas activadas inducidas por tumorigénesis (por ejemplo,

TGF- β , CXCL5-CXCR2). Los MDSC y las células Treg se infiltran en el tumor en crecimiento para interrumpir la vigilancia inmunológica a través de múltiples mecanismos, incluyendo la disrupción de la presentación de antígenos por DCs, la inhibición de la proliferación y activación de células T y B o la inhibición de la citotoxicidad NK. Los fibroblastos asociados al cáncer (CAF), que se activan por factores derivados de tumores (por ejemplo, TGF- β , FGF, PDGF, etc.), secretan proteínas de matriz extracelular (ECM) y componentes de membrana basal, regulan la diferenciación celular, modulan respuestas inmunes y contribuyen a la desregulación de la homeostasis. Las CAF también son una fuente clave de VEGF, que apoya la angiogénesis durante el crecimiento del tumor. Además de las contribuciones celulares, varias propiedades extracelulares contribuyen a la progresión del tumor, incluyendo la baja tensión de oxígeno, la alta presión de fluido intersticial y los cambios en componentes específicos de la ECM^{40,41}.

4.4 Metástasis en cáncer de mama

La cascada de invasión y metástasis de células epiteliales en tumores primarios tiene las siguientes fases: (1) invasión local a través de los alrededores de la matriz extracelular (ECM) y de las capas de células estromales, (2) intravasación luminal de los vasos sanguíneos, (3) sobrevivencia al transporte a través de la vasculatura, (4) detención en los sitios de órganos distantes, (5) extravasación en el parénquima de los tejidos distantes, (6) sobrevivencia inicial en estos microambientes distantes con el fin de formar las micrometástasis y (7) reinicio de sus programas proliferativos en sitios metastásicos, la que genera crecimientos neoplásicos macroscópicos, clínicamente detectables⁴⁵.

4.4.1 Invasión

La invasión local implica la entrada de las células cancerosas que han residido dentro de un tumor primario bien confinado en el estroma asociado al tumor circundante y a partir de entonces en el parénquima del tejido normal adyacente. Con el fin de invadir el estroma, las células de carcinoma deben romper primero la membrana basal (MB). Además, la MB también juega un papel crucial en los eventos de transducción de señales dentro de las células de carcinoma a través de vías iniciadas por adherencias célula-matriz mediados por la integrina, lo que conduce a alteraciones en la polaridad celular, la proliferación, invasividad, y la supervivencia. Las células mioepiteliales en la mama ayudan a mantener la integridad de la membrana basal, la modulación de rigidez de la matriz extracelular mediante el colágeno, lo que afecta a la progresión del carcinoma de mama. Por otro lado, las uniones intercelulares mediadas por E-cadherina tejen láminas de células epiteliales y evitan la disociación de las células epiteliales individuales de sus vecinos. Con el fin de superar este y otros obstáculos a la invasión, las células de carcinoma pueden optar por usar una vía celular conocida como transición epitelio-mesenquimal (EMT), que es crítica para múltiples aspectos de la morfogénesis embrionaria normal. El programa de EMT implica la disolución de uniones adherentes y estrechas, y una pérdida de la polaridad celular; también se disocian las células dentro de láminas de células epiteliales en células individuales que presentan varios atributos mesenquimales, incluyendo mayor invasividad. La pérdida de la MB permite la invasión directa por células de carcinoma del

compartimiento del estroma; las metaloproteinasas de matriz (MMPs), impulsan esta pérdida mediante proteólisis^{42,43}.

Una vez que han disuelto la MB las células de carcinoma, entran en el estroma. Aquí, se enfrentan con una variedad de células estromales asociadas a tumores, cuya composición se rige por el estado de la progresión tumoral. A medida que avanza la progresión del tumor primario, el estroma se vuelve cada vez más “reactivo” y adquiere muchos de los atributos del estroma de los tejidos que están cursando una curación de heridas o inflamadas crónicamente. En consecuencia, las células tumorales, fibroblastos y miofibroblastos del estroma se encuentran con células endoteliales, adipocitos, y células derivadas de médula de hueso diferentes, tales como células madre mesenquimales, macrófagos y otras células inmunes. Estas células estromales son capaces de aumentar aún más los comportamientos agresivos de las células de carcinoma mediante diversos tipos de señalización heterotípica. Por ejemplo, la invasividad del cáncer de mama se puede estimular a través de la secreción de interleucina-6 (IL-6) por los adipocitos presentes en el microentorno local. Además, los linfocitos T CD4⁺ promueven invasión del carcinoma mamario mediante la estimulación de los macrófagos asociados al tumor (TAM) para activar el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en las células de carcinoma. Del mismo modo, la secreción de IL-4 por las células de cáncer de mama desencadena actividad de la proteasa catepsina en TAMs, aumentando aún más la invasividad de células de carcinoma^{42,43}.

4.4.2 Intravasación

La intravasación puede ser facilitada por los cambios moleculares que promueven la capacidad de las células de carcinoma de cruzar la barrera de pericitos y células endoteliales que forman las paredes de los microvasos. Por ejemplo, el modulador amino-terminal potenciador transcripcional de split (AES) inhibe la intravasación de células de carcinoma de colon en un menoscabo de *trans* invasión -endotelial a través de mecanismos Notch-dependiente. Por el contrario, el factor transformante (TGF) mejora la intravasación de carcinoma mamario, aparentemente mediante el aumento de la penetración celular del carcinoma en paredes de microvasos o al aumentar la invasividad de manera más general. Además, la intravasación de células de carcinoma de mama se puede mejorar mediante TAMs perivasculares a través de retroalimentación positiva del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor estimulante de colonias-1 (CSF-1) por TAM y células de carcinoma, respectivamente. La mecánica de intravasación es fuertemente influenciada por las características estructurales de los vasos sanguíneos asociados al tumor a través de una variedad de mecanismos, muchos de los cuales convergen en las acciones de los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Además, las células del tumor estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos dentro de su microambiente local a través de la neoangiogénesis^{42,43}.

4.4.3 Supervivencia en la circulación

Las células tumorales circulantes (sangre), deben sobrevivir a una variedad de tensiones con el fin de llegar a sitios en órganos distantes. Por ejemplo, ser privadas de la adhesión dependiente de integrinas a los componentes de matriz extracelular

que normalmente son esenciales para la supervivencia celular. En ausencia de tal anclaje, las células epiteliales normalmente se someten a anoikis, una forma de la apoptosis desencadenada por la pérdida de anclaje al sustrato. Sin embargo, en las células epiteliales intestinales transformadas se ha descrito a la tirosina quinasa TrkB como un supresor de la anoikis cuya expresión favorece la progresión metastásica. Las células tumorales también son capaces de protegerse de las fuerzas del torrente sanguíneo y evitar la detección inmunológica mediante la formación de émbolos a través de interacciones con plaquetas de la sangre, un proceso que parece estar mediado por la expresión de selectinas L y P en las células de carcinoma^{42,43}.

4.4.4 Detención en sitios de órganos distantes

En el cáncer de mama la célula tumoral circundante (CTC) tiene predilección hacia ciertos tejidos como pulmón, hígado, hueso, bazo y cerebro. De hecho, algunas células de carcinoma son capaces de formar interacciones adhesivas específicas en tejidos particulares que favorecen preferentemente su captación. Por ejemplo, se ha propuesto que la expresión de metadherina en células de cáncer de mama causa detención en los pulmones, facilitando la unión a la vasculatura pulmonar. Del mismo modo, la entrada de células colorrectales y de carcinoma de pulmón en la microvasculatura hepática puede iniciar una cascada proinflamatoria que se traduce en que las células de Kupffer secreten quimiocinas que regulan el alza de diversos receptores de adhesión vascular, permitiendo de este modo la adherencia de las CTC en la microvasculatura del hígado^{42,43}.

4.4.5 Extravasación

Las células de carcinoma pueden cruzar la lumina recipiente en el parénquima de tejido mediante la penetración de las capas de pericitos y células endoteliales que separan la lumina del microambiente estromal, un proceso conocido como la extravasación. La proteína secretada de tipo angiopoyetina-4 (ANGPT4), así como los factores EREG, COX-2, MMP-1 y MMP-2, interrumpen las uniones célula-célula de endotelio vascular pulmonar con el fin de fomentar la extravasación de células de carcinoma de mama en los pulmones. También la angiopoyetina-2 (ANGPT2), MMP-3, MMP-10, factor de crecimiento de placenta y VEGF secretado por varios tipos de tumores primarios son capaces de inducir la hiperpermeabilidad pulmonar antes de la llegada de células de carcinoma en los pulmones y de este modo facilitar la subsiguiente extravasación de CTC. Finalmente, los monocitos inflamatorios reclutados a metástasis pulmonares a través de mecanismos dependientes de CCL2 promueven la extravasación de células de carcinoma de mama en los pulmones mediante la secreción de VEGF^{42,43}.

4.4.6 Formación de micrometástasis

Algunos han propuesto que las células de carcinoma pueden enfrentarse al problema de un microambiente incompatible en el lugar de la metástasis a través del establecimiento de un “nicho premetastásico”. Según este modelo, los tumores primarios liberan señales sistémicas, quizás incluyendo lisil oxidasa (LOX), que inducen la regulación positiva específica de órgano de la fibronectina a partir de fibroblastos de tejido residentes. Esto conduce a la movilización de células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea VEGF receptor 1-positivas

(VEGFR1⁺) hacia los sitios de metástasis a través de interacciones entre la fibronectina depositada y su receptor afín, $\alpha 4\beta 1$ integrina, que se expresa en estas células. A continuación, estas células progenitoras hematopoyéticas modifican los microambientes locales mediante la secreción de MMP-9. Se cree que la activación de MMP-9 en los futuros sitios de resulta en la estimulación de diferentes integrinas, así como en la liberación de moléculas de la matriz extracelular^{42,43}.

4.4.7 Colonización metastásica

Se han identificado diversos genes cuya expresión facilita la colonización metastásica de las células de cáncer de mama hacia el hueso, pulmón, el cerebro, o el hígado. Estos genes parecen dictar el tropismo metastásico específico de órgano debido a su capacidad para compensar y superar las incompatibilidades entre los programas de crecimiento intrínsecas de las células de carcinoma diseminada y las demandas impuestas por el nuevo microambiente del tejido a invadir. Es probable que el éxito en la colonización metastásica sea influenciado por otro atributo de las células fundadoras: deben poseer una alta capacidad de auto-renovación con el fin de generar grandes crecimientos malignos. Algunos han propuesto que sólo una subpoblación de las células neoplásicas presentes dentro de un tumor, de las denominadas “células iniciadoras del tumor” (TIC) poseen una extensa capacidad de tal auto-renovación^{41,42,46}.

4.5 Clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama se clasifica por etapas (I-IV) usando el sistema TNM de la *American Joint Commission on Cancer (AJCC)* que se basa en:

- El tamaño del tumor (T) del seno y si éste ha crecido hacia áreas cercanas.
- Si el cáncer ha alcanzado a los ganglios linfáticos (nódulos, N) cercanos.
- Si el cáncer ha hecho metástasis (se ha propagado) a otras partes del cuerpo (M).

Hay otras clasificaciones, como la que se basan en el estado de los receptores de estrógeno, de progesterona y la sobreexpresión de HER2. Esta clasificación va de la mano con el pronóstico del paciente: i) neoplasias de bajo grado, para aquellas que expresan receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP) y ii) neoplasias de alto grado que no presentan RE y RP, pero en las cuales hay sobreexpresión o amplificación de HER2⁴⁷.

4.6 Diagnóstico del cáncer de mama

Algunos de los métodos utilizados para diagnóstico de cáncer de mama y sobre todo para determinar el pronóstico de la enfermedad es la inmunohistoquímica y amplificación para validación de expresión de HER2/neu. Existen otros oncogenes asociado al cáncer de mama como, la familia de genes ras, bcl-2, genes supresores de tumores Rb, BRCA-1, BRCA-2, p53 y genes asociados a la respuesta inmune NOS2, IFNG, TNF- α , entre otros. La mutación de estos genes se ha relacionado con un riesgo elevado de desarrollar este tipo de cáncer²⁷.

De acuerdo a la NOM-041-SSA2-2001, para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama el diagnóstico temprano se realiza con exploración física, ultrasonido y mastografía de tamizaje. Si se encuentra una masa se debe proceder a una biopsia para su análisis. En personas portadoras

de mutaciones de BRCA1/BRCA2 este deberá ser efectuado en un servicio especializado de patología mamaria o en un servicio de oncología⁴⁸.

El análisis de la(s) muestra(s) extraídas durante la biopsia le permite al médico obtener más información acerca de características específicas de un cáncer, lo cual ayuda a determinar las opciones de tratamiento y define el pronóstico del paciente⁴⁹.

- **Características del tumor.** El examen microscópico del tumor se usa para determinar si es invasivo o *in situ*, ductal o lobular y si el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos. También se examinan los márgenes o bordes del tumor, y se mide la distancia con respecto al tumor, lo que se denomina ancho de margen.
- **ER y PR.** Las pruebas de ER y PR ayudan a determinar el riesgo de recurrencia de la paciente y el tipo de tratamiento que tiene más probabilidades de disminuirlo. En general, la terapia hormonal es eficaz para los tipos de cáncer ER o PR positivos.
- **HER2.** El estado del HER2 ayuda a determinar si los fármacos dirigidos al receptor del HER2, por ejemplo: el uso de anticuerpos terapéuticos como el trastuzumab (Herceptin) puede ayudar a tratar el cáncer. Además, alrededor del 50% de los tumores HER2 positivos también tienen receptores hormonales y las pacientes se pueden beneficiar con ambos tipos de terapia: hormonal y dirigida al HER2.
- **Grado.** Con la biopsia también se determina el grado del tumor, que hace referencia a la diferencia que existe entre las células cancerosas y las células sanas y si su aspecto es de crecimiento rápido o lento. Existen tres grados: grado

1 (altamente diferenciado), grado 2 (moderadamente diferenciado) y grado 3 (poco diferenciado).

La medición de la cantidad de citoqueratinas (un tipo de marcador tumoral) específicas en la sangre puede ayudar a planificar el tratamiento del cáncer, determinar si este es eficaz o si el cáncer reincidió⁴⁴.

Dentro del diagnóstico también se realizan pruebas genómicas como:

- **Oncotype Dx™**. Esta prueba se realiza en mujeres con cáncer de mama ER positivo en estadio I o estadio II, que recibieron tratamiento con terapia hormonal sola; evalúa 16 genes relacionados con el cáncer y 5 genes de referencia para estimar el riesgo de reaparición del cáncer en un lugar que no sea la mama ni los ganglios linfáticos cercanos, en el término de 10 años después del diagnóstico²⁸.
- **Mammaprint™**. Esta prueba utiliza información de 70 genes para predecir el riesgo de reaparición del cáncer de mama de bajo riesgo y en estadio temprano²⁸.

4.7 Tratamiento del Cáncer de Mama

4.7.1 Cirugía

La cirugía es la extirpación del tumor y el tejido circundante durante una operación; también se utiliza para evaluar los ganglios linfáticos cercanos debajo del brazo o axilares. En general, cuanto más pequeño es el tumor, más opciones quirúrgicas tienen las pacientes. Los tipos de cirugía incluyen los siguientes:

- Una lumpectomía, que consiste en la extirpación del tumor y de un pequeño margen de tejido sano sin cáncer alrededor del mismo, pero queda la mayor parte de la mama³⁹.
- La mastectomía es la extirpación quirúrgica de toda la mama y existen diversos tipos de esta dependiendo si se conserva la piel o el pezón³⁹.

4.7.2 Radioterapia

La radioterapia es el uso de rayos X u otras partículas con alta potencia para matar las células cancerosas. El tipo más frecuente de tratamiento con radiación se denomina radioterapia con haz externo, que es radiación administrada desde una máquina externa al cuerpo. Cuando se administra tratamiento con radiación usando un catéter en el quirófano, se llama radioterapia intraoperatoria. Si se administra colocando fuentes radiactivas en el tumor, se llama braquiterapia. Con mayor frecuencia, la radioterapia se administra luego de una tumorectomía y en ocasiones también se de una quimioterapia adyuvante. Con la cirugía y la radioterapia modernas, los índices de recurrencia en la mama ahora son menores del 5 % en los 10 años posteriores al tratamiento y la supervivencia, por lo general, es la misma con una lumpectomía que con una mastectomía. La radioterapia neoadyuvante se aplica antes de la cirugía para disminuir el tamaño de un tumor grande y facilitar su extirpación³⁹.

4.7.3 Quimioterapia

La quimioterapia es el uso de fármacos para destruir las células cancerosas, que actúa al inhibir su capacidad para proliferar y dividirse. Algunos de los métodos

frecuentes para administrar quimioterapia incluyen un tubo intravenoso (i.v.) que se coloca en una vena con una aguja, o una pastilla o cápsula por vía oral.

La quimioterapia se administra como neoadyuvante antes de la cirugía para reducir el tamaño de un tumor grande, o después de ésta, para reducir el riesgo de recurrencia (quimioterapia adyuvante); también se puede aplicar cuando una paciente tiene una recurrencia del cáncer de mama metastásico.

Los fármacos usados con mayor frecuencia para el tratamiento del cáncer de mama son fluorouracilo (antimetabolito que se une de forma irreversible a la enzima timidilato sintasa, esencial para la síntesis de nucleótidos de timina), ciclofosfamida (agente alquilante que inhibe síntesis de ADN), doxorubicina (antibiótico que se une covalentemente al ADN inhibiendo su biosíntesis y el avance de la topoisomerasa II que desenrolla el ADN en la transcripción), taxanos (impiden la unión de microtúbulos, mediante estabilización de GDP y destruyen el huso mitótico durante la mitosis) y cisplatino que interfiere en la construcción del ADN a través de distintos mecanismos, como uniones intracatenarias, cruces entre cadenas e interacción con proteínas celulares, alterando la mitosis celular, el ADN dañado dispara mecanismos de reparación lo que acaba generando la apoptosis de la célula cuando esta reparación resulta imposible³⁹.

4.7.4 Terapia Dirigida

La terapia dirigida es un tratamiento que apunta a los genes, a las proteínas específicos del cáncer, o a las condiciones del tejido que contribuyen al crecimiento y a la supervivencia del mismo. Estos tratamientos son muy focalizados y son

distintos de la quimioterapia; se basan en bloquear el crecimiento y la diseminación de las células cancerosas y limitar el daño a las células sanas.

Las primeras terapias dirigidas aprobadas para el cáncer de mama fueron las terapias hormonales o endócrinas, un tratamiento eficaz para la mayoría de los tumores que tienen los receptores de estrógeno o los receptores de progesterona (ER positivo o PR positivo), tanto en el cáncer de mama en estadio temprano como en el metastásico. Este tipo de tumor usa hormonas para estimular su crecimiento, por lo que bloquearlas puede ayudar a prevenir la recurrencia del cáncer y la muerte de los pacientes cuando se utiliza en un estadio temprano de la enfermedad, ya sea como único tratamiento o después de la quimioterapia.

Otras terapias están dirigidas al HER2 para tratar el cáncer de mama con HER2 positivo y pueden administrarse junto con la quimioterapia. Un ejemplo es el uso de trastuzumab combinado con taxanos. Los medicamentos más nuevos, que incluyen palbociclib (Ibrance) y Everolimus (Afinitor), son terapias dirigidas aprobadas para el cáncer de mama metastásico con ER positivo y con HER2 negativo.

Algunos ejemplos de medicamentos para terapia dirigida son:

- Tamoxifeno. El tamoxifeno es un medicamento que bloquea el estrógeno e impide su fijación a las células del cáncer de mama.
- Inhibidores de la aromatasa (AI). Los AI disminuyen la cantidad de estrógeno producido por los tejidos que no son de los ovarios en las mujeres postmenopáusicas al bloquear la enzima aromatasa, que cambia las hormonas

masculinas débiles, llamadas andrógenos, a estrógenos cuando los ovarios dejan de producir estrógenos durante la menopausia. Entre estos medicamentos se incluyen el anastrozol (Arimidex), el letrozol (Femara) y el exemestano (Aromasin).

- El trastuzumab está aprobado para el tratamiento del cáncer de mama con HER2 positivo avanzado y como terapia adyuvante para el cáncer de mama con HER2 positivo no metastásico. Actualmente, los pacientes con cáncer de mama en estados de I a III, a menudo reciben un régimen basando en trastuzumab que incluye una combinación de trastuzumab con quimioterapia seguida de un año de trastuzumab adyuvante. Para el cáncer metastásico, el trastuzumab se puede administrar en combinación con diferentes tipos de quimioterapia.
- El pertuzumab (Perjeta) está aprobado para el tratamiento del cáncer de mama avanzado y se está estudiando como un tratamiento para la enfermedad en estadio temprano. Las investigaciones demuestran que agregar pertuzumab al trastuzumab y la quimioterapia para el cáncer de mama avanzado aún no tratado ni con quimioterapia ni con trastuzumab aumenta la efectividad del tratamiento y alarga la vida con pocos efectos secundarios adicionales^{27,28,39,47}.

4.8 Efectos secundarios del tratamiento para cáncer de mama

En los últimos años ha tomado vital importancia la mitigación de los efectos secundarios de la quimioterapia, radioterapia y terapias dirigidas para mejorar la calidad de vida del paciente; estos efectos secundarios son varios y van desde dolor de cabeza, fatiga, náuseas, pérdida de cabello, salpullido, malestar estomacal hasta

daño nervioso, depresión severa, sangrado rectal o rigidez articular. En el caso de quimioterapéuticos como el cisplatino se ha visto resistencia por parte de las células cancerosas después de las primeras aplicaciones. Frecuentemente, la quimioterapia, radioterapia y terapias dirigidas van combinadas con analgésicos para reducir el dolor y la terapia psicológica. En algunos países como en Estados Unidos el uso de la Cannabis sativa (marihuana) en diferentes presentaciones es legal y efectiva para tratamiento del dolor, vómito y náuseas, además de que ha funcionado para reducir algunos tumores sólidos en el cáncer^{28,46}.

5. Modelos de estudio del cáncer *in vivo* e *in vitro*

Para la investigación del cáncer se utilizan diferentes modelos *in vivo* e *in vitro*. En el caso de los modelos *in vitro* algunos ejemplos son el cultivo celular en monocapa, esferoides y cultivo celular tridimensional; por otro lado, los modelos *in vivo* pueden ser tumores espontáneos, tumores inducidos por virus, radiación y químicos y modelos de tumores trasplantables en los que se realiza el trasplante fuera del órgano blanco a los que se les llaman heterotópicos o en el órgano blanco llamados ortotrópicos. También pueden ser isogénicos si la especie del donador y receptor son iguales y xenogénicos cuando la especie del donador y el receptor son diferentes. Así mismo, hay modelos de tumores transgénicos y knockout⁵⁰.

6. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los medicamentos utilizados actualmente son lesivos para el organismo y en muchas ocasiones no son curativos ni evitan metástasis; por esto, se ha trabajado en el desarrollo de nuevos fármacos, menos agresivos o que coadyuven a los tratamientos ya establecidos; tal es el caso del *Agave mapisaga* que se sabe contiene saponinas, a las que se les han atribuido actividades antifungales, antibacterianas y citotóxicas para las células cancerosas.

7. HIPÓTESIS

El extracto de *Agave mapisaga* es citotóxico en células 4T1 cultivadas *in vitro* y su administración oral en ratones isotransplantados con cáncer de mama reduce la implantación, el tamaño tumoral y la metástasis.

8. OBJETIVO

Evaluar el efecto del extracto de *Agave mapisaga*, en el tumor primario y metástasis de ratones isotrasplantados con cáncer de mama, para investigar su potencial coadyuvante en el tratamiento de cáncer de mama.

9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la citotoxicidad ejercida por el extracto acuoso del *Agave mapisaga* en células de cáncer de mama *in vitro*.
2. Establecer el modelo murino de isotrasplante con células de cáncer de mama para identificar el establecimiento del tumor primario y metástasis espontánea.
3. Evaluar el efecto del *Agave mapisaga* en el desarrollo tumoral y la metástasis inducida en ratones isotrasplantados.

10. MATERIAL Y MÉTODOS

El protocolo fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la Facultad de Química con oficio FQ/CICUAL/183/17 y del Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia con número MC-2017/2-4, ambas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

10.1 Ensayo *in vitro* de citotoxicidad de extracto de *Agave mapisaga*.

Las células 4T1 se adquirieron de ATCC®. Estas son células triple negativas, utilizadas para el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica espontánea (en el pulmón, el bazo, el hígado, los ganglios linfáticos y el cerebro) en ratones BALB/c; imitan al cáncer de mama humano y las células son resistentes a la 6-tioguanina. El medio base para esta línea celular es el RPMI con 10% de suero fetal bovino (SFB)^{51,52}.

Se realizó el ensayo de citotoxicidad con 10,000 células 4T1 en 100 µl por pozo, a las que se les agregó el extracto acuoso de *Agave mapisaga*, probado en el trabajo de Peralta PH²⁰, utilizando 10 µl de agave a concentraciones de 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 mg/ml por 24 h, colocadas en 8 pozos por placa con un total de tres placas. Se utilizó como control positivo 10 µl cisplatino (®PISA) a concentraciones de 0.34, 0.78, 1.56, 3.15 y 6.25 µg/ml por 24 h y como control negativo se colocaron 10 µl de PBS o medio de cultivo²⁰.

Para determinar la viabilidad celular se realizó la tinción de sulforodamina B (SRB) de acuerdo al Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) de la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC) de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (Anexo 1)

Se utilizó como variable de respuesta la viabilidad celular y a los datos obtenidos se les realizó una curva probit, para obtener la concentración inhibitoria al 50% (CI50%); también se realizó prueba de normalidad, homogeneidad de varianzas y Kruskal-Wallis, todos los análisis estadísticos se realizaron en IBM SPSS Statistics 20.

10.2 Estandarización del modelo de isotrasplatación murino de cáncer de mama.

Para la estandarización del modelo de isotrasplatación murino de cáncer de mama se realizó el método de trasplante ortotrópico en ratonas BALB/c. Se determinaron los tiempos en los que se implantó el tumor y se hizo una descripción del tumor de forma macro y microscópica. Asimismo, se encontró el momento de sacrificio adecuado según el crecimiento del tumor, la aparición de metástasis y la viabilidad de los ratones. Para obtener estos datos se realizaron dos fases:

Fase 1

Se inocularon 4 grupos de 4 ratones BALB/c hembra de 8-12 semanas de edad, con 1×10^5 y otros 4 grupos con 4 ratones con 1×10^6 células 4T1, en PBS y se colocaron 100 μ l vía subcutánea en glándula mamaria abdominal (anexo 2). Se contó con 4 tiempos de eutanasia a los 12, 20, 25 y 35 días post inoculación de las células 4T1. Al realizar la necropsia, se obtuvo el tumor para su descripción macroscópica y

microscópica por histopatología, se midió el ancho y largo y se obtuvo su peso; también se extrajeron el hígado y bazo, los cuales se pesaron y se dispusieron para histopatología. Por último, el pulmón se perfundió con solución de Bouin (anexo 3). El número de animales se determinó por proporciones reportadas con $\pi=0.85$ y $\beta=0.1$ ^{11,35,49,53-57}.

Fase 2

Se inocularon 4 grupos de 3 ratones BALB/c hembra de 8-12 semanas de edad, inoculados con 1×10^5 células 4T1, en PBS y se colocaron 100 μ l vía subcutánea en glándula mamaria abdominal (Anexo 2). También se utilizaron 4 ratones a los que no se le inocularon células (sanos). Se tuvieron 4 tiempos de sacrificio a los 14, 20, 27 y 34 días post inoculación de células 4T1; al sacrificio se obtuvieron el tumor para medir ancho y largo, peso e histopatología, el hígado y bazo, a los que se les realizó, histopatología y el pulmón se perfundió con solución de Bouin (anexo 3)^{11,35,49-54}.

La eutanasia en todos los ensayos de este trabajo se realizó con cámara de CO₂, de acuerdo a lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999 (9.4.1.3) para mamíferos. Los órganos fueron enviados al área de patología de la UNIPREC y se procesaron de acuerdo a sus protocolos estándar para análisis histopatológico.

10.3 Efecto *in vivo* del extracto de *Agave mapisaga* en el tumor primario y metástasis.

Una vez establecido el modelo de isotrasplatación murino y de acuerdo con los resultados del ensayo de citotoxicidad, se determinó el tiempo de sacrificio óptimo, las técnicas para determinar el volumen tumoral, evaluar la metástasis y las dosis del extracto acuoso de *Agave mapisaga*. Para evaluar su efecto en el tumor primario y la metástasis se hicieron dos ensayos (diagrama 1).

Primer ensayo

En el primer ensayo se tuvieron 5 grupos de 10 ratones BALB/c hembras de 8-12 semanas, inoculados con 100 μ l con 1×10^5 células 4T1 en PBS, vía subcutánea en glándula mamaria abdominal (Anexo 2). Los grupos quedaron de la siguiente manera: grupo 1 (*Agave mapisaga* 100 mg/kg), grupo 2 (*Agave mapisaga* 50 mg/kg), grupo 3 (*Agave mapisaga* 25 mg/kg), grupo 4 (agua de bebida) y grupo 5 (cisplatino 3.5 mg/kg). Dando un total de 50 animales. El número de animales se obtuvo de la “Guía para el bienestar y uso de animales en la investigación del cáncer”⁵⁸.

La administración del *Agave mapisaga* se realizó en 100 μ l de agua de bebida, vía oral por sondeo esofágico, una vez al día, comenzando el día 1 post inoculación hasta el día del sacrificio. Para el grupo con cisplatino la administración se realizó vía intraperitoneal los días 3, 6 y 9. El sacrificio se realizó los días 27 y 29 post inoculación. Se obtuvieron el tumor para medir ancho y largo, peso e histopatología;

el hígado y bazo fueron pesados y enviados a histopatología, por último, el pulmón se perfundi6 con soluci6n de Bouin (anexo 3)^{11,20,35,49-54}.

Segundo ensayo

En el segundo ensayo se tuvieron 6 grupos, 5 grupos con 6 ratones y un grupo con 10 ratones, todos BALB/c hembras de 8-12 semanas, inoculados con 100 µl con 1×10^5 c6lulas 4T1 en PBS, vía subcutánea en glándula mamaria abdominal (Anexo 2). Los grupos quedaron de la siguiente manera: grupo 1 (*Agave mapisaga* 250 mg/kg) este fue el único grupo con 10 ratones, grupo 2 (*Agave mapisaga* 100 mg/kg), grupo 3 (*Agave mapisaga* 50 mg/kg), grupo 4 (*Agave mapisaga* 25 mg/kg), grupo 5 (agua de bebida) y grupo 6 (cisplatino 3.5 mg/kg, ®Pisa). Dando un total de 40 animales. La administraci6n del *Agave mapisaga* se realiz6 en 100 µl de agua de bebida, vía oral por sondeo esofágico, una vez al día, del día 1 hasta el día del sacrificio. Para el grupo con cisplatino la administraci6n se realiz6 vía intraperitoneal los días 1, 5 y 9. El sacrificio se realiz6 el día 27 post inoculaci6n y se obtuvieron el tumor para medir ancho y largo, peso e histopatología; el hígado y bazo fueron pesados y enviados a histopatología y el pulm6n se perfundi6 con soluci6n de Bouin (Anexo 3)^{11,20,35, 49-54}.

Las variables respuesta fueron la implantaci6n tumoral, volumen tumoral, peso del tumor, n6mero de focos metastásicos en pulm6n y peso de hígado y bazo. Se realiz6 la prueba de normalidad y homogeneidad de varianzas, ANOVA, Dunett y Kruskal-Wallis dependiendo el caso, utilizando IBM SPSS Statistics 20. El volumen tumoral se obtuvo con la siguiente f6rmula:

$$\text{Volumen tumoral (cm}^3\text{)} = \frac{[(\text{longitud en cm}) \times (\text{ancho en cm})^2 \times \pi]}{6}$$

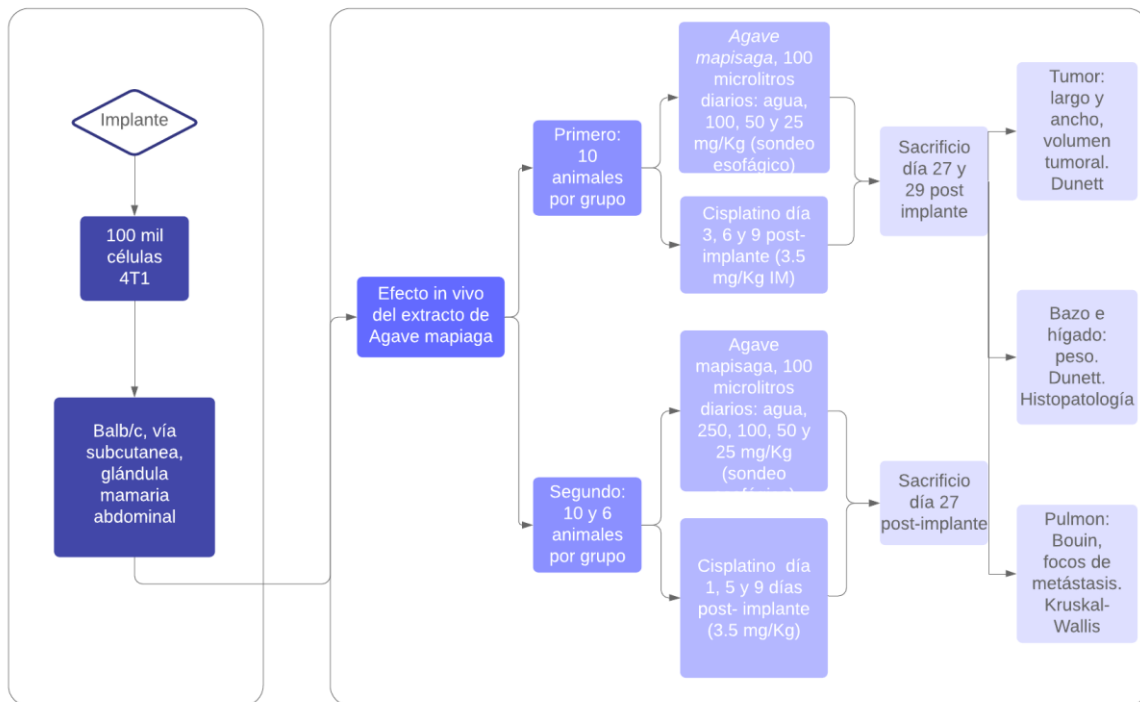
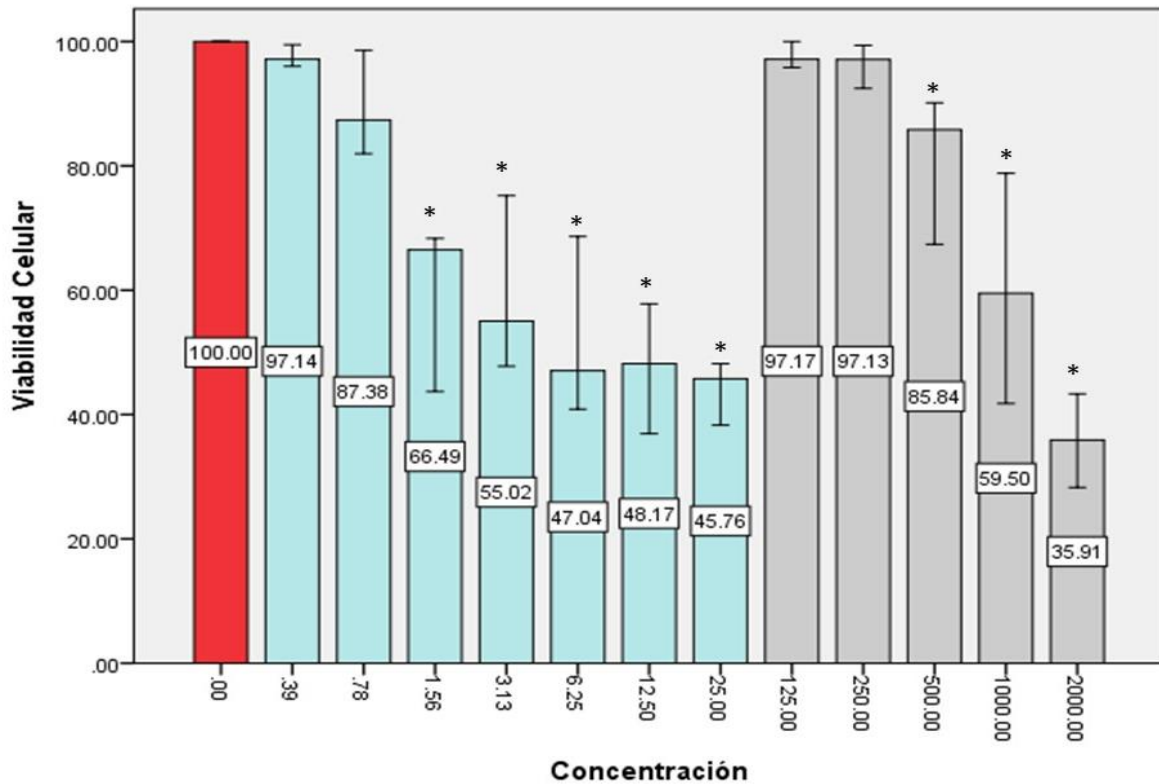


Diagrama 1. Efecto in vivo del Agave mapisaga. Metodología utilizada en los dos ensayos para demostrar el efecto del agave en el tumor primario y la metástasis

11. RESULTADOS

11.1 Ensayo *in vitro* de citotoxicidad del *Agave mapisaga*.

Al realizar la curva probit con los datos de la viabilidad celular obtenidos del ensayo de citotoxicidad con *Agave mapisaga* a diferentes concentraciones, en las células 4T1 se encontró que la IC50% del *Agave mapisaga* fue de 1605 $\mu\text{g/ml}$ (1.605 mg/ml) con un límite inferior de 1365 $\mu\text{g/ml}$ (1.365 mg/ml) y un límite superior de 1935 $\mu\text{g/ml}$ (1.935 mg/ml) con una confianza del 95% y la del cisplatino 7.231 $\mu\text{g/ml}$ con límite inferior 5.741 $\mu\text{g/ml}$ y un límite superior de 9.216 $\mu\text{g/ml}$ con 95% de confianza. Se realizó la prueba de normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos y no se cumplió con estas dos características por lo que éstos se analizaron con la prueba Kruskal-Wallis en la que se encontró diferencia estadística a partir de la dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$ de *Agave mapisaga* y 1.56 $\mu\text{g/ml}$ de cisplatino (gráfica 1); por lo tanto, el *Agave mapisaga* fue citotóxico a partir de 500 $\mu\text{g/ml}$ en células 4T1.



Gráfica 1. Viabilidad de células 4T1. Gráfica de barras del porcentaje de células 4T1 vivas (viabilidad celular) después de su tratamiento con *Agave mapisaga* y cisplatino a diferentes concentraciones en microgramos con índice de confianza del 95%. La barra roja representa el control de células a las que se les adicionó PBS. Las barras azules representan las células a las que se les adicionó cisplatino a concentraciones de 0.34, 0.78, 1.56, 3.15 y 6.25 $\mu\text{g/ml}$ y las barras grises a las que se les adicionó *Agave mapisaga* a concentraciones de 125, 250, 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g/ml}$. Los asteriscos representan las células tratadas con cisplatino o *Agave* que presentaron diferencia significativa con respecto al control (barra roja) en la prueba Kruskal-Wallis con $\alpha=0.05$.

11.2 Estandarización del modelo de isotrasplatación murino de cáncer de mama.

Descripción del trasplante y desarrollo del tumor

En la imagen 1 se observa el implante de las células 4T1 realizado por vía subcutánea en la glándula mamaria inguinal craneal izquierda (anexo 2).



Imagen 1. Trasplante ortotópico de células 4T1 en glándula mamaria. Imagen representativa del trasplante de células 4T1 en ratones BALB/c hembras de 8-12 semanas de edad.

Al momento de realizar el trasplante y durante el ensayo se observó que el crecimiento y forma del tumor depende en gran medida de la ejecución de dicho trasplante. Los tumores a los que se les realizó un trasplante efectivo crecieron circulares, una parte creció hacia dentro y otra hacia fuera de la cavidad abdominal; mientras más grandes fueron (alrededor de 2 cm) estos perdieron la forma circular

inicial, sobre todo la parte que creció por dentro. Cuando el implante fue menos exitoso los tumores crecieron hacia adentro de forma irregular, ovalada y aplanada. En ocasiones, por error en el trasplante, algunas células pudieron ser inoculadas en peritoneo presentándose tumores en hígado, estómago y linfonodos mesentéricos, acelerando la muerte del ratón, por lo que estos últimos no fueron incluidos en el estudio (imagen 2). En la fase 1 se presentó deceso de 4 animales inoculados con 1 millón de células debidas a que no se realizó el implante adecuadamente (gráfica 2).

Los tumores formaron varios vasos sanguíneos que crecieron alrededor de él y adhirieron a las capas inferiores de la piel.

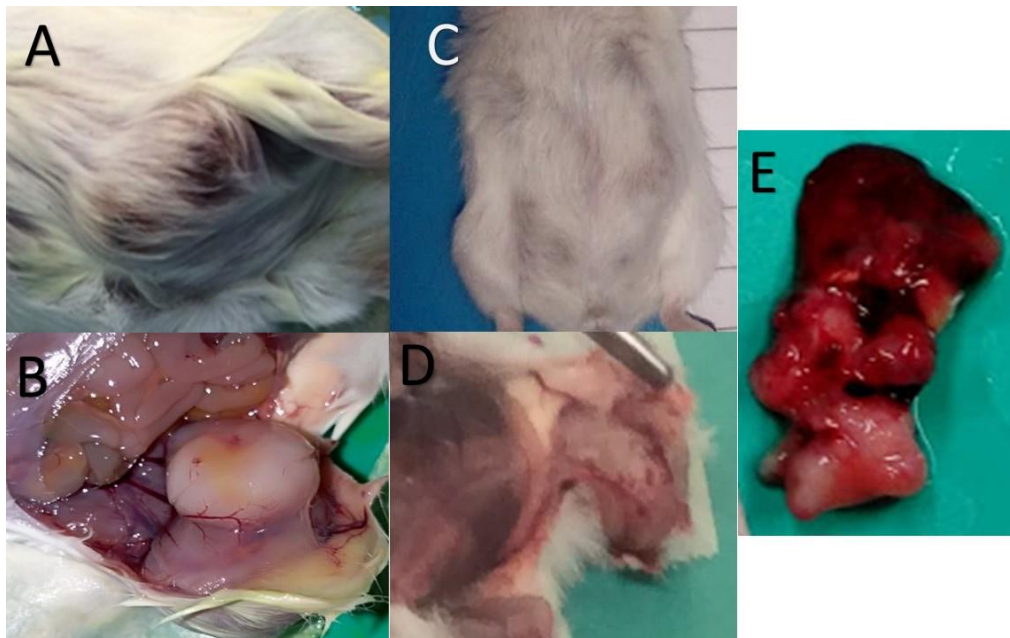


Imagen 2. Crecimiento del tumor en glándula mamaria. Después del trasplante de las células 4T1 en glándula mamaria se observó el crecimiento del tumor. Se muestran fotos representativas de los tumores, en el panel A se puede observar un tumor circular por fuera y en el panel B el mismo tumor observado por dentro, en el cual, se pueden observar las venas que se forman alrededor de él; en

el panel C se muestra un tumor que creció por dentro y en el panel D se muestra el mismo tumor una vez diseccionado, en el que se puede ver la pérdida de forma característica del mismo y en el panel E un tumor en hígado y estómago, el cual, se forma al inocular células en peritoneo.

Descripción histológica del tumor y metástasis

Tumor: en el tejido subcutáneo se observaron múltiples nódulos de gran tamaño, no encapsulados, mal delimitados e infiltrantes, conformados por un manto sólido de células epiteliales poliédricas y en ocasiones fusiformes, sostenidos por escaso estroma fibrovascular. Las células fueron de tamaños variables, con abundante citoplasma eosinofílico pálido, bien definido, con uno o dos núcleos basofílicos ovalados de diversos tamaños, centrales, con condensación fina de la cromatina y en ocasiones 1-2 nucléolos evidentes; además, se observaron 2 mitosis atípicas por 10 campos de gran aumento. Multifocalmente, se observaron áreas de necrosis y en ocasiones se vieron linfocitos, células plasmáticas y algunos neutrófilos infiltrando la neoplasia.

Metástasis: se encontraron células con las mismas características que las del tumor expandiendo y reemplazando el parénquima hepático y esplénico. En la imagen 3, 4 y 5 se puede observar la descripción del tumor en la glándula mamaria y la metástasis en bazo e hígado.

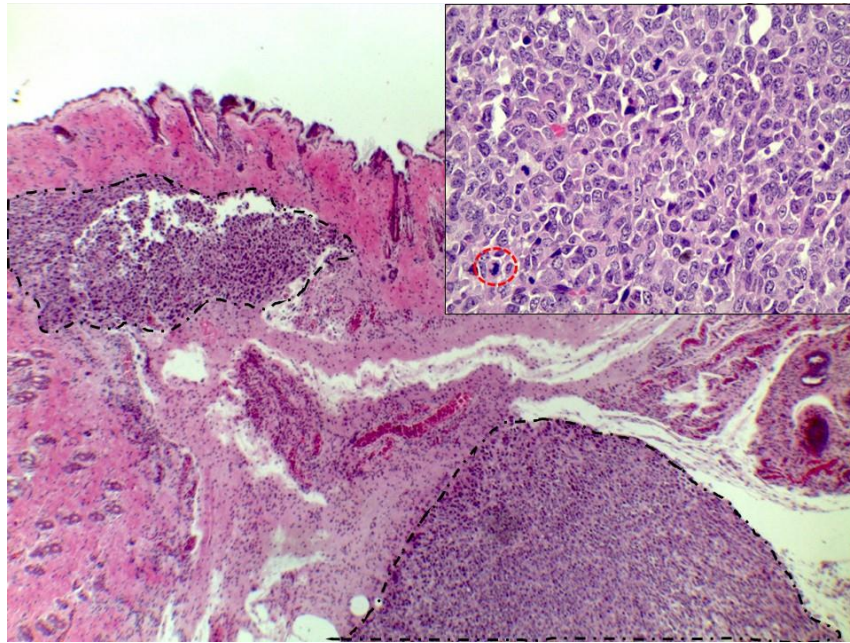


Imagen 3. Sección histológica de piel y glándula mamaria. Objetivo 4X y 40X, tinción H&E. Por debajo de dermis profunda, se aprecian zonas hipercelulares mal delimitadas, no encapsuladas (líneas negras) que infiltran el tejido adiposo subcutáneo. En un acercamiento (recuadro superior derecho), dichas áreas están conformadas por células poliédricas, dispuestas en mantos sólidos, poseen un citoplasma eosinofílico de bordes poco distinguibles, su núcleo es de redondo a oval y con un nucléolo evidente. Hay un alto conteo de mitosis atípicas (circulo rojo).

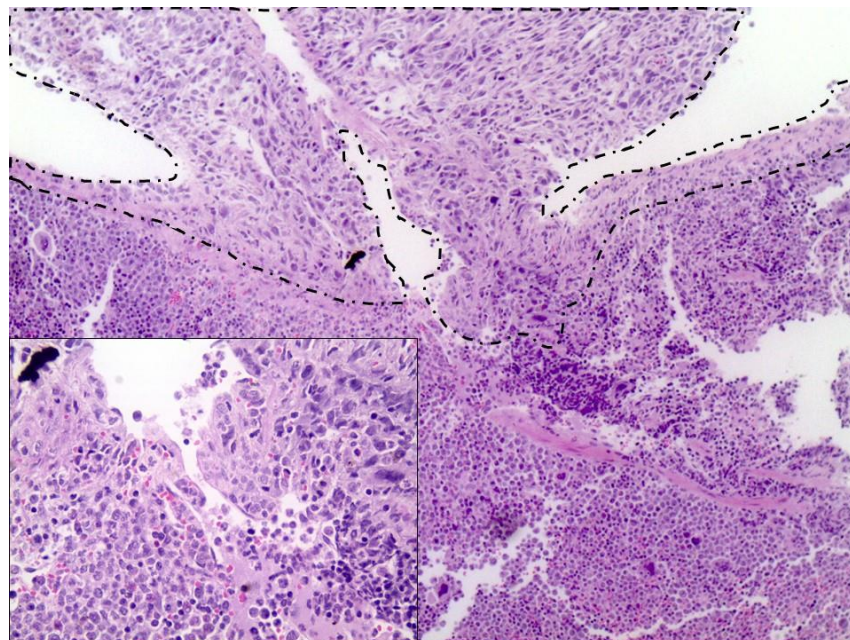


Imagen 4. Sección histológica de bazo. Objetivos 10X y 40X , H&E. A un costado del parénquima esplénico, se aprecian zonas celulares (línea negra), conformadas por células poliédricas, dispuestas en grupos más delimitados en un acercamiento (recuadro inferior izquierdo), poseen citoplasma eosinofílico, de bordes mal definidos, el núcleo es de cromatina fina granular y con un nucléolo evidente.

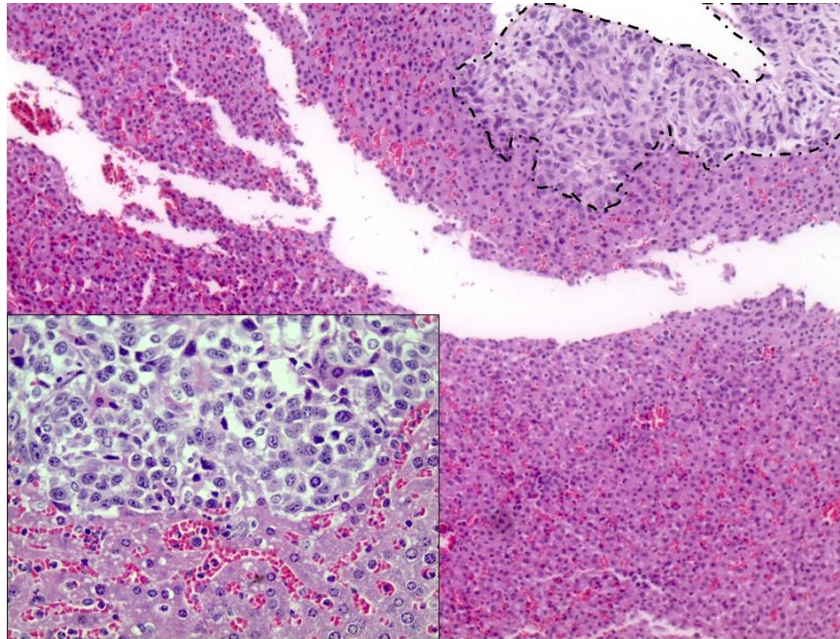


Imagen 5. Sección histológica de hígado. Objetivos 4 y 40X, tinción H&E. Se observa un área hiper celular que sustituye porciones del parénquima hepático en un acercamiento (recuadro inferior izquierdo) se observan células neoplásicas poliédricas que presentan las mismas características histomorfológicas a las descritas en las secciones de glándula mamaria.

Implantación tumoral

Se consideró como el momento en el cual las células utilizadas encuentran un nicho óptimo en el que se establecen y que permite el crecimiento gradual del tumor. Pudo observarse que, una vez que el pezón de la glándula mamaria en el que se realizó el trasplante se puso duro, comenzó el crecimiento gradual del tumor y este se pudo

palpar o medir, por lo tanto, el pezón duro fue la referencia tomada como el momento de implantación.

En la primera fase del establecimiento del modelo se observó, que los tumores de los ratones inoculados con 1 millón de células (1×10^6) se implantaron de forma más temprana: el 60% de los tumores se implantaron en los ratones alrededor del día 8, a diferencia de los inoculados con 100 mil células (1×10^5), en los que sus tumores se implantaron por el día 10, de la misma forma se presentó un tumor medible o palpable (cuadro 1). Solo los tumores que crecieron por fuera se pudieron medir, mientras que, los que crecieron dentro sólo se palparon.

En el cuadro 1, se puede observar que entre más grande fue el número de células que se implantaron más temprana fue la implantación y el momento en el que un tumor se puede medir o palpar, existiendo 2 días de diferencia entre la implantación y la posible medición del tumor; así mismo, entre mayor fue el número de células que se implantaron, presentaron mayor volumen tumoral al día de sacrificio (cuadro 2). Cabe señalar que en la fase 1 los animales implantados con un millón de células, fueron sacrificados antes del día 35 post implante (gráfica 2).

En la fase 2 en la que sólo se tuvieron ratones implantados con 100 mil células y ratones sanos, la implantación de los tumores fue más temprana que en la fase 1 (cuadro 1), alrededor del día 5. Al día 34 de la fase 2 los tumores tuvieron un volumen entre 2 y 3.9 cm^3 , que es más elevado que al día 35 en la fase 1 en los ratones con 100 mil células que presentaron volúmenes entre $1.8\text{-}2.8 \text{ cm}^3$ (cuadro 2).

En el cuadro 1 se muestran los tiempos de implantación de los tumores (momento en que los pezones de las ratonas se endurecen) y los tiempos en que los tumores

son medibles o palpables; tanto de la primera fase del estudio (ratones Balb/c implantados con cien mil y un millón de células), como de la segunda fase (ratones implantados con cien mil células). En el cuadro 2 se muestra el rango del volumen que presentaron los tumores en los dos últimos tiempos de sacrificio en la fase 1 (día 25 y 35) y el último tiempo de la fase 2 (día 34). Cabe señalar que en la fase 1 los animales implantados con un millón de células, fueron sacrificados antes del día 35 post implante (gráfica 2).

Cuadro 1. Tiempo de implantación de tumores de glándula mamaria en ratones BALB/c.

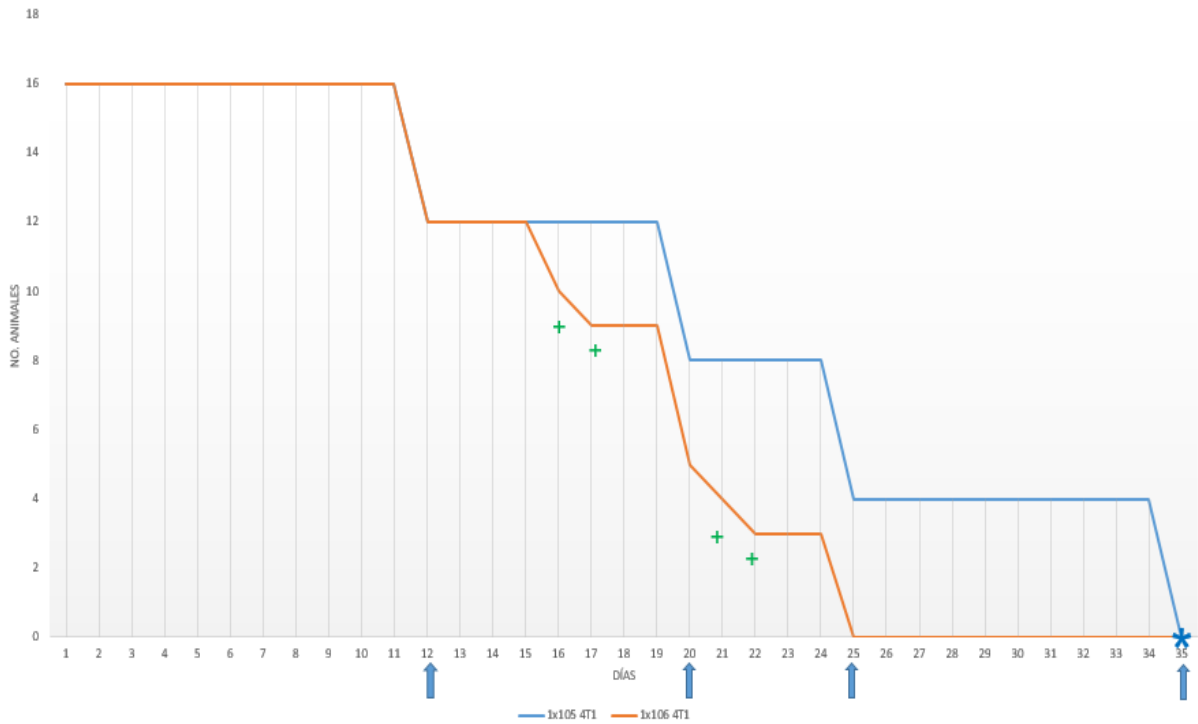
No. de células inoculadas	Día de Implantación	Día en que fue Medible o palpable
FASE 1		
1X10 ⁵	6-12 (60% día 10)	8-14 (60% día 12)
1X10 ⁶	4-12 (60% día 8)	6-14 (60% día 10)
FASE 2		
1X10 ⁵	5-7 (50% día 5)	7-9 (60% día 9)

Cuadro 2. Volumen tumoral en el tiempo.

Nó. de células inoculadas	Día 25	Día 34	Día 35
FASE 1			
1X10 ⁵	0.2-0.7 cm ³	_____	1.8-2.8 cm ³
1X10 ⁶	0.5-0.9 cm ³	_____	_____
FASE 2			
1X10 ⁵	_____	2-3.9 cm ³	_____

Metástasis

En la fase 1 en los animales inoculados con 100 mil células se encontró metástasis al día 35 en pulmón con el método de perfusión con Bouin (gráfica 2, imagen 6). Los animales que se implantaron con 1 millón de células tuvieron un deterioro más temprano que los de 100 mil células, e incluso no llegaron al día 35; hubo 4 ratones muertos en el transcurso del estudio en los animales inoculados con un millón de células; estos presentaron abdomen pendulante, pelo hirsuto, arqueamiento y disminución en el consume de agua o alimento; además de cambios en el comportamiento, tales como disminución de su actividad física (juego, movilidad, hacer nido). En la necropsia se observó esplenomegalia, hepatomegalia y tumores pequeños, pero no se identificó ascitis (gráfica 2).



Gráfica 2. Comportamiento del modelo de isotrasplatación murino en 35 días. Fase 1 de establecimiento del modelo de isotrasplatación murino. La línea roja representa a los animales inoculados con 1 millón de células (1×10^6) y la línea verde los inoculados con 100 mil células (1×10^5), las flechas azules nos indican los días de sacrificio y las cruces verdes los animales muertos durante el estudio. Los asteriscos azules nos muestran los tiempos en los que se encontró metástasis.

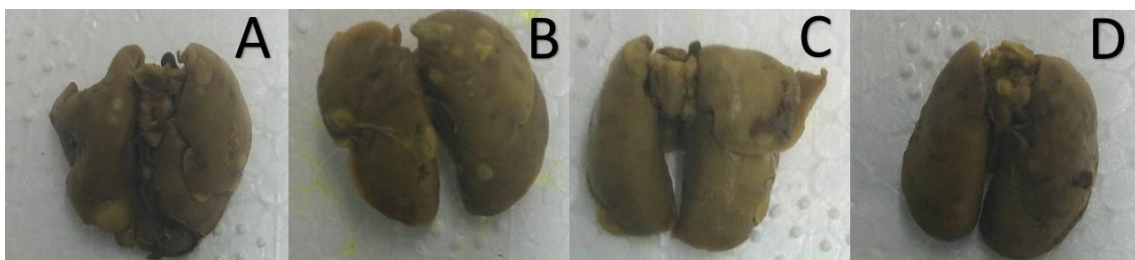


Imagen 6. Perfusión con solución de Bouin. Fotos representativas de metástasis presente en 4/4 pulmones de ratones implantados con 1×10^5 células 4T1 y sacrificados al día 35 post implante. En el panel A y B se observa de color amarillo pálido los focos de metástasis bien definidos y grandes con

30 y 26 focos respectivamente y en el Panel C y D focos de metástasis pequeños y poco visibles, 11 y 7 focos respectivamente.

En la fase dos, en los días 14 y 20 no se encontraron focos metastásicos en pulmón, mientras que en los días de sacrificio 27 y 34 se encontraron focos metastásicos en pulmones perfundidos con solución de Bouin en los 2/2 ratones sacrificados en cada tiempo. Los ratones sanos no presentaron focos metastásicos en pulmón.

11.3 Efecto *in vivo* del extracto de *Agave mapisaga* en el tumor primario y metástasis.

- Primer ensayo

Debido a los resultados obtenidos al establecer el modelo *in vivo* se decidió realizar el implante de los ratones con cien mil células y se realizó el sacrificio a los días 27 y 29.

Implantación

En el cuadro 3 se muestran los días de implantación. Esta ocurrió en los días 4 al 8 en los grupos tratados con *Agave mapisaga*, 5 al 7 en el control de agua y del día 5 al 11 en los tratados con cisplatino. Los días en que fue medible o palpable el tumor van del día 7 al 9 en los tratados con *Agave mapisaga* y a los que se les dio agua, y del día 7 al 11 en los que se trataron con cisplatino. Estos resultados (tanto de la implantación como del momento en que el tumor es medible o palpable) fueron muy parecidos a la fase 2 del establecimiento del modelo (cuadro 1). Cabe mencionar que en el grupo de cisplatino la implantación se vio retrasada, por lo tanto, el

crecimiento del tumor para ser medible o palpable, así como, el volumen al día de sacrificio, también.

Cuadro 3. Volumen tumoral y tiempo de implantación y medición de tumores tratados con *Agave mapisaga*.

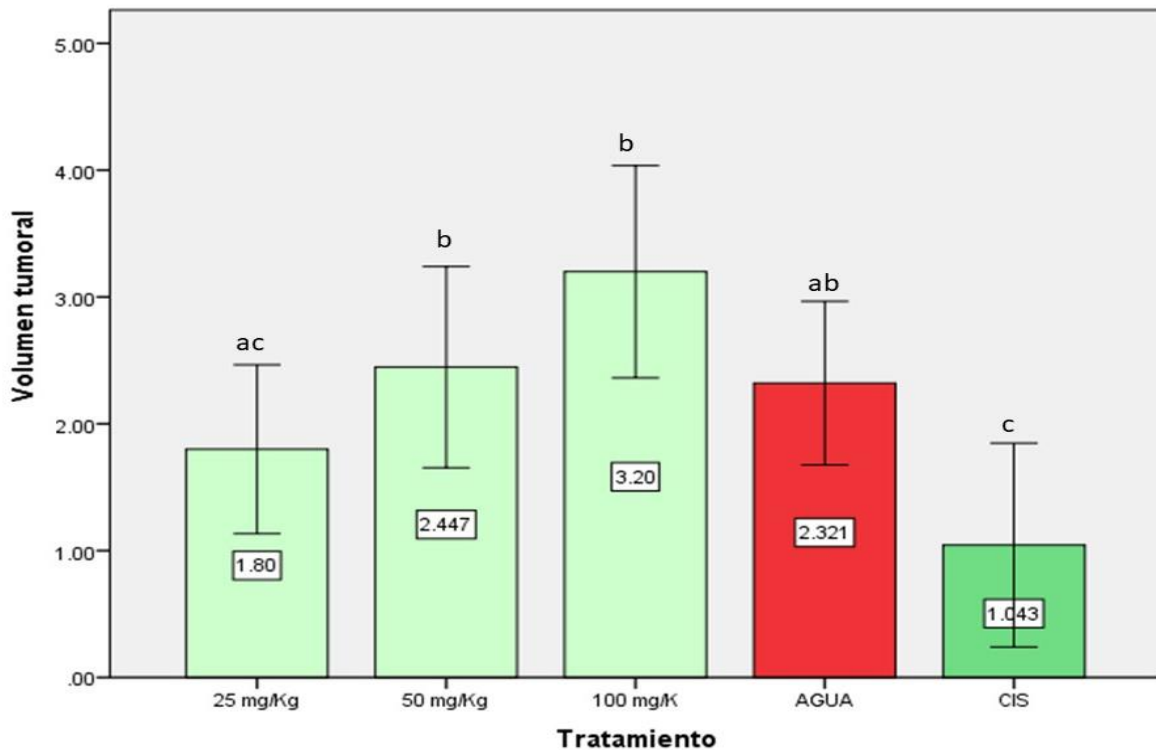
Tratamiento	Implantación	Tumor medible o palpable	Volumen tumoral cm³
25 mg/kg	4-7 (50% día 5)	7-9 (70% día 7)	0.86-2.9
50 mg/kg	5-8 (50% día 7)	7 y 9 (50/50%)	1-5.8
100 mg/kg	4-7 (50% día 6)	7-9 (80% día 7)	1.7-4.4
Agua	5-7 (90% día 5)	7-9 (80% día 7)	1.4-3.9
Cisplatino	5-11 (50% día 9 a 11)	7-25 (60% día 11 a 25)	0.6-2.7

En el cuadro 3 se muestran los tiempos de implantación en días, los tiempos en que los tumores son medibles o palpables y el volumen tumoral de los grupos tratados con diferentes concentraciones de *Agave mapisaga*, los tratados con cisplatino y a los que solo de les dio agua de bebida. Los porcentajes corresponden al día en el que se implantaron más tumores en los diferentes grupos.

Tumor

En la gráfica 3 se puede observar que a dosis creciente del extracto de *Agave mapisaga*, aumentó el volumen de los tumores. En el caso del volumen tumoral se cumplió con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas y no se

encontró evidencia suficiente para decir que el tratamiento con 25 mg/Kg de *Agave mapisaga* redujo el volumen tumoral, a pesar de ser el tratamiento en el cual se observaron los tumores con volumen más pequeño, prueba de Dunnett (con $\alpha=0.05$). Adicionalmente, se realizó una correlación de Pearson con el programa SPSS en la que se encontró un valor de p menor que 0.05 bilateral. Así mismo, se encontró una correlación positiva entre los tratamientos con diferentes concentraciones de *Agave mapisaga* y el agua (25 mg/Kg $r= 0.450$, 50 mg/Kg $r= 0.286$, 100 mg/Kg $r= -0.1$), negativa entre los tratamientos con agave y el cisplatino (25 mg/Kg $r= -0.603$, 50 mg/Kg $r= -0.036$, 100 mg/Kg $r= -0.678$) y entre el cisplatino y el agua existió una correlación negativa ($r= -0.427$). También se encontró una correlación negativa entre el tratamiento de 25 mg/Kg y el de 50 mg/Kg ($r= -0.214$), así como entre la de 50 mg/Kg y 100 mg/Kg ($r= -0.571$). Lo anterior nos indicó que al aumentar la dosis del extracto de *Agave mapisaga* aumentó el volumen tumoral.

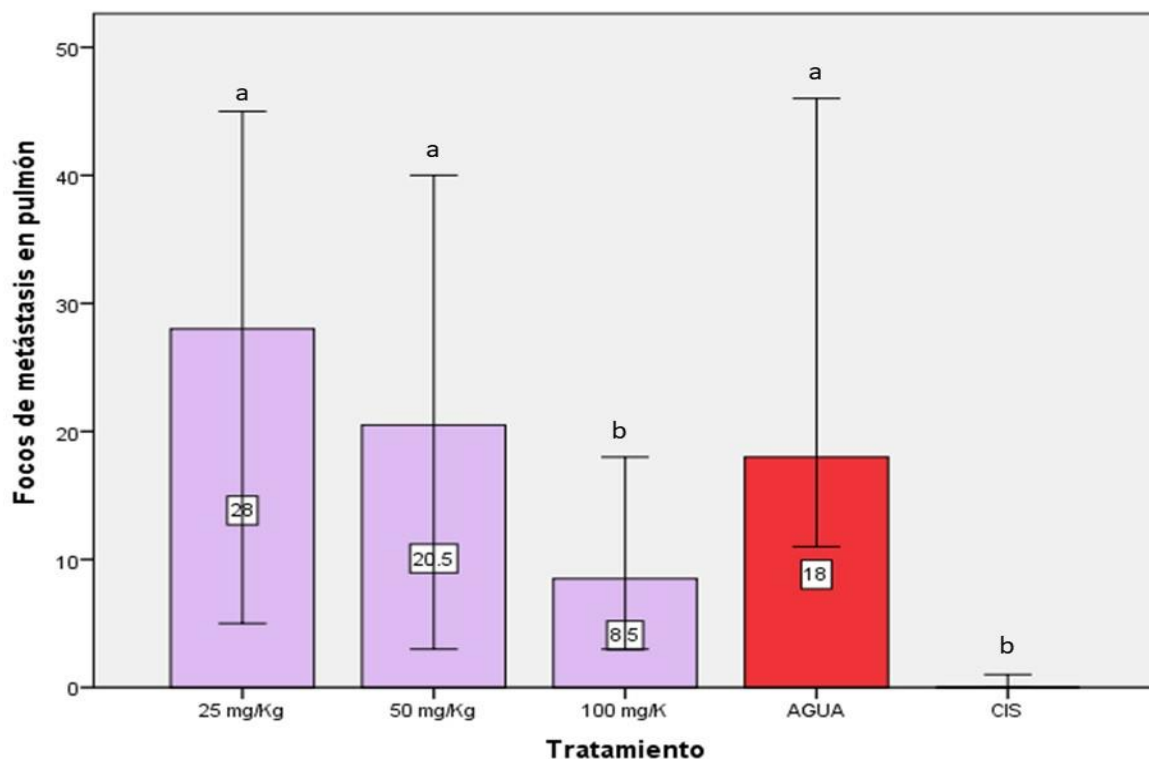


Gráfica 3. Volumen tumoral. Gráfica del volumen tumoral de los grupos tratados con concentraciones de 25, 50 y 100 mg/kg de *Agave mapisaga*, del grupo tratado con cisplatino y del grupo con agua. Letras iguales corresponde a que se acepta $H_0: \mu_1 = \mu_2$ y letras diferentes se rechaza H_0 por lo que no hay evidencia suficiente para decir que las medias son iguales, datos obtenidos de la prueba de Dunnett con $\alpha=0.05$

Metástasis

En la gráfica 4 se puede observar el comportamiento que tuvieron los focos de metástasis en pulmón; conforme aumentó la dosis, disminuyó el número de focos de metástasis. Al conteo de focos metastásicos se le realizó estadística no paramétrica debido a que los datos si presentan normalidad, pero no homogeneidad de varianzas. El cisplatino y la dosis de agave 100 mg/Kg redujeron significativamente el número de focos metastásicos de pulmón con respecto al

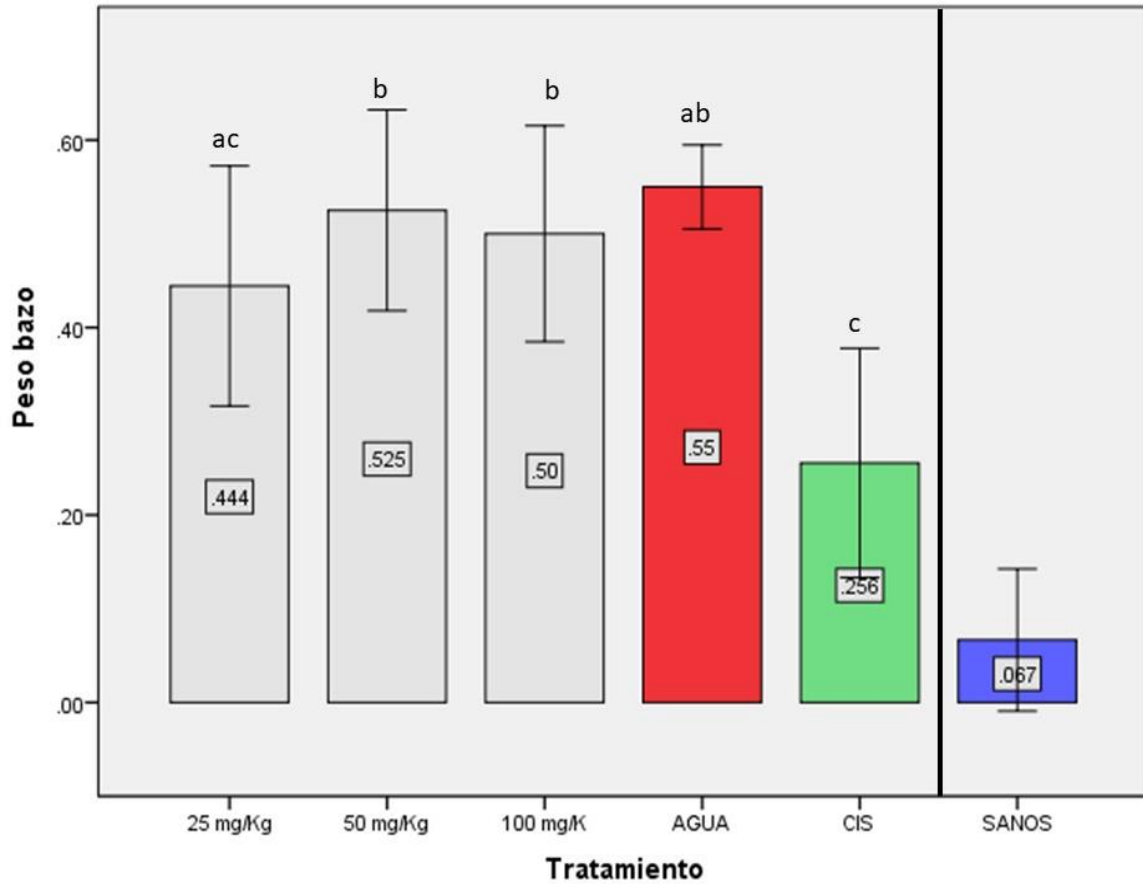
grupo control, como se demostró por el análisis de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney. Adicionalmente, se realizó una correlación de Spearman con el programa SPSS y se encontró una correlación negativa (con un valor de p menor a 0.05) entre los tratamientos con diferentes concentraciones de *Agave mapisaga* y el agua (25 mg/Kg $r = -0.268$, 50 mg/Kg $r = -0.167$, 100 mg/Kg $r = -0.072$); también fue negativa entre los tratamientos y el cisplatino ((25 mg/Kg $r = -0.212$ y 100 mg/Kg $r = -0.408$) excepto con el tratamiento de 50 m/Kg de *Agave mapsaga* ($r = 0.204$), finalmente entre el cisplatino y el agua también se encontró una correlación negativa ($r = -0.204$). Lo anterior nos indicó un efecto decreciente en los focos de metástasis en pulmón, al aumentar la dosis de *Agave mapisaga*.



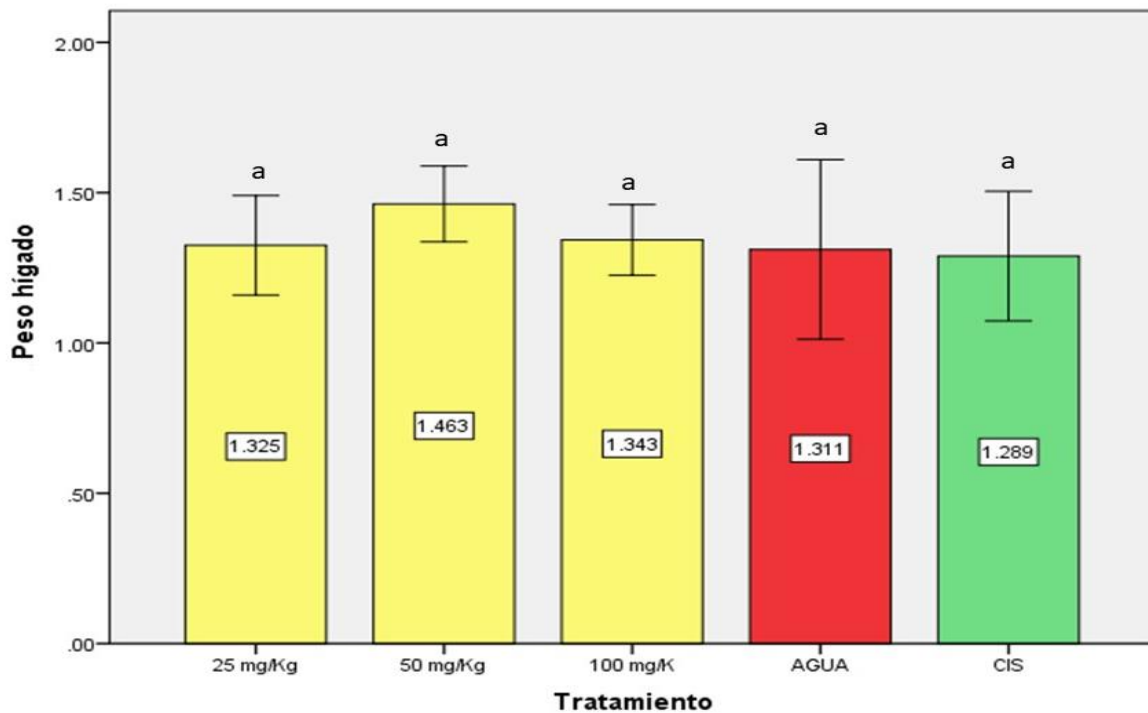
Gráfica 4. Focos de metástasis en pulmón. Gráfica del conteo de focos de metástasis en pulmón perfundidos con solución de Bouin de los grupos tratados con diferentes concentraciones de *Agave mapisaga* (25, 50 y 100 mg/Kg) del grupo tratado con cisplatina y del grupo con agua. Letras iguales corresponde a que se acepta $H_0: \mu_1 = \mu_2$ y letras diferentes se rechaza H_0 por lo que no hay evidencia suficiente para decir que las medias son iguales, datos obtenidos de la prueba de Kruskal-Wallis y U de Mann con $\alpha = 0.05$

Evaluación de bazo e hígado

Al realizar la eutanasia se obtuvo el bazo e hígado de cada animal por grupo de tratamiento, estos fueron pesados y los datos se analizaron estadísticamente. Los datos del bazo e hígado presentaron normalidad y homogeneidad de varianzas por lo que se les realizó un ANOVA y comparación de medias por Dunnett, en los que, pudo observar que en el hígado (gráfica 6) no se presentó ninguna diferencia estadística entre grupos, por lo que el peso de este órgano no fue indicador de enfermedad para este modelo. En el caso de los bazos si hubo diferencia estadística entre grupos: los pesos de los bazos fueron menores en el grupo al que se le administró cisplatino que en el que se dio agua y los pesos de los bazos variaron entre los grupos con las diferentes concentraciones de agave (gráfica 5). En la fase 2 del establecimiento del modelo se tuvieron animales sanos y en los diferentes tiempos de sacrificio sus bazos presentaron pesos menores a los de los grupos tratados con agave, agua y cisplatino de este ensayo (gráfica 5). Macroscópicamente los bazos de los grupos de agua, 25, 50 y 100 mg/Kg presentaron esplenomegalia, por lo tanto, se pudo considerar el peso del bazo como una variable para inferir sobre el estado de salud o la respuesta inmune del animal y probablemente en el grado de metástasis del mismo.



Gráfica 5. Peso del bazo. Gráfica del peso de los bazos en miligramos de los grupos tratados con concentraciones de 25, 50 y 100 mg/kg de *Agave mapisaga*, del grupo tratado con cisplatino y del grupo con agua. Letras iguales corresponde a que se acepta $H_0: \mu_1 = \mu_2$ y letras diferentes se rechaza H_0 por lo que no hay evidencia suficiente para decir que las medias son iguales, datos obtenidos de la prueba de Dunnett con $\alpha = 0.05$



Gráfica 6. Peso del Hígado. Gráfica de pesos de los hígados en miligramos de los grupos tratados con concentraciones de 25, 50 y 100 mg/kg de *Agave mapisaga*, del grupo tratado con cisplatino y del grupo con agua; en la que se observa que no hay diferencia significativa entre grupos. Letras iguales corresponde a que se acepta $H_0: \mu_1 = \mu_2$ y letras diferentes se rechaza H_0 por lo que no hay evidencia suficiente para decir que las medias son iguales, datos obtenidos de la prueba de Dunnett con $\alpha = 0.05$

Histopatología

Se tomaron muestras de hígado y bazo para su inclusión en parafina y posterior tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E). Estas fueron de 4 ratonas administradas con 25 y 100 mg/Kg y 5 ratonas administradas con 50 mg/Kg de extracto acuoso de *Agave mapisaga*, 6 ratonas a las que solo se les dio agua y 3 ratonas administradas con cisplatino. Se revisó un corte por órgano, por ratona, haciendo un barrido de

toda el área del corte y se determinó la presencia de metástasis. Los datos obtenidos se encuentran en cuadro 4.

Cuadro 4. Metástasis en hígado y bazo.

Tratamiento	Hígado	Bazo
25 mg/Kg	2/4	0/4
50 mg/Kg	3/5	2/5
100 mg/Kg	2/4	2/4
Agua	3/6	3/6
Cis	0/3	0/3

El cuadro cuatro comprende el número de animales que presentaron metástasis en hígado y bazo entre el total de animales por tratamiento: 25, 50 y 100 mg/Kg de *Agave mapsaga*, agua y cisplatino. Se puede observar que los grupos de animales tratados con *Agave mapisaga* aparentemente presentaron un menor número de órganos con metástasis en bazo e hígado comparado con el grupo agua. Sin embargo, los datos fueron analizados por Kruskal-Wallis en el programa SPSS y estadísticamente no hubo diferencia significativa entre los grupos.

- Segundo Ensayo

Se decidió repetir el primer ensayo, contemplando una dosis más alta de *Agave mapisaga* (250 mg/Kg), esperando que esta redujera los focos metastásicos más que la dosis de 100 mg/Kg.

Implantación

En el cuadro 5 se muestran los días de implantación, que fueron del 4 al 10 en los grupos tratados con *Agave mapisaga*, del día 4 al 8 en el control de agua y del día 5 al 10 en los tratados con cisplatino. El tumor fue medible o palpable alrededor del 7 al 11 en los tratados con *Agave mapisaga* y a los que se les dio agua, a diferencia de los tratados con cisplatino que se palparon entre el día 10 y el 11. Estos resultados (tanto de la implantación como del momento en que el tumor es medible o palpable) fueron muy parecidos a la fase 2 del establecimiento del modelo (cuadro 2) y al ensayo anterior. Cabe mencionar que en el grupo de cisplatino no se presentó la implantación en 3 de 6 animales y en los otros 3 la implantación, el crecimiento del tumor para ser medible o palpable y el volumen al día de sacrificio se vieron retrasados.

Cuadro 5. Volumen tumoral y tiempo de implantación y medición de tumores tratados con *Agave mapisaga*.

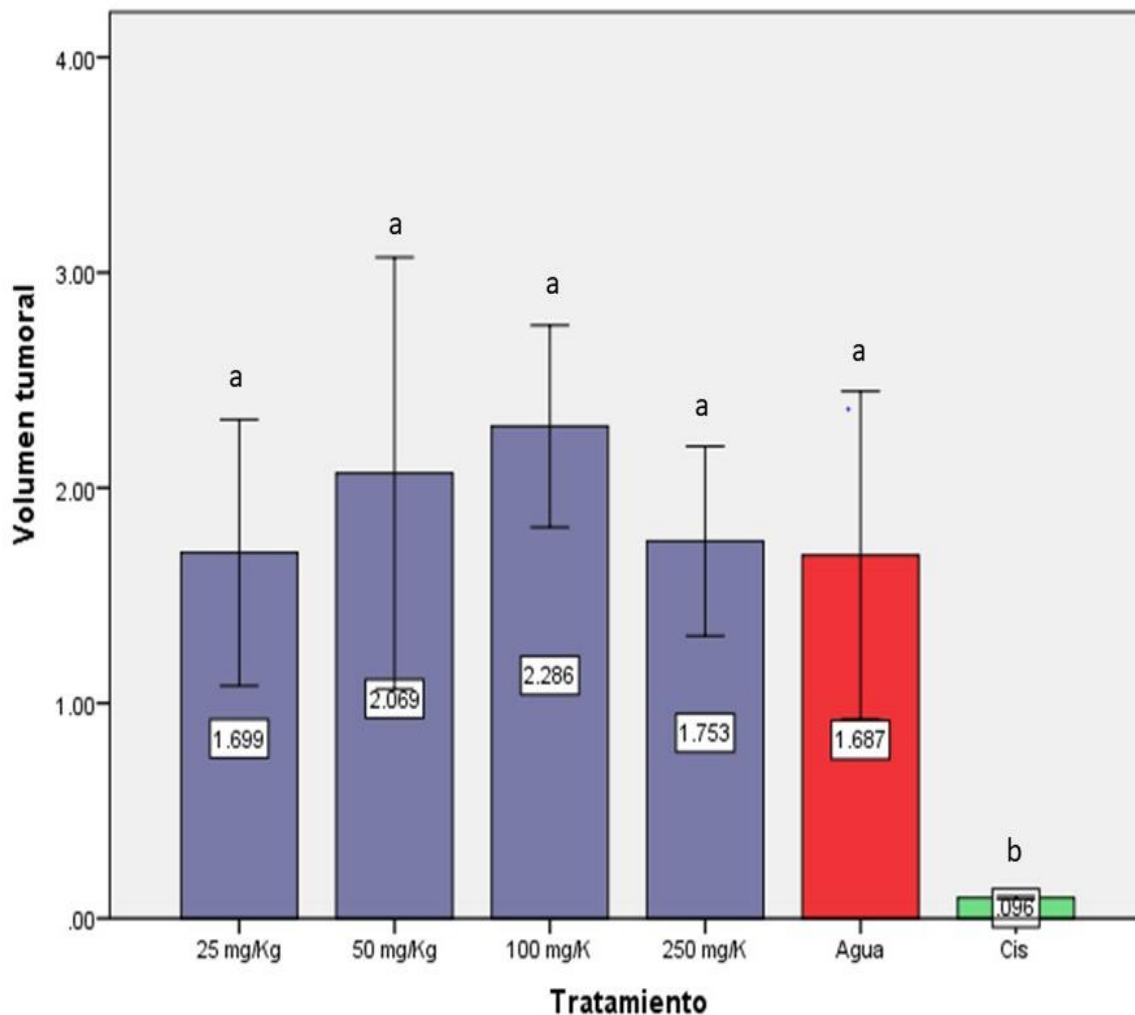
Tratamiento	Implantación	Tumor medible o palpable	Volumen tumoral cm³
25 mg/kg	4-7 (50% día 5)	7-11 (50% día 10-11)	0.79-2.5
50 mg/kg	5-7 (50% día 5)	7-11 (50% día 8)	1.1-3.2
100 mg/kg	5-7 (60% día 5)	7-9 (60% día 8)	1.8-2.9
250 mg/kg	4-10 (30% día 7)	7-9 (45% día 7)	0.87-2.8

Agua	4-8 (30% día 5)	7-11 (50% día 8)	0.9-2.8
Cisplatino	5-10 (70% día 5) 3/6 sin tumor	10-11 3/6 sin tumor	0.09-0.8

En el cuadro 5 se muestran los tiempos de implantación, en días post-implante, los tiempos en que los tumores son medibles o palpables y el volumen tumoral de los grupos, tratados con diferentes concentraciones de extracto de *Agave mapisaga*, los tratados con cisplatino y a los que solo de les dio agua de bebida.

Desarrollo del tumor

En el primer ensayo en el que se probaron diferentes dosis de *Agave mapisaga* se observó un comportamiento creciente en el volumen tumoral, de los tumores implantados en ratones, por lo tanto, se probó una dosis más elevada (250 mg/Kg). Como se puede observar en la gráfica 7, esta dosis no presentó volúmenes tumorales mayores a la dosis de 100 mg/Kg, sino que éstos fueron más parecidos a la dosis de 25 mg/Kg; por otro lado, el grupo de 25 mg/Kg y el de 250 mg/Kg son los que presentaron los menores volúmenes tumorales después del cisplatino. En la gráfica 7 también se puede observar una correlación de Pearson positiva entre la dosis del extracto de *Agave mapisaga*. Sin embargo, el cisplatino redujo significativamente el volumen tumoral, como se demostró con la prueba de Dunett para comparación de medias ($\alpha=0.05$).

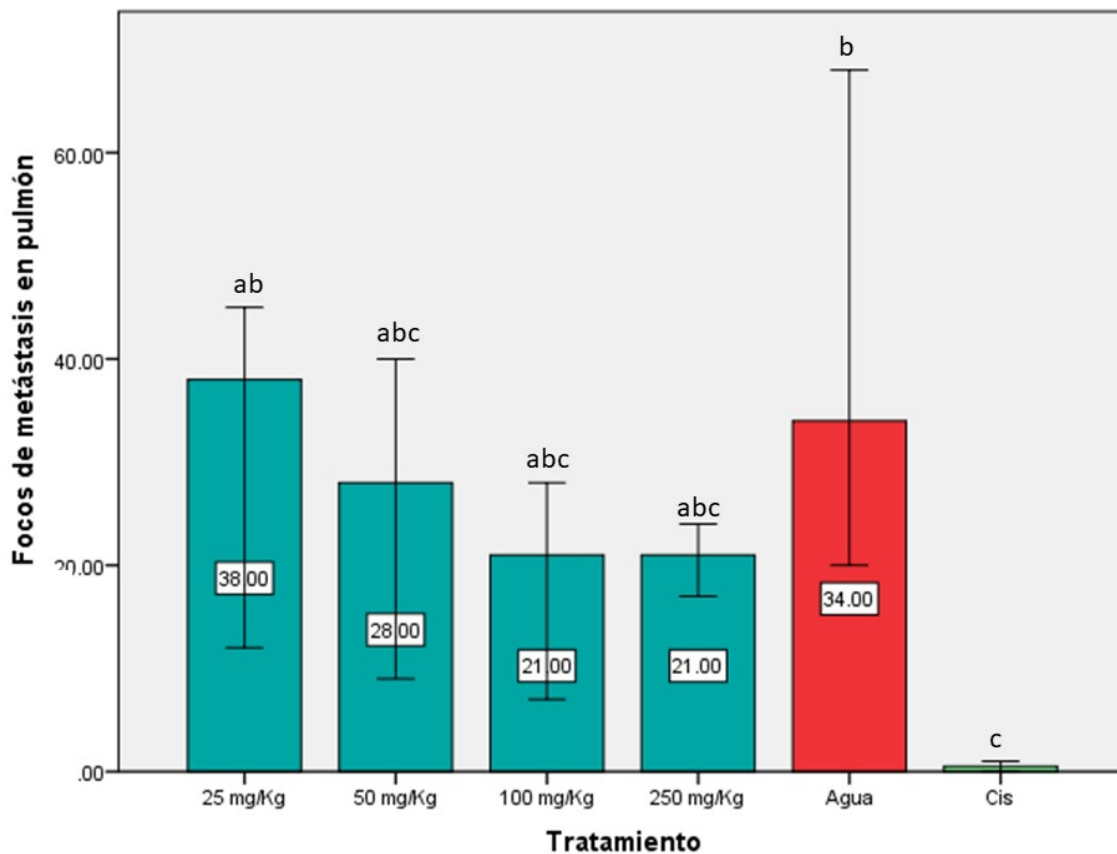


Gráfica 7. Volumen tumoral. Gráfica del volumen tumoral de los grupos tratados con concentraciones de 25, 50, 100 y 250 mg/kg de *Agave mapisaga*, del grupo tratado con cisplatino y del grupo al que solo se le dio agua. Letras iguales corresponde a que se acepta $H_0: \mu_1 = \mu_2$ y letras diferentes se rechaza H_0 por lo que no hay evidencia suficiente para decir que las medias son iguales, datos obtenidos de la prueba de Dunnett con $\alpha = 0.05$

Metástasis

En el primer ensayo en el que se probaron diferentes dosis de *Agave mapisaga*, mostrando que conforme aumentó la dosis del agave disminuyó el número de focos de metástasis en los pulmones de los ratones. En el segundo ensayo se evaluó una

dosis más alta del extracto, 250mg/Kg, en la que se esperaba una mayor reducción de los focos de metástasis. Como se observa en la gráfica 8, la dosis de 250 mg/Kg presentó el mismo comportamiento que la de 100 mg/Kg donde los focos de metástasis disminuyeron conforme aumentó la dosis. Al realizar el análisis Kruskal-Wallis se encontró que el cisplatino redujo significativamente los focos de metástasis, el tratamiento de 25 mg/Kg aumentó los focos de metástasis y no se encontró evidencia suficiente para decir que el tratamiento con 50, 100 y 250 mg/Kg de *Agave mapisaga* redujo o aumentó la metástasis en pulmón a pesar de ser los tratamientos en los que se observaron menos focos metastásicos. En este segundo ensayo al realizar la correlación, igual que en el primer ensayo, se pudo determinar el comportamiento decreciente del *Agave mapisaga* en el que al aumentar la dosis disminuyeron los focos de metástasis.

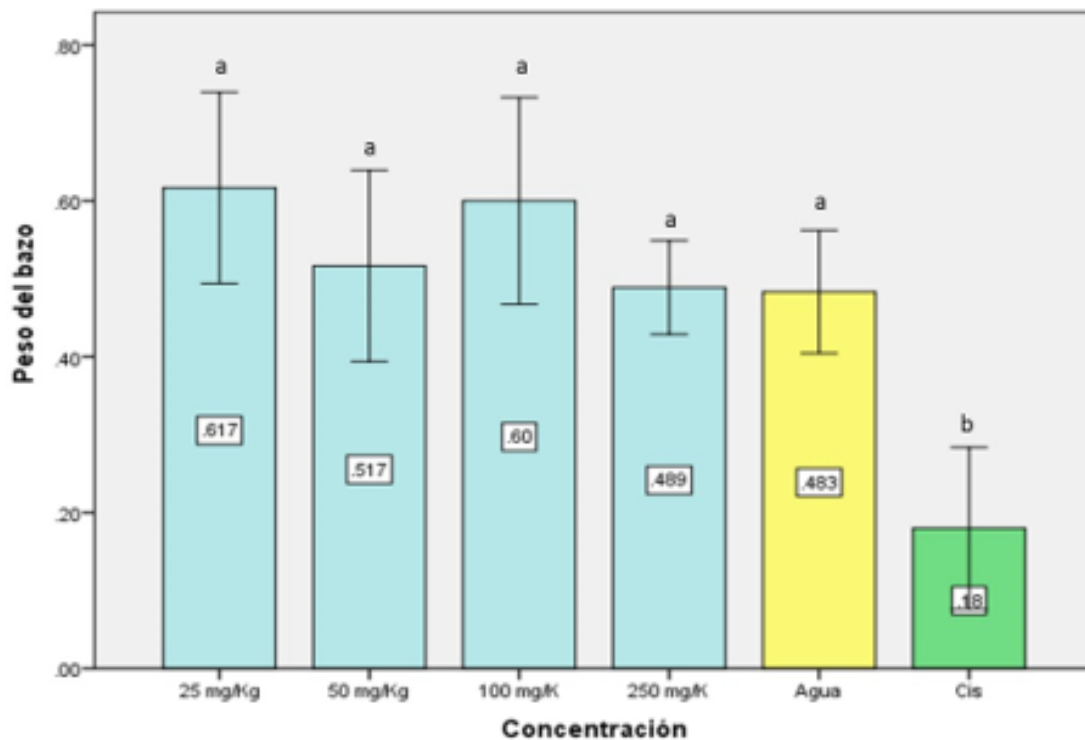


Gráfica 8. Focos de metástasis en pulmón. Gráfica del conteo de focos de metástasis en pulmón perfundidos con solución de Bouin de los grupos tratados con diferentes concentraciones de *Agave mapisaga* (25, 50, 100 y 250 mg/Kg) del grupo tratado con cisplatina y del grupo al que solo se le dio agua. Letras iguales corresponde a que se acepta $H_0: \mu_1 = \mu_2$ y letras diferentes se rechaza H_0 por lo que no hay evidencia suficiente para decir que las medias son iguales, datos obtenidos de la prueba de Kruskal-Wallis y U de Mann con $\alpha = 0.05$.

Evaluación de bazo e hígado

Los datos de los pesos del bazo e hígado presentaron normalidad y homogeneidad de varianzas por lo que se les realizó un ANOVA y comparación de medias por Dunett, Se pudo observar que los pesos de los hígados de los 6 grupos (*Agave mapisaga* 25, 50, 100 y 250 mg/Kg, agua y cisplatino) fueron muy parecidos a los

obtenidos en el ensayo anterior: no se presenta ninguna diferencia estadística entre grupos, por lo que el peso de este órgano no fue indicador de enfermedad para este modelo, aunque algunos tuvieran hepatomegalia. De igual manera que en el ensayo anterior, en el caso de los bazos si hubo diferencia estadística entre grupos, los pesos de los bazos del grupo al que se le administró cisplatino fueron más pequeños que en el grupo al que se le dio agua o a los grupos con *Agave* (gráfica 9). Macroscópicamente los bazos de los grupos de agua y *Agave* presentaron esplenomegalia, por lo tanto, se pudo considerar el peso del bazo como una variable para inferir sobre el estado de salud del animal.



Gráfica 9. Peso del bazo. Gráfica del peso de los bazos de los grupos tratados con concentraciones de 25, 50, 100 y 250 mg/kg de *Agave mapisaga*, del grupo tratado con cisplatino y del grupo al que solo se le dio agua. Letras iguales corresponde a que se acepta $H_0: \mu_1 = \mu_2$ y letras diferentes se

rechaza H_0 por lo que no hay evidencia suficiente para decir que las medias son iguales, datos obtenidos de la prueba de Dunnett con $\alpha=0.05$

Histopatología

Se tomaron muestras de hígado, bazo y tumor para su inclusión en parafina y posterior tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E), Estos fueron de 6 ratonas administradas con 25, 50 y 100 mg/Kg y 10 ratonas administradas con 250 mg/Kg de extracto acuoso de *Agave mapisaga*, 6 ratonas a las que solo se les dio agua y 5 ratonas administradas con cisplatino; para el estudio histopatológico de bazo e hígado, así como del tumor, se tomaron en cuenta el grado de la metástasis en hígado y bazo además de la mitosis, grado de la necrosis y presencia o ausencia de permeación vascular en el tumor.

Se revisó un corte por hígado, por animal, haciendo un barrido de toda el área del corte y se determinó el grado: leve, moderado y severo de la metástasis, de acuerdo a la superficie abarcada por la misma. En el caso de la metástasis en hígado, esta solo fue observada en 1/6 ratones del grupo de agua y 1/6 del grupo administrado con 50 mg/Kg.

Como se puede observar en los diagramas de pastel de la imagen 7 la metástasis en bazo se presentó en todas las ratonas, con diferente grado. En los grupos administrados con 25, 50 y 250 mg/Kg de *Agave mapisaga* y en el grupo administrado con cisplatino, la mayor proporción de metástasis fue de grado leve. En el grupo de 100 mg/Kg hubo una proporción de 50:50 entre el grado de metástasis leve y moderado, en el grupo de 25 mg/Kg el 83% presentó metástasis leve y en el caso de 250 mg/Kg fue el 60%, en el grupo de agua se presentó en mayor

proporción el grado moderado (66%) y en el grupo de cisplatino la mayor proporción fue de metástasis leve (80%).

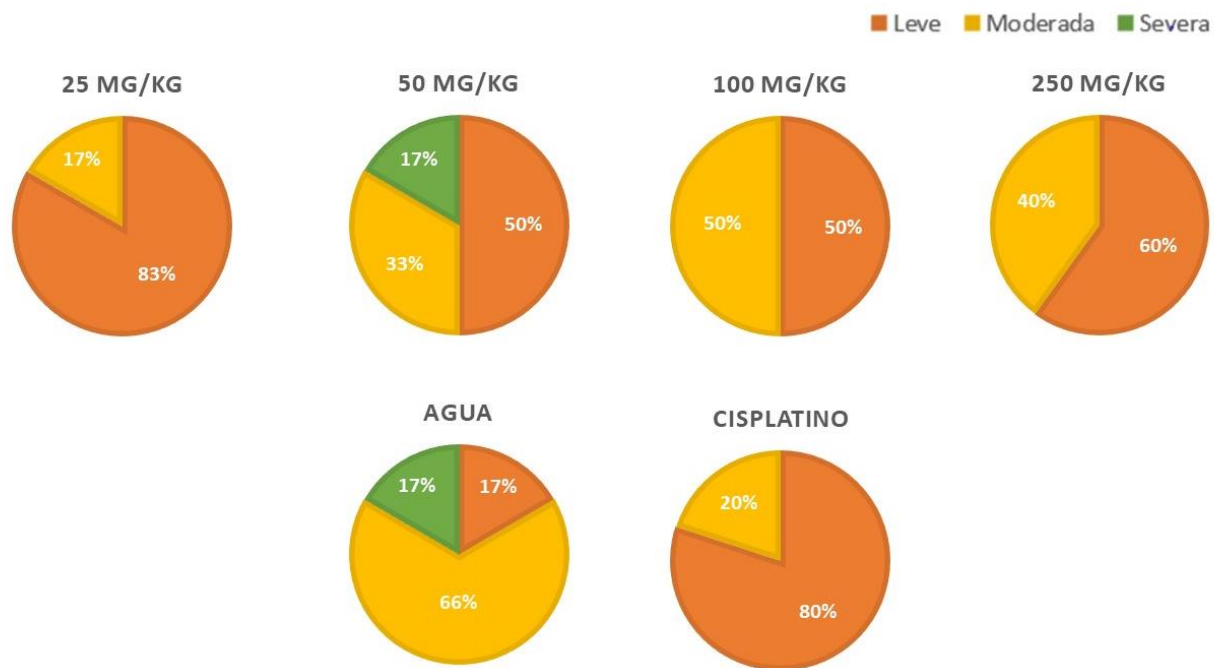
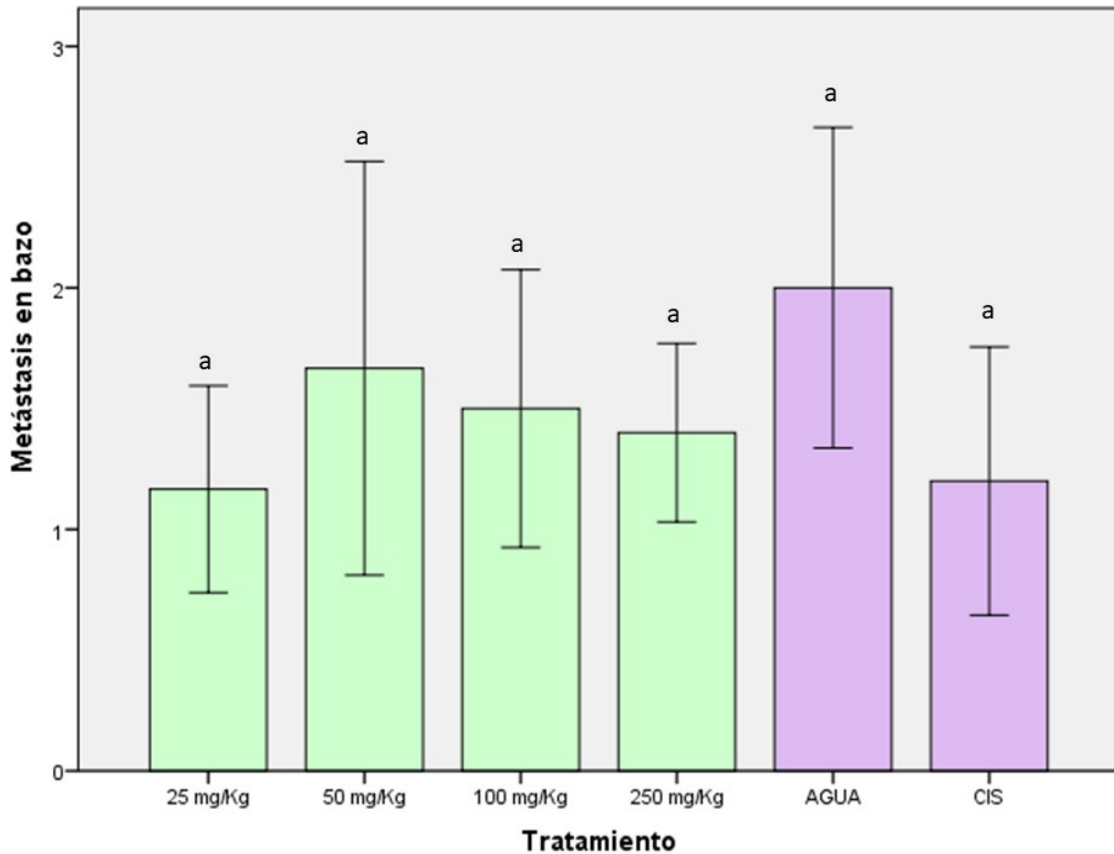


Imagen 7. Metástasis en bazo. Diagramas de pastel de la revisión histológica del bazo, los cuales muestran el porcentaje de ratonas sin metástasis y con metástasis en bazo, leve, moderada y severa, de cortes histológicos tenidos con H-E, para los animales de los 6 grupos estudiados en el ensayo: 25, 50, 100 y 250 mg/Kg de *Agave mapisaga*, agua y cisplatino.

En la gráfica 10 se muestra la distribución de los seis grupos en el que la metástasis en bazo aumentó en el grupo con 50 mg/Kg de *Agave mapisaga* y con 25 y 250 mg/Kg disminuyó. Todos los grupos tratados con agave presentaron menor metástasis que el grupo control al que se le dio agua y similares o mayores al cisplatino. Se realizó Kruskal-Wallis y no se encontró significancia estadística entre los grupos.



Gráfica 10. Metástasis del bazo. Gráfica de la revisión histológica de bazo de los grupos tratados con *Agave mapisaga* (25, 50, 100 y 250 mg/Kg) del grupo tratado con cisplatino y del solo se le dio agua. Letras iguales corresponde a que se acepta H_0 : todas las muestras provienen de la misma distribución y letras diferentes se rechaza H_0 por lo que no hay evidencia suficiente para decir que todas las muestras provienen de la misma distribución (o al menos una muestra proviene de una población con distribución distinta), datos obtenidos de la prueba de Kruskal-Wallis con $\alpha=0.05$.

Se determinó el número de mitosis por tumor, observando 30 campos. Los tumores del grupo de ratones al que se le administró agua presentaron de 2-4 hasta 7-8 mitosis. En los animales tratados con agave se observaron de 3-5 hasta 5-6 mitosis para el grupo de 25 mg/Kg, 4-5 hasta 7-8 mitosis para el grupo de 50 mg/Kg, 2-4

hasta 4-7 mitosis para el grupo de 100 mg/Kg y 1-3 hasta 7-9 mitosis para el grupo de 250 mg/Kg; mientras que en el grupo de cisplatino se observaron de 4-7 y hasta 8-9 mitosis.

Se revisó un corte por tumor, por ratona, haciendo un barrido de toda el área del corte y se determinó el grado: leve, moderado o severo de la necrosis, de acuerdo a la superficie abarcada por la misma.

En los diagramas de pastel de la imagen 8 se muestra el grado de necrosis en los tumores. Este se presentó en las mismas proporciones en el grupo de 25 mg/Kg de *Agave mapisaga*, el grupo de 50 mg/Kg de *Agave mapisaga* tuvo mayor proporción de necrosis severa y los grupos de 100 y 250 mg/Kg de *Agave mapisaga* y el grupo de agua presentaron mayor proporción de necrosis moderada. El grupo de cisplatino tuvo mayor proporción de tumores sin necrosis y en el grupo de agua el 17% tampoco presentó necrosis.

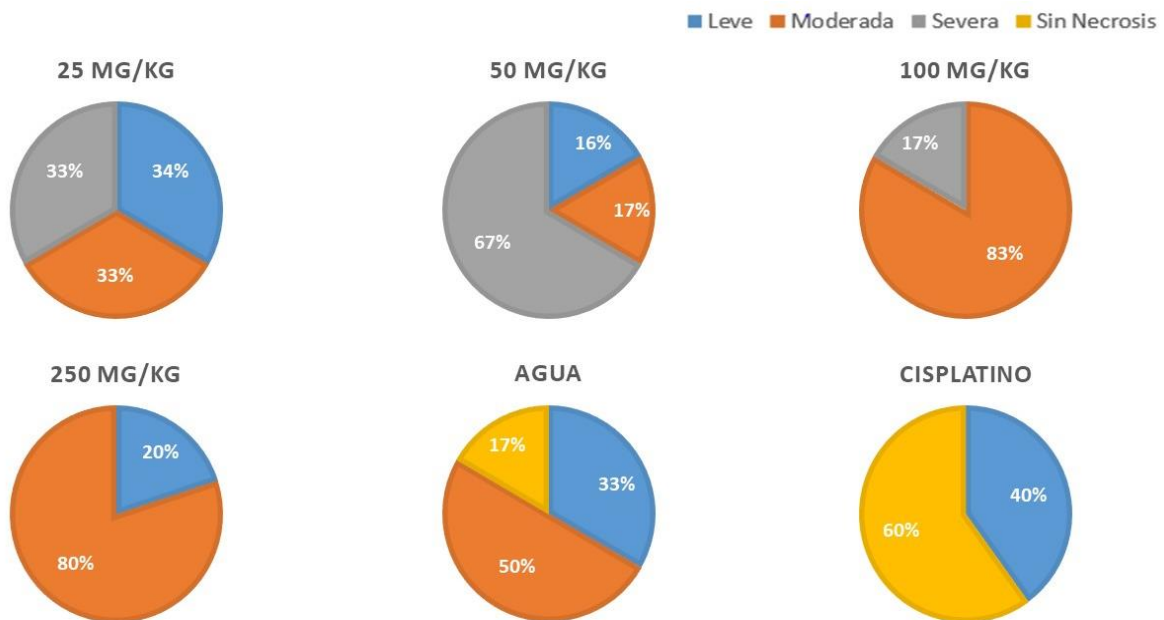
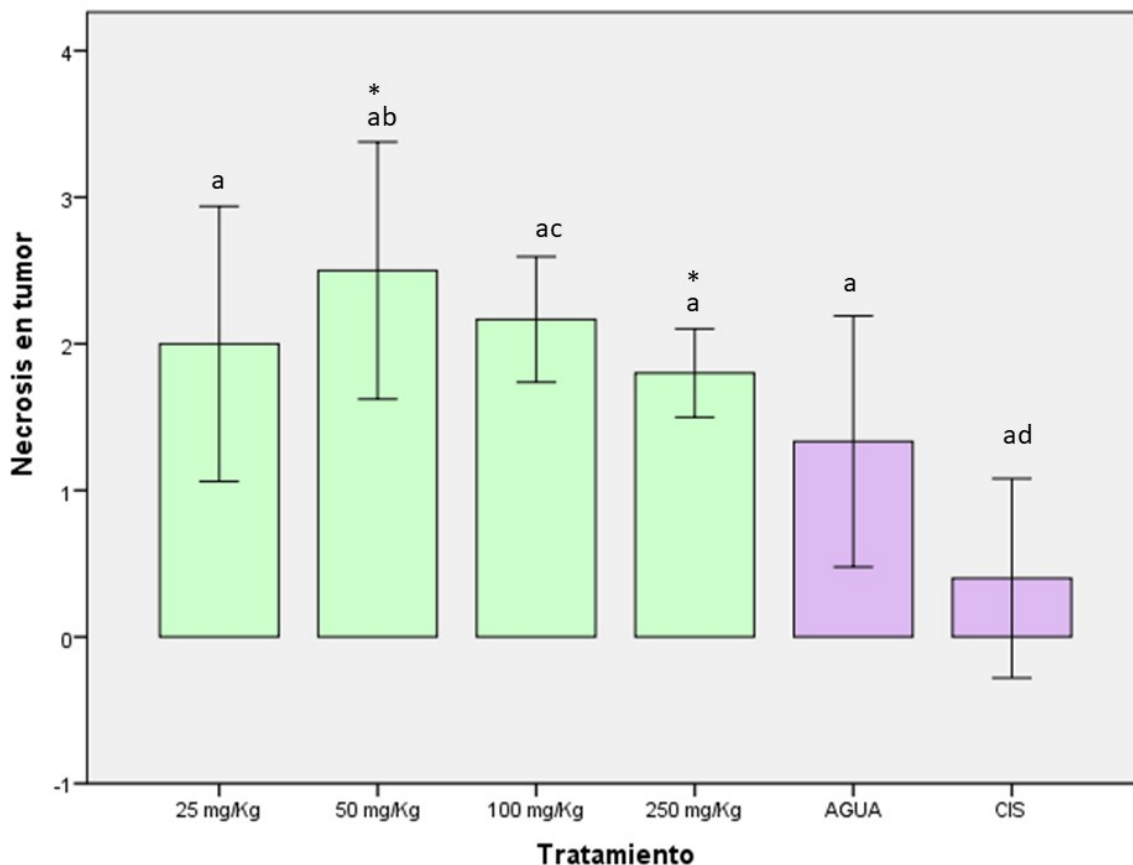


Imagen 8. Necrosis en el tumor. Diagramas de pastel de la revisión histológica de los tumores, los cuales muestran el porcentaje de ratonas sin necrosis, leve, moderada y severa, de cortes histológicos tenidos con H-E, para los animales de los 6 grupos estudiados en el ensayo: 25, 50, 100 y 250 mg/Kg de *Agave mapisaga*, agua y cisplatino.

En la gráfica 11 se muestra la distribución de los seis grupos y se puede observar que las barras entre los grupos de *Agave mapisaga* son similares excepto en el tratamiento con 50 mg/Kg que se encuentra más elevada. Todos los tratamientos con agave se presentaron por arriba del cisplatino y del agua y el grupo de cisplatino se presentó por debajo del agua. Se realizó Kruskal-Wallis y con significancia estadística podemos concluir que el grupo de 250 mg/Kg presentó una menor necrosis que el grupo de 50 mg/Kg, además de que los grupos de 50 y 100 mg/Kg aumentaron la necrosis a diferencia del cisplatino que la disminuyó.



Gráfica 11. Necrosis. Gráfica de la revisión histológica de necrosis en tumores de los grupos tratados con *Agave mapisaga* (25, 50, 100 y 250 mg/Kg) del grupo tratado con cisplatino y del grupo al que solo se le dio agua. Letras iguales corresponde a que se acepta H_0 : todas las muestras provienen de la misma distribución y letras diferentes se rechaza H_0 por lo que no hay evidencia suficiente para decir que todas las muestras provienen de la misma distribución (o al menos una muestra proviene de una población con distribución distinta), datos obtenidos de la prueba de Kruskal-Wallis con $\alpha=0.05$.

Se evaluó la permeación vascular en el tumor de acuerdo a los grupos de tratamiento. Se revisó un corte de tumor de cada ratona, realizando un barrido de todo el corte teñido con H-E y se determinó la ausencia (No) o presencia (Si) de vasos sanguíneos con células cancerosas en su luz.

En los diagramas de pastel de la imagen 9 se muestra que la proporción de la permeación vascular estuvo en un 50:50 en los grupos de 25 y 100 mg/Kg de *Agave mapisaga*, en el grupo de 50 mg/Kg la mayor proporción de tumores presentó permeación vascular, parecido al grupo al que se le dio agua y contrario a lo sucedido con el grupo de cisplatino y 250 mg/Kg de *Agave mapisaga*, en el que la mayoría no presentó permeación vascular.

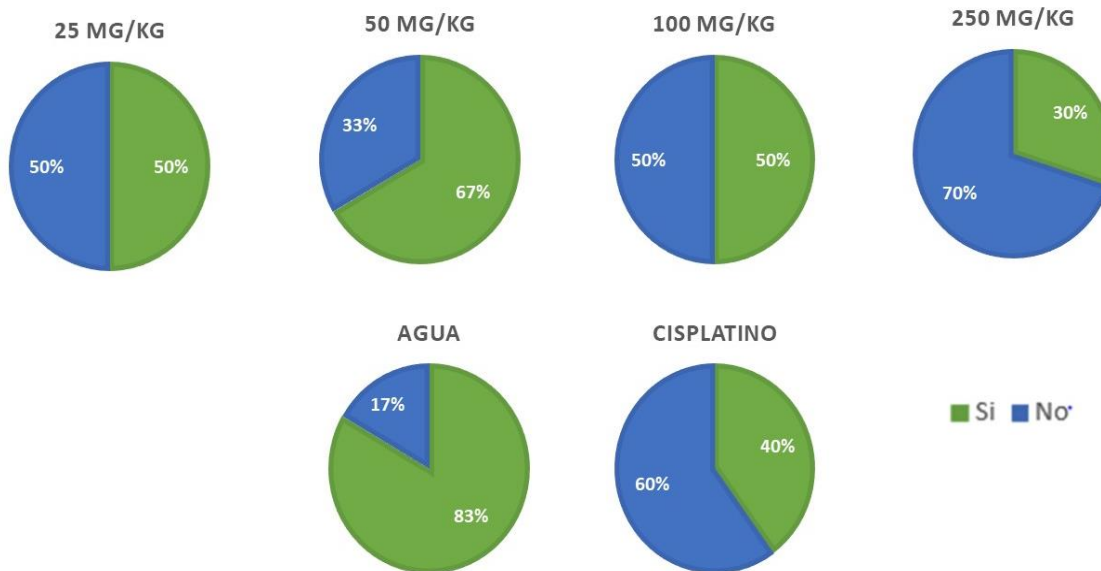
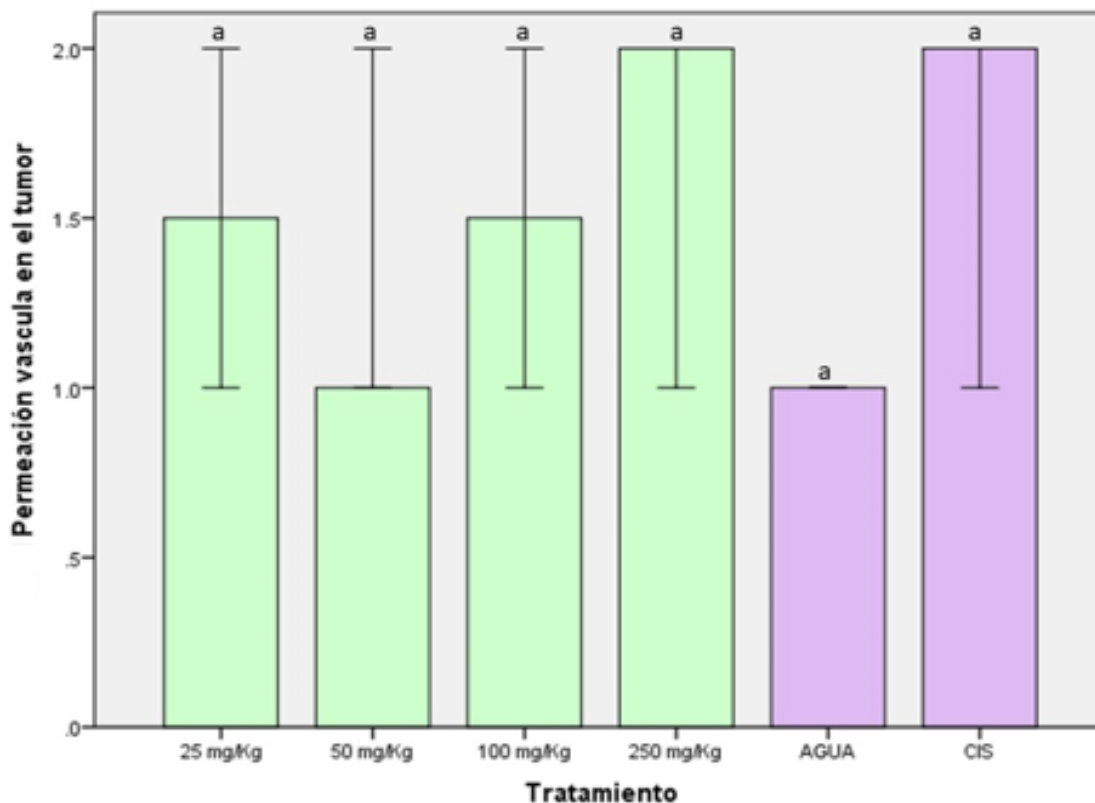


Imagen 9. Permeación vascular. Diagramas de pastel de la revisión histológica de los tumores, los cuales muestran el porcentaje de ratonas con ausencia (No) o presencia (Si) de permeación vascular en los tumores, de cortes histológicos tenidos con H-E, para los animales de los 6 grupos estudiados en el ensayo: 25, 50, 100 y 250 mg/Kg de *Agave mapisaga*, agua y cisplatino.

En la gráfica 12 se puede observar la distribución de los seis grupos, en el que el grupo de cisplatino y el de 250 mg/Kg de agave tuvieron las barras más altas representando el mayor número de tumores con ausencia de permeación vascular

y el grupo de agua y 50 mg/Kg de agave presentaron el mayor número de tumores con presencia de permeación vascular. Sin embargo, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis y estadísticamente no hubo diferencia significativa entre los grupos.



Gráfica 12. Permeación vascular. Gráfica de la revisión histológica de la permeación vascular de los grupos tratados con *Agave mapisaga* (25, 50, 100 y 250 mg/Kg) del grupo tratado con cisplatino y del grupo al que solo se le dio agua. Letras iguales corresponden a que se acepta H_0 : todas las muestras provienen de la misma distribución y letras diferentes se rechaza H_0 por lo que no hay evidencia suficiente para decir que todas las muestras provienen de la misma distribución (o al menos una muestra proviene de una población con distribución distinta), datos obtenidos de la prueba de Kruskal-Wallis con $\alpha=0.05$.

12. DISCUSIÓN

En este trabajo se encontró que el extracto acuoso del *Agave mapisaga* es citotóxico en células 4T1 a dosis de 0.5 mg/ml. Por otro lado, la dosis de 250 mg/Kg, redujo la permeación vascular en los tumores, además de disminuir la metástasis en bazo y pulmón.

En el ensayo *in vitro* se pudo determinar que la IC50% del *Agave mapisaga* fue de 1605.121 µg/ml. Claramente la dosis citotóxica y la IC50% del agave es mucho mayor que la del cisplatino (1.56 µg /ml y 7.231 µg/ml, respectivamente). Sin embargo, aunque el uso del cisplatino se justifica como grupo control en el experimento, no era de esperarse que el extracto de agave fuera tan potente como lo es un compuesto puro, que entra a la célula e inhibe la síntesis de ADN, ya que el primero es un extracto crudo que contiene diversos elementos que probablemente interactúan de más de una forma con las células, generando efectos diversos en ellas.

Si bien aún no se ha establecido claramente cuál podría ser el mecanismo de acción del *Agave mapisaga*, se cree que la saponina hecogenina podría tener un papel citotóxico²⁰. Hay varios estudios con *Agave uthaensis* en diferentes líneas celulares de cáncer de mama, próstata, linfoma, pulmón y otros en las que el IC50% de las saponinas esteroidales puras oscila entre 5.5 y 12.3 µg/ml,⁵⁹ lo cual se acerca más a la IC50% del cisplatino. En un estudio en el que utilizaron *Agave salmiana* y *Agave duranguensis* observaron que de ambos agaves se extraen diferentes concentraciones de saponinas, 26.53 y 14.05 g/L respectivamente, y se necesitan 3 mg/ml de estas para disminuir el crecimiento en levaduras; sin embargo, ninguno de los trabajos citados puede compararse directamente con el nuestro. En este

estudio no utilizamos saponinas esteroideas puras sino un extracto acuoso del que no conocemos su concentración de saponinas, ni hemos determinado que otros componentes del *Agave mapisaga* podrían estar involucrados en el efecto citotóxico hacia las células 4T1. Dentro de los posibles componentes activos, podría citarse a los fructanos, que han sido encontrados en diferentes tipos de agaves con propiedades citotóxicas⁶⁰.

Respecto a la valoración *in vivo*, en los dos ensayos en los que se utilizó el *Agave mapisaga* y se observó que éste no tiene ningún efecto en la implantación tumoral, puesto que y no se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con diferentes concentraciones de agave con los grupos a los que se les administró agua. Este resultado difiere a lo reportado por Peralta en 2016, quien demostró que con 25 y 50 mg/Kg de extracto acuoso de *Agave mapisaga* se redujo la implantación del tumor en el modelo de cáncer de próstata. Lo anterior pudo deberse a que el modelo de isotrasplatación con cáncer de mama es sumamente agresivo, con un crecimiento rápido del tumor y con desarrollo de metástasis espontánea, como ha sido reportado por diferentes autores⁴⁹⁻⁵³, mientras que en el estudio realizado por Peralta no se observó metástasis y el crecimiento tumoral fue menos agresivo.

En los dos ensayos de este trabajo se observó una correlación negativa entre el volumen tumoral y la metástasis ya que a mayor concentración de *Agave mapisaga* administrado, las ratonas desarrollaron menos metástasis pulmonar, aun cuando el volumen tumoral fue en aumento (excepto con la dosis de 250 mg/Kg) (gráficas 3, 4, 7 y 8). Este comportamiento, no era lo esperado, ya que por lo regular existe una correlación positiva entre el tamaño tumoral y la metástasis. Probablemente, alguno de los componentes del extracto inhibe la migración celular (aun cuando no logre

controlar el volumen tumoral). Lo anterior podría estar asociado a una disminución de la permeación vascular, tal como pudo observarse en el grupo que recibió una dosis de 250 mg /Kg de *Agave mapisaga* y que no presentó permeación vascular en el 70% de los tumores. La permeación vascular puede estar disminuida por diferentes mecanismos, tales como: 1) el bloqueo de los Factores de Crecimiento Endotelial A, C Y D (VEFG-A, VEFG-C, VEFG-D), implicados en la señalización angiogénica y que aumentan la permeación vascular;⁵⁸ 2) el aumento en la proliferación de pericitos o la disminución de su desprendimiento, ya que estos son capaces de reducir la proliferación endotelial durante la angiogénesis, y su desprendimiento del estroma, provoca dilatación y aumento de la permeabilidad vascular; además de permitir que los factores pro-angiogénicos interactúen con sus receptores^{61,62}. Sería importante determinar si el *Agave mapisaga* podría estar regulando alguno de los mecanismos citados.

En este mismo grupo (tratado con 250 mg/Kg de *Agave mapisaga*) los animales presentaron un volumen tumoral semejante al control de agua, pero una menor metástasis en pulmón y metástasis leve en el 60% de los bazo; además, los tumores presentaron necrosis moderada en un 80% y leve en el otro 20%, sin presentar necrosis severa, por lo que podemos observar que este grupo disminuyó el número de tumores con necrosis y la severidad de la misma, con respecto a los otros tratamientos de agave.

La disminución de la necrosis, también parece correlacionarse con una menor metástasis en el pulmón y el bazo; esto tiene mucho sentido ya que la necrosis tiene un potencial proinflamatorio y promotor de tumores; además, en el cáncer se

estimula la angiogénesis para la creación de neovasculatura, la cual nutre y oxigena al tumor y las células neoplásicas pueden viajar por ellas para invadir otros órganos. Por lo anterior, el agave a 250 mg/Kg podría estar inhibiendo la inflamación, la angiogénesis y de forma indirecta a la permeación vascular⁶³.

Al encontrar que este tratamiento mejora algunas variables sería importante probar si al administrarlo junto con la quimioterapia convencional podría coadyuvar al tratamiento y mejorar la calidad de vida durante la quimioterapia.

13. CONCLUSIONES

- El extracto acuoso del *Agave mapisaga* es citotóxico en células 4T1 a concentraciones de 0.5 mg/ml, con una IC50% de 1605.121 µg/ml.
- En ratones BALB/c hembras isotrasplantadas con células 4T1 y tratadas con una dosis de 250 mg/Kg, reduce la permeación vascular, además de disminuir la metástasis en bazo y pulmón.

14. PERSPECTIVAS

Si bien los datos obtenidos en el presente trabajo demuestran que el extracto de *Agave mapisaga* está modulando la permeación vascular y la necrosis en los tumores, además de la metástasis en el pulmón y el bazo, es importante profundizar más sobre las vías en la que interviene para mejorar estas variables. También se debe realizar un estudio fitoquímico para saber los componentes del extracto acuoso del *Agave mapisaga* y caracterizar la actividad biológica de cada uno de ellos, además de purificar el producto activo para reducir su concentración efectiva. Este extracto también podría estar potenciando la respuesta citotóxica anti-tumoral, por lo que sería importante analizar el infiltrado tumoral.

15. ANEXOS

15.1 ANEXO 1

Cultivo de células en placa

- I. Realizar una suspensión celular de 1×10^6 células/ml y se colocar a cada pozo 100 μ l de medio RPMI suplementado con 10% de SFB, teniendo 10,000 células por pozo.
- II. Incubar a 37°C y 5% de CO₂ durante 12-24 h.

Tinción de sulforodamina B

- I. Después de haber incubado las células y que estas se encuentren homogéneas en los pozos, retirar medio y adicionar 90 μ l de RPMI+10% SFB y 10 μ l del tratamiento (*Agave*, cisplatino, PBS) e incubar durante 24 h.
- II. Retirar medio y fijar con 100 μ l de ácido tricloroacético al 10% 1 h a 4°C.
- III. Lavar 5 veces con agua destilada y dejar secar a temperatura ambiente.
- IV. Adicionar 50 μ l de SRB al 4% en ácido acético al 0.1%, a cada pozo e incubar a temperatura ambiente.
- V. Retirar exceso de colorante lavando 5 veces con ácido acético al 1% y dejar secar a temperatura ambiente.
- VI. Solubilizar colorante con 100 μ l de Tris base 10 Mm (pH 10.5) dejando reposar 5 min y con agitación mecánica suave hasta observar la solubilización y homogenización del mismo.

VII. Leer a 564 nm de longitud de onda. Determinar porcentaje de células adheridas el cual indica el porcentaje de células viables al momento de la fijación. Se considera la proliferación celular máxima (100%) de los pozos que no reciban tratamiento.

15.2 ANEXO 2

Inoculación de células 4T1 en glándula mamaria

1. Preparar el inóculo para 0.1 ml/ratona de acuerdo al número de células que se requiera inocular (1×10^5 , 1×10^6), en un frasco, para el total de ratonas con un excedente del 20%. Las células pueden ser inoculadas con PBS o medio RPMI.
2. Homogeneizar suavemente el frasco donde se preparó el inóculo para el total de las ratonas y con una jeringa de 1ml sin la aguja, se toman 0.4 ml del inóculo para 4 ratonas. Poner la aguja en la jeringa y con el bisel de la aguja hacia arriba, depositar 0.1 ml del inóculo en la segunda glándula mamaria inguinal de la ratona, por debajo del pezón, repetir en las siguientes tres ratonas, antes de depositar cada inóculo mover suavemente la jeringa para mezclar. Si se observa la formación de una ampolla que levanta el pezón de la ratona, el inóculo fue depositado adecuadamente. Repetir para el número total de ratonas.
3. Se debe tener cuidado de no insertar la aguja profundamente ya que la inoculación debe ser subcutanea, si se realiza de manera errónea, las células pueden depositarse en peritoneo y formar tumores en intestinos, estómago hígado y linfonodos, de forma rápida y con ello acelerar la muerte del animal.

15.3 ANEXO 3

Fijación con solución de Bouin

1. Abrir al ratón, retirar las costillas y exponer la tráquea.
2. Con una jeringa de 5 ml perfundir el pulmón, colocando la solución de Bouin en la tráquea.
3. Esperar un minuto, extraer el pulmón perfundido y colocarlo en 5 ml de solución de Bouin. Realizar la observación y conteo de focos superficiales de metástasis a las 24 h.

16. BIBLIOGRAFÍA

1. Encyclopaedia Britannica. [actualización: 2019]
<https://www.britannica.com/science/phytotherapy> [consulta: 15 mayo 2019].
2. Atlas de los Pueblos Indígenas de México [actualización: 2018]
http://atlas.cdi.gob.mx/?page_id=67 [consulta: 15 mayo 2019].
3. Heinrich M, Anki A, Frei B, Weimann C, Sticher O. Medicinal plants in Mexico: healer's consensus and cultural importance. Soc Sci Med. 1998 Dec;47(11):1859-71.
4. Revista Cofepris. Uso de productos herbolarios en México [actualización: 2018] <http://revistacofepris.salud.gob.mx/inter/2016/1/bienestar.html> [consulta: 12 abril 2019].
5. Barquero AA. Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. QuimicaViva 2007; 2: 19-35.
6. Romero GB, Catella RMT. Actualización en fitoterapia y plantas medicinales. FMC. 2012;19(3):149-60.
7. Castro AJA, Vázquez MCJ, Xolalpa NC. Medicinal Plants from Mexico, Central America, and the Caribbean Used as Immunostimulants. Evid.-Based Complementary Altern. Med. 2016; 1-15
8. La Revista de la CANIFARMA. La COFEPRIS avala el uso de 18 plantas medicinales [actualización: 2018] <https://codigof.mx/la-cofepris-avala-el-uso-de-18-plantas-medicinales/> [consulta: 12 abril 2019].

9. Mendoza AG. Los agaves de México. *Ciencias* 2007; 87: 14-23.
10. Tecno Agro. El Agave como planta medicinal [actualización: 2017] <https://tecnoagro.com.mx/no.-92/el-agave-como-planta-medicinal> [consulta: 20 abril 2019].
11. Yazan LS, Ong YS, Zaaba NE, Ali RM, Foo JB, Tor YS. Anti-breast cancer properties and toxicity of *Dillenia sulfruticosa* root aqueous extract in BALB/c mice. *Asian Pac J Tropic Biomed* 2015; 5(12): 1018-1026.
12. Lin YG, Kunnumakkara AB, Nair A, Merritt WM, Han LY et al. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma targeting the Nuclear Factor K β pathway. *Clin Cancer Res* 2007; 13(11): 3423-30
13. Prakash O, Kumar A, Kumar P, Ajeet. Anticancer potential of plants and natural products: A review. *Am J Pharmacol Sci* 2013; 1(6): 104-115
14. Wilken R, Veena MS, Wang MB, Srivatsan ES. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer* 2011 10:12
15. Seely D, Kennedy DA, Myers SP, Cheras PA, Lin D, Li R, Cattley T, Brent PA, Mills E, Leonard BJ. In vitro analysis of the herbal compound Essiac. *Anticancer Res* 2007; 27(6B): 3875-82.
16. Yokosuka A, Mimaki Y. Steroidal saponins from the whole plants *Agave Utahensis* and their cytotoxic activity. *Phytochem* 2009; 70: 807-8015.
17. Chen PY, Chen CH, Kuo CC, Lee TH, Kuo YH, Lee CK. Cytotoxic steroidal saponins from *Agave sisalana*. *Plant Med* 2011; 77: 929-933.

18. Mthembu NN, Motadi. Apoptotic potential role of *Agave palmeri* and *Tulbaghia violacea* extracts in cervical cancer cells. *Mol Biol Rep* 2014; 41: 6143-6155.
19. Céspedes AD. Efecto quimiopreventivo de los fructanos de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick sobre cáncer de colon (tesis de maestría). San Luis Potosí México Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 2012.
20. Peralta PH. Evaluación anti-neoplásica e inmunomoduladora *in vivo* e *in vitro* del extracto hidrosoluble del *Agave mapisaga* en cáncer de próstata murino. Ciudad de México México: UNAM, 2016.
21. Chen PY, Chen CH, Kuo CC, Lee TH, Kuo YH, Lee CK. Cytotoxic steroidal saponins from *Agave sisalana*. *Planta Med* 2011; 77(9): 929-33.
22. Gaofeng YM, Mark LW, Guoqing H, Min Y, Duo L. Natural products and anti-inflammatory activity. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2006;15(2):143-52.
23. Yokosuka A, Jitsuno M, Yui S, Yamazaki M, Mimaki Y. et.al. Steroidal Glycosides from *Agave utahensis* and Their Cytotoxic Activity. *J Nat Prod* 2009; 72(8): 1399-404.
24. Man S, Gau W, Zhang Y, Huang L, Liu C. Chemical study and application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia* 2010; 81: 703-714
25. Escobar SML, Sánchez SL, Sandoval RS. Cell Death-Autophagy, Apoptosis and Necrosis, Sudáfrica: IntechOpen; 2015

26. Sica A and Montovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. JCI 2012; 122(3): 787-795.
27. Global Cancer Observatory GLOBOCAN [actualización: 2020] <https://gco.iarc.fr/today/home> [consulta: 22 feb 2020]
28. Estadística a propósito del día mundial del cáncer de mama INEGI. http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/mama2016_0.pdf [publicación:2016].
29. Organización Mundial de la Salud. [actualización: 2008]. <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index4.html> [consulta: 25 feb 2017].
30. Instituto Nacional del Cáncer [actualización:2015] EUA. <https://www.cancer.gov> [consulta: 25 feb 2017].
31. National Cancer Institute. Radiación [actualización:2019] <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/radiacion> [consulta: 28 abril 2019].
32. Facultad de Medicina UNAM. Virus Oncogénicos [actualización:2015] <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/virus-oncogenicos.html> [consulta: 4 jun 2017].
33. Astoviza MB, Suarez MMS. Micotoxinas y cancer. Rev cubana Invest Biomed 2005;24(1):54-9.
34. Sayanas MP, et. al. Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer. Oncol Rep 2009; 22: 1277-1282.

35. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010 Jan; 31(1): 27–36.
36. Alberts, B. et. al. *Biología Molecular de la Célula*. 5ta ed. Barcelona: Omega; 2010.
37. Tao K, Fang M, Joseph A, Sahagian GG. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cáncer. *BMC Cancer*. 2008; 8: 228.
38. Swann BJ, Smyth JM. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 2007 May; 117(5):1137-46.
39. Meuten DJ. *Tumors in Domestic Animals*. 5ta ed. USA: Wiley Blackwell; 2017.
40. Ortega JP. *Histopatología de la glándula mamaria*. España: Fesitess Andalucía; 2011.
41. American Cancer Society [actualización:2016] USA <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/acerca/que-es-el-cancer-de-seno.html> [consulta: 4 jun 2017].
42. García GM, Rodríguez AOG, Gómez HJ. *Tratamiento del cáncer: oncología médica, quirúrgica y radioterapia*. 1ª ed. México: Manual Moderno; 2016.
43. Quail DF, Joyce JA. Microenviromental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 2013 Nov; 19(11): 1423–1437.
44. Abbas AK, Lichman AH. Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. 7a ed. España: Elseiver; 2012.

45. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 2011 Oct; 147(2): 253-292.
46. Meadows GG, Zhang H. Effects of Alcohol on Tumor Growth, Metastasis, Immune Response, and Host Survival. *Alcohol Res.* 2015; 37(2): 311–322.
47. Imigo GF, Masilla E, Delama GI, Poblete SMT, Fonfach ZC. Molecular Classification of breast cancer. *Cuad. Cir.* 2011; 25: 67-74
48. Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA2-2002, Para la prevención, diagnóstico, tratamiento, control y vigilancia epidemiológica del cáncer de mama. MEX <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/041ssa202.html> [publicación:2003].
49. Cancer. Net [actualización:2015] <http://www.cancer.net> [consulta: 4 jun 2017].
50. Navale AM. Animal models of cancer: a review. *IJPSR* 2012; 4(1): 19-28.
51. ATCC. Mammary cells 4T1. [actualización:2017] <https://www.atcc.org/products/all/CRL-2539.aspx> [consulta: 28 agosto 2017].
52. Pulaski BA, Ostrand RS. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Curr Potoc Immunol.* 2000; 39: 20.2.1-20.2.16.
53. Pulasky AB, Ostrand RS. Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major Histocompatibility Complex Class II and B7.1 cell-based tumor vaccines. *Can Res* 1998 April; 58: 1486-1493.

54. Pulaski AB, Terman SD, Khan S, Muller E, Ostarand RS. Cooperativity of *Staphylococcal aureus* enterotoxin B superantigen, Major Histocompatibility Complex Class II, and CD80 for immunotherapy of advanced spontaneous metastases in a clinically relevant postoperative mouse breast cancer model. *Can Res* 2000 May; 60: 2710-2715.
55. Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Can Res* 1992 March; 52: 1399-1405.
56. Pulaski AB, Clements KV, Pipeling RM, Ostarand RS. Immunotherapy with vaccines combining MHC class II/CD80+ tumor cells with interleukin-12 reduces established metastatic disease and stimulates immune effectors and monokine induced by interferon γ . *Cancer Immunol Immunother* 2000; 49: 34-45.
57. Li Y, Jin M, Shao S, Huang W, Yang F, Chen W. et, al, Small-sized polymeric micelles incorporating docetaxel suppress distant metastases in the clinically-relevant 4T1 mouse breast cancer model. *BMC Cancer*. 2014; 14: 329.
58. Workman P, Aboagye EA, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ. et. al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *BJC* 2010; 102: 1555-1577.
59. Podolak I, Galanty A, Sobolewska D. Saponin as cytotoxic agents: a review *Phytochem Rev*. 2010 Sep; 9(3): 425–474.

60. Alcazar VEM. Caracterización de saponinas de *Agave durangensis* y salmiana, y su efecto en la pared y membrana celular de *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Posgrado Interinstitucional de Ciencia y Tecnología. México, 2016.
61. Martínez EJD, Herrera LA. Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Cancerología* 2006; 1: 83-96.
62. García EJ. Bases Moleculares de la Angiogénesis Tumoral: Papel del VEGF, Madrid, España: Universidad Complutense, 2016.
63. Hanahan D, Weinberg RA. Halmarks of cáncer: The Next Generation. *Cell* 2011 Mar; 144: 646-674