



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DE LA COMBINACIÓN DE CISPLATINO CON TRITERPENOS  
CITOTÓXICOS AISLADOS DE LA PLANTA MEDICINAL**

*Amphipterygium adstringens*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

LIDIA DÍAZ SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ

INSTITUTO DE QUÍMICA

COMITÉ TUTOR:

DRA. NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG

INSTITUTO DE QUÍMICA

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, CDMX, NOVIEMBRE DE 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

No es que me disgusten positivamente los perros, no más de lo que me disgustan los monos, los seres humanos, los vendedores, las vacas, las ovejas o los pterodáctilos; pero por el gato he sentido siempre un respeto y un afecto especial, desde los días más tempranos de mi infancia. En su gracia sin tacha y en su superior autosuficiencia he visto un símbolo de la belleza perfecta y la suave personificación del universo mismo objetivamente considerado, y en su aire de silencioso misterio reside para mí todo el secreto y la fascinación de lo desconocido.

El perro da, pero ¡EL GATO ES!

H. P. Lovecraft  
*Something About Cats and Other Pieces*  
Arkham House, 1949

...a mis Tukis,  
Gordita & Negrita

## AGRADECIMIENTOS

A la Negra [Mabi Sánchez Ramos].

A la Universidad Nacional Autónoma de México [UNAM].

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas [PDCB].

Al Instituto de Química-UNAM [IQ-UNAM]. Especialmente al Laboratorio 1-4 de Productos Naturales.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías [CONAHCYT]. Por la beca, con número de registro 604694, para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa y la Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera de la Unidad de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” [INCMNSZ].

A los técnicos M. en C. María Teresa Obdulia Ramírez Apan y M. en C. Antonio Nieto Camacho del Laboratorio de Pruebas Biológicas IQ-UNAM.

A los técnicos M. en C. María Laura Ventura Ayala y M. en C. José Luis Ventura Gallegos de la Unidad de Bioquímica del INCMNSZ.

A mi jurado de examen de grado: Dra. Leticia Rocha Zavaleta, Dra. María Margarita Canales Martínez, Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay y, el Dr. Ricardo Reyes Chilpa.

A mis compañeros y amigos: M. en C. Verónica García Gutiérrez y M. en C. Freddy Muñoz Monjaraz; Dra. María del Carmen Juárez Vázquez; Dr. Víctor Alberto Castro Torres; Dr. Javier Porrás Ramírez; y la doctora chiquita Dra<sup>Ch</sup>. Mimí [Noemí Silva Jiménez].

A mi pequeña familia: La Perrita [Arelí De Aquino], La LuxXan [Luisa Herrera], Mi Twin Gabo [Gabriel Samano] y, Mi Flaco [Andrés MA]

A las mocosas: Yaya/La niña grande [Illariy Aguilar Díaz], La Nana/El Harry [Harry Aguilar Díaz] y, Maytuga/Mi May [Mayta Díaz]; a la Gallina [Inti Díaz Sánchez]; y al Dodo; y al BoOb; y al Thomas; y a Muscario; y a Cariño; y al Robert; y a Cacha...

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez. Gracias a la confianza que usted me brindó, siempre lo consideraré no solo un gran maestro, sino también un gran amigo. Doctor, le agradezco tanto.

## ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	3
2.1. El cáncer.....	3
2.1.1. Diferencias entre las células normales y las células cancerosas.....	4
2.1.2. Características distintivas del cáncer.....	4
2.1.3. ¿Cómo aparece el cáncer?.....	5
2.1.4. “Causantes” del cáncer.....	6
2.1.5. La carcinogénesis.....	7
2.1.6. Tipos de cáncer.....	7
2.1.7. El cáncer en México y el mundo.....	9
2.1.8. Tratamientos contra el cáncer.....	11
2.2. Metabolitos secundarios.....	13
2.2.1. Clasificación de los metabolitos secundarios.....	14
2.2.2. Terpenos.....	16
2.2.3. Triterpenos.....	17
2.2.3.1. Triterpenos como agentes anticancerígenos.....	17
3. Antecedentes.....	19
3.1. El “cuachalalate”: <i>Amphipterygium adstringens</i> (schltdl.) Standl.....	19
3.1.1. Jerarquía taxonómica.....	20
3.1.2. Etnobotánica y usos de <i>A. adstringens</i> .....	20
3.1.3. Composición fitoquímica de <i>A. adstringens</i> .....	21
3.1.4. Farmacología de <i>A. adstringens</i> .....	22

3.1.5. Ácido masticadienónico y ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico.....	23
4. Pregunta de Investigación.....	25
5. Hipótesis.....	26
6. Objetivos.....	27
6.1. Objetivo general.....	27
6.1.1. Objetivos particulares.....	27
7. Estrategia experimental y métodos.....	28
7.1. Material vegetal.....	28
7.1.1. Preparación de los extractos.....	28
7.1.1.1. Extracto hexánico de corteza.....	28
7.1.1.2. Extracto de acetato de etilo de corteza.....	28
7.1.1.3. Extracto metanólico de raíz.....	28
7.1.2. Fraccionamiento del extracto orgánico.....	29
7.1.2.1. Extracto hexánico de corteza.....	29
7.1.2.2. Extracto de acetato de etilo de corteza.....	29
7.1.2.3. Extracto de metanólico de raíz.....	30
7.1.3. Material y equipo.....	30
7.2. Actividad biológica.....	31
7.2.1. Actividad anti-proliferativa <i>in vitro</i> : ensayo de citotoxicidad.....	31
7.2.1.1. Condiciones generales.....	31
7.2.1.2. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC <sub>50</sub> ).....	33

7.2.1.2.1. Evaluación del porcentaje de inhibición de las combinaciones del cisplatino con los ácidos masticadienónico o 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico en la proliferación de las líneas celulares PC3 y HCT116.....	35
7.2.1.2.2. Evaluación del porcentaje de inhibición del pretratamiento de las líneas celulares PC3 y HCT116 con los ácidos masticadienónico o 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y, el cisplatino.....	36
7.2.1.2.1.1. Determinación del tipo de muerte celular por citometría de flujo.....	37
7.2.2. Actividad anti-tumoral <i>in vivo</i> : ensayo de xenotrasplante.....	38
7.2.2.1. Xenotrasplante.....	38
7.2.2.2. Tratamiento.....	38
7.2.3. Análisis estadístico.....	39
8. Resultados y análisis.....	41
8.1. Aislamiento de los ácidos masticadienónico y 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico.....	41
8.2. Actividad biológica <i>in vitro</i> .....	41
8.2.1. Screening celular.....	41
8.2.2. Evaluación del porcentaje de inhibición de la proliferación inducida por el cisplatino, el ácido masticadienónico y, el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico.....	41
8.2.2.1. Línea celular PC3.....	41
8.2.2.1.1. Combinaciones del cisplatino más el ácido masticadienónico o el 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, en la línea celular PC3.....	42
8.2.2.2. Línea celular HCT116.....	45
8.2.2.2.1. Combinaciones del cisplatino más el ácido masticadienónico o el 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, en la línea celular HCT116.....	46

8.2.3. Análisis isoblográfico: combinación cisplatino más ácido masticadienónico.....	49
8.2.4. Obtención del tipo de muerte celular inducida por la combinación del cisplatino más el ácido masticadienónico .....	53
8.3. Actividad anti-tumoral <i>in vivo</i> .....	55
8.3.1. Línea celular PC3.....	55
8.3.2. Línea celular HCT116.....	58
9. Conclusión.....	60
10. Referencias bibliográficas.....	62
11. Información suplementaria.....	70
11.1. Líneas celulares.....	70
11.1.1. Línea celular PC3.....	70
11.1.2. Línea celular HCT116.....	70
11.1.3. Línea celular MCF10A.....	71
11.2. Resonancia Magnética Nuclear de los triterpenos.....	72
11.3. Espectro Infrarrojo.....	77
11.4. Análisis isoblográfico: combinación cisplatino más ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico.....	78
11.5. Combinaciones del cisplatino más el ácido masticadienónico o el 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, en la línea celular MCF10A.....	81
12. Resumen gráfico del proyecto.....	83
13. Artículo.....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Los sellos distintivos de cáncer.....	5
Figura 2 Vías del metabolismo secundario en plantas.....	15
Figura 3 Isopreno.....	16
Figura 4 Jerarquía taxonómica de <i>A. adstringens</i> .....	20
Figura 5 Triterpenos de <i>A. adstringens</i> .....	22
Figura 6 Estructura de los triterpenos.....	23
Figura 7 Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano PC3 y HCT116 y, en la línea celular no cancerosa MCF10A .....	33
Figura 8 Determinación de la IC <sub>50</sub> .....	34
Figura 9 Concentración inhibitoria 50 (IC <sub>50</sub> ).....	35
Figura 10 Xenotransplante .....	39
Figura 11 Prueba de sinergismo.....	50
Figura 12 Representaciones gráficas obtenidas del Informe CompuSyn para las combinaciones de cisplatino más ácido masticadienónico.....	52
Figura 13 El ácido masticadienónico mejora la apoptosis celular inducida por cisplatino en las líneas celulares PC3 y HCT116.....	53
Figura 14 Efecto anti-tumoral in vivo de las combinación de cisplatino más ácido masticadienónico en la línea celular PC3.....	55-56
Figura 15 Efecto anti-tumoral in vivo de las combinación de cisplatino más ácido masticadienónico en la línea celular HCT116.....	58-59

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Combinaciones.....	36
Tabla 2 Pretratamientos.....	37
Tabla 3 Concentraciones de las combinaciones evaluadas en la línea PC3.....	43
Tabla 4 Concentraciones de las combinaciones evaluadas en la línea HCT116.....	47

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Dosis individuales en la línea celular PC3.....	40
Gráfica 2 Combinaciones en proporción 1:1 en la línea celular PC3.....	44
Gráfica 3 Combinaciones en proporción 1:3 y 3:1 en la línea celular PC3.....	45
Gráfica 4 Dosis individuales en la línea celular HCT116.....	46
Gráfica 5 Combinación en proporción 1:1 en la línea celular HCT116.....	45
Gráfica 6 Combinaciones en proporción 1:3 y 3:1 en la línea celular HCT116.....	46

## INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

### ÍNDICE DE FIGURAS

S1 Ficha técnica de las características generales de la línea celular P3.....	70
S2 Ficha técnica de las características generales de la línea celular HCT116.....	70
S3 Ficha técnica de las características generales de la línea celular MCF10A.....	71
S4 Espectro NMR- <sup>1</sup> H (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del ácido masticadienónico (AMD).....	72
S5 Espectro NMR- <sup>13</sup> C (176 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del ácido masticadienónico (AMD).....	73
S6 NMR-HSQC (CDCl <sub>3</sub> ) del ácido masticadienónico (AMD).....	73
S7 NMR-HMBC (CDCl <sub>3</sub> ) del ácido masticadienónico (AMD).....	74
S8 Espectro NMR- <sup>1</sup> H (500 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del ácido 3α-hidroximasticadienónico (3α-AMD).....	74
S9 Espectro NMR- <sup>13</sup> C (126 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del ácido 3α-hidroximasticadienónico (3α-AMD).....	75
S10 NMR-HSQC (CDCl <sub>3</sub> ) del ácido 3α-hidroximasticadienónico (3α-AMD).....	75
S11 NMR-HMBC (CDCl <sub>3</sub> ) del ácido 3α-hidroximasticadienónico (3α-AMD).....	76
S12 Espectro IR del ácido masticadienónico (AMD).....	77
S13 Espectro IR del ácido 3α-hidroximasticadienónico (3α-AMD).....	77
S14 Prueba de antagonismo.....	78
S15 Representaciones gráficas obtenidas del Informe CompuSyn para las combinaciones de ácido 3α-hidroximasticadienónico con cisplatino.....	80
S16 Combinación cisplatino más ácido masticadienónico en proporción 1:1 en la línea celular MCF10A.....	81

## RESUMEN

El cisplatino (CDDP) es un fármaco comúnmente utilizado para varios tipos de cáncer. Sin embargo, puede causar daño renal. Se puede usar una dosis más baja de CDDP para prevenir el daño renal, pero esto puede reducir su efectividad en el tratamiento del cáncer. En este estudio se explora el potencial de combinar CDDP con el ácido masticadienónico (AMD), un triterpeno que se encuentra en *Ampherygium adstringens* (Schltdl.) Schiede ex Standl, para aumentar la citotoxicidad a las líneas celulares PC3 (adenocarcinoma de próstata) y, HCT116 (cáncer colorrectal); y sus efectos antitumorales en un modelo xenográfico en ratón.

Se evaluaron las combinaciones 0.5 ( $IC_{50}$ ) (la mitad de la  $IC_{50}$ ),  $IC_{50}$  y, 2 ( $IC_{50}$ ) (dos veces la  $IC_{50}$ ) en una proporción 1:1, 1:3 y 3:1. Nuestros hallazgos indican que la combinación CDDP más AMD es sinérgica, no así la combinación de CDDP más 3 $\alpha$ -AMD (3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico), que resultó ser antagónica. La combinación CDDP ( $IC_{50}$ ) más AMD ( $IC_{50}$ ) tuvo casi el 100% de inhibición de la proliferación celular y, a través de un estudio de citometría de flujo, pudimos observar un aumento de la apoptosis, en PC3 y HCT116, en comparación con su administración por separado. Sin embargo, en cierto modo no esperado, el pretratamiento de las células cancerosas con AMD induce resistencia a los tratamientos CDDP, AMD o, 3 $\alpha$ -AMD.

Por último, se llevó a cabo un ensayo de xenotransplante de ambas líneas celulares, PC3 y HCT116; la combinación de CDDP 02.0 mg/kg más AMD 47.5 mg/kg dada cada tercer día (3D) durante tres semanas (21 días) dio como resultado una inhibición del 85.3% del crecimiento del tumor en comparación con los ratones sin tratamiento. Sin embargo, cuando la misma dosis de AMD a 47.5 mg/kg se administró individualmente, cada tercer día durante 3 semanas, tuvo el mismo efecto.

Mientras que la combinación de CDDP más AMD demostró una potente citotoxicidad sinérgica contra PC3 y HCT116 *in vitro* e indujo apoptosis, este beneficio no se tradujo en una mayor actividad antitumoral *in vivo* con CDDP en la combinación, pero si en el estado físico (observable) del animal.

## SUMMARY

Cisplatin (CDDP) is a drug used for several types of cancer. However, it can cause kidney damage. A lower dose of CDDP can be used to prevent kidney damage, but this may reduce its effectiveness in treating cancer. This study explores the potential of combining CDDP with masticadienonic acid (AMD), a triterpene found in *Ampherygium adstringens* (Schltdl.) Schiede ex Standl, to increase cytotoxicity to PC3 (prostate adenocarcinoma) cell lines and, HCT116 (colorectal cancer); and its antitumor effects in a xenographic mouse model.

Combinations 0.5 ( $IC_{50}$ ) (half the  $IC_{50}$ ),  $IC_{50}$ , and 2 ( $IC_{50}$ ) (twice the  $IC_{50}$ ) were evaluated in a ratio of 1:1, 1:3, and 3:1. Our findings indicate that the combination of CDDP plus AMD is synergistic, but not the combination of CDDP plus 3 $\alpha$ -AMD (3 $\alpha$ -hydroxymasticadienonic acid), which turned out to be antagonistic. The combination CDDP ( $IC_{50}$ ) plus AMD ( $IC_{50}$ ) had almost 100% inhibition of cell proliferation and, through a flow cytometry study, we were able to observe an increase in apoptosis, in PC3 and HCT116, compared to its administration separately. However, in a somewhat unexpected way, pretreatment of cancer cells with AMD induces resistance to CDDP, AMD or, 3 $\alpha$ -AMD treatments.

Finally, a xenotransplantation trial was carried out with both cell lines, PC3 and HCT116; The combination of CDDP 02.0 mg/kg plus AMD 47.5 mg/kg given every third day (3D) for three weeks (21 days) resulted in 85.3% inhibition of tumor growth compared to untreated mice. However, when the same dose of AMD at 47.5 mg/kg was administered individually, every third day for 3 weeks, it had the same effect.

While the combination of CDDP plus AMD demonstrated potent synergistic cytotoxicity against PC3 and HCT116 *in vitro* and induced apoptosis, this benefit did not translate into greater antitumor activity *in vivo* with CDDP in the combination, but did in the physical state (observable) of the animal.

## **1. Introducción**

El cáncer es la principal causa de muerte, de enfermedades no transmisibles, en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) menciona que en 2020 se atribuyeron a esta enfermedad casi 10 millones de defunciones, es decir, casi una de cada seis de las que se registran (OMS, 2022). En México, esta enfermedad fue la responsable de 90 mil 603 defunciones en toda la población (INEGI, 2016,2022). Si bien es cierto que existen numerosos tratamientos cuyo fin es eliminar las células tumorales, la mayoría de estos son sumamente tóxicos para el organismo, atacando no solo a las células neoplásicas, sino también a células sanas. Dado este inconveniente, surge la necesidad de generar nuevas estrategias en el tratamiento de esta enfermedad. Una aproximación que ha producido varios fármacos anticancerosos utilizados en la clínica es la referente a los llamados productos naturales. Por ejemplo los alcaloides de la vinca aislados de *Cantharatus roseus* (L.) G.Don, el taxol aislado de *Taxus brevifolia* (Nutt.) y otros indican la pertinencia de utilizar los metabolitos secundarios de origen natural como fármacos anticancerosos.

*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht (Anacardiaceae), es un árbol endémico de México y Centro América. En México, esta planta, conocida como cuachalalate, palo de rosa, cuachalalá, maxiterán y volador (García, 2006), cuenta con un amplio uso dentro de la etnofarmacología, con más de 40 usos tradicionales reportados para ésta especie (Dalla Via *et al.*, 2012) En particular, la decocción de la corteza es usada comúnmente en el tratamiento de úlceras gástricas, cáncer gastrointestinal, y varias condiciones inflamatorias (Mata *et al.*, 1991; Argueta *et al.*, 1994; Makino, 2004; Oviedo-Chávez *et al.*, 2004). Los resultados de nuestros estudios así como de otros grupos indican que los ácidos triterpénicos masticadienónico (AMD) y 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3 $\alpha$ -AMD) son en parte responsables de las actividades antiproliferativas y antiinflamatorias (Dalla Via *et al.*, 2012, Oviedo-Chávez *et al.*, 2004).

Por otro lado, la terapia de combinación de fármacos es empleada en el tratamiento de muchas enfermedades, y es particularmente importante en el cáncer. Sin

embargo, se corre el riesgo de incrementar la toxicidad cuando dos o más fármacos son coadministrados.

Con el fin de explorar las posibles propiedades terapéuticas de combinaciones de un fármaco anticanceroso utilizado en la clínica con metabolitos secundarios citotóxicos, en este trabajo se propuso evaluar la actividad de los ácidos masticadienónico (AMD) y 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3 $\alpha$ -AMD) en diferentes combinaciones con el cisplatino (CDDP).

## **2. Marco teórico**

### *2.1. El cáncer*

¿Qué es el cáncer? La OMS define la palabra cáncer como un término genérico utilizado para designar un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias malignas» (OMS, 2022). Las células cancerosas cuentan con un conjunto de capacidades funcionales adquiridas a medida que pasan de la normalidad a los estados de crecimiento neoplásico, más específicamente capacidades que son cruciales para su capacidad de formar tumores malignos (Hanahan y Weinberg, 2000,2011). Una característica definitoria del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, en un proceso que se denomina «metástasis». La extensión de las metástasis es la principal causa de muerte por la enfermedad.

El cáncer puede empezar casi en cualquier lugar del cuerpo humano. Normalmente, las células humanas normales crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita. Cuando estas células normales envejecen o se dañan, mueren, y células nuevas las reemplazan. Sin embargo, en el cáncer, este proceso ordenado se descontrola. A medida que las células se hacen más y más anormales, las células viejas o dañadas sobreviven cuando deberían morir, y células nuevas se forman cuando no son necesarias. Estas células adicionales pueden dividirse sin interrupción y pueden formar masas que se llaman tumores (INC, 2021).

Muchos cánceres forman tumores sólidos, los cuales son masas de tejido. Los cánceres de la sangre, como las leucemias, en general no forman tumores sólidos.

Los tumores cancerosos son malignos, lo que significa que se pueden extender a los tejidos cercanos o los pueden invadir. Además, al crecer estos tumores, algunas células cancerosas pueden desprenderse y moverse a lugares distantes del cuerpo por medio del sistema circulatorio o del sistema linfático y formar nuevos tumores lejos del tumor original (AMLCC, 2020).

### *2.1.1 Diferencias entre las células normales y las células cancerosas*

Las células cancerosas difieren de las células normales de muchas maneras que les permiten crecer sin control y se vuelven invasivas. Una diferencia importante es que las células cancerosas son menos especializadas que las células normales. Esto quiere decir que, mientras las células normales maduran en tipos celulares muy distintos con funciones específicas, las células cancerosas no lo hacen. Esta es una razón por la que, al contrario de las células normales, las células cancerosas siguen dividiéndose sin detenerse (INC, 2021).

Además, las células cancerosas pueden ignorar las señales que normalmente dicen a las células que dejen de dividirse o que empiecen un proceso que se conoce como muerte celular programada, o apoptosis, el cual usa el cuerpo para deshacerse de las células que no son necesarias (INC, 2021).

### *2.1.2. Características distintivas del cáncer*

Las características distintivas del cáncer comprenden capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo de tumores humanos en varios pasos. Las características distintivas constituyen un principio organizador para racionalizar las complejidades de la enfermedad neoplásica. Incluyen el mantenimiento de señalización proliferativa, eludir los supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis y activar la invasión y la metástasis, entre otras (Figura 1). Detrás de estas características se encuentra la inestabilidad del genoma, que genera la diversidad genética que acelera su adquisición y fomenta múltiples funciones distintivas. Además de las células cancerígenas, los tumores exhiben otra dimensión de complejidad: contienen un repertorio de células reclutadas, ostensiblemente normales que contribuyen a la adquisición de rasgos distintivos mediante la creación del "microambiente tumoral" (Hanahan y Weinberg, 2011).



**Figura 1 Los sellos distintivos de cáncer.** Esta ilustración abarca las capacidades distintas propuestas. La última década ha sido testigo de un progreso notable hacia la comprensión de los fundamentos mecanicistas de cada sello distintivo. Tomada de Hanahan y Weinberg, 2011. Las características del cáncer –señales y/o sellos distintivos y emergentes que permiten el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica- proporcionan una base sólida para comprender la biología del cáncer.

### 2.1.3. ¿Cómo aparece el cáncer?

El cáncer es una enfermedad genética, es decir, es causado por cambios en los genes que controlan la forma como funcionan nuestras células, especialmente la forma como crecen y se dividen (INC, 2022).

Los cambios genéticos que causan cáncer pueden ser hereditarios. Pueden suceder también en la vida de una persona como resultado de errores que ocurren al dividirse las células o por el daño del ADN causado por algunas exposiciones del ambiente (Martínez y Blasco, 2011). Las exposiciones ambientales que causan cáncer son: las radiaciones ionizantes y ultravioleta (cancerígenos físicos), las sustancias, como los compuestos químicos en el humo de tabaco, el alcohol, los asbestos, el arsénico y las aflatoxinas (cancerígenos químicos) y las infecciones

causadas por ciertos virus, bacterias o parásitos (cancerígenos biológicos), que en conjunto reciben el nombre de agentes cancerígenos (INC, 2022).

El cáncer de cada persona tiene una combinación única de cambios genéticos. Conforme sigue creciendo el cáncer, ocurrirán cambios adicionales. Aun dentro de cada tumor, células diferentes pueden tener cambios genéticos diferentes. En general, las células cancerosas tienen más cambios genéticos, como mutaciones en el ADN, que las células normales. Algunos de estos cambios pueden no estar relacionados con el cáncer; pueden ser el resultado del cáncer y no su causa (Hanahan y Weinberg, 2000).

#### 2.1.4. "Causantes" del cáncer

Los cambios genéticos que contribuyen al cáncer tienden a afectar tres tipos principales de genes: proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN. Estos cambios se llaman a veces "causantes" de cáncer (Weitzel et al., 2011).

- Los proto-oncogenes se dedican al crecimiento y división celular normal. Sin embargo, cuando estos genes se alteran en ciertas maneras o son más activos de lo normal, ellos pueden convertirse en genes causantes de cáncer (u oncogenes), al permitir a las células que crezcan y sobrevivan cuando no deberían.
- Los genes supresores de tumores se dedican también a controlar el crecimiento y la división celular. Las células con algunas alteraciones en los genes supresores de tumores pueden dividirse en una forma sin control.
- Los genes reparadores del ADN se dedican a arreglar un ADN dañado. Las células con mutaciones en estos genes tienden a formar mutaciones adicionales en otros genes. Juntas, estas mutaciones pueden causar que las células se hagan cancerosas.

Conforme se ha aprendido más acerca de los cambios moleculares que resultan en cáncer, ciertas mutaciones se han encontrado juntas en muchos tipos de cáncer. A causa de esto, los cánceres se caracterizan a veces según los tipos de alteraciones

genéticas que se cree son causantes, no solo por el sitio del cuerpo en donde se forman y por la forma como se ven las células cancerosas al microscopio (Mitrus et al., 2012)..

#### *2.1.5. La carcinogénesis*

La carcinogénesis en un organismo multicelular puede resultar, como se describió anteriormente, por diferentes factores: químicos, físicos, biológicos o genéticos (Pitot, 1993). Las etapas de la carcinogénesis son iniciación, promoción y progresión. La iniciación es el proceso por el cual una célula normal sufre una o varias mutaciones genéticas que refuerzan su tendencia a proliferar y le proporciona una ventaja sobre las células vecinas; dicha mutación es transmitida a sus células hijas. La célula transformada o iniciada puede permanecer inactiva a menos que un agente promotor estimule su proliferación, es entonces cuando comienza la promoción; a diferencia de la iniciación, esta etapa es reversible. Durante esta etapa se lleva a cabo el crecimiento del tumor. Dicho desarrollo tumoral es promovido por la supervivencia y la “expansión clonal” de las células iniciadas. Los agentes promotores no interactúan directamente con el material genético, pero si afectan la expresión de los genes. En la progresión ya se pueden apreciar alteraciones discernibles en el genoma de las células, donde mutaciones y aberraciones cromosómicas se ven involucradas, así como una pérdida de forma y estructura de las células, mientras el tumor sigue en crecimiento. Durante la progresión, las células que ya poseen ventajas significativas de crecimiento sobre las células normales, se ven aún más afectadas. Estas alteraciones cariotípicas están asociadas con una tasa de crecimiento acelerada, alta capacidad de invasión y metástasis (Pinot *et al.*, 1981; Devi, 2004; Grivennikov *et al.*, 2010).

#### *2.1.6. Tipos de cáncer*

De acuerdo al Instituto Nacional de Cáncer (NCI), hay más de 100 tipos de cáncer, los cuales se pueden agrupar en las siguientes categorías:

- Carcinoma

Los carcinomas son los tipos más comunes de cáncer. Se forman en las células epiteliales, las cuales son las células que cubren las superficies internas y externas del cuerpo. Dentro de esta categoría encontramos las siguientes subcategorías: el adenocarcinoma, el carcinoma de células basales, el carcinoma de células escamosas y el carcinoma de células de transición.

- Sarcoma

Son cánceres que se forman en el hueso y en los tejidos blandos, incluso en músculos, tejido adiposo (graso), vasos sanguíneos, vasos linfáticos y en tejido fibroso (como tendones y ligamentos).

- Leucemia

Cánceres que empiezan en los tejidos que forman la sangre en la médula ósea. Hay cuatro tipos comunes de leucemia, los cuales se agrupan de acuerdo a la rapidez con la que empeora la enfermedad (aguda o crónica) y del tipo de glóbulo en donde empieza el cáncer (linfoblástico o mieloide).

- Linfoma

El linfoma es un cáncer que empieza en los linfocitos (células T o células B). Hay dos tipos principales de linfomas: Linfoma de Hodgkin y Linfoma no Hodgkin.

- Mieloma múltiple

El mieloma múltiple es cáncer que empieza en las células plasmáticas, otro tipo de células inmunitarias.

- Melanoma

El melanoma es cáncer que empieza en las células que se convierten en melanocitos, los cuales son células especializadas en producir melanina (el pigmento que da el color a la piel).

- Tumores de cerebro y de la médula espinal

Estos tumores se llaman según el tipo de célula en donde se formaron y en donde primero se formó el tumor en el sistema nervioso central.

- Otros tipos de tumores

Tumores de células germinativas: Tipo de tumores que empiezan en las células que forman los espermatozoides o los óvulos.

Tumores neuroendocrinos: Los tumores neuroendocrinos se forman de células que secretan hormonas en la sangre como respuesta a una señal del sistema nervioso.

### *2.1.7. El cáncer en México y el mundo*

A nivel mundial, 63% de las muertes anuales son causadas por enfermedades no transmisibles (ENT) que generalmente son crónicas, es decir, son de larga duración y progresan lentamente; los cuatro tipos principales de ENT son: las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades respiratorias crónicas, la diabetes y el cáncer, que juntas causan aproximadamente 38 millones de defunciones al año de las cuales, 75% se concentran en países de bajos y medianos ingresos (OMS, 2013 y 2015b).

Como se mencionó anteriormente, el cáncer (a veces también denominado neoplasia o tumor maligno) forma parte de este grupo de enfermedades y provoca cerca de ocho millones de muertes al año, lo que la convierte en la principal causa de muerte a nivel mundial. La OMS asegura que la cifra de nuevos casos, que cada año suman más de 14 millones, se incrementará 70% en los próximos 20 años (OMS, 2015a y 2015b).

Cabe destacar que el cáncer es una enfermedad crónico-degenerativa de mayor incidencia entre los adultos, en comparación con los niños y jóvenes, y es un padecimiento que no hace distinción de razas, nivel socioeconómico o sexo, aunque se observa una diferencia en los tipos de cáncer que afectan a hombres y mujeres. Al respecto, la OMS identifica que a nivel mundial en 2015, los tumores malignos de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado son los más comunes entre los

varones, mientras que en las mujeres son los de mama, colorrectal, pulmón, cuello del útero y estómago (OMS, 2014 y 2015a).

El cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo de ENT: en 2020 se atribuyeron a esta enfermedad casi 10 millones de defunciones alrededor del mundo.

Los cánceres más comunes en 2020, por lo que se refiere a los nuevos casos, fueron los siguientes:

- de mama (2,260,000 millones de casos);
- de pulmón (2,210,000 millones de casos);
- colorrectal (1,930,000 millones de casos);
- de próstata (1,410,000 millones de casos);
- de piel (distinto del melanoma) (1,200,000 millones de casos); y
- gástrico (1,090,000 millones de casos).

Los tipos de cáncer que causaron un mayor número de fallecimientos en 2020 fueron los siguientes:

- de pulmón (1,800,00 millones de defunciones);
- colorrectal (916 000 defunciones);
- hepático (830 000 defunciones);
- gástrico (769 000 defunciones); y
- de mama (685 000 defunciones).

La exposición a los diversos agentes cancerígenos (mencionados con anterioridad), en combinación con factores ambientales y genéticos, así como estilos de vida poco saludables que incluyen hábitos como el tabaquismo, la ingesta de alcohol y de alimentos ricos en grasas y carbohidratos, así como el sedentarismo, son las causas que más se asocian al desarrollo de la enfermedad. Se calcula que el consumo de

tabaco se relaciona con 20% de las muertes por cáncer a nivel mundial, por lo que se considera como la principal causa prevenible de cáncer en el mundo; por otro lado, la quinta parte de los casos se deben a infecciones crónicas como el virus del papiloma humano, vinculado al cáncer de cuello de útero y la hepatitis B, relacionada al cáncer hepático (OMS, 2014).

En México, el cáncer es la tercera causa de muerte actualmente, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Durante el periodo enero-junio de 2022, las defunciones por enfermedades del corazón fueron la primera causa de muerte a nivel nacional, con 105 864 casos. Siguió las causadas por diabetes mellitus, con 59 996 y por tumores malignos, con 44 533 casos (INEGI, 2023).

La cantidad de defunciones por esta causa mantiene su tendencia histórica al presentar un ligero incremento respecto al periodo de referencia en el año inmediato anterior (2021).

Cada año, se estiman 148 mil nuevos casos de cáncer. Aproximadamente 65.5 mil casos en hombres y 82.4 mil en mujeres. El cáncer más frecuente en el México es el de mama, con 27,500 casos por año; seguido del de próstata con 25,000; colon, 15,000; tiroides 12,000; cervicouterino, 7,870 y de pulmón con 7,810. A su vez, el cáncer de mama ocasiona 7,000 defunciones al año, el de próstata 6,900; colon, 7,000; tiroides, 900; cervicouterino, 4,000, y pulmón, 6,700., de acuerdo a cifras de la Secretaría de Salud.

#### *2.1.8. Tratamientos contra el cáncer*

Hay muchos tipos de tratamiento para el cáncer. El tratamiento que se recibirá depende del tipo de cáncer y de lo avanzado que esté. Sin embargo, la mayoría de los pacientes reciben una combinación de tratamientos como cirugía con quimioterapia o con radioterapia.

Los principales tipos de tratamiento del cáncer son (INC, 2023):

- Cirugía

Procedimiento mediante el cual se extirpa parcial o totalmente el tumor.

- Radioterapia

Tratamiento que usa altas dosis de radiación para destruir células cancerosas y reducir tumores.

- Inmunoterapia

Tipo de terapia biológica que usa sustancias producidas por organismos vivos para tratar el cáncer. Por ejemplo: anticuerpos monoclonales, citosinas, transferencia adoptiva celular, Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), etc.

- Medicina de precisión y terapia dirigida

Se trata de un tipo de tratamiento del cáncer que actúa sobre los cambios que promueven el crecimiento, la división y diseminación de las células cancerosas, usando la información sobre genes, proteínas y otras características del cáncer de una persona a fin de determinar el diagnóstico o el tratamiento de la enfermedad.

- Terapia hormonal

Tratamiento del cáncer que hace lento o detiene el crecimiento del cáncer que usa hormonas para crecer. La terapia hormonal se llama también tratamiento con hormonas o terapia endocrina.

- Trasplante de células madre

Procedimientos que restauran las células madre que forman la sangre en individuos cuyas células madre fueron destruidas por dosis muy elevadas de quimioterapia o de radioterapia que se usan para tratar algunos cánceres.

- Quimioterapia

Tratamiento del cáncer que usa fármacos para detener o hacer más lento el crecimiento de las células cancerosas, o bien, destruir dichas células.

Una vez que el cáncer es detectado, puede ser posible eliminarlo. Si el tumor se encuentra confinado en regiones específicas puede ser removido con cirugía. La detección temprana de estos tumores es importante, pues el cáncer se puede remover antes de que haya metástasis. Sin embargo, en algunos casos, la cirugía

no es opción; como es el caso de la leucemia, en donde el crecimiento incontrolado de leucocitos en la médula ósea no puede ser tratado por medio de un procedimiento quirúrgico, o cuando el tumor se encuentra comprometiendo tejido sano que no puede ser removido. Es aquí cuando se hace uso de los otros tipos de tratamientos, entre ellos, los más utilizados actualmente son la radioterapia y la quimioterapia, las cuales pueden ser utilizadas en combinación con el fin de aumentar su efecto. Desafortunadamente, la citotoxicidad no es inducida exclusivamente a células cancerosas. La quimioterapia expone a todas las células a sustancias tóxicas, debilitando las defensas naturales del organismo. La radiación también daña células sanas. Con ambos tratamientos se tienen muchos efectos secundarios (Enger *et al.*, 2011).

Actualmente, como parte de la búsqueda para optimizar el tratamiento del cáncer logrando mejores resultados, así como para mejorar la calidad de vida de los pacientes, las investigaciones se han centrado en el aislamiento de compuestos biológicamente activos (metabolitos secundarios) a partir de recursos naturales siguiendo las pistas que el conocimiento tradicional nos ha brindado (Dhami, 2013). Lo cual parece la vía a seguir para conseguir fármacos menos nocivos para el organismo.

## *2.2. Metabolitos secundarios*

Las plantas sintetizan dos tipos de metabolitos: los primarios y los secundarios. Los metabolitos primarios son aquellos compuestos químicos que intervienen en forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas. Ejemplo de ellos son los ácidos lipídicos, nucleótidos, aminoácidos y ácidos orgánicos, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (Croteau *et al.*, 2000; Lincoln y Zeiger, 2006). Por otro lado, los metabolitos secundarios son compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es letal para el organismo, como lo son los metabolitos primarios. Dentro del marco ecológico propuesto por Strassburger, Noll, Schenk y Schimper (1994), los metabolitos secundarios son sustancias ecológicamente

eficaces, frente a compuestos primarios que serían sustancias fisiológicamente eficaces.

Los metabolitos secundarios, como se menciona en el párrafo anterior, intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente (factores bióticos y abióticos), como adaptación o defensa; contribuyen al sabor de los frutos y color de las flores, atraen polinizadores y dispersores de semillas, actúan como compuestos de defensa o toxinas contra patógenos y herbívoros. Se sabe que diversas señales de estrés abiótico como la temperatura, salinidad, cantidad de agua, radiación, estrés químico y mecánico poseen una influencia en la producción de los metabolitos secundarios; esto quiere decir que los distintos metabolitos secundarios tienen una distribución restringida en el reino de las plantas, y algunos solo se encuentran en una especie o grupo (Swain, 1973; Levin, 1976; Cronquist, 1977; Yang *et al.*, 2012).

El reconocimiento de las diversas propiedades biológicas de muchos metabolitos secundarios ha alentado su investigación como medicamentos, antibióticos, insecticidas y herbicidas. Sin embargo, la producción de estos compuestos por lo general es baja (cerca del 1% del peso seco de la planta) y depende en gran medida del estado fisiológico y de desarrollo de la planta (Akula y Ravishankar, 2011).

### *2.2.1. Clasificación de los metabolitos secundarios*

Los metabolitos secundarios de las plantas pertenecen a tres grupos, según sus orígenes biosintéticos (Croteau *et al.*, 2000; Lincoln y Zeiger, 2006):

- Terpenoides

Todos los terpenoides, tanto los que participan en el metabolismo primario como los más de 25 000 metabolitos secundarios (Croteau *et al.*, 2000), son derivados del compuesto IPP (Isopentenil difosfato o "5-carbono isopentenil difosfato") formados en la ruta del ácido mevalónico. Aparecen en muchos tipos de plantas y tienen una actividad biológica importante (Goodwin, 1971). Entre ellos se cuentan los aceites esenciales, restringidos a unas pocas especies.

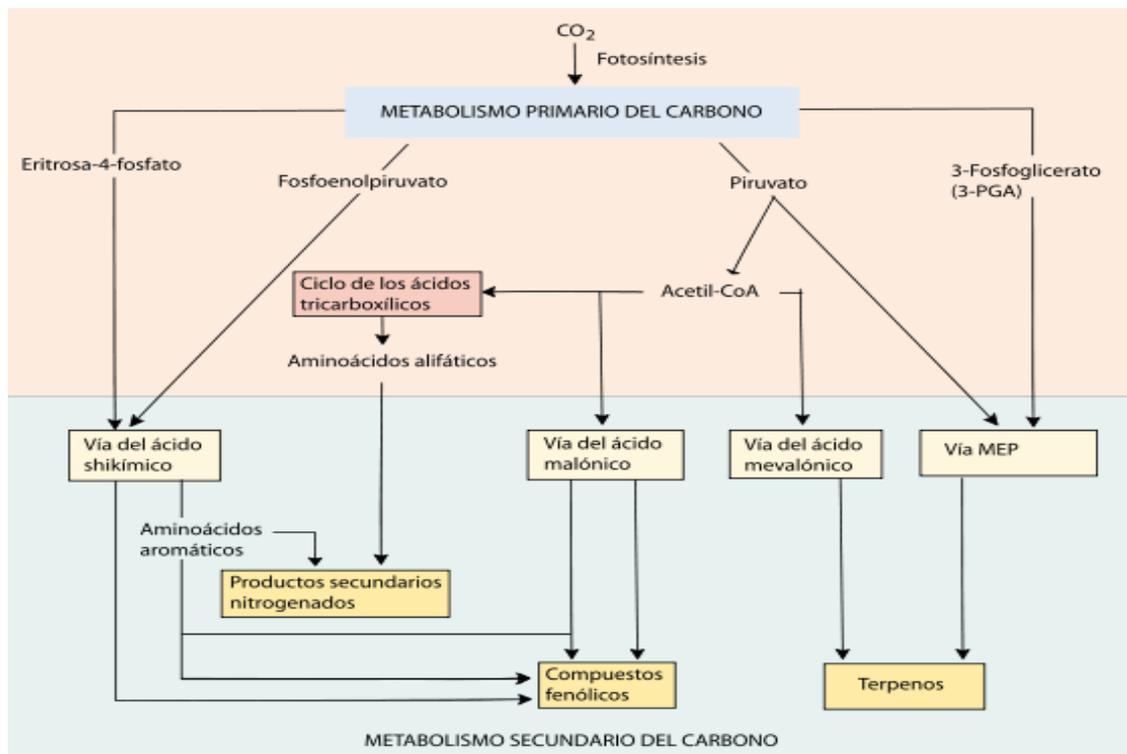
- Compuestos fenólicos y sus derivados

Los más de 8000 compuestos fenólicos conocidos se sintetizan por la ruta del ácido shikímico o por la del malonato/acetato. Incluyen a los fenilpropanoides, cumarinas, estilbenos y flavonoides.

- Compuestos nitrogenados o alcaloides

Se conocen alrededor de 12 000 alcaloides (Croteau *et al.*, 2000), que contienen uno o más átomos de nitrógeno, son biosintetizados principalmente a partir de aminoácidos. Los alcaloides presentan una gran diversidad de estructuras químicas (Robinson, 2012). Son fisiológicamente activos en los animales, aún en bajas concentraciones, por lo que tiene muchos usos en medicina. Ejemplos conocidos son la cocaína, la morfina, la atropina, la colchicina, la quinina, y la estricnina.

La biosíntesis de los metabolitos secundarios parte del metabolismo primario de las plantas del que se desvía acorde con las vías generales (Figura 2).



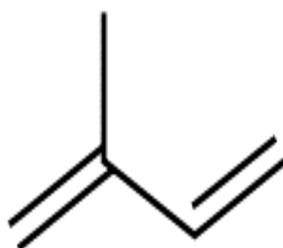
**Figura 2 Vías del metabolismo secundario en plantas.** La figura muestra las vías del metabolismo secundario de las plantas que producen los tres tipos generales de compuestos secundarios: productos nitrogenados, productos fenólicos, y terpenoides. También se

muestra su relación con el metabolismo primario. Tomada de [http://www.wikiwand.com/es/Metabolitos\\_secundarios\\_de\\_las\\_plantas](http://www.wikiwand.com/es/Metabolitos_secundarios_de_las_plantas)

Para el año 2012, se conocían más de 36 000 terpenoides, 12 000 alcaloides y 10 000 flavonoides, aunque estos representan solo una fracción de los que existen en la naturaleza (Yang *et al.*, 2012).

### 2.2.2. Terpenos

Los terpenos son compuestos orgánicos derivados de la fusión repetitiva de subunidades de cinco átomos de carbono; estas subunidades son conocidas como isoprenos (Figura 3). Los terpenos se clasifican según el número de subunidades de isopreno en: hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos. Los terpenos son la clase más abundante de productos naturales y se encuentran no solo en plantas, sino también en hongos, insectos, animales marinos, entre otros organismos (Gershenzon y Dudareva, 2007). La formación de terpenos en plantas, animales y microorganismos es hecha por enzimas muy similares, pero hay importantes diferencias en los procesos. En particular, las plantas producen una variedad muchísimo mayor que la que producen los animales o los microbios, y esta diferencia está reflejada en la compleja organización de la biosíntesis de los terpenos de las plantas al nivel del tejido, celular, subcelular, y genético. La biosíntesis de los terpenos está compartimentalizada, como también lo está la formación de su precursor el IPP.



**Figura 3 Isopreno.** Estructura química del isopreno, el cual es la subunidad de los terpenos

La función de los terpenos en las plantas es considerada tanto ecológica, como fisiológica. Algunos terpenos inhiben el crecimiento de plantas competidoras (alelopatía). Existen triterpenos insecticidas, mientras que otros se encuentran en flores y frutos, y atraen insectos polinizadores (Kaufman *et al.*, 1998). Los terpenos en las plantas son importantes en la resistencia a enfermedades causadas por hongos y bacterias, así como a la herbivoría. En general, los terpenos son los compuestos mayoritarios emitidos por la plantas para un gran número de funciones (Gershenzon y Dudareva, 2007).

### 2.2.3. Triterpenos

Los triterpenos son compuestos que se encuentran en la mayoría de los organismos, siendo un grupo abundante dentro del reino vegetal. Son un tipo de lípidos no saponificables que se forman por unión de varias unidades de isopreno, concretamente 6 (30 carbonos).

Los triterpenos poseen un amplio espectro de propiedades farmacológicas, como actividad anti-inflamatoria, antibacterial, antifúngica, antiviral, antidiabética, analgésica, antioxidante, hepatoprotectora, neuroprotectora, antitumoral, entre otras (González-Coloma *et al.*, 2011).

#### 2.2.3.1. Triterpenos como agentes anticancerígenos

Varios estudios han demostrado que los triterpenos suprimen la inflamación crónica (la cual está altamente ligada al desarrollo del cáncer), a través de la modulación de mediadores proinflamatorios, por ejemplo inhibiendo la 5.lipooxigenasa (5-LOX), iNOS, COX-2, NF-κB (Patlolla y Rao, 2012).

Algunos triterpenos inducen el arresto del ciclo celular en la fase G1, por medio de la inducción de un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina (p21) y disminuyendo la expresión de ciclinas D1 y E, así como fosforilando la proteína del retinoblastoma (Rb) CDK2 y CDK4. Otros triterpenos inducen el arresto en G0/G1, inhibiendo así la proliferación celular, y existen triterpenos que arrestan en la fase G2, lo cual está asociado con la regulación negativa de la ciclina B1 y los niveles de expresión de cdc25C (Patlolla y Rao, 2012).

Estudios han probado que algunos triterpenos inducen la apoptosis por medio de la inducción de la escisión de las caspasas 3 y 8, evento que es precedido por la alteración del potencial de la membrana mitocondrial y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). También se ha reportado que regulan negativamente la expresión de productos génicos regulados por STAT-3, como Bcl-2, Bcl-xL, ciclina D1 y survivina, aumentando la apoptosis al incrementar la población celular sub-G1 y aumentando la escisión de poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) inducido por la caspasa 3 (Patlolla y Rao, 2012).

Respecto a la angiogénesis, se ha demostrado que algunos triterpenos inhiben la formación de vasos sanguíneos inducidos por el Factor de Crecimiento de Fibroblasto básico (bFGF) o por el Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF) (Patlolla y Rao, 2012).

Se ha probado que existen triterpenos que inhiben la expresión de isoenzimas involucradas en la activación metabólica de procarcinógenos en metabolitos genotóxicos. También se han realizado estudios *in vivo* que exhiben los efectos anticarcinogénicos de algunos triterpenos. Los estudios clínicos de triterpenos como anticarcinogénicos son limitados (Patlolla y Rao, 2012).

### 3. Antecedentes

#### 3.1. El “cuachalalate”: *Amphipterygium adstringens* (schltdl.) Standl.

Es un árbol dioico con ramas ascendentes y torcidas, muy ramificado y con fuste corto y recto, algunas veces torcido. Llega a medir hasta 10 metros de altura y posee un diámetro a la altura del pecho de 40 centímetros hasta 1.30 metros. La punta de las ramas es engrosada a manera de clava, con hojas ovobadas, sésiles y con el borde aserrado, las cuales en ambos sexos, machos y hembras, se pierden durante 6 meses del año (Pennington, 2005). El factor distintivo de este árbol es su corteza. Su corteza es rugosa, de color grisáceo y verrugosa, con protuberancias de corcho; ornamentada en ocasiones y de base lisa pero con áreas de aspecto áspero muy variable: en algunas áreas casi liso y en otras con grandes proyecciones suberificadas que incluso le dan apariencia acostillada (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). De color café rojizo a café oscuro y con lenticelas circulares dispersas, de 5 a 7 mm de diámetro. Es una corteza extremadamente gruesa, muy compacta y dura, pero en las áreas lisas tiene 15-20 mm de grosor total (Pennington, 2005).

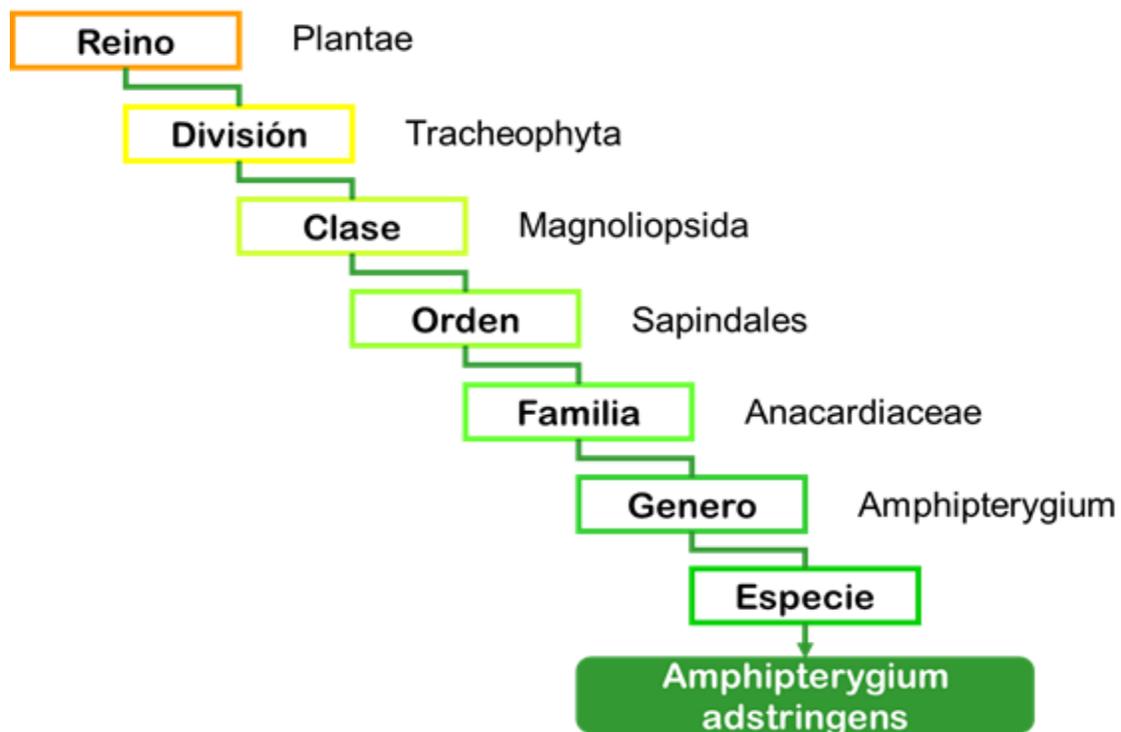
Sus ramas suelen estar cubiertas de cicatrices de hojas caídas y puede estar desnudo o cubierto con finas estructuras como cabellos. Sus hojas son imparipinnadas con pecíolos de 5,4 cm de longitud. Por lo general, tiene 3-7 folíolos. Estos folíolos tienen una base cuneada y ápice obtuso o redondeado, su margen es dentado o crenado. *A. adstringens* puede diferenciarse de los otros miembros del género *Amphipterygium* por la forma de sus valvas terminales, que son espatuladas, y tiene márgenes dentados en la mitad distal de la valva (Boletín del Instituto de Botánica, 2006).

Las flores son sésiles o con pedicelos de hasta 3mm de largo, actinomorfas, las flores masculinas forman panículas tomentosas. Las flores femeninas se encuentran solitarias en las axilas de las hojas en pedúnculos aplanados. Frutos de 2.5 a 5 centímetros, alados y persistentes por varios meses. Su fruto es una sámara, seco, indehiscente y fibroso, que se encuentra sobre pedicelos aplanados y

acrescentes hasta formar una especie de ala de 3 a 4 cm, y en cada fruto hay de una o dos semillas aplanadas de 5 mm de largo (Pennington, 2005).

El cuachalalate es un componente de la selva baja caducifolia de México, y se puede encontrar desde los 100 hasta los 700 msnm en los estados de Jalisco, Colima, Guerrero, México, Puebla, Nayarit, Morelos, Michoacán, Oaxaca y la cuenca del Balsas (SIRE, 2014).

### 3.1.1. Jerarquía taxonómica



**Figura 4** Jerarquía taxonómica de *A. adstringens*. Modificada de Encyclopedia of Life, 2014.

### 3.1.2. Etnobotánica y usos de *A. adstringens*.

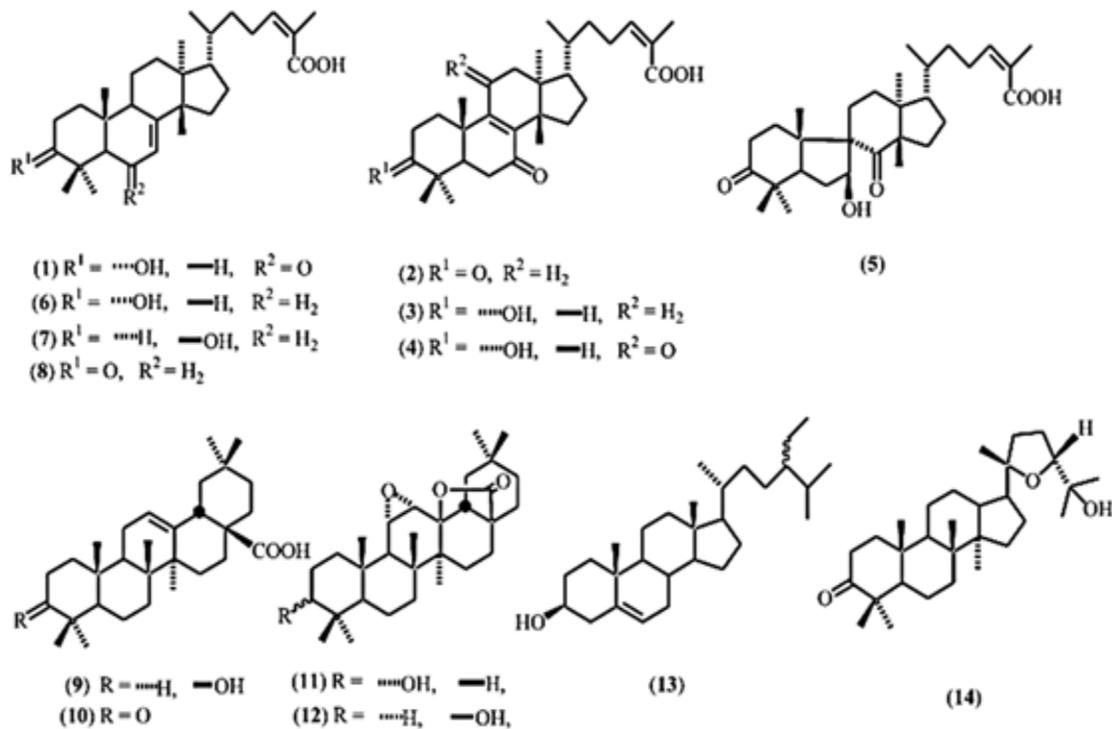
La corteza de ésta planta es administrada de diferentes maneras: como macerado acuoso o pulverizada, utilizando la resina de la corteza para hacer jarabes, etc., en especial, la decocción de la corteza se utiliza para el tratamiento de úlceras gástricas, gastritis, lesiones cutáneas, granos, heridas, llagas, golpes, rozaduras, mordeduras de animales, malestares digestivos, afecciones respiratorias,

enfermedades del riñón, problemas circulatorios, fiebre, para lavados vaginales, como cicatrizante, como analgésico y para el tratamientos de varios tipos de cáncer ( Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

### 3.1.3. Composición fitoquímica de *A. adstringens*.

Los metabolitos secundarios mayoritarios de los extractos orgánicos de la corteza de *A. adstringens* (Figura 5), son el ácido masticadienónico –AMD- (Fig. 5(8)) y el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico - 3 $\alpha$ -AMD- (Fig. 5(6)) (Rosas-Acevedo *et al.*, 2011).

Otros triterpenos que han sido aislados de esta planta son: ácido 3 $\alpha$ -hidroxi-6-oxo-7, 24Z-tirucaladien-26-oico (Fig. 5(1)); ácido 3,7- dioxo-8, 24Z-tirucaladien-26-oico (Fig. 5(2)); ácido 3 $\alpha$ -hidroxi-7-oxo-8, 24Z-tirucaladien-26-oico (Fig. 5(3)); ácido 7,11-dioxo-3 $\alpha$ -hidroxi--8, 24Z-tirucaladien-26-oico (Fig. 5(4)); ácido 3,8-dioxo-7 $\beta$ -hidroxi-7,9-cicro-7,8-seco-24Z-tirucaladien-26-oico (Fig. 5(5)); ácido 3 $\beta$ -hidroximasticadienónico (Fig. 5(7)); ácido oleanólico (Fig. 5(9)); ácido oleanólico (Fig. 5(10)); 3 $\alpha$ -hidroxi-11 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -epoxi-oleonano-28, 13 $\beta$ -olido (Fig. 5(11)); 3 $\beta$ -hidroxi-11 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -epoxi-oleonano-28,13 $\beta$ -olido (Fig. 5(12));  $\beta$ -sitosterol (Fig. 5(13)) y ocotillona (Fig. 5(14)) (Makino *et al.*, 2004).



**Figura 5 Triterpenos de *A. adstringens*.** La figura muestra la estructura química de algunos de los triterpenos aislados de los extractos orgánicos de la corteza de *A. adstringens*.

### 3.1.4. Farmacología de *A. adstringens*.

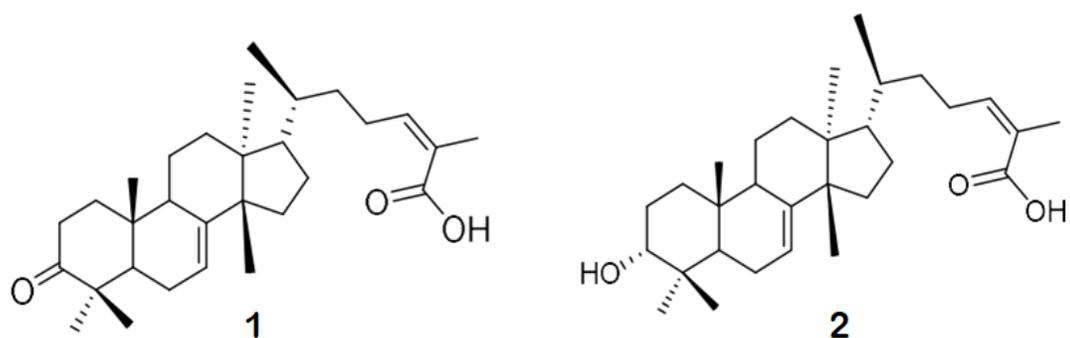
Algunos de los efectos en el uso de los productos derivados de *A. adstringens* (tés, jarabes, extractos, etc.) han sido comprobados experimentalmente. Por ejemplo, el efecto gastro protector del extracto hidroalcohólico ha sido bien demostrado en modelos animales. El extracto de metanol de la corteza produce un efecto gastro protector en las lesiones gástricas inducidas por etanol, lo cual proporciona validación a su uso en la medicina tradicional mexicana de esta planta como remedio contra las úlceras gástricas (Navarrete *et al.*, 1998). En este mismo contexto en 2005, Navarrete y colaboradores demostraron que el extracto metanólico de esta planta protege contra lesiones gástricas inducidas por altas dosis de diclofenaco sódico (sin alterar el efecto anti-inflamatorio del medicamento). También se ha determinado el efecto antibacteriano de la corteza del cuachalalate, al ser probada la fracción de éter de petróleo, así como una mezcla de ácidos anacárdicos obtenidos de dicha fracción contra *Helicobacter pylori* (Castillo-Juárez

et al., 2007). El extracto hexánico y una mezcla de ácidos anacárdicos de la planta poseen actividad anti-censado de quórum en las bacterias *Chromobacterium violaceum* y *Pseudomonas aeruginosa* (Castillo-Juárez et al., 2013). El extracto hexánico de la corteza ejerce un significativo efecto hipocolesterolémico (Mata et al., 1991).

De igual manera, se ha encontrado que, particularmente, algunos de los triterpenos aislados de *A. adstringens* presentan actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares de cáncer humano (experimentos que se han llevado a cabo tanto *in vitro*, como *in vivo*), así como actividad antiinflamatoria (Mata et al., 1991; Argueta et al., 1994; Makino, 2004; Oviedo-Chávez et al., 2004). Los resultados de nuestros estudios así como de otros grupos indican que los ácidos triterpénicos masticadienónico (AMD) y 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3 $\alpha$ -AMD) son en parte responsables de las actividades antiproliferativas y antiinflamatorias (Dalla Via et al., 2012, Oviedo-Chávez et al., 2004). Lo cual ha conducido las investigaciones hacia estos triterpenos con el fin de proporcionar un mejor tratamiento contra el cáncer.

### 3.1.5. Ácido masticadienónico y ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico

El AMD y el 3 $\alpha$ -AMD son triterpenos tetracíclicos (Figura 6), y unos de los componentes principales de diversas especies, entre ellas nuestro sujeto de estudio: *A. adstringens*.



**Figura 6 Estructura de los triterpenos.** Ácido masticadienónico (1) y ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (2).

Se ha demostrado que ambos ácidos poseen efectos anti-inflamatorios en dos modelos *in vivo*: el modelo de edema auricular en ratón inducido por TPA y el modelo de edema plantar inducido por carragenina. La actividad antiinflamatoria que presenta el extracto hexánico de *A. adstringens* se atribuye tanto a la presencia del AMD, como a la del 3 $\alpha$ -AMD. Así mismo, estos dos triterpenos inhiben la producción de óxido nítrico (NO), la cual está involucrada en procesos inflamatorios (Oviedo-Chávez *et al.*, 2004). También se ha observado que ambos poseen actividad antiproliferativa en varias líneas de cáncer humano. Se sabe que el 3 $\alpha$ -AMD causa una deficiencia en las funciones mitocondriales, lo cual podría explicar su potencial antiproliferativo (Dalla *et al.*, 2012).

#### **4. Pregunta de investigación**

¿La coadministración de triterpenos citotóxicos con el cisplatino presentara un mejor perfil farmacológico tanto en la eficacia como en la toxicidad que la administración por separado de cada compuesto?

## **5. Hipótesis**

La coadministración del cisplatino (CDDP) en combinación con el ácido masticadienónico (AMD) o el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3 $\alpha$ -AMD) presentará un mejor perfil farmacológico tanto en la eficacia como en la toxicidad que la administración por separado de cada compuesto.

## 6. Objetivos

### 6.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antiproliferativa *in vitro* y antitumoral *in vivo* de diferentes combinaciones de cisplatino (CDDP) y de los triterpenos ácido masticadienónico (AMD) y 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3 $\alpha$ -AMD).

#### 6.1.1. Objetivos particulares

Obtener extractos con disolventes orgánicos de *A. adstringens*: extracto hexánico de corteza, extracto de acetato de etilo de corteza y, extracto metanólico de raíz.

Aislar los ácidos AMD y 3 $\alpha$ -AMD a partir de todos los extractos de *A. adstringens*.

Evaluar la actividad antiproliferativa *in vitro* en las líneas celulares PC3 y HCT116 de AMD y 3 $\alpha$ -AMD en combinación con el CDDP.

Establecer si la interacción entre las diferentes combinaciones de CDDP más AMD y CDDP más 3 $\alpha$ -AMD, son aditivas, subaditivas o superaditivas mediante análisis isobolográficos.

Determinar el tipo de muerte celular inducido por las combinaciones a través de citometría de flujo.

Evaluar la actividad antitumoral *in vivo* de las combinaciones de CDDP más AMD en un modelo de xenotransplante.

## 7. Estrategia experimental y métodos

### 7.1. Material vegetal

La corteza y la raíz de *A. adstringens* se obtuvieron de varios ejemplares recolectados durante el mes de enero de 2012 en Barranca Honda, municipio de Tlatizapán, el cual se localiza geográficamente al norte a una latitud de 18°49'50", al sur a 18°34'41", al este a una longitud de 98°59'44" y 99°11'58" al oeste. Dicho municipio se encuentra entre 700 a 1700 msnm. La temperatura media anual en esta localidad se ha reportado en el rango de 22 a 24 °C y la precipitación promedio de lluvia es de 1060.4 mm anuales (INEGI, 2021). Tanto la corteza como la raíz se pulverizaron (por separado) y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Una muestra vegetal se depositó en el Herbario de la especialidad de Botánica del Colegio de Postgraduados (Texcoco, Estado de México) con el número de registro 1531. Identificada por la Dra. M. Soto.

#### 7.1.1. Preparación de extractos

##### 7.1.1.1 Extracto hexánico de corteza

El material seco (200 g) se trató con hexano (3 x 3 L) durante 12 h a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida y se obtuvo un concentrado de color verde oscuro.

##### 7.1.1.2. Extracto de acetato de etilo de corteza

El material seco (200 g) se trató con acetato de etilo (3 x 3 L) durante 12 h a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida y se obtuvo un concentrado de color verde oscuro.

##### 7.1.1.3. Extracto metanólico de raíz

El material seco (200 g) se trató con metanol (3 x 3 L) durante 12 h a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida y se obtuvo un concentrado de color café.

## 7.1.2. Fraccionamiento del extracto orgánico

### 7.1.2.1. Extracto hexánico de corteza

El residuo orgánico (punto de aplicación 1:1 – sílice/extracto-) se absorbió en 7.5 g de sílice y se preparó la columna (1:100 del punto de aplicación respecto a la fase estacionaria). Se colectaron 58 fracciones de 250 mL. Se reunieron las porciones con un comportamiento similar en cromatografía de capa fina (ccf) y resultaron 4 porciones (F1-F6): F1 (fracciones 12-18), F2 (fracciones 19-27), F3 (fracciones 28-30), F3 (fracciones 31-36), F4 (fracciones 37-39), F5 (fracciones 40-50) y F6 (fracciones 51-58). Todas las fracciones se recolectaron en una mezcla de hexano/AcOEt 9:1 como fase móvil.

De la porción F2 después de un proceso de recristalización con AcOEt se obtuvo un sólido blanco y se identificó como ácido masticadienónico (**1**) (400 mg, rendimiento de 2.6%).

De la porción F5 después de un proceso de recristalización con AcOEt se obtuvo un sólido cristalino y se identificó como ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (**2**).

### 7.1.2.2. Extracto de acetato de etilo de corteza

El residuo orgánico (punto de aplicación 1:1 – sílice/extracto-) se absorbió en 5 g de sílice y se preparó la columna (1:100 del punto de aplicación respecto a la fase estacionaria). Se colectaron 120 fracciones de 250 mL. Se reunieron las porciones con un comportamiento similar en ccf y resultaron 3 porciones (F1-F4): F1 (fracciones 21-34), F2 (fracciones 57-63) y F3 (fracciones 78-91. De la fracción 1-50 se recolectaron en una mezcla de hexano/AcOEt 9:1 como fase móvil, de la fracción 51-65 se recolectaron en una mezcla de hexano/AcOEt 8:2 como fase móvil y de la fracción 66-120 se recolectaron en una mezcla de hexano/AcOEt 7:3 como fase móvil.

De la porción F1, después de un proceso de recristalización con AcOEt se obtuvo un sólido blanco y se identificó como **2** (600 mg, rendimiento de 12%).

De la porción F2, después de un proceso de recristalización con AcOEt se obtuvo un sólido blanco y se identificó como **1** (400 mg, rendimiento de 8%)

#### 7.1.2.3. Extracto metanólico de raíz

El residuo orgánico (punto de aplicación 1:1 – sílice/extracto-) se absorbió en 15 g de sílice y se preparó la columna (1:100 del punto de aplicación respecto a la fase estacionaria). Se colectaron 380 fracciones de 250 mL. Se reunieron las porciones con un comportamiento similar en ccf y resultaron 4 porciones (F1-F4): F1 (fracciones 31-34), F2 (fracciones 35-39), F3 (fracciones 40-44), F3 (fracciones 94-114) y F4 (fracciones 209-259). De la fracción 1-79 se recolectaron en una mezcla de hexano/AcOEt 9:1 como fase móvil, de la fracción 80-120 se recolectaron en una mezcla de hexano/AcOEt 8:2 como fase móvil, de la fracción 121-200 se recolectaron en una mezcla de hexano/AcOEt 7:3 como fase móvil y de la fracción 201-380 se recolectaron en una mezcla de hexano/AcOEt 1:1 como fase móvil.

De la porción F3, después de un proceso de recristalización con AcOEt se obtuvo un sólido blanco y se identificó como **2** (47 mg, rendimiento de 0.16%).

#### 7.1.3. Aislamiento de los ácidos masticadienónico y 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico

El aislamiento de los triterpenos AMD y 3 $\alpha$ -AMD se realizó mediante cromatografía en columna abierta empacada con gel de sílice y eluida con mezclas de disolventes con polaridad ascendente iniciando con hexano y terminando con metanol. A partir del extracto de acetato de etilo de la corteza de *A. adstringens* (24 g), se preparó el punto de aplicación en relación 1:1 con sílice gel.

#### 7.1.4. Material y equipo

La destilación de los disolventes se realizó en un rotavapor Büchi R-114.

Para la cromatografía en columna (cc) se utilizó Sílicagel 60 (0.2 mm – 0.5 mm) (MERCK). Las cromatografías en capa fina (ccf) se realizaron en cromatofolios de aluminio cubiertos con sílice DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra Sil G/UV254 de 0.2 mm de espesor. Como reveladores se emplearon una disolución de sulfato cérico (Ce<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 1% en ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2N; y una lámpara de luz UV de 254 y 365 nm (Cole Parmer 9815 series Lamps).

Los puntos de fusión se determinaron en un equipo Fisher Johns.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) protónica (<sup>1</sup>H) se efectuaron en espectrómetros Varian VXR 300 o Bruker AS X 300; se utilizó el siguiente disolvente deuterado (Aldrich): cloroformo (CDCl<sub>3</sub>).

Los disolventes empleados se destilaron previamente, y se almacenaron en recipientes color ámbar.

## **7.2. Actividad biológica**

### *7.2.1. Actividad anti-proliferativa in vitro: ensayo de citotoxicidad*

La citotoxicidad en líneas tumorales y normales, se determinó de acuerdo a los protocolos establecidos por el Instituto Nacional de Cáncer (INC) de Estados Unidos (Skehan *et al.*, 1990; Monks *et al.*, 1991). Se evaluaron el AMD (ácido masticadienónico) (**1**) y 3 $\alpha$ -AMD (3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico) (**2**) (Figura 6), y el CDDP (cisplatino). El ensayo se efectuó en las líneas celulares de cáncer humano PC3 (próstata), HCT116 (adenocarcinoma colorectal) y, en la línea celular no cancerosa MCF10A (células epiteliales de mama). El CDDP se usó como fármaco de referencia.

#### *7.2.1.1. Condiciones generales*

Las líneas celulares PC3 y HCT116 se cultivaron en el medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado, 100 UI/mL de penicilina G, 100  $\mu$ g/mL de sulfato de estreptomycin, 0.25  $\mu$ g/mL de anfotericina B y 2 mM de L-glutamina. La línea celular MCF10A se cultivó en medio DMEN-F12 suplementado con 10% de SFB inactivado. Se conservaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

Los compuestos AMD, 3 $\alpha$ -AMD y, el CDDP, se disolvieron en DMSO. La concentración final de DMSO en los cultivos celulares fue menor a 0.05% y no tuvo efecto en los ensayos. Para realizar los tratamientos, las diluciones se hicieron en medio RPMI-1640, o medio DMEN-F12 en el caso de las células MCF10A, suplementado con 10% de SFB inactivado. En cada caso se realizaron 4 experimentos independientes. El procedimiento general se representa en la Figura 7.

En una placa de 96 pozos se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de cada línea celular, los cuales contenían  $1 \times 10^4$  células. A continuación, la placa se incubó durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$  en  $\text{CO}_2$  al 5%. Posteriormente se les dio un lavado con PBS y se le adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de los compuestos de prueba o de los tratamientos según el caso. La placa se incubó por 24 o 48 h bajo las mismas condiciones. Los grupos control contenían solamente un volumen equivalente de cada línea celular y RPMI-1640 o DMEN-F12 + 10% SFB inactivado.

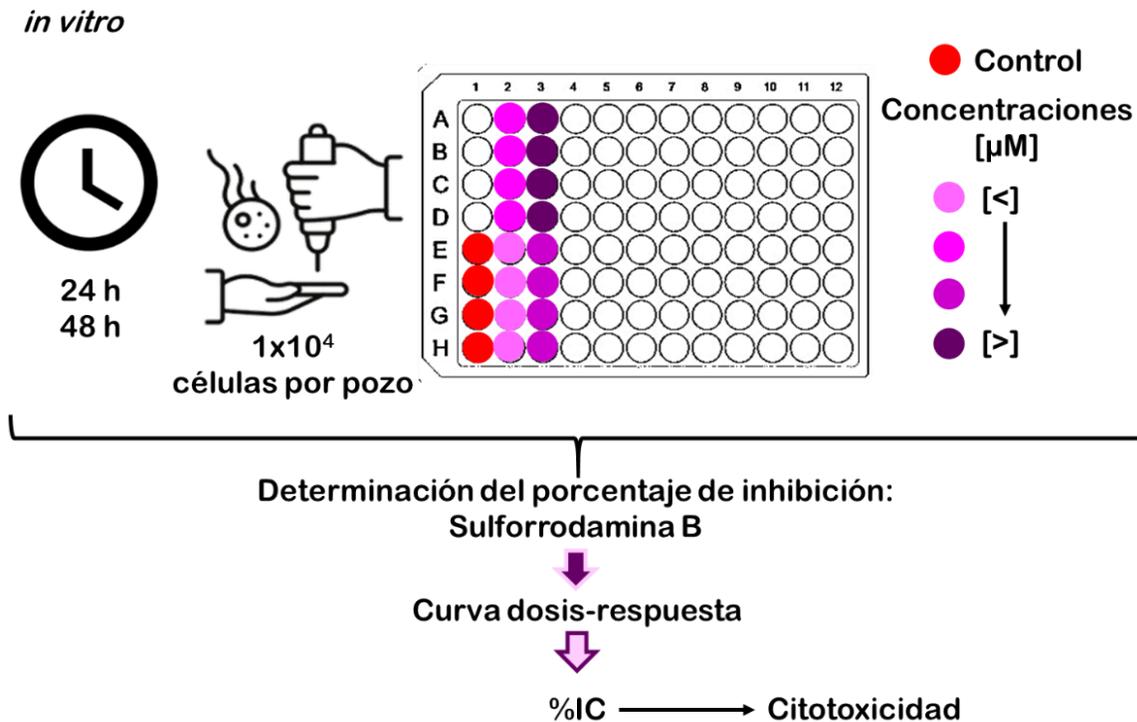
Después, las células se fijaron con una disolución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) al 10% p/v (100  $\mu\text{L}$ /pozo). La placa se incubó durante 1 h a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante se desechó y la placa se lavó 3 veces con agua corriente y se dejó secar. Posteriormente las células fueron tratadas con 100  $\mu\text{L}$  de sulforrodamina B al 0.4% durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, la placa se lavó tres veces con una disolución de ácido acético al 1%. El colorante se extrajo con una disolución 10 mM de base Tris pH 10.5. La densidad óptica (DO) se determinó con un lector de placas a una  $\lambda$  de 515 nm. La intensidad del color es directamente proporcional al número de células vivas, por lo tanto, a mayor coloración menor porcentaje de inhibición (%IC) del crecimiento celular.

La citotoxicidad se calculó conforme con la ecuación:

$$\%IC = 100 - [B / A \times 100]$$

En donde A corresponde al valor de DO de las células sin tratar; y B, al valor de DO de las células tratadas con los compuestos de prueba o de referencia.

En algunos casos se construyó una curva de dosis-respuesta, donde los valores de dosis y %IC eran las respectivas variables  $\langle\langle x \rangle\rangle$  y  $\langle\langle y \rangle\rangle$  respectivamente.



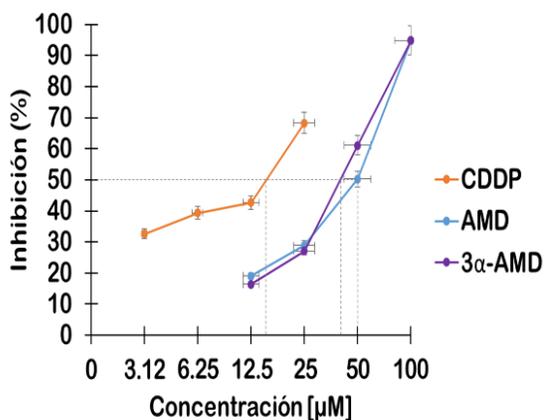
**Figura 7** Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano PC3 y HCT116 y, en la línea celular no cancerosa MCF10A. El esquema muestra una síntesis de los pasos que se siguieron para obtener la citotoxicidad de los compuestos en las distintas líneas celulares que se ocuparon para la realización de este proyecto.

### 7.2.1.2. Determinación de la concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ )

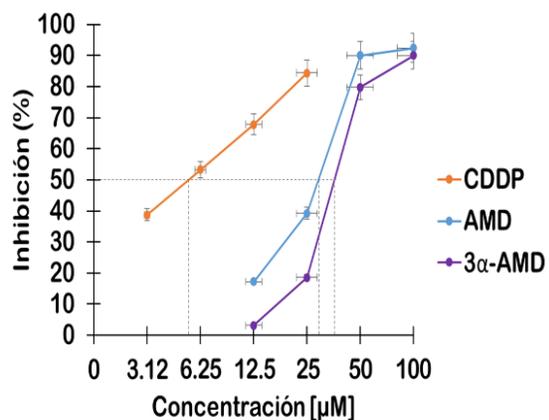
La determinación de las  $IC_{50}$  de los compuestos se llevó a cabo como se describió anteriormente, utilizando las concentraciones que se refieren en la Figura 8.

Curva dosis-respuesta	Concentraciones [ $\mu\text{M}$ ]					
Compuesto	3.12	6.25	12.5	25	50	100
CDDP						
AMD						
3 $\alpha$ -AMD						

A) PC3: Curva dosis-respuesta



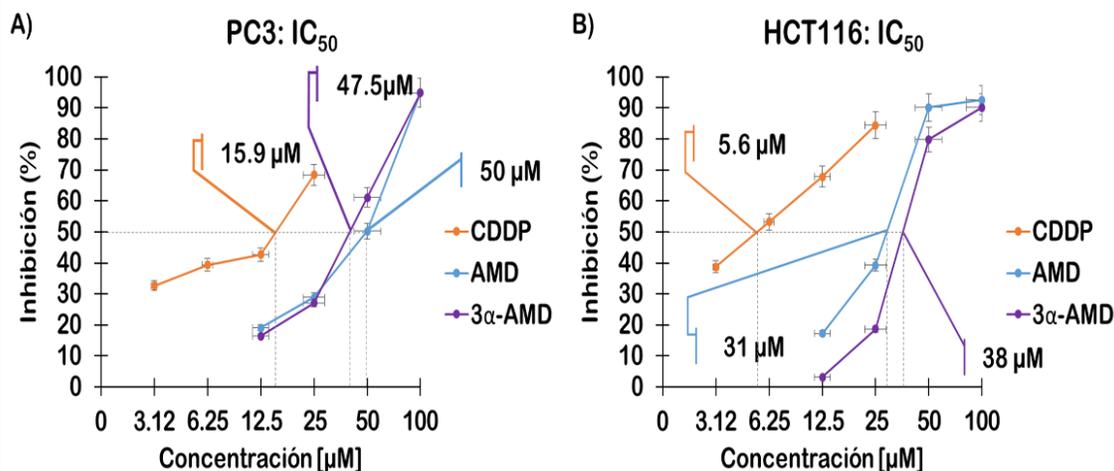
B) HCT116: Curva dosis-respuesta



**Figura 8 Determinación de la  $\text{IC}_{50}$ .** Se presentan las concentraciones [ $\mu\text{M}$ ] que se utilizaron para determinar la  $\text{IC}_{50}$  de los compuestos, a través de una curva dosis-respuesta, en las líneas celulares A) PC3 y B) HCT116. Las barras muestran la media  $\pm$  SD.

Los valores obtenidos de IC<sub>50</sub> se muestran en la Figura 9.

IC <sub>50</sub> [μM]			
Línea celular	Compuesto		
	CDDP	AMD	3αAMD
PC3	15.9±0.8	47.5±0.4	50.0±1.0
HCT116	05.6±0.8	31.0±0.5	38.0±0.8



**Figura 9 Concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>).** Valores de IC<sub>50</sub> para el CDDP y los triterpenos AMD y 3α-AMD, a través de una la curva dosis-respuesta, en las líneas celulares A) PC3 y B) HCT116. Las barras muestran la media ± SD.

7.2.1.2.1. *Evaluación del porcentaje de inhibición de las combinaciones del cisplatino con los ácidos masticadienónico o 3α-hidroximasticadienónico en la proliferación de las líneas celulares PC3 y HCT116.*

Las concentraciones utilizadas se establecieron a partir de los valores de IC<sub>50</sub> de los compuestos como dosis bioequivalentes (Figura 9).

Las concentraciones utilizadas para las combinaciones de CDDP más AMD y CDDP más 3α-AMD en las líneas celulares PC3 y HCT116, se describen en la Tabla 1.

A)	PC3 Combinaciones		Concentraciones [ $\mu\text{M}$ ]	
			CDDP + AMD	CDDP + 3 $\alpha$ -AMD
1 : 1	0.5 ( $\text{IC}_{50}$ )	07.9 + 23.8	07.9 + 25.0	
	$\text{IC}_{50}$	15.9 + 47.5	15.9 + 50.0	
	2 ( $\text{IC}_{50}$ )	31.7 + 95.0	31.7 + 100	
1 : 3 ( $\text{IC}_{50}$ )		15.9 + 143	15.9 + 150	
3 : 1 ( $\text{IC}_{50}$ )		47.6 + 47.5	47.6 + 50.0	

B)	HCT116 Combinaciones		Concentraciones [ $\mu\text{M}$ ]	
			CDDP + AMD	CDDP + 3 $\alpha$ -AMD
1 : 1	0.5 ( $\text{IC}_{50}$ )	02.8 + 15.5	02.8 + 19.0	
	$\text{IC}_{50}$	05.6 + 31.0	05.6 + 38.0	
	2 ( $\text{IC}_{50}$ )	11.2 + 62.0	11.1 + 76.0	
1 : 3 ( $\text{IC}_{50}$ )		05.6 + 93.0	05.6 + 114	
3 : 1 ( $\text{IC}_{50}$ )		16.7 + 31.0	16.7 + 38.0	

**Tabla 1 Combinaciones.** Concentraciones en [ $\mu\text{M}$ ] de los ácidos 1 y 2, y CDDP utilizadas en las diferentes combinaciones. En las líneas celulares A) PC3 y B) HCT116. Las combinaciones se basaron en las  $\text{IC}_{50}$  obtenidas de cada uno de los compuestos en las líneas celulares utilizadas (Figura 9).  $\pm$  SD.

7.2.1.2.2. *Evaluación del porcentaje de inhibición del pretratamiento de las líneas celulares PC3 y HCT116 con los ácidos masticadienónico o 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico y, el cisplatino.*

Las concentraciones utilizadas para los pretratamientos de AMD y 3 $\alpha$ -AMD a 24 h, así como las de la posterior incubación con CDDP durante este mismo tiempo, en cada una de las líneas celulares, PC3 y HCT116, se describen en la siguiente tabla (Tabla 2).

A)	PC3 Pretratamientos	Concentración [ $\mu\text{M}$ ]		
		CDDP	AMD	3 $\alpha$ -AMD
	0.25 ( $\text{IC}_{50}$ )	04.0	11.9	12.5
	0.5 ( $\text{IC}_{50}$ )	07.9	23.8	25.0
	$\text{IC}_{50}$	15.9	47.5	50.0
	2 ( $\text{IC}_{50}$ )	31.7	95.0	100

B)	HCT116 Pretratamientos	Concentración [ $\mu\text{M}$ ]		
		CDDP	AMD	3 $\alpha$ -AMD
	0.25 ( $\text{IC}_{50}$ )	1.4	07.8	09.5
	0.5 ( $\text{IC}_{50}$ )	02.8	15.5	19.0
	$\text{IC}_{50}$	5.6	31.0	38.0
	2 ( $\text{IC}_{50}$ )	11.2	62.0	76.0

**Tabla 2 Pretratamientos.** La tabla muestra las concentraciones en [ $\mu\text{M}$ ] de AMD y 3 $\alpha$ -AMD administradas 24h antes de la administración de las diferentes concentraciones de CDDP. En las líneas celulares A) PC3) y B) HCT116. Las concentraciones se basaron en las  $\text{IC}_{50}$  de cada uno de los compuestos obtenidas para las líneas celulares PC3 y HCT116 (Figura 9).

#### 7.2.1.2.1.1. Determinación del tipo de muerte celular por citometría de flujo

Las líneas celulares PC3 y HCT116 se sembraron en placas de 60 mm con una densidad de  $1.5 \times 10^5$ , por pozo, durante 24 h y luego se trataron con el compuesto solo o con la combinación durante 48 h. A continuación, se recogieron las células con tripsina, se lavaron dos veces con PBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. El sedimento celular se resuspendió en buffer de unión y se tiñeron con anexina V-FITC y yoduro de propidio (PI) de acuerdo a las indicaciones del Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit Sigma-Aldrich. La mortalidad de las células se determinó usando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, CA) del Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Se analizaron 10 000 células por evento utilizando el programa BD CellQuest Pro software.

### *7.2.2. Actividad anti-tumoral in vivo: ensayo de xenotrasplante*

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron ratones macho de cepa nu/nu (ratones inmunosuprimidos) de 6 a 8 semanas de edad con un peso promedio de  $24.0 \pm 2.0$  g. Los ratones se mantuvieron en micro aisladores libres de patógenos a una temperatura de 22°C, humedad relativa de 55% y un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h. Alimento *ad libitum*. El Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) aprobó los procedimientos experimentales. Número de *CICUAL BQO-1961-19-21-1*

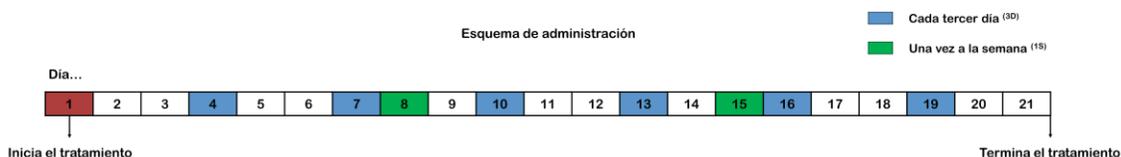
#### *7.2.2.1. Xenotrasplante*

Las líneas celulares PC3 y HCT116 en cultivo se recuperaron, por separado, con tripsina y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, el sedimento celular se resuspendió en medio RPMI-1640 y se inoculó subcutáneamente a cada uno de los ratones en el lado superior derecho del tronco del animal en una densidad de  $2 \times 10^6$  y  $1.5 \times 10^6$  de células respectivamente.

#### *7.2.2.2. Tratamiento*

El tratamiento comenzó una vez que los tumores alcanzaron un volumen aproximado de  $50.0 \pm 10.0$  mm<sup>3</sup>. Los diferentes compuestos, o combinación de estos, fueron diluidos en DMSO al 5% y aceite de ajonjolí (volumen total de 100 µL) para su administración vía intraperitoneal (ip). Todos los tratamientos fueron preparados el día de la administración.

Xenotransplante	Grupo						
	1	2	3	4	5	6	7
PC3	Control negativo	04.0 mg/kg <sup>(1S)</sup>	02.0g/kg <sup>(3D)</sup>	95.0 mg/kg <sup>(1S)</sup>	47.5 mg/kg <sup>(3D)</sup>	02.0 mg/kg + 47.5 mg/kg <sup>(1S)</sup>	02.0 mg/kg + 47.5 mg/kg <sup>(3D)</sup>
HCT116	Control negativo	04.0 mg/kg <sup>(1S)</sup>	02.0g/kg <sup>(3D)</sup>	62.0 mg/kg <sup>(1S)</sup>	31.0 mg/kg <sup>(3D)</sup>	—	
Compuesto	Sin tratamiento	CDDP		AMD		Combinación CDDP + AMD	



**Figura 10 Xenotransplante.** La figura muestra los grupos que se formaron para el xenotransplante con las líneas celulares PC3 y HCT116. Se formaron 7 grupos de 5 ratones cada uno para el ensayo de xenotransplante en la línea celular PC3: 1.Control negativo (sin tratamiento), 2.CDDP 04.0 mg/kg<sup>(1S)</sup>, 3.CDDP 02.0 mg/kg<sup>(3D)</sup>, 4.AMD 95.0 mg/kg<sup>(1S)</sup>, 5.AMD 47.5 mg/kg<sup>(3D)</sup>, 6.Combinación CDDP 02.0 mg/kg + AMD 47.5 mg/kg<sup>(1S)</sup> y, 7.Combinación CDDP 02.0 mg/kg + AMD 47.5 mg/kg<sup>(3D)</sup>. Para el ensayo de xenotransplante en la línea HCT116 se formaron 5 grupos de 5 ratones cada uno: 1.Control negativo (sin tratamiento), 2.CDDP 04.0 mg/kg<sup>(1S)</sup>, 3.CDDP 02.0 mg/kg<sup>(3D)</sup>, 4.AMD 62.0 mg/kg<sup>(1S)</sup> y, 5.AMD 31 mg/kg<sup>(3D)</sup>. Así como el esquema de administración: Una vez a la semana<sup>(1S)</sup> y Cada tercer día<sup>(3D)</sup>, durante los 21 días de tratamiento.

Los controles negativos de administración de DMSO al 5% en aceite de ajonjolí una vez por semana y cada tercer día se tomaron de estudios previos (Couder García, 2022).

### 7.2.3. Análisis estadístico

Los experimentos fueron llevados a cabo por cuadruplicado u octuplicado. Los datos son presentados como la media  $\pm$  desviación estándar (SD) de cuatro experimentos independientes. Las IC<sub>50</sub> y las diferencias estadísticas fueron determinadas usando el Graphpad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc). La comparación entre los tratamientos y los grupos control fue realizado con la prueba Student's t-test y ANOVA de dos vías. Una diferencia estadística de \*p<0.05 fue considerada significativa.

El análisis isoblográfico para establecer si la interacción entre las diferentes combinaciones de CDDP más AMD y CDDP más 3 $\alpha$ -AMD, son aditivas, subaditivas o superaditivas, se llevó a cabo a través del CompuSyn software (ComboSyn Inc).

El análisis de los datos obtenidos en la citometría de flujo, así como su representación gráfica, se llevó a cabo a través del FlowJo Software (BD Biosciences).

## 8. Resultados y análisis

### 8.1. Aislamiento de los ácidos masticadienónico y 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico

Los ácidos AMD (1 g) y 3 $\alpha$ -AMD (1.9 g) se lograron aislar de las fracciones eluidas con 9:1 hexano:AcOEt. Las estructuras de AMD y 3 $\alpha$ -AMD (Figura 6) se determinaron por el análisis de su datos espectroscópicos de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC) y se compararon con los datos previamente reportados en la literatura (Barton y Seoane, 1956; Soriano-García *et al.*, 1987; Navarrete *et al.*, 1989; Mulholland y Nair, 1994; Papageorgiou *et al.*, 1997) (*Información suplementaria*).

Ácido masticadienoico (AMD) (**1**). Sólido cristalino de color blanco. Pf 164-172°

Ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienoico (3 $\alpha$ -AMD) (**2**). Sólido blanco amorfo. Pf 142-150°

### 8.2. Actividad biológica *in vitro*

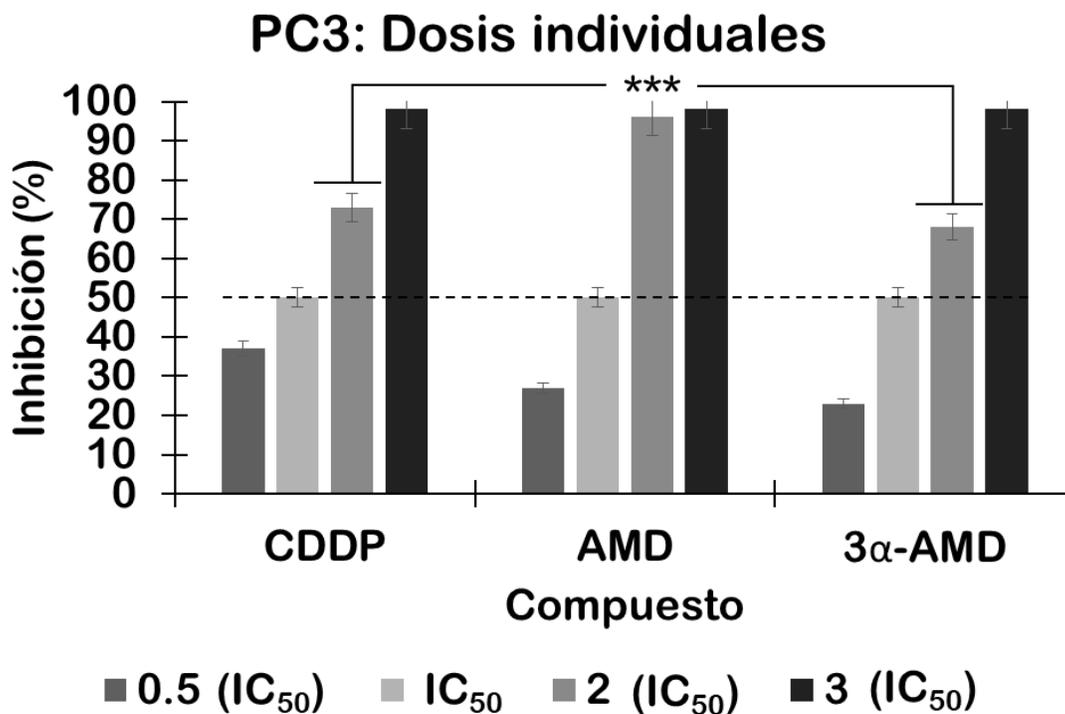
#### 8.2.1. Screening celular

Anteriormente se evaluó la citotoxicidad de los ácidos masticadienónico y 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico en cinco líneas celulares de cáncer humano: HCT15 (colon), MCF7 (mama), U251 (sistema nervioso central), PC3 (prostata), K562 (leucemia) (Oviedo, 2005) y, HCT116 (colon). Siguiendo estos resultados, para este proyecto fueron seleccionadas las líneas celulares PC3 y HCT116, siendo estas donde la actividad citotóxica de los compuestos **1** y **2** (Figura 6), fue mayor; así también se evaluó la disponibilidad de estas líneas dentro del grupo de trabajo.

8.2.2. Evaluación del porcentaje de inhibición de la proliferación inducida por el cisplatino, el ácido masticadienónico y, el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico.

#### 8.2.2.1. Línea celular PC3

La inhibición de proliferación celular de CDDP, AMD y, 3 $\alpha$ -AMD en la línea celular PC3 fue dosis dependiente. Sin embargo, es significativo que a la concentración de 2 (IC<sub>50</sub>) AMD, mostró una inhibición de cerca del 100%. Mientras que, CDDP y 3 $\alpha$ -AMD a la misma concentración solo mostraron una inhibición del aproximadamente 70% (Grafica 1).



**Gráfica 1 Dosis individuales en la línea celular PC3.** La gráfica muestra el %IC del CDDP y los triterpenos AMD y, 3α-AMD, de las concentraciones utilizadas para realizar las combinaciones en la línea celular PC3 (Tabla 1A). Las concentraciones se basaron en las IC<sub>50</sub> obtenidas para la línea PC3 de cada uno de los compuestos (Figura 9). Las barras muestran la media ± SD. \*Student's t-test. \*\*\*p<0.0001. La línea punteada indica el 50% de inhibición.

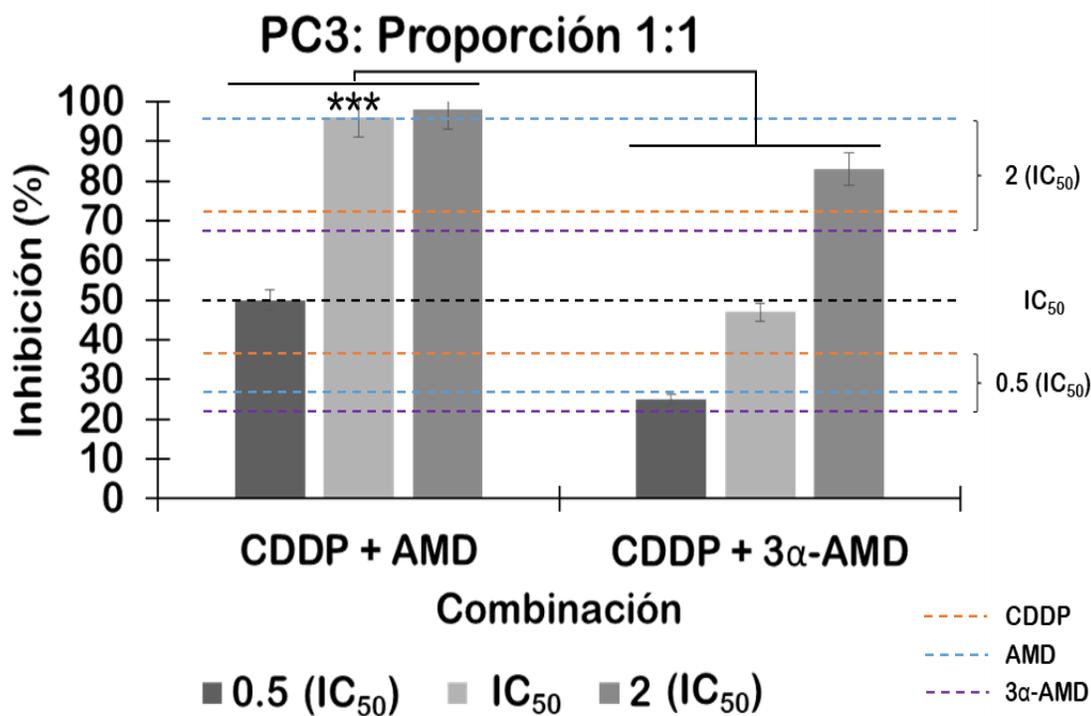
#### 8.2.2.1.1. Combinaciones del cisplatino más el ácido masticadienónico o el 3α-hidroxi-masticadienónico, en la línea celular PC3.

Las combinaciones de CDDP más AMD y CDDP más 3α-AMD se evaluaron en tres concentraciones 0.5 (IC<sub>50</sub>), IC<sub>50</sub> y 2 (IC<sub>50</sub>) en relación 1:1; e IC<sub>50</sub> y 3 (IC<sub>50</sub>) en relación 1:3 y 3:1 (Tabla 3).

PC3 Combinaciones		Concentraciones [ $\mu\text{M}$ ]	
		CDDP + AMD	CDDP + 3 $\alpha$ -AMD
1 : 1	0.5 ( $\text{IC}_{50}$ )	07.9 + 23.8	07.9 + 25.0
	$\text{IC}_{50}$	15.9 + 47.5	15.9 + 50.0
	2 ( $\text{IC}_{50}$ )	31.7 + 95.0	31.7 + 100
1 : 3 ( $\text{IC}_{50}$ )		15.9 + 143	15.9 + 150
3 : 1 ( $\text{IC}_{50}$ )		47.6 + 47.5	47.6 + 50.0

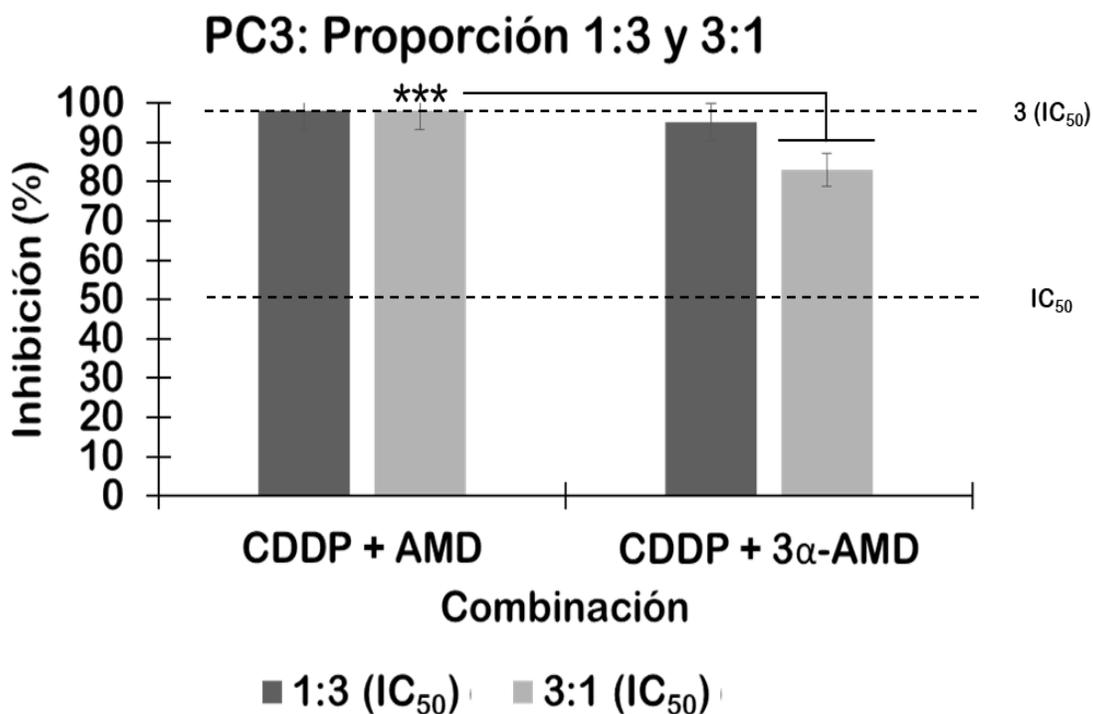
**Tabla 3 Concentraciones de las combinaciones evaluadas en la línea PC3.** La tabla muestra las concentraciones [ $\mu\text{M}$ ] utilizadas de cada uno de los compuestos en las diferentes proporciones en la línea celular PC3.  $\pm$  SD

Los resultados indicaron que la actividad de estas combinaciones depende del triterpeno evaluado. En la combinación CDDP más AMD a la concentración de 0.5 ( $\text{IC}_{50}$ ) se observó una actividad aproximadamente del 50%. Mientras que a la concentración de  $\text{IC}_{50}$  (CDDP (15.87  $\mu\text{M}$ ) + AMD (47.50  $\mu\text{M}$ )) se observó una inhibición del 100%. Estos resultados indican una clara sinergia entre CDDP y AMD para inhibir la proliferación celular (Gráfica 2). Por el contrario, en la combinación CDDP más 3 $\alpha$ -AMD a la concentración 0.5 ( $\text{IC}_{50}$ ) (CDDP (07.9  $\mu\text{M}$ ) + 3 $\alpha$ -AMD (25.0  $\mu\text{M}$ )) solo se observa un 20% de inhibición y a la concentración de  $\text{IC}_{50}$  (CDDP (15.9  $\mu\text{M}$ ) más 3 $\alpha$ -AMD (50.0  $\mu\text{M}$ )) apenas si se observa un 50% de actividad, el mismo porcentaje de actividad mostrado por los compuestos por separado. Estos resultados indican que la combinación CDDP más 3 $\alpha$ -AMD no es aditiva o sinérgica (Gráfica 2).



**Gráfica 2 Combinaciones en proporción 1:1 en la línea celular PC3.** La gráfica muestra el %IC de las combinaciones de CDDP más AMD y CDDP más 3α-AMD en proporción 1:1 que se presentan en la Tabla 3 para la línea celular PC3. La proporción se basó en las IC<sub>50</sub> obtenidas para la línea celular PC3 de cada uno de los compuestos (Figura 9). Las barras muestran la media ± SD. \* Student's t-test. \*\*\*p<0.0001. La línea punteada indica el porcentaje de inhibición de cada uno de los compuestos de manera individual a las mismas concentraciones utilizadas en las combinaciones en proporción 1:1.

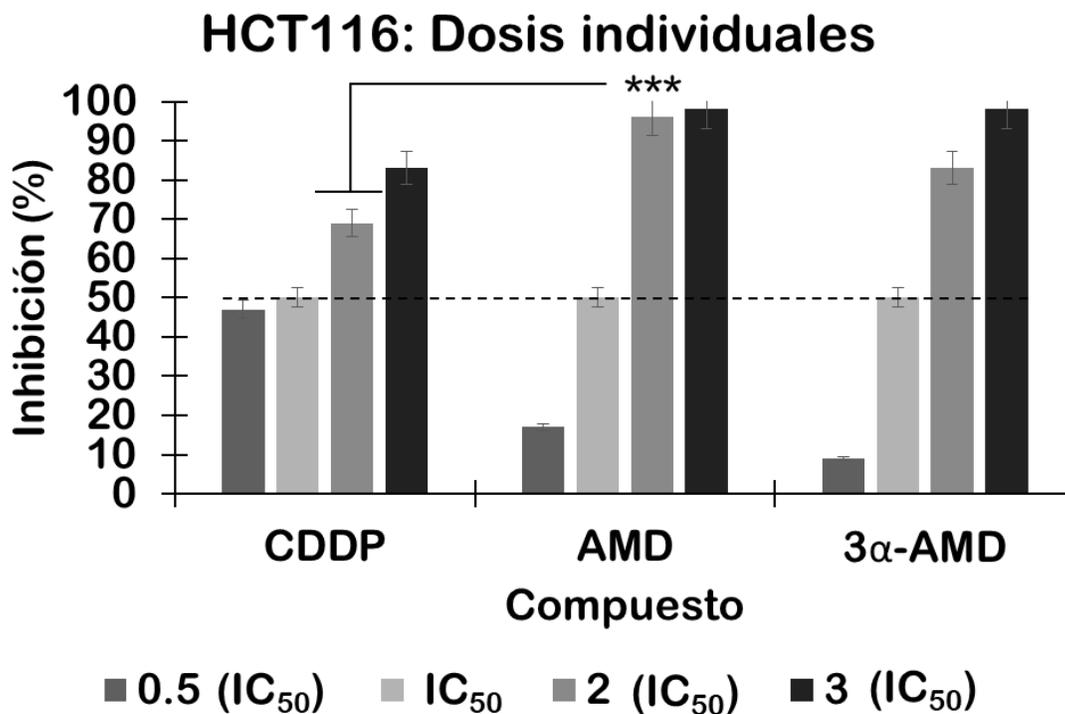
Los resultados de las combinaciones (Tabla 2) en proporción 1:3 (CDDP (IC<sub>50</sub>) más 3 (IC<sub>50</sub>) triterpeno) indicaron un 98% de inhibición, tanto para AMD como para 3α-AMD, lo cual es un buen hallazgo, ya que la concentración de CDDP es solo aquella que corresponde a su IC<sub>50</sub> (15.87 μM). Por otro lado, las combinaciones 3:1 (CDDP 3 (IC<sub>50</sub>) + triterpeno (IC<sub>50</sub>)) mostraron una inhibición del 98 y 83 %, en la combinación CDDP más AMD y CDDP más 3α-AMD, respectivamente (Gráfica 3). Se notó una disminución significativa en el porcentaje de inhibición de la combinación CDDP más 3α-AMD, lo que refleja el papel antagónico en dicha combinación cuando el 3α-AMD es el compuesto mayoritario, infiriendo que afecta el mecanismo de acción del CDDP.



**Gráfica 3 Combinaciones en proporción 1:3 y 3:1 en la línea celular PC3.** La gráfica muestra el %IC bajo el tratamiento de la combinación en proporción 1:3 (CDDP (IC<sub>50</sub>) más 3 triterpeno (IC<sub>50</sub>)) y, 3:1 (CDDP 3(IC<sub>50</sub>) más triterpeno (IC<sub>50</sub>)) que se presentan en la Tabla 3 para la línea celular PC3. La proporción se basó en las IC<sub>50</sub> obtenidas para la línea PC3 de cada uno de los compuestos (Figura 9). Las barras muestran la media ± SD. \*Student's t-test. \*\*\*p<0.0001. La línea punteada indica el porcentaje de inhibición de cada uno de los compuestos de manera individual a las mismas concentraciones utilizadas para las concentraciones en proporción 1:3 y 3:1.

#### 8.2.2.2. Línea celular HCT116.

La inhibición de proliferación celular de CDDP, AMD y, 3α-AMD y en la línea celular HCT116 fue dosis dependiente. Sin embargo, es significativo que a la concentración de AMD 2 (IC<sub>50</sub>), mostró una inhibición de cerca del 100%. Mientras que, CDDP y 3α-AMD a la misma concentración solo mostraron una inhibición del aproximadamente 70 y 80%, respectivamente, habiendo una diferencia significativa del AMD con respecto al CDDP a la dosis de 2 (IC<sub>50</sub>) (Grafica 4).



**Gráfica 4 Dosis individuales en la línea celular HCT116.** La gráfica muestra el %IC de los compuestos AMD y 3α-AMD, y el CDDP de las concentraciones utilizadas para realizar las combinaciones en la línea celular de cáncer HCT116 (Tabla 3B). Las concentraciones se basaron en las IC<sub>50</sub> obtenidas para la línea HCT116 de cada uno de los compuestos (Tabla 2). Las barras muestran la media ± SD. \*Student's t-test. \*\*\*p<0.0001. La línea punteada indica el 50% de inhibición.

8.2.2.2.1. Combinaciones del cisplatino más el ácido masticadienónico o el 3α-hidroximasticadienónico, en la línea celular HCT116.

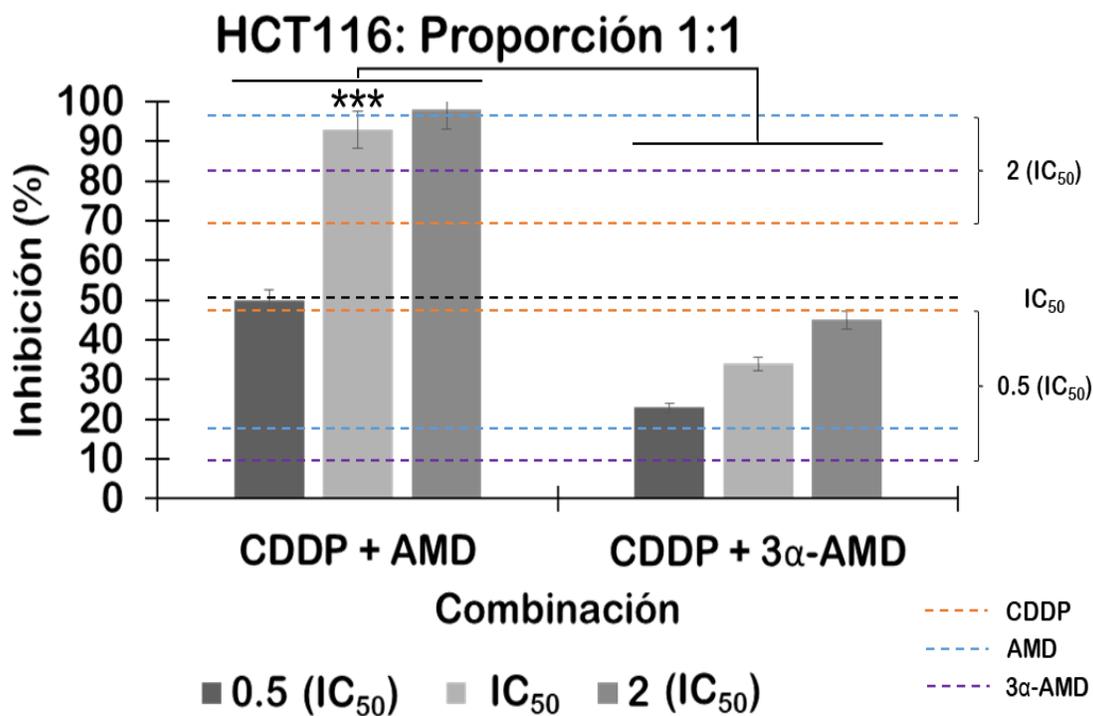
Las combinaciones de CDDP más AMD y CDDP más 3α-AMD se evaluaron en tres concentraciones 0.5 (IC<sub>50</sub>), IC<sub>50</sub> y 2 (IC<sub>50</sub>) en relación 1:1; e IC<sub>50</sub> y 3 (IC<sub>50</sub>) en relación 1:3 y 3:1 (Tabla 4).

HCT116 Combinaciones		Concentraciones [ $\mu\text{M}$ ]	
		CDDP + AMD	CDDP + 3 $\alpha$ -AMD
1 : 1	0.5 ( $\text{IC}_{50}$ )	02.8 + 15.5	02.8 + 19.0
	$\text{IC}_{50}$	05.6 + 31.0	05.6 + 38.0
	2 ( $\text{IC}_{50}$ )	11.2 + 62.0	11.1 + 76.0
1 : 3 ( $\text{IC}_{50}$ )		05.6 + 93.0	05.6 + 114
3 : 1 ( $\text{IC}_{50}$ )		16.7 + 31.0	16.7 + 38.0

**Tabla 4 Concentraciones de las combinaciones evaluadas en la línea HCT116.** La tabla muestra las concentraciones [ $\mu\text{M}$ ] utilizadas de cada uno de los compuestos en las diferentes proporciones en la línea celular HCT116.

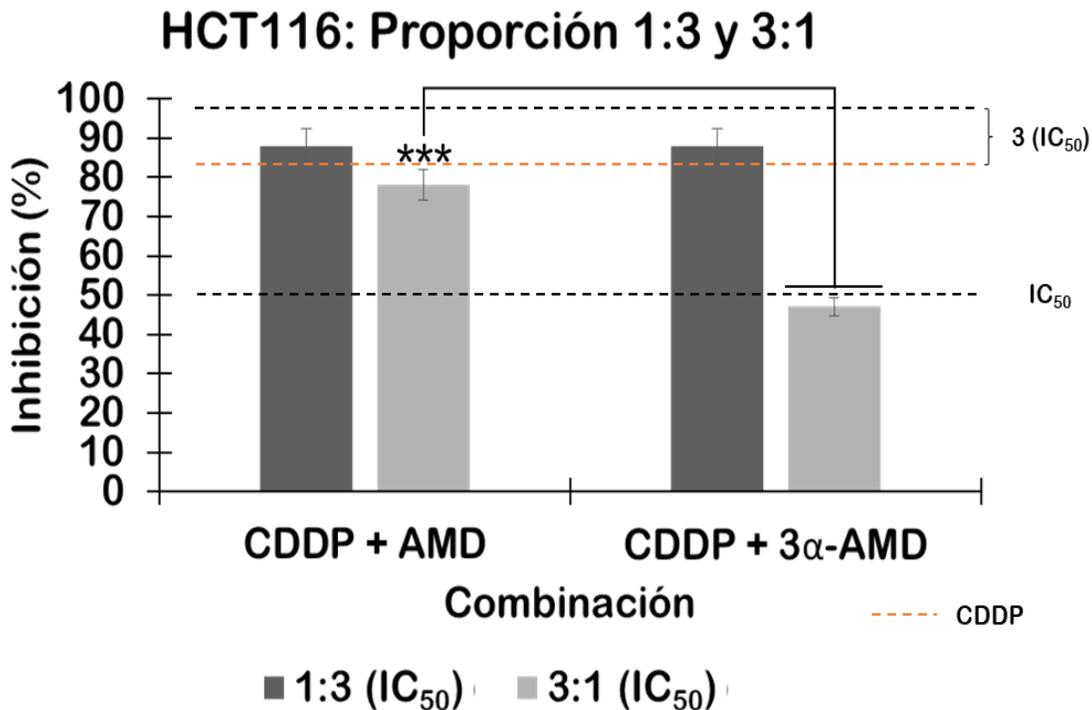
Los resultados indicaron que la actividad de estas combinaciones depende del triterpeno evaluado. En la combinación CDDP más AMD a la concentración de 0.5 ( $\text{IC}_{50}$ ) se observó una actividad aproximadamente del 50%. Mientras que a la concentración de  $\text{IC}_{50}$  (CDDP (05.6  $\mu\text{M}$ ) más AMD (31.0  $\mu\text{M}$ )) se observó una inhibición del 100%. Estos resultados indican una clara sinergia entre CDDP y AMD para inhibir la proliferación celular (Gráfica 5). Por el contrario, en la combinación CDDP más 3 $\alpha$ -AMD a la concentración 0.5 ( $\text{IC}_{50}$ ) (CDDP (02.8  $\mu\text{M}$ ) más 3 $\alpha$ -AMD (19.0  $\mu\text{M}$ )) solo se observa un 20% de inhibición y a la concentración de  $\text{IC}_{50}$  (CDDP (05.6  $\mu\text{M}$ ) más 3 $\alpha$ -AMD (38.0  $\mu\text{M}$ )) apenas si se observa un 30% de actividad, el mismo efecto antagónico de estos compuestos se observa en la combinación de 2 ( $\text{IC}_{50}$ ); en ambos casos se presenta un porcentaje menor a la actividad mostrada por los compuestos por separado. Estos resultados indican que la combinación CDDP más 3 $\alpha$ -AMD no es aditiva o sinérgica (Gráfica 5).

En la Gráfica 5 y 6 se representan los resultados del %IC de los compuestos AMD y 3 $\alpha$ -AMD en combinación con el CDDP en la línea celular de cáncer HCT116.



**Gráfica 5 Combinación en proporción 1:1 en la línea celular HCT116.** La gráfica muestra el %IC de las combinaciones de CDDP más AMD y CDDP más 3α-AMD en proporción 1:1 que se presentan en la Tabla 4 para la línea celular HCT116. La proporción se basó en las IC<sub>50</sub> obtenidas para la línea HCT116 de cada uno de los compuestos (Figura 9). Las barras muestran la media ± SD. \*Student's t-test. \*\*\*p<0.0001. La línea punteada indica el porcentaje de inhibición de cada uno de los compuestos de manera individual a las mismas concentraciones utilizadas en las combinaciones en proporción 1:1.

Los resultados de las combinaciones (Gráfica 5) en proporción 1:3 (CDDP (IC<sub>50</sub>) más triterpeno 3 (IC<sub>50</sub>)) indicaron cerca de un 90% de inhibición, tanto para AMD como para 3α-AMD, lo cual es un buen hallazgo, ya que la concentración de CDDP es solo aquella que corresponde a su IC<sub>50</sub> (05.6 μM). Por otro lado, las combinaciones 3:1 (CDDP 3 (IC<sub>50</sub>) + triterpeno (IC<sub>50</sub>)) mostraron una inhibición del 78 y 45 %, en la combinación CDDP más AMD y CDDP más 3α-AMD, respectivamente (Gráfica 6). Se notó una disminución significativa en el porcentaje de inhibición de la combinación CDDP más 3α-AMD con respecto a su contra parte CDDP más AMD, lo que refleja el papel antagónico en dicha combinación cuando el 3α-AMD es el compuesto mayoritario, infiriendo que afecta el mecanismo de acción del CDDP.



**Gráfica 6 Combinaciones en proporción 1:3 y 3:1 en la línea celular HCT116.** La gráfica muestra el %IC bajo el tratamiento de la combinación en proporción 1:3 (CDDP (IC<sub>50</sub>) más triterpeno 3(IC<sub>50</sub>)) y, 3:1 (CDDP 3(IC<sub>50</sub>) + triterpeno (IC<sub>50</sub>)) (Tabla 4). La proporción se basó en las IC<sub>50</sub> obtenidas para la línea HCT116 de cada uno de los compuestos (Figura 9). Las barras muestran la media ± SD. \*Student's t-test. \*\*\*p<0.0001. La línea punteada indica el porcentaje de inhibición de cada uno de los compuestos de manera individual a las mismas concentraciones utilizadas para las concentraciones en proporción 1:3 y 3:1.

Como se observa en los resultados obtenidos en los pretratamientos, la mejor manera de administrar los compuestos es al unísono. Por lo cual decidimos continuar los experimentos de esta manera.

#### 8.2.3. Análisis isoblográfico: combinación cisplatino más ácido masticadienónico.

A través del análisis isoblográfico de las combinaciones, se pudo determinar el tipo de relación (aditivas, subaditivas o superaditivas) que tenían los compuestos.

En el caso de las combinaciones de CDDP más 3α-AMD, se llegó a la determinación de que ambos compuestos eran antagonistas (*Información suplementaria*); por lo

que en este punto decidimos continuar la investigación solamente con las combinaciones de AMD más CDDP.

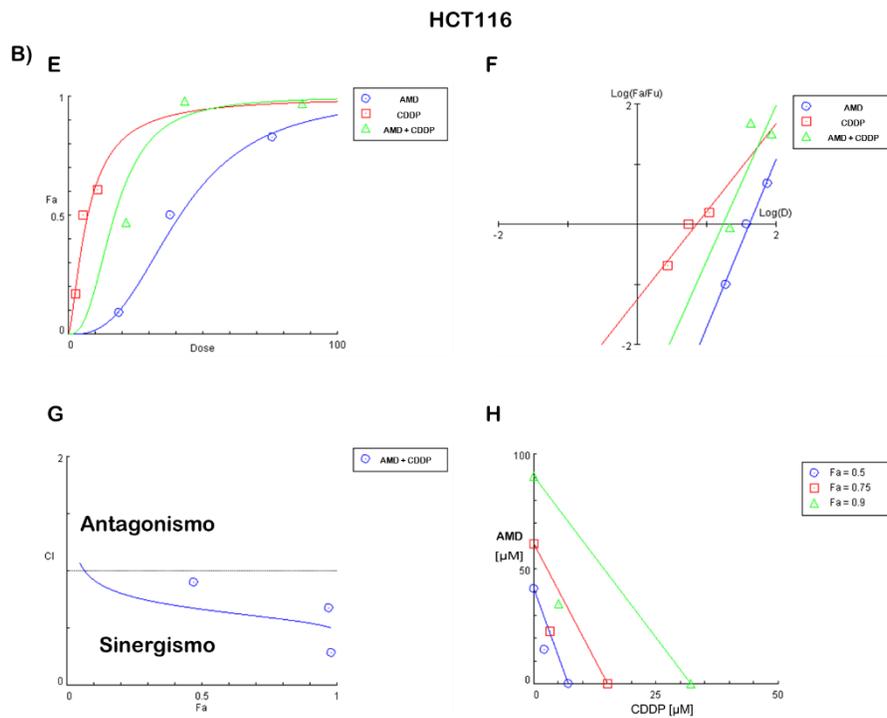
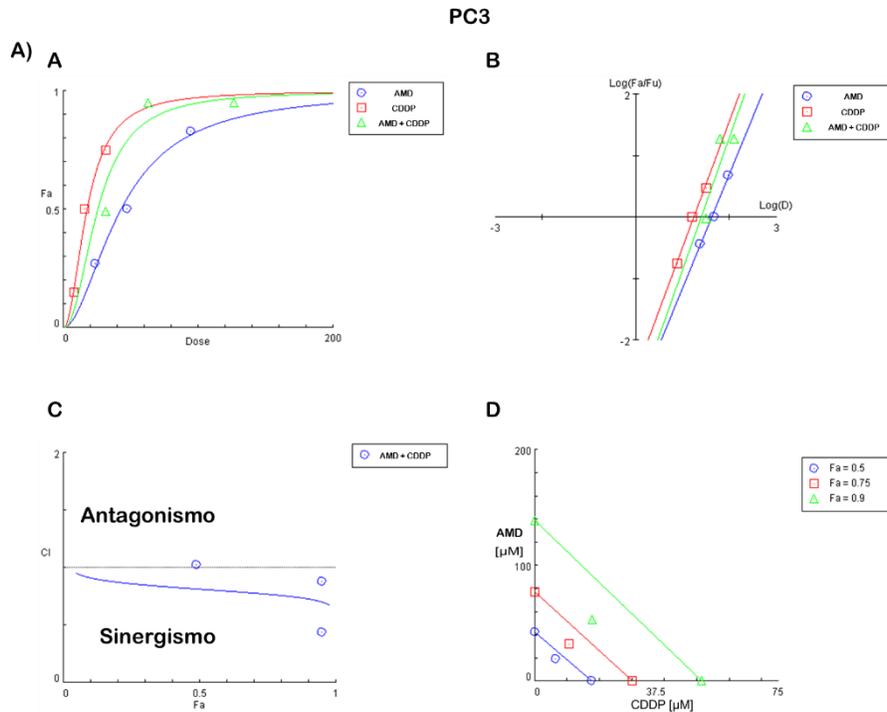
De acuerdo a los ensayos de citotoxicidad llevados a cabo, la mejor combinación resultante fue la de CDDP (IC<sub>50</sub>) más AMD (IC<sub>50</sub>). Por lo que, ayudándonos del programa CompuSyn, se pudo determinar el tipo de relación que mostraban los compuestos, resultando en un sinergismo.

A)		PC3						
Compuesto [μM]		Fractional Inhibition ( <i>fa</i> )	Parámetros <sup>a</sup>			CI <sup>b</sup>	DRI <sup>c</sup> [AMD;CDDP]	
AMD	CDDP		m	Dm	r			
(D) <sub>1</sub>								
23.75		0.27						
47.50		0.50						
95.00		0.83	1.91363	42.3148	0.99655			
(D) <sub>2</sub>								
	07.94	0.15						
	15.87	0.50						
	31.75	0.75	2.04373	16.6102	0.97947			
(D) <sub>1</sub> + (D) <sub>2</sub>								
23.75	07.94	0.49				1.02634	[1.76087;2.18132]	
47.50	15.87	0.95				0.44139	[4.37593;4.69771]	
95.00	31.75	0.95	2.15282	25.6052	0.96452	0.88279	[2.18796;2.34885]	
B)		HCT116						
Compuesto [μM]		Fractional Inhibition ( <i>fa</i> )	Parámetros <sup>a</sup>			CI <sup>b</sup>	DRI <sup>c</sup> [AMD;CDDP]	
AMD	CDDP		m	Dm	r			
(D) <sub>1</sub>								
19.00		0.09						
38.00		0.50						
76.00		0.83	2.81272	41.4241	0.99424			
(D) <sub>2</sub>								
	02.78	0.17						
	05.56	0.50						
	11.12	0.61	1.46646	7.20189	0.95151			
(D) <sub>1</sub> + (D) <sub>2</sub>								
19.00	02.78	0.47				0.89866	[2.08904;2.38111]	
38.00	05.56	0.98				0.28441	[4.34891;18.3613]	
76.00	11.12	0.98	2.59414	17.1697	0.81506	0.67776	[1.87569;6.91443]	

**Figura 11 Prueba de sinergismo.** La figura muestra la prueba de sinergismo de la combinación del ácido masticadienónico con cisplatino en proporción 1:1 a las concentraciones indicadas en la Tabla 3 y 4, contra las líneas celulares A) PC3 y B) HCT116, respectivamente.

Estas tablas se construyen a partir de los contenidos generados por CompuSyn Report. Los datos de dosis y efecto se obtuvieron del ensayo Sulforrodamina B (PC3: Gráfica 2 y 3; HCT116: Gráfica 5 y 6) -valor promedio por triplicado- y se sometieron a análisis CompuSyn.

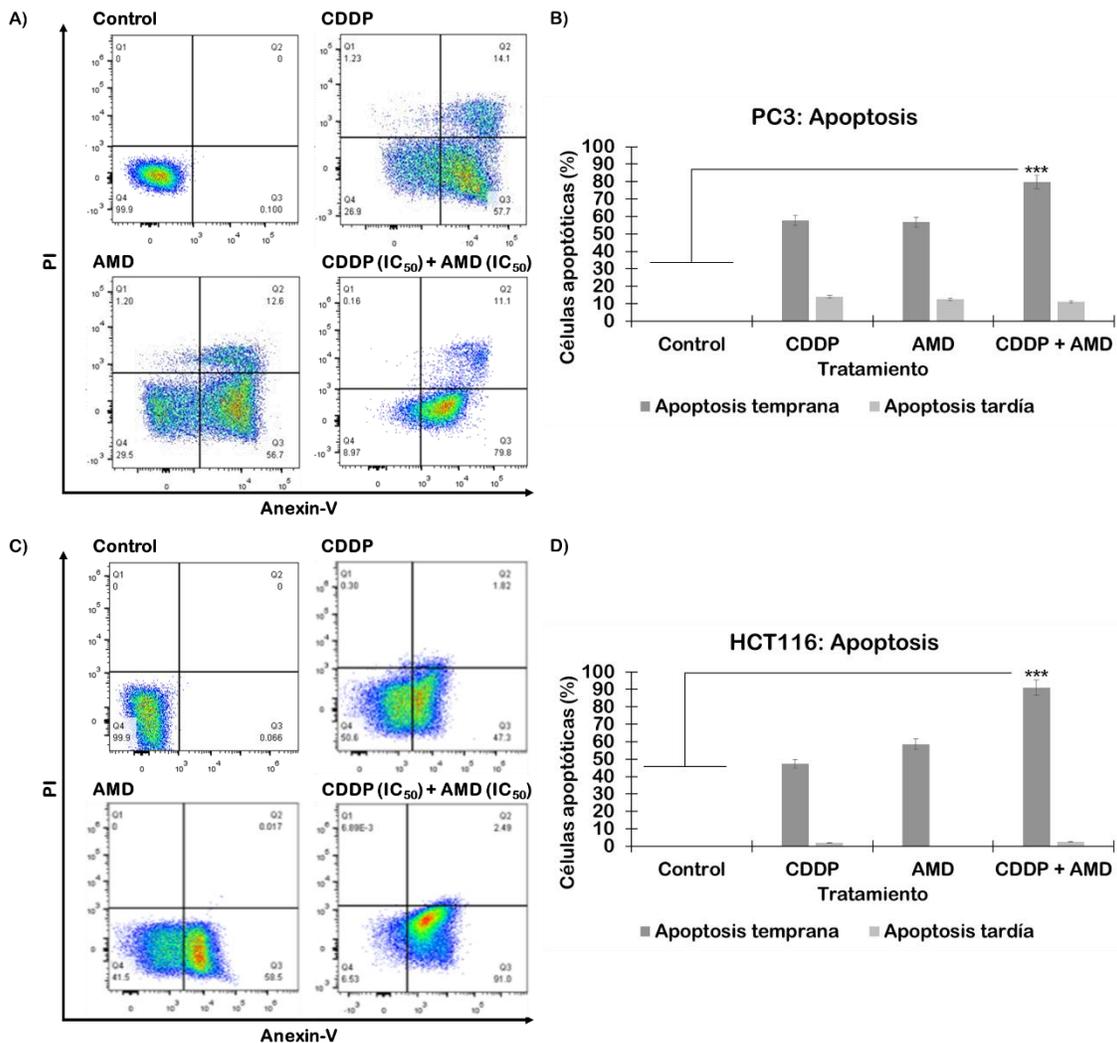
Los parámetros se calcularon a partir de la ecuación del efecto mediano y la gráfica del efecto mediano.  $M$  es pendiente, significa forma;  $D_m$  es  $IC_{50}$  [ $\mu M$ ], significa potencia; y  $r$  es el coeficiente de correlación lineal, significa conformidad (a). El índice de combinación (CI) se calculó a partir de los algoritmos de ecuación de CI utilizando el software CompuSyn.  $CI=1$ ,  $<1$  y  $>1$  indica efecto aditivo, sinergismo y antagonismo, respectivamente (b). El índice de reducción de dosis (DRI) se calculó a partir de la ecuación y el algoritmo DRI utilizando el software CompuSyn.  $DRI=1$ ,  $>1$  y  $<1$  indica que no hay reducción de la dosis, una reducción de la dosis favorable y una reducción de la dosis no favorable, respectivamente, para cada compuesto de la combinación (c).



**Figura 12** Representaciones gráficas obtenidas del Informe CompuSyn para las combinaciones de cisplatino más ácido masticadienónico. Líneas celulares A) PC3 y B) HCT116. Curvas de efecto de dosis (A y E); Gráfica de efecto mediano (B y F); Gráfico de índice de combinación (C y G); Isobologramas (D y H).

8.2.4. Obtención del tipo de muerte celular inducida por la combinación del cisplatino más el ácido masticadienónico.

De la mejor combinación que obtuvimos, de la proporción 1:1, de CDDP más AMD, (AMD (IC<sub>50</sub>) + CDDP (IC<sub>50</sub>)), Gráfica 2 y 5, para PC3 y HCT116, respectivamente, se determinó el tipo de muerte celular inducida por esta en ambas líneas celulares. En la Figura 11, podemos observar los resultados que se obtuvieron a través de la citometría de flujo.



**Figura 13** El ácido masticadienónico mejora la apoptosis celular inducida por cisplatino en las líneas celulares PC3 y HCT116. El AMD mejora la apoptosis inducida por cisplatino en las líneas celulares PC3 y HCT116 (A y C, respectivamente). Las células después del tratamiento durante 48 h se recogieron y se tiñeron con anexina V y PI. La tasa de apoptosis celular se analizó mediante análisis de citometría de flujo. Resultados similares

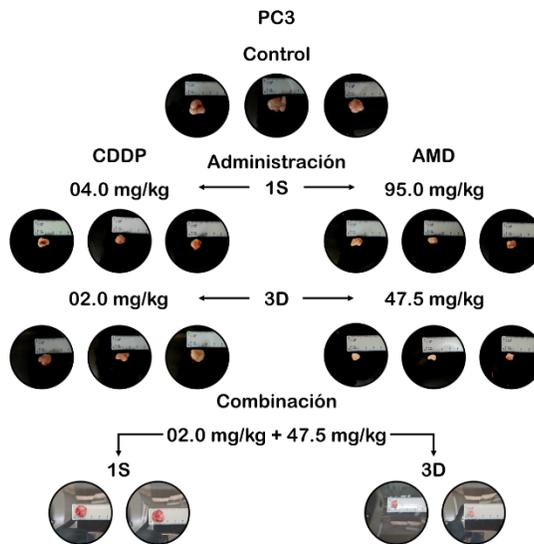
fueron obtenidos en tres experimentos independientes. Se calculó el porcentaje de células apoptóticas en los grupos de tratamiento para las líneas celulares PC3 y HCT116 (B y D, respectivamente). Las barras muestran la media  $\pm$  SD. \*Student's t-test. \*\*\* $p < 0.0001$  vs control.

Se observó un aumento significativo en el porcentaje de células apoptóticas cuando ambas líneas celulares fueron tratadas con la combinación de CDDP ( $IC_{50}$ ) más AMD ( $IC_{50}$ ) con respecto al control y a los compuestos evaluados de manera individual.

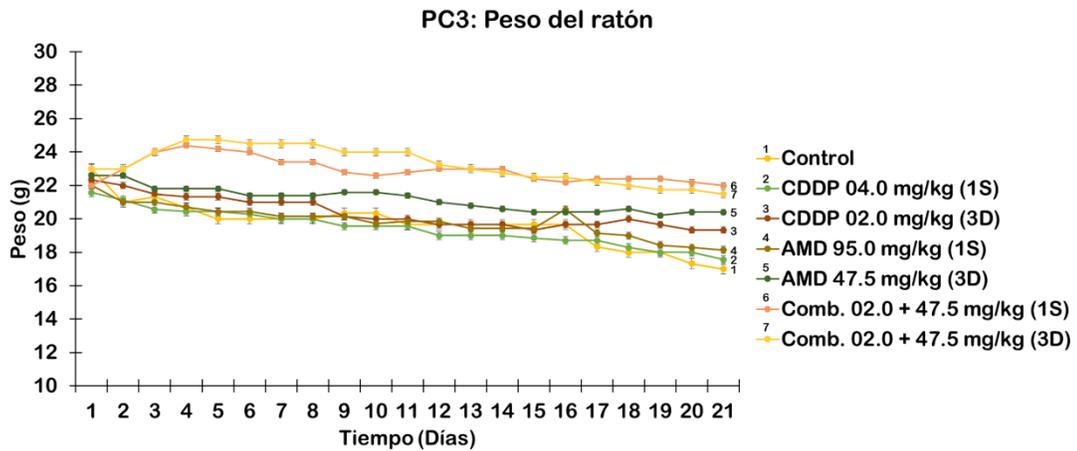
### 8.3. Actividad anti-tumoral in vivo.

#### 8.3.1 Línea celular PC3.

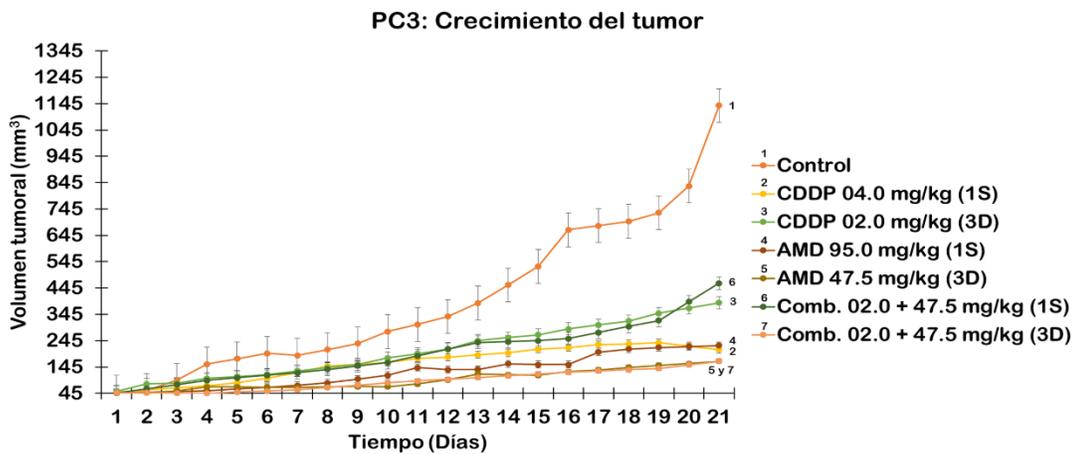
A)



B)



C)



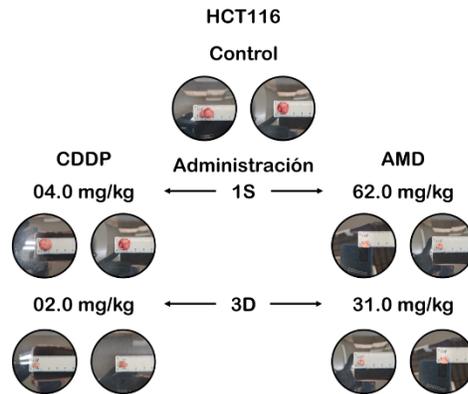
**Figura 14 Efecto anti-tumoral *in vivo* de las combinación de cisplatino más ácido masticadienónico en la línea celular PC3.** La actividad antitumoral *in vivo* se llevó a cabo en un modelo de xenotransplante con células PC3 ( $2 \times 10^6$ ) en ratones macho de la cepa nu/nu. A) La figura muestra las fotografías representativas del control y cada uno de los tratamientos, indicando las concentraciones utilizadas, así como el esquema de administración. B) La gráfica muestra el peso (g) de cada una de los grupos con respecto a los días de tratamiento. C) La gráfica muestra el volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) de cada una de las variables con respecto a los días de tratamiento (21 días). Las barras muestran la media  $\pm$  SD. Administración: Una vez a la semana (<sup>1S</sup>) y Cada tercer día (<sup>3D</sup>).

Se analizó el efecto antitumoral de la combinación de cisplatino más ácido masticadienónico en un modelo murino de xenotrasplante de células PC3. Los resultados muestran que la combinación inhibió significativamente el crecimiento de xenotrasplantes derivados de estas células. Es importante notar que la combinación, en ambos esquemas de administración, disminuyó el volumen tumoral, obteniendo un 59.2 y 85.3% de inhibición del crecimiento del tumor, una vez a la semana (1S) y cada tercer día (3D), respectivamente, con respecto al control (sin tratamiento); podemos observar que el CDDP, en ambas dosis administradas en los dos esquemas de administración, presentaron comportamientos similares a los obtenidos por parte de la combinación, obteniendo un 81.5 y 65.8%, para la dosis de 04.0 y 02.0 mg/kg, respectivamente, con respecto al control (sin tratamiento); por lo que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, si comparamos el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral con respecto al esquema de administración, notamos que existe una diferencia significativa entre ambos resultados, lo cual nos indica que el camino a seguir sería variar el esquema de administración a menores dosis de la combinación. Esto se ve apoyado gracias a los resultados obtenidos para denotar la toxicidad del CDDP, el AMD o la combinación, CDDP ( $\text{IC}_{50}$ ) más AMD ( $\text{IC}_{50}$ ), la cual fue determinada a través de la medición del peso del ratón. Como se observa, en la Figura 12, existe una diferencia significativa sumamente notable donde el control, el CDDP a 04.0 mg/kg y el AMD a 95 mg/kg, una vez a la semana (1S), disminuyen de manera considerable el peso del ratón, mermando el estado físico del mismo; pero, por otro lado, la administración de la combinación, en ambos esquemas de administración, no denotó cambios en el peso del animal, mismos que se ven reflejados en un estado físico normal. Por lo tanto, queremos pensar, que la combinación disminuye la toxicidad de ambos compuestos por separado, esto a sus dosis más altas. De tal manera que es posible, ligando ambos resultados (peso del ratón y crecimiento del tumor), que el siguiente movimiento sea variar las concentraciones de ambos compuestos a dosis mucho menores dentro de la combinación y mantener el esquema de administración de cada tercer día (3D). Sin embargo, se debe mencionar que, el AMD administrado individualmente a 47.5

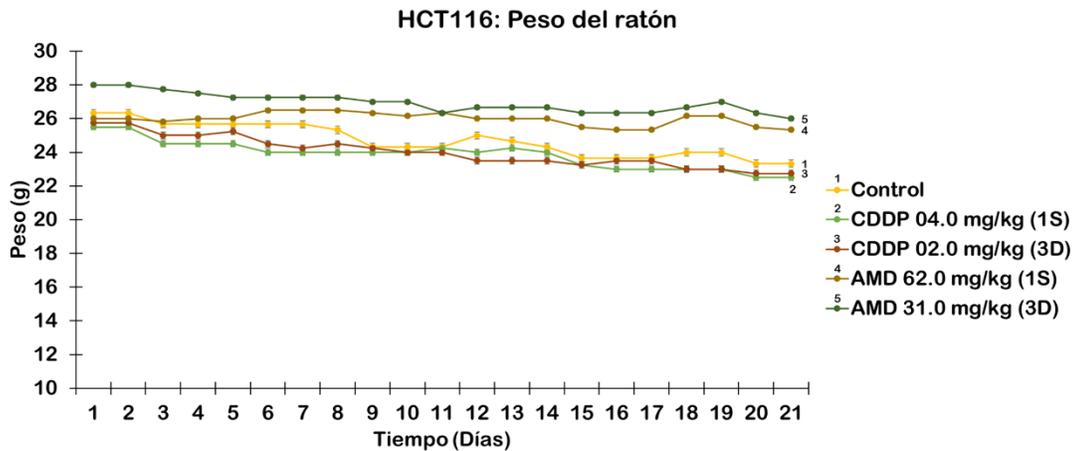
mg/kg con una administración cada tercer día (3D), mostró exactamente el mismo resultado en cuanto al porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral que la combinación en su mejor esquema de administración (cada tercer día (3D)), 85.3%; así mismo, aunque existe una ligera diferencia entre la disminución del peso del ratón, de una u otra condición, esta no es significativa; pero, suponiendo que, al disminuir la concentración de ambos compuesto en la combinación, podríamos estar mejorando la toxicidad y la actividad farmacológica, y esto se vea reflejado en un mejor estado físico general para el final del tratamiento.

### 8.3.2. Línea celular HCT116

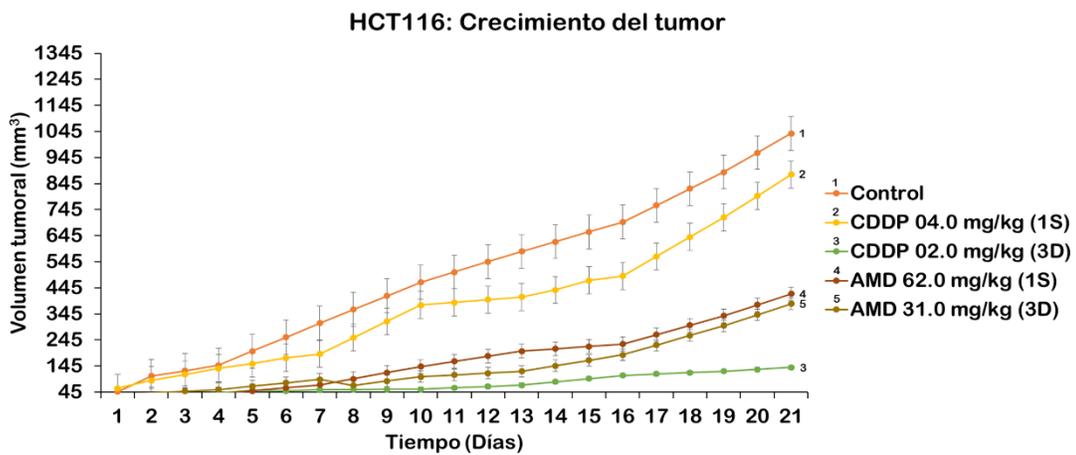
A)



B)



C)



**Figura 15 Efecto anti-tumoral in vivo de las combinación de cisplatino más ácido masticadienónico en la línea celular HCT116.** La actividad antitumoral *in vivo* se llevó a cabo en un modelo de xenotransplante con células HCT116 ( $1.5 \times 10^6$ ) en ratones macho de

la cepa nu/nu. A) La figura muestra las fotografías representativas del control y cada uno de los tratamientos, indicando las concentraciones utilizadas, así como el esquema de administración. B) La gráfica muestra el peso (g) de cada uno de los grupos con respecto a los días de tratamiento. C) La gráfica muestra el volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) de cada una de las variables con respecto a los días de tratamiento (21 días). Las barras muestran la media  $\pm$  SD. Administración: Una vez a la semana <sup>(1S)</sup> y Cada tercer día <sup>(3D)</sup>.

Se analizó el efecto antitumoral del cisplatino y el ácido masticadienónico en un modelo murino de xenotrasplante de células HCT116. Los resultados muestran que el AMD inhibió significativamente el crecimiento de xenotrasplantes derivados de estas células. Es importante notar que el AMD, en ambos esquemas de administración, disminuyó el volumen tumoral, obteniendo un 59.3 y 62.9% de inhibición del crecimiento del tumor, una vez a la semana (1S) y cada tercer día (3D), respectivamente, con respecto al control (sin tratamiento); por otro lado, podemos observar que el CDDP presentó comportamientos muy diferentes en las dos dosis utilizadas, obteniendo un 15.1 y 86.5%, para la dosis de 04.0 y 02.0 mg/kg, respectivamente, obteniendo un resultado aún mejor que la administración de AMD a cualquiera de sus dos condiciones. Sin embargo, si tomamos en cuenta el peso del ratón, se observa una disminución significativa del peso del animal con respecto a aquellos que fueron tratados únicamente con el AMD. Como mencionábamos anteriormente, el peso del ratón puede ser un indicativo de la toxicidad de nuestros compuestos; por tanto, creemos que, aunque el CDDP a su dosis más baja tenga un mejor efecto antitumoral, esto se ve opacado por el deterioro físico que muestran los ratones; de tal manera que, observando una disminución favorable del crecimiento del tumor al tratar los ratones con AMD y, al no observar un desgaste físico de los animales, el camino a seguir sería llevar a cabo los experimentos de la combinación de ambos compuestos para el xenotrasplante de esta línea celular. Tomando como referencia los resultados presentados por la combinación en la línea celular PC3, se recomienda empezar con dosis bajas de ambos compuestos en combinación con un esquema de administración cada tercer día (3D).

## 9. Conclusión

La fusión de dos compuestos biológicamente activos es atractiva, ya que puede mejorar los efectos farmacológicos. Sin embargo, es fundamental tener en cuenta que la eficacia de la combinación depende de varios factores, incluidas las dosis o concentraciones adecuadas de los medicamentos utilizados, así como su esquema de administración.

Después de una cuidadosa consideración, realizamos un estudio para determinar los efectos citotóxicos y antitumorales de varias combinaciones de CDDP, AMD y, 3 $\alpha$ AMD, en dos líneas celulares de cáncer humano: PC3 (adenocarcinoma de próstata) y HCT116 (cáncer colorrectal). Las concentraciones de CDDP, AMD y, 3 $\alpha$ AMD, en las combinaciones, se basaron en su IC<sub>50</sub>. Las combinaciones de CDDP más AMD y CDDP más 3 $\alpha$ -AMD se evaluaron en tres concentraciones 0.5 (IC<sub>50</sub>), IC<sub>50</sub> y 2 (IC<sub>50</sub>) en relación 1:1; e IC<sub>50</sub> y 3 (IC<sub>50</sub>) en relación 1:3 y 3:1 (Tabla 3 y 4; para PC3 (Gráficas 2-3) y, HCT116 (Grafica 5 y 6), respectivamente).

Los resultados del estudio demostraron que la combinación de CDDP más AMD fue la más efectiva para eliminar las células cancerosas en ambas líneas celulares probadas. Mostrando una especificidad para las líneas celulares de cáncer que se utilizaron en el proyecto. Contrariamente, la combinación de CDDP más 3 $\alpha$ -AMD resultó ser antagonista en ambas líneas celulares.

Posteriormente, durante la prueba de xenotrasplante, la combinación de CDDP (02.0 mg/kg) más AMD (47.5 mg/kg), administrada cada tercer día (3D) durante 21 días, resultó ser la más eficaz para inhibir el crecimiento tumoral en la línea celular PC3, con una inhibición del 85.3%, paralelamente, la administración de AMD a 47.5 mg/kg, logró el mismo porcentaje de inhibición. Este resultado sugiere que incluir CDDP en la combinación no tendría sentido. Sin embargo, después de algunas consideraciones, el sentido de incluir el AMD dentro de la combinación, cisplatino más AMD, siempre ha sido mejorar el efecto farmacológico, el cual no solo se ve expresado en el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral, sino, también, en ofrecer una alternativa al tratamiento con fármacos usados en la clínica combinados

con compuestos de origen natural (productos naturales), que mejoren la toxicidad de un tratamiento, lo que significaría una mejor calidad de vida durante el cáncer.

En resumen, mientras que la combinación de AMD y CDDP demostró una potente citotoxicidad sinérgica contra las líneas celulares PC3 y HCT116 *in vitro* e indujo apoptosis, este beneficio no se tradujo en una mayor actividad antitumoral *in vivo* con CDDP en la combinación, pero sí en el estado físico (observable) del animal.

## 10. Referencias bibliográficas

Akula, R., y Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11): 1720-1731.

Alonso-Castro, A. J., Maldonado-Miranda, J. J., Zarate-Matinez, A., Jacobo-Salcedo, M. R., Fernández-Galicia, C., Figueroa-Zuñiga, L. A., Rios-Reyes, N. A., León-Rubio, M. A., Medellín-Castillo, N. A., Reyes-Munguia, A., Méndez-Martínez, R., y Carranza-Álvarez, C. (2012). Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, México. *Journal Ethnopharmacol*, 143 (1): 292-298.

Alonso-Castro, A. J., Villareal, M. L., Salazar-Olivo L. A., Gómez-Sánchez, M., Dominguez, F., y Garcia-Carrancá, A. (2011). Mexican medicinal plants use for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal Ethnopharmacol*, 133 (3): 945-972.

Argueta, V. A., Cano, L., y Rodarte, M. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. *Instituto Nacional Indigenista: México*, 542-543.

Asociación Mexicana de Lucha Contra el Cáncer [AMLCC]. (2020). El Cáncer. Recuperado el 5 de febrero de 2023, de: <https://www.amlcc.org/el-cancer-y-sus-etapas/>

Barton, D. H. R., y Seoane, E. (1956). 801. Triterpenoids. Part XXII. The constitution and stereochemistry of masticadienonic acid. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 4150-4157.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). Recuperado el 9 de febrero de 2023, de: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Cuachalalate&id=7945>

Boletín del Instituto de Botánica. (2006). Ibugana. México: Universidad de Guadalajara. 13(1): 27-47

Castillo-Juárez, I., García-Contreras, R., Velázquez-Guadarrama, N., Soto-Hernández, M., y Martínez-Vázquez, M. (2013). *Amphypterygium adstringens*

anacardic acid mixture inhibits quorum sensing-controlled virulence factors of *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of medical research*, 44(7): 488-494.

Castillo-Juárez, I., Rivero-Cruz, F., Celis, H., y Romero, I. (2007). Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Journal of ethnopharmacology*, 114(1): 72-77.

Couder García, B.C. (2022). Evaluación de la actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* del peniocerol aislado de *Myrtillocactus geometrizans* [Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México]. TESIUNAM-Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de Información.

Cronquist, A. (1977). On the taxonomic significance of secondary metabolites in angiosperms. *Plant Systematics and Evolution*, 179-189.

Croteau, R., Kutchan, T. M., y Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24: 1250-1319.

Dalla Via, L., Braga, A., García-Argáez, A. N., Martínez-Vázquez, M., y Toninello, A. (2012). 3 $\alpha$ -Hydroxymasticadienonic acid as an antiproliferative agent that impairs mitochondrial functions. *Journal of natural products*, 75(4): 557-562.

Devi, P. U. (2004). Basics of carcinogenesis. *Health Adm*, 17(1): 16-24.

Dhami, N. (2013). Trends in Pharmacognosy: A modern science of natural medicines. *Journal of Herbal Medicine*, 3(4): 123-131.

Enciclopedia de la vida [EOL]. (2014). Recuperado el 11 de noviembre de 2017, de: <http://eol.org/pages/5614174/overview>

Enger, E., Ross, F., y Bailey D. (2011). *Concepts in Biology* (Fourteenth Edition). McGraw-Hill Education.

García, G. K. Y. (2006). Principales usos y posibles acciones farmacológicas del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schltedl). *InfÁRMate*, 7: 1-7.

Gershenzon, J., y Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature chemical biology*, 3(7): 408-414.

González-Coloma, A., López-Balboa, C., Santana, O., Reina, M., y Fraga, B. M. (2011). Triterpene-based plant defenses. *Phytochemistry Reviews*, 10(2): 245-260.

Goodwin, T. W. (1971). Biosynthesis. *Carotenoids*, 577-636.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., y Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6): 883-899.

Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1): 57-70.

Hanahan, D., y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5): 646-674.

Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos de América [INC]. (2015). Recuperado el 5 de noviembre de 2017, de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>

Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos de América [INC]. (2021). ¿Qué es el cáncer?. Recuperado el 2 de enero de 2023, de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>

Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos de América [INC]. (2022). Genética del cáncer. Recuperado el 3 de enero de 2023, de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/genetica>

Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos de América [INC]. (2023). Genética del cáncer. Recuperado el 3 de enero de 2023, de: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2016). Recuperado el 7 de noviembre del 2017, de: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2021). Síntesis Estadística Municipal 2021: Tlaltizapán de Zapata. Recuperado el 3 de octubre de 2023, de: [https://www.hacienda.morelos.gob.mx/images/docu\\_planeacion/planea\\_estrategica/planes\\_municipales/TLALTIZAPN\\_DE\\_ZAPATA2021\\_UltimaActualizacin1.pdf](https://www.hacienda.morelos.gob.mx/images/docu_planeacion/planea_estrategica/planes_municipales/TLALTIZAPN_DE_ZAPATA2021_UltimaActualizacin1.pdf)

Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2022). Estadísticas a propósito del Día Mundial Contra el Cáncer. Recuperado el 02 de enero de 2023, de:

[https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2022/EAP\\_CANCER22.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2022/EAP_CANCER22.pdf)

Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2023). Estadística de defunciones registradas de enero a junio de 2022 (preliminar). Recuperado el 2 de febrero de 2023, de: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2023/DR/DR-Ene-jun2022.pdf>

Kaufman, P. B., Cseke, L. J., Warber, S., Duke, J. A., y Brielmann, H. L. (1998). *Natural products from plants*. CRC Press Inc.

Levin, D. A. (1976). The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. *Annual review of Ecology and Systematics*, 7(1): 121-159.

Lincoln, T., y Zeiger, E. (2006). Secondary metabolites and plant defense. *Plant Physiology. Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc.*, 13: 125.

Makino, M., Motegi, T., y Fujimoto, Y. (2004). *Phytochemistry*, 65: 891-896.

Martínez, P., y Blasco, M. A. (2011). Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nature Reviews Cancer*, 11(3): 161-176.

Mata, R., Calzada, F., Navarrete, A., Del Rio, F., y Delgado, G. J. (1991). *Ethnopharmacol*, 34: 147-154.

Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., y Gray-Goodrich, M. (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse

panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 83(11): 757-766.

MR Patlolla, J., y V Rao, C. (2012). Triterpenoids for cancer prevention and treatment: current status and future prospects. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(1): 147-155.

Mulholland, D. A., y Nair, J. J. (1994). Triterpenoids from *Dysoxylum pettigrewianum*. *Phytochemistry*, 37(5): 1409-1411.

Mitrus, I., Bryndza, E., Sochanik, A., y Szala, S. (2012). Evolving models of tumor origin and progression. *Tumor Biology*, 33: 911-917.

Navarrete, A., Martínez-Uribe, L. S., y Reyes, B. (1998). Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytotherapy Research*, 12(1): 1-4.

Navarrete, A., Mata, R., y Delgado, G. (1989). Alkylsuccinic Acids from *Amphipterygium adstringens*. *Planta médica*, 55(06): 579-579.

Navarrete, A., Sánchez-Mendoza, M. E., Arrieta, J., Cruz-Antonio, L., Oliva, I., y Castañeda-Hernández, G. (2005). Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 57(12): 1629-1636.

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2007). Recuperado el 17 de mayo de 2023, de: <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2007/np31/en/>.

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2013). 10 datos sobre enfermedades no transmisibles. Recuperado el 17 de mayo de 2023, de: [http://www.who.int/features/factfiles/noncommunicable\\_diseases/es/](http://www.who.int/features/factfiles/noncommunicable_diseases/es/)

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2014). 10 datos sobre el cáncer. Recuperado el 16 de febrero de 2023, de: <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/es/>

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2015a). Cáncer. Nota descriptiva N° 297. Recuperado el 16 de febrero de 2023, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2015b). Enfermedades no transmisibles. Nota descriptiva. Recuperado el 16 de febrero de 2023, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2020). Lyon: International Agency for Research on Cancer. Recuperado el 16 de febrero del 2021, de <https://gco.iarc.fr/today>

Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2022) “Cáncer-World Health Organization”. Recuperado el 02 de enero de 2023, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Oviedo-Chávez, I., Ramírez-Apan, T., Soto-Hernández, M., y Martínez-Vázquez, M. (2004). *Phytomedicine*, 11: 436-445.

Papageorgiou, V. P., Bakola-Christianopoulou, M. N., Apazidou, K. K., y Psarros, E. E. (1997). Gas chromatographic–mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. *Journal of Chromatography A*, 769(2): 263-273.

Pennington, T. D. (2005). Árboles tropicales de México: manual para la identificación de las principales especies. UNAM.

Perfiles oncológicos de los países. (2005). Recuperado el 17 de mayo de 2023, de <http://www.who.int/cancer/country-profiles/es/>.

Pinot, H. C., Goldsworthy, T., y Moran, S. (1981). The natural history of carcinogenesis: Implications of experimental carcinogenesis in the génesis of human cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 17(2): 133-146.

Pitot, H. C. (1993). The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*, 72(S3): 962-970.

Robinson, T. (2012). The biochemistry of alkaloids (Vol. 3). *Springer Science & Business Media*.

Rosas-Acevedo, H., Terrazas, T., Gonzáles-Trujano, M. E., Guzmán, Y., y Soto-Hernández, M. (2011). Anti-ulcer activity of *Cyrtocarpa procera* analogous to that of *Amphipterygium adstringens*, both assayed on the experimental gastric injury in rats. *Journal Ethnopharmacol*, 134(1): 67-73.

Sistema de Información para la Reforestación [SIRE]. (2014). Paquetes tecnológicos: *Amphipterygium adstringens*. Recuperado el 7 de enero de 2023, de: <https://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/884Amphipterygium%20adstringens.pdf>

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., y Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13): 1107-1112.

Soriano-García, M., Toscano, R. A., Ortiz, B., Navarrete, A., Sánchez-Obregón, R., Barrios, H., y Yuste, F. (1987). Structure and stereochemistry of the methyl ester of (5 $\alpha$ , 13 $\alpha$ , 14 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 20S, 24Z)-3-oxolanosta-7, 24-dien-26-oic acid (masticadienonic acid). *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 43(5): 990-992.

Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., y Schimper, A. F. W. (1994). *Tratado de Botánica. 8va. Edición. Editorial Omega*. Barcelona, España.

Swain, T (editor). 1973. Chemistry in evolution and systematics. Butterworth, Londres

Weitzel, J. N., Blazer, K. R., MacDonald, D. J., Culver, J. O., y Offit, K. (2011). Genetics, genomics, and cancer risk assessment: state of the art and future directions in the era of personalized medicine. *Cancer journal for clinicians*, 61(5): 327-359.

Yang, C. Q., Fang, X., Wu, X. M., Mao, Y. B., Wang, L. J., y Chen, X. Y. (2012).  
Transcriptional regulation of plant secondary metabolism. *Journal of integrative plant  
biology*, 54(10): 703-712.

## 11. Información suplementaria

### 11.1. Líneas celulares

#### 11.1.1. Línea celular PC3

PC3 es una línea celular iniciada a partir de una metástasis ósea de un adenocarcinoma de próstata de grado IV de un hombre blanco de 62 años.

PC3	
<b>Categoría</b>	<b>Células humanas</b>
<b>Organismo</b>	<i>Homo sapiens</i>
<b>Morfología</b>	<b>Epitelial</b>
<b>Tejido</b>	<b>Próstata</b>
<b>Enfermedad</b>	<b>Adenocarcinoma Grado IV</b>

S1 Ficha técnica de las características generales de la línea celular PC3. Modificada de <https://www.atcc.org/products/crl-1435>

#### 11.1.2. Línea celular HCT116

La línea celular HCT116 se aisló del colon de un hombre adulto con cáncer de colon.

HCT116	
<b>Categoría</b>	<b>Células humanas</b>
<b>Organismo</b>	<i>Homo sapiens</i>
<b>Morfología</b>	<b>Epitelial</b>
<b>Tejido</b>	<b>Intestino grueso</b>
<b>Enfermedad</b>	<b>Carcinoma colorrectal</b>

S2 Ficha técnica de las características generales de la línea celular HCT116. Modificada de <https://www.atcc.org/products/ccl-247>

### 11.1.3. Línea celular MCF10A

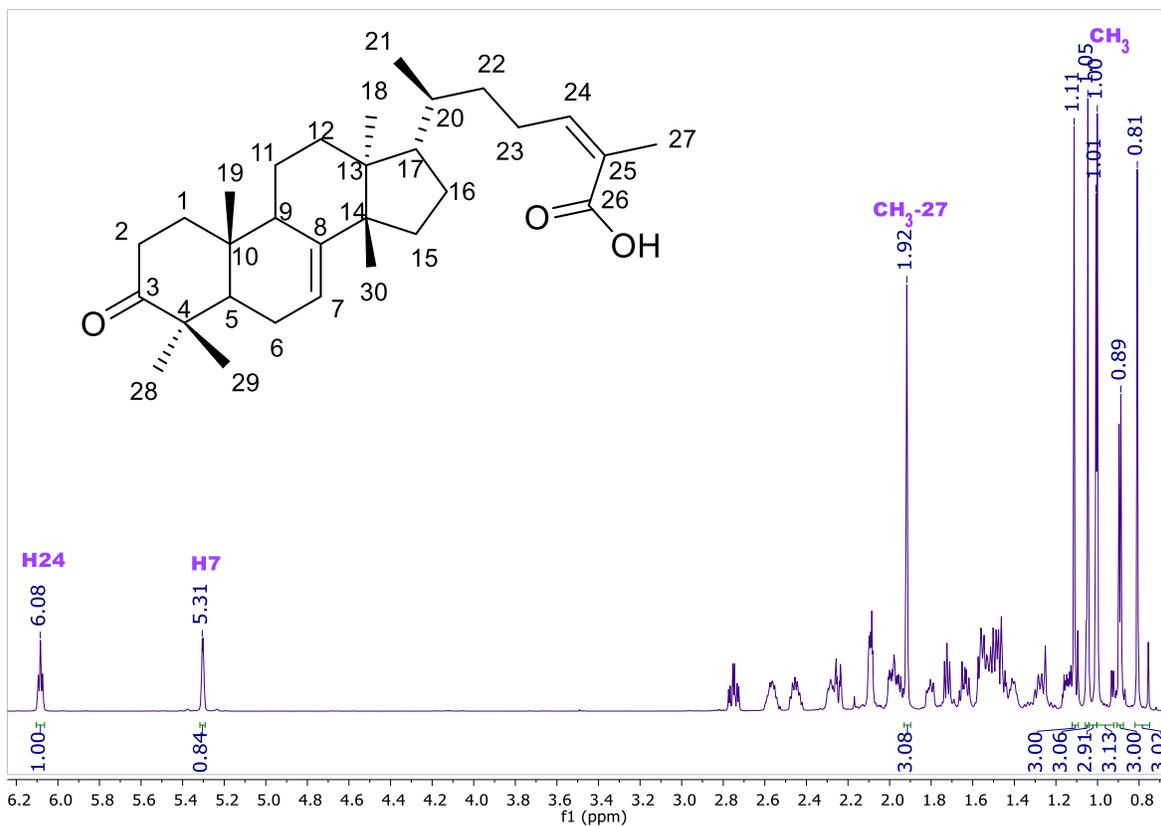
MCF10A es una línea celular epitelial que se aisló en 1984 de la glándula mamaria de una mujer blanca de 36 años con mamas fibroquísticas. Esta línea celular fue depositada por la Michigan Cancer Foundation.

<b>MCF10A</b>	
<b>Categoría</b>	<b>Células humanas</b>
<b>Organismo</b>	<i>Homo sapiens</i>
<b>Morfología</b>	<b>Epitelial</b>
<b>Tejido</b>	<b>Glándula mamaria</b>
<b>Enfermedad</b>	<b>Mamas fibroquísticas</b>

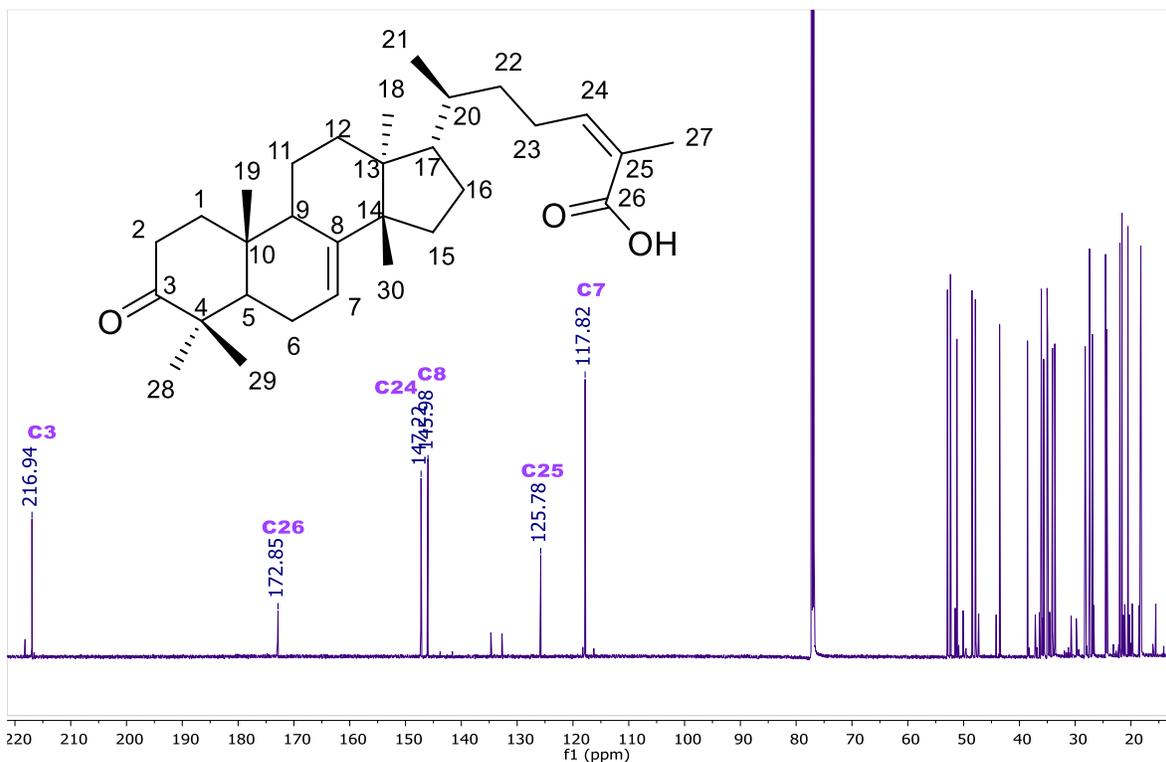
**S3** Ficha técnica de las características generales de la línea celular MCF10A. Modificada de <https://www.atcc.org/products/crl-10317>

## 11.2. Resonancia Magnética Nuclear de los triterpenos

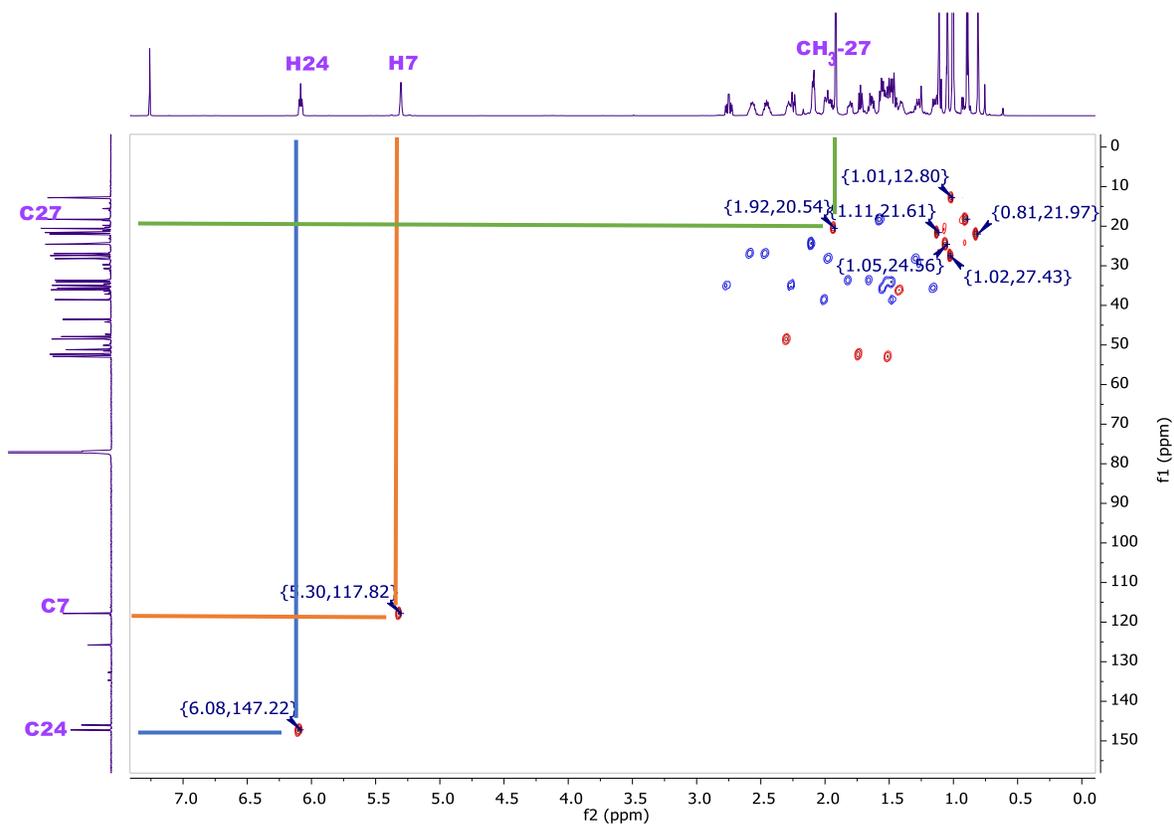
Los espectros de RMN se adquirieron en un espectrómetro Bruker Ascend 500 MHz (para 3 $\alpha$ -AMD) y Bruker Advanced III HD (para AMD) utilizando TMS como referencia a temperatura ambiente. Los valores de cambio químico se expresan en  $\delta$  (ppm) en relación con la referencia.



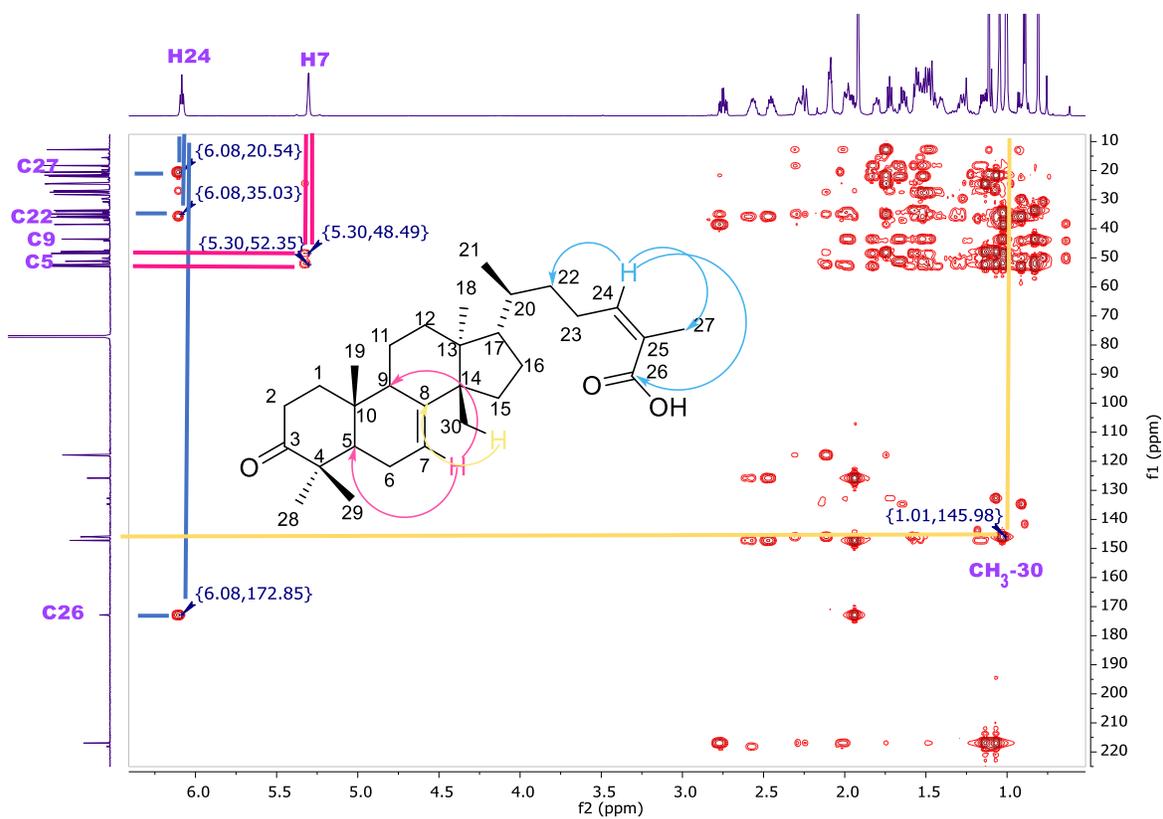
S4 Espectro NMR-<sup>1</sup>H (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del ácido masticadienónico (AMD)



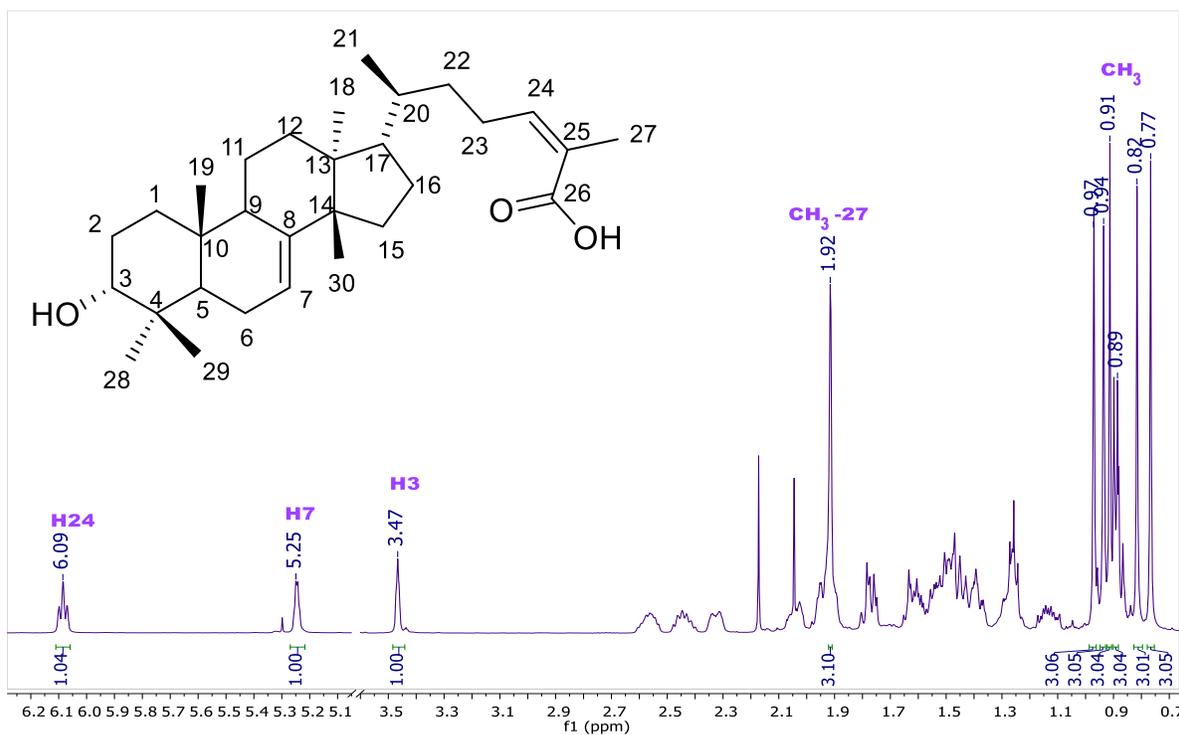
S5 Espectro NMR- $^{13}\text{C}$  (176 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) del ácido masticadienónico (AMD)



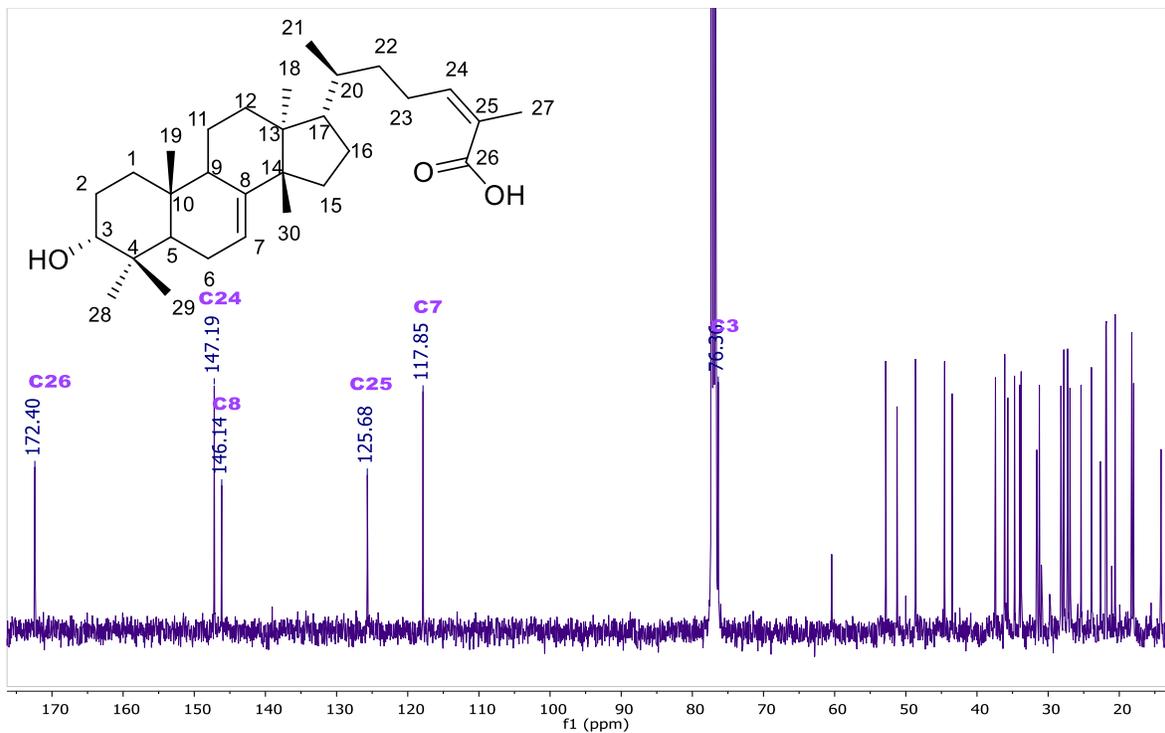
S6 NMR-HSQC ( $\text{CDCl}_3$ ) del ácido masticadienónico (AMD)



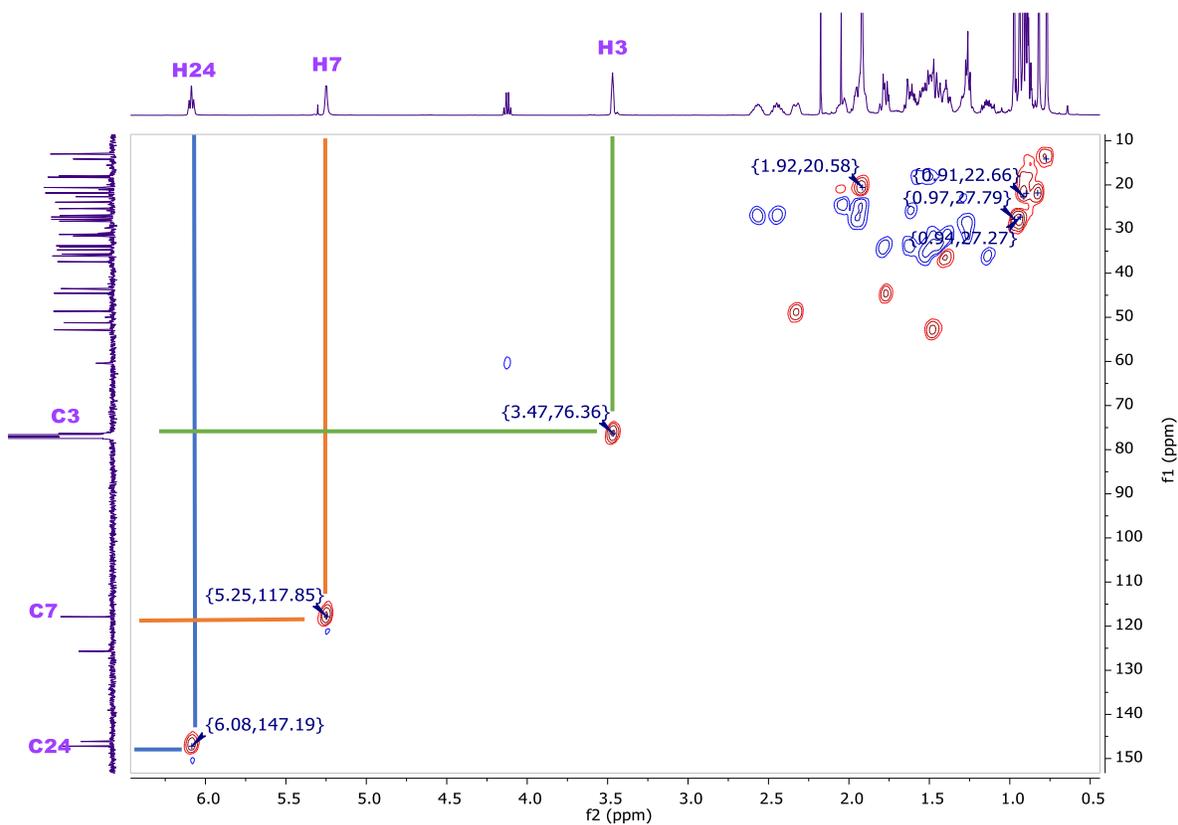
S7 NMR-HMBC (CDCl<sub>3</sub>) del ácido masticadienónico (AMD)



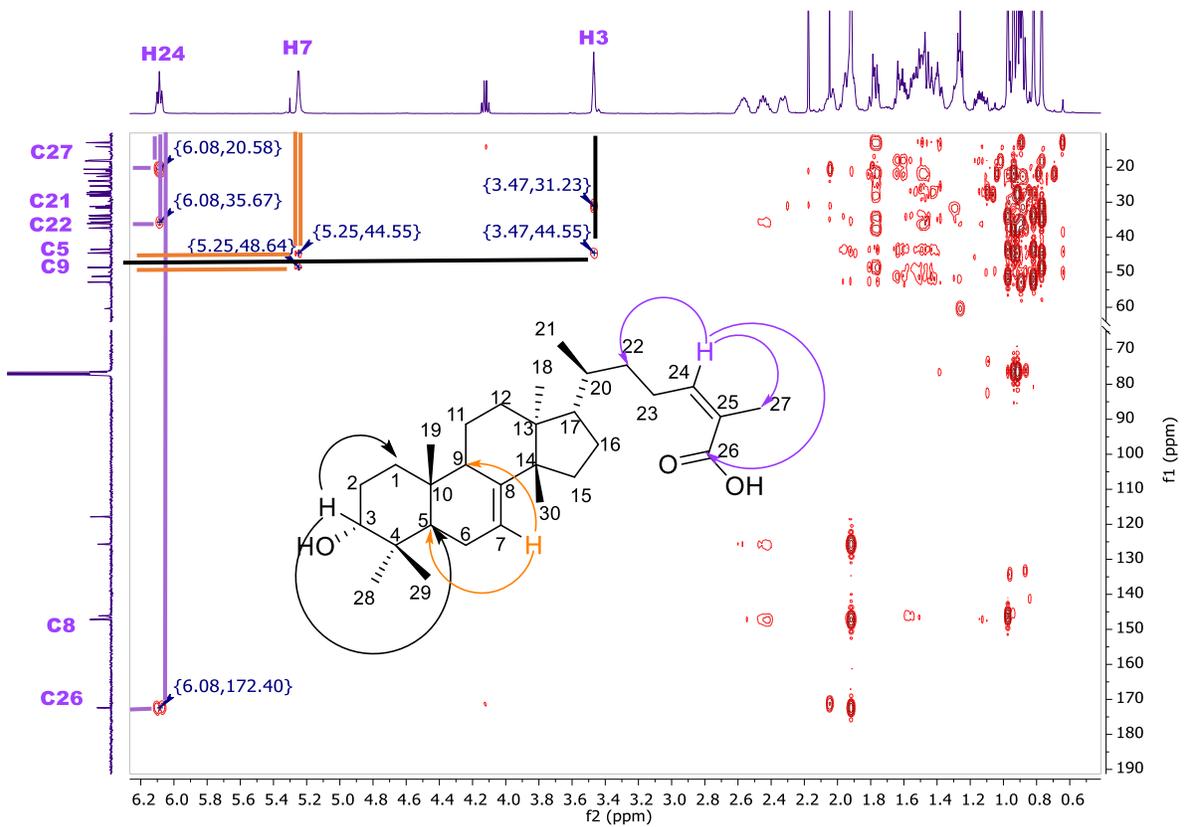
S8 Espectro NMR-<sup>1</sup>H (500 MHz CDCl<sub>3</sub>) del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3 $\alpha$ -AMD)



**S9** Espectro NMR-<sup>13</sup>C (126 MHz CDCl<sub>3</sub>) del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3 $\alpha$ -AMD)

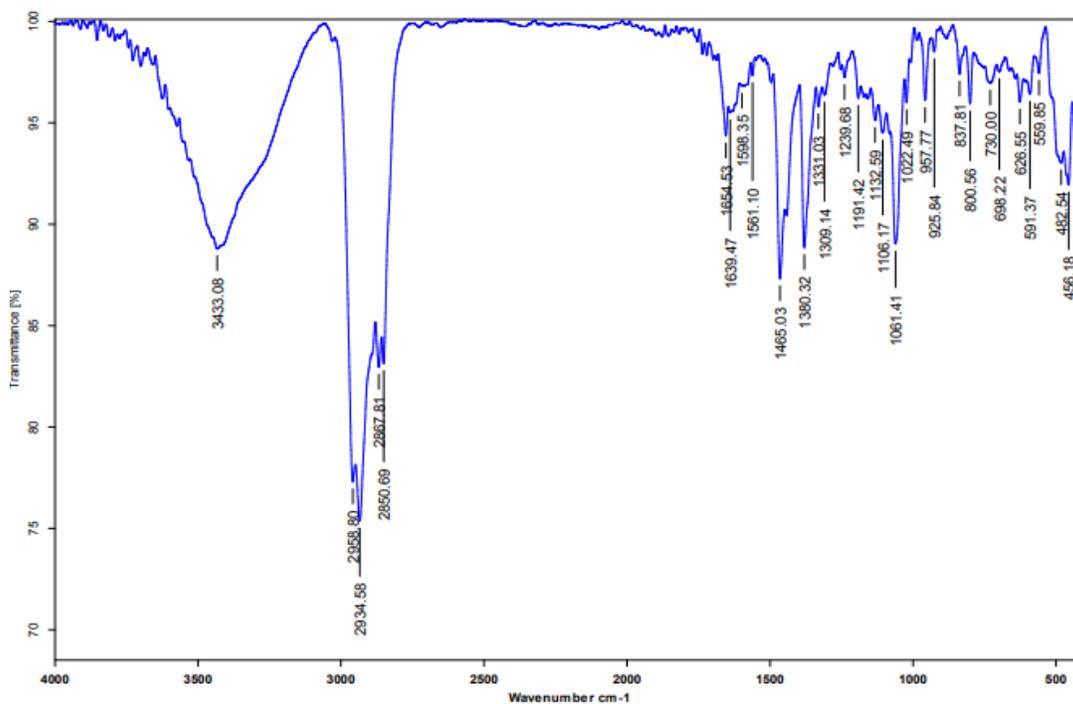


**S10** NMR-HSQC (CDCl<sub>3</sub>) del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3 $\alpha$ -AMD)

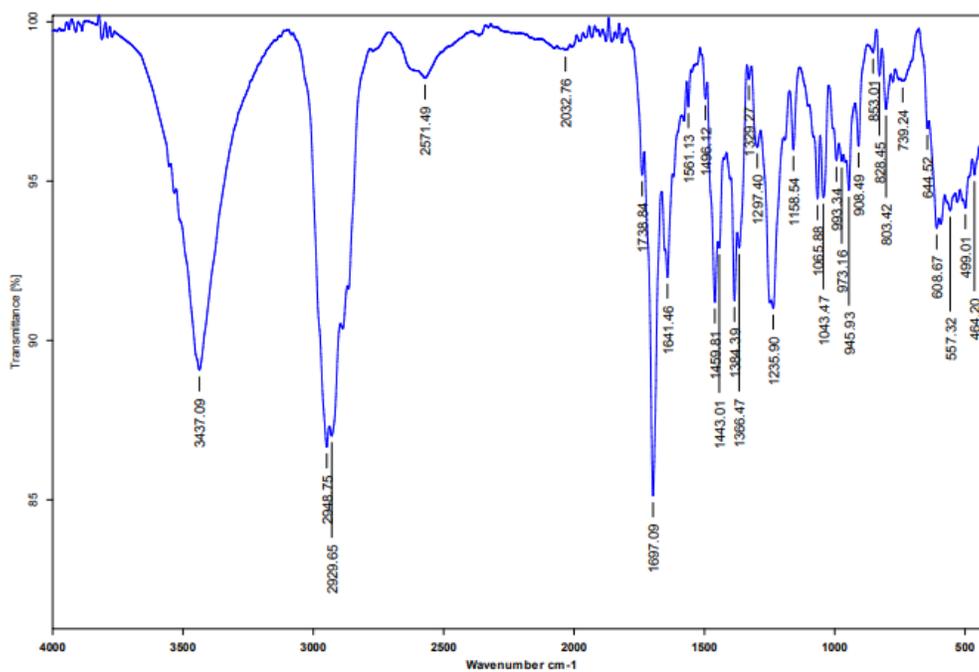


### 11.3. Espectro infrarrojo

Los espectros infrarrojos se adquirieron en un espectrómetro FT-IR Bruker (gránulo KBr).



**S12** Espectro IR del ácido masticadienónico (AMD)



**S13** Espectro IR del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3 $\alpha$ -AMD)

11.4. *Análisis isobolográfico: combinación cisplatino más ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico*

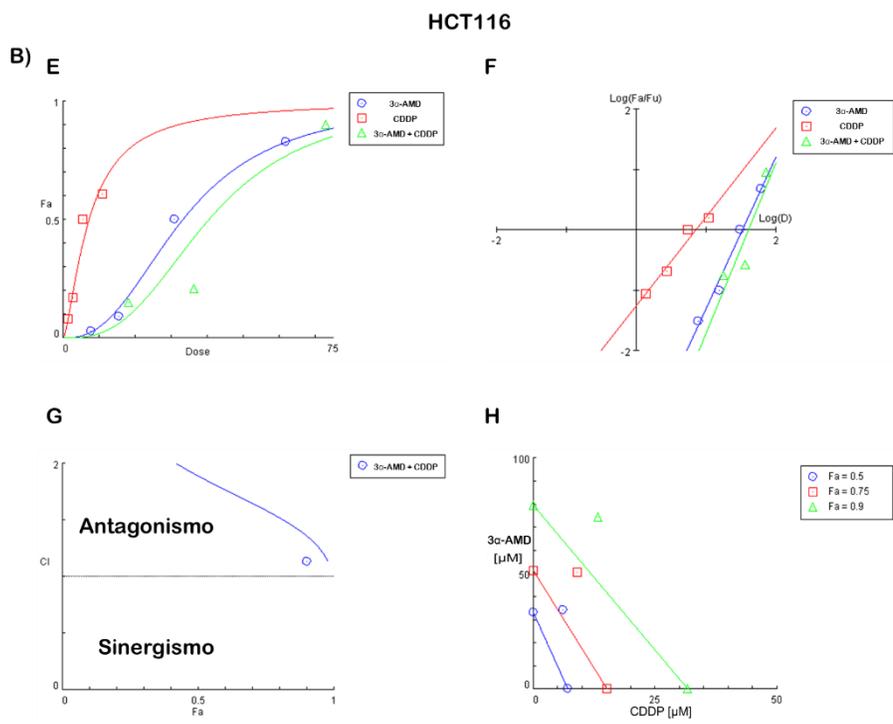
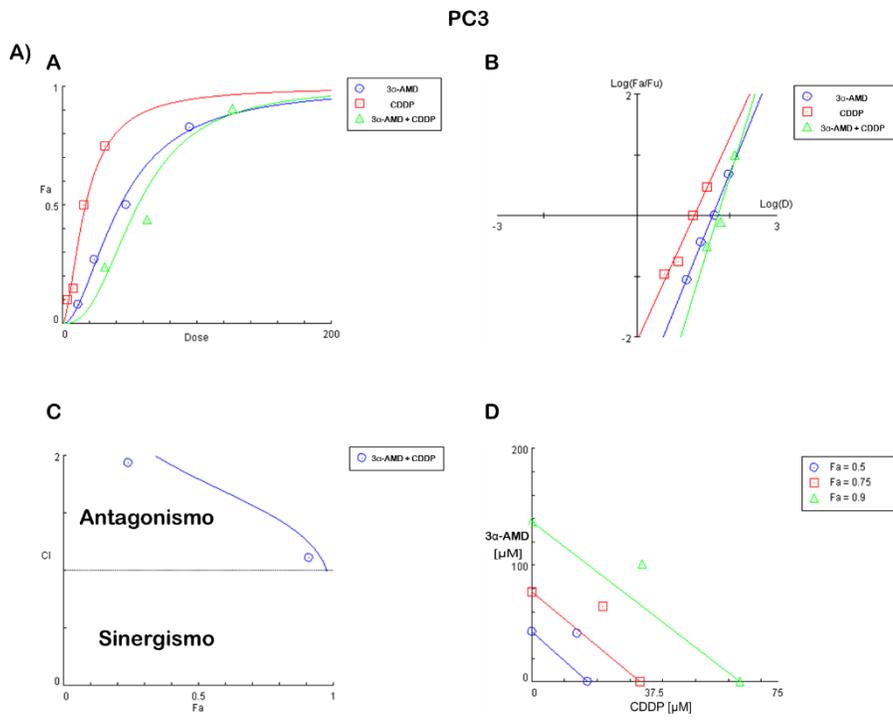
De acuerdo a los ensayos de citotoxicidad llevados a cabo, en el caso de las combinaciones de CDDP más 3 $\alpha$ -AMD, se llegó a la determinación de que ambos compuestos eran antagonistas.

A)		PC3					
Compuesto [ $\mu$ M]		Fractional Inhibition ( <i>fa</i> )	Parámetros <sup>a</sup>			CI <sup>b</sup>	DRI <sup>c</sup> [3 $\alpha$ -AMD;CDDP]
3 $\alpha$ -AMD	CDDP		m	Dm	r		
(D) <sub>1</sub>							
23.75		0.27					
47.50		0.50					
95.00		0.83	1.88684	42.9250	0.99655		
(D) <sub>2</sub>							
	07.94	0.15					
	15.87	0.50					
	31.75	0.75	1.67301	17.1152	0.97947		
(D) <sub>1</sub> + (D) <sub>2</sub>							
23.75	07.94	0.49				1.94048	[0.98114;1.08546]
47.50	15.87	0.95				2.32600	[0.79526;0.93585]
95.00	31.75	0.95	2.50042	56.0248	0.96452	1.11348	[1.53998;2.15462]
B)		HCT116					
Compuesto [ $\mu$ M]		Fractional Inhibition ( <i>fa</i> )	Parámetros <sup>a</sup>			CI <sup>b</sup>	DRI <sup>c</sup> [3 $\alpha$ -AMD;CDDP]
3 $\alpha$ -AMD	CDDP		m	Dm	r		
(D) <sub>1</sub>							
19.00		0.09					
38.00		0.50					
76.00		0.83	2.52455	33.2394	0.99285		
(D) <sub>2</sub>							
	02.78	0.17					
	05.56	0.50					
	11.12	0.61	1.47943	7.20014	0.98005		
(D) <sub>1</sub> + (D) <sub>2</sub>							
19.00	02.78	0.15				2.17860	[1.07875;0.79898]
38.00	05.56	0.21				3.47400	[0.63440;0.52695]
76.00	11.12	0.90	2.83621	40.4815	0.90951	1.13219	[1.28011;2.84895]

**S14** Prueba de antagonismo. La figura muestra la prueba de antagonismo de la combinación del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico con cisplatino en proporción 1:1 a las concentraciones indicadas en la Tabla 3 y 4, contra las líneas celulares A) PC3 y B) HCT116, respectivamente.

Estas tablas se construyen a partir de los contenidos generados por CompuSyn Report. Los datos de dosis y efecto se obtuvieron del ensayo Sulforrodamina B (PC3: Gráfica 2 y 3; HCT116: Gráfica 5 y 6) -valor promedio por triplicado- y se sometieron a análisis CompuSyn. Los parámetros se calcularon a partir de la ecuación del efecto mediano y la gráfica del

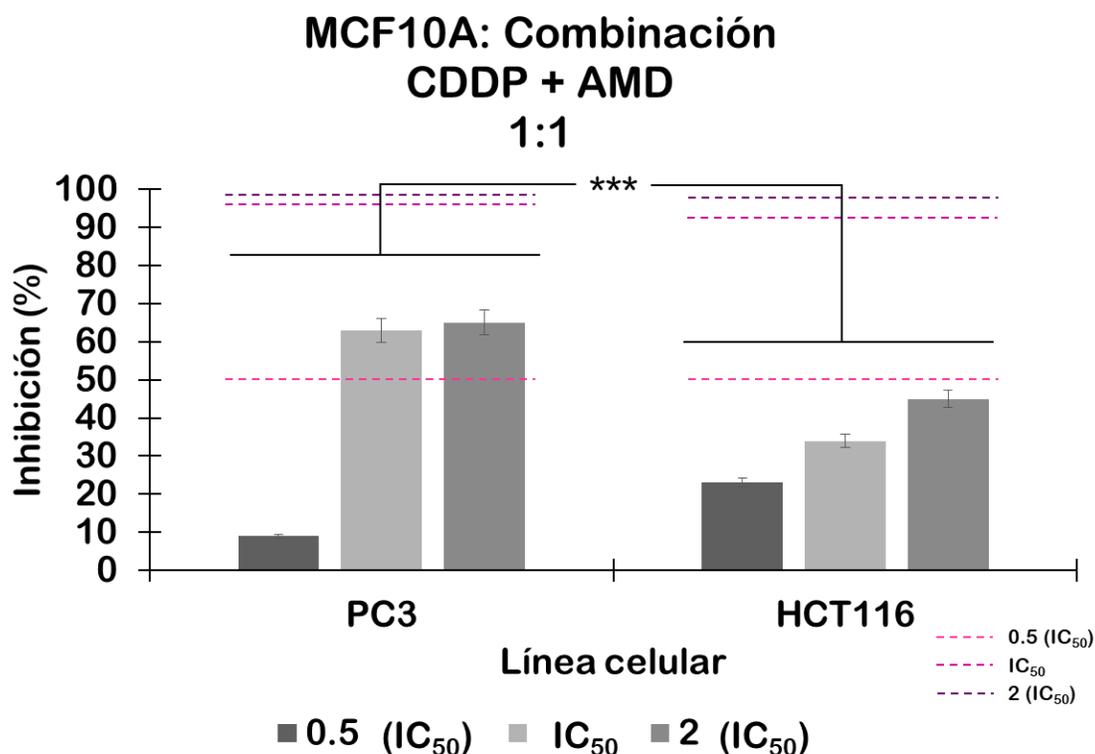
efecto mediano.  $M$  es pendiente, significa forma;  $D_m$  es  $IC_{50}$  [ $\mu M$ ], significa potencia; y  $r$  es el coeficiente de correlación lineal, significa conformidad (a). El índice de combinación (CI) se calculó a partir de los algoritmos de ecuación de CI utilizando el software CompuSyn.  $CI=1$ ,  $<1$  y  $>1$  indica efecto aditivo, sinergismo y antagonismo, respectivamente (b). El índice de reducción de dosis (DRI) se calculó a partir de la ecuación y el algoritmo DRI utilizando el software CompuSyn.  $DRI=1$ ,  $>1$  y  $<1$  indica que no hay reducción de la dosis, una reducción de la dosis favorable y una reducción de la dosis no favorable, respectivamente, para cada compuesto de la combinación (c).



**S15** Representaciones gráficas obtenidas del Informe CompuSyn para las combinaciones de ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico con cisplatino. En las líneas celulares A) PC3 y B) HCT116. Curvas de efecto de dosis (A y E); Gráfica de efecto mediano (B y F); Gráfico de índice de combinación (C y G); Isobogramas (D y H).

11.5. Combinaciones del cisplatino más el ácido masticadienónico o el 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico, en la línea celular MCF10A

Las combinaciones de CDDP más AMD evaluadas en la línea celular MCF10A corresponden a aquellas evaluadas en las líneas celulares PC3 y HCT116 (Tabla 3 y 4).



**S16** Combinación cisplatino más ácido masticadienónico en proporción 1:1 en la línea celular MCF10A. La gráfica muestra el %IC de las combinaciones de CDDP más AMD en proporción 1:1 que se presentan en la Tabla 3 y 4, para PC3 y HCT116, respectivamente.

Las barras muestran la media  $\pm$  SD. \*Student's t-test. \*\*\* $p < 0.0001$  vs los resultados obtenidos para PC3 y HCT116 (línea punteada). La línea punteada indica el porcentaje de inhibición de cada una de las combinaciones a las mismas concentraciones utilizadas en PC3 y HCT116 (Gráfica 2 y 5).

En la combinación CDDP más AMD a la concentración de 0.5 (IC<sub>50</sub>), utilizando las mismas concentraciones para las líneas celulares PC3 y HCT116 en la línea celular MCF10A, se observó una actividad aproximadamente del 10 y 20%, respectivamente. Mientras que a la concentración de IC<sub>50</sub> se observó, apenas, una inhibición del 60 y 30%. Un comportamiento similar se observó a la concentración de 2 (IC<sub>50</sub>), donde el

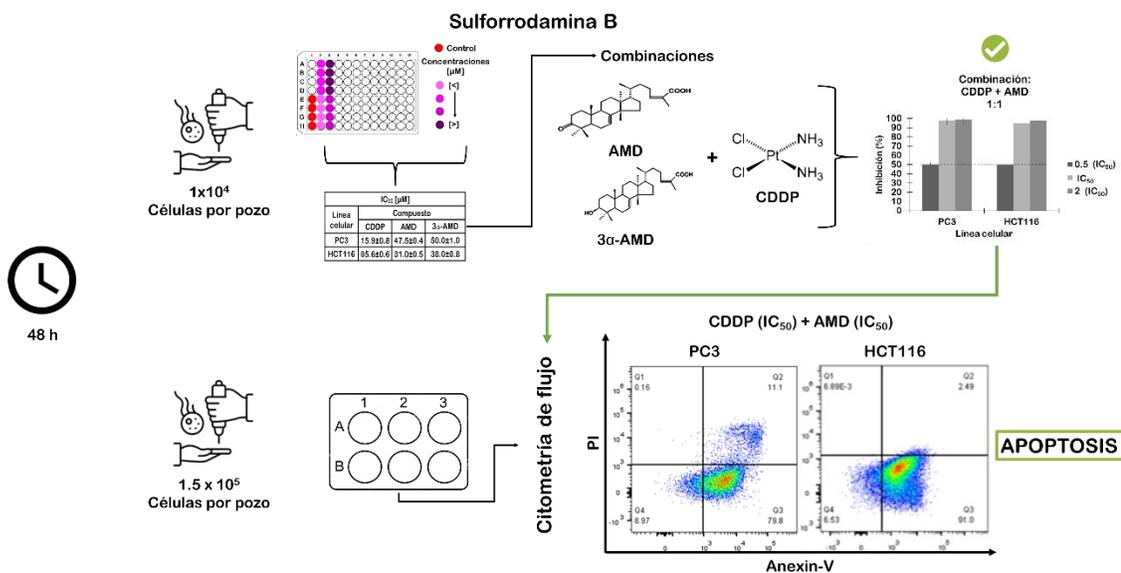
%IC tan solo alcanzó un 65 y 45%. Estos resultados indican que la actividad de estas combinaciones es selectiva a líneas celulares de cáncer.

Debido a que la combinación CDDP más 3 $\alpha$ -AMD no fue aditiva o sinérgica, más bien antagonista, en las líneas celulares de cáncer humano que se utilizaron (PC3 y HCT116) para la realización de este proyecto, se decidió no evaluarla en la línea MCF10A.

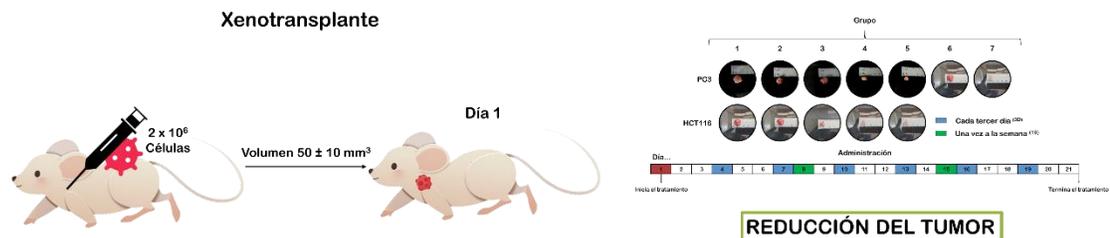
## 12. Resumen gráfico del proyecto.



*in vitro*



*in vivo*



Evaluations of Anticancer Effects of Combinations of Cisplatin and Tirucallane-Type Triterpenes Isolated from *Amphipterygium adstringens* (Schltdl).

<https://doi.org/10.1002/cbdv.202300893>

### **13. Artículo**

# Evaluations of Anticancer Effects of Combinations of Cisplatin and Tirucallane-Type Triterpenes Isolated from *Amphipterygium adstringens* (Schltdl).

Lidia Díaz-Sánchez,<sup>[a]</sup> Alejandro Zentella-Dehesa,<sup>[b, c]</sup> Víctor Alberto Castro-Torres,<sup>[a]</sup> Noemi Silva-Jiménez,<sup>[a]</sup> Nadia Judith Jacobo-Herrera,<sup>\*[b]</sup> and Mariano Martínez-Vázquez<sup>\*[a]</sup>

The cytotoxic activity of combinations of masticadienonic (AMD) or 3 $\alpha$ OH-hydroxy-masticadienonic (3 $\alpha$ OH-AMD) acids with cisplatin (CDDP) was evaluated against PC3 prostate and HCT116 colon cancer cell lines. Combinations A (half the IC<sub>50</sub> value), B (IC<sub>50</sub> value), and C (twice the IC<sub>50</sub> value) were tested at a 1:1 ratio. All AMD plus CDDP combinations demonstrated increased cytotoxic effect, as determined by the sulforhodamine B test, in both cell types. The best combination was B, which

showed 93% and 91% inhibition of the proliferation of PC3 and HCT116 cells, respectively. It also increased apoptosis in the PC3 cell lines, as evaluated by flow cytometry. However, *in vivo* tests showed no additional activity from the AMD plus CDDP combinations. These results showed that the increased cytotoxic activity of the combinations *in vitro* did not reflect *in vivo* tests. All combinations of 3 $\alpha$ OH-AMD plus CDDP exerted antagonistic effects in both cell types.

## Introduction

In 2020, more than 1.4 million new cases of prostate cancer were diagnosed globally, with an incidence rate of 36.0 per 100,000 males.<sup>[1]</sup> Surgical intervention is a standard procedure in the initial stages of prostate cancer, and chemotherapy is also a crucial method to combat cancer, whether used as a neoadjuvant or adjuvant treatment or when employed against recurrent and metastatic cancers. Colorectal cancer (CRC) is a serious illness with severe consequences if not treated properly. Environmental factors influence the development of this malignant disease, necessitating proper diagnostic evaluation, aggressive surgery, and intensive chemotherapy to prevent the spread of cancer and disease recurrence. However, prolonged chemotherapy can be harmful to patients, thus limiting its use in cancer therapy.<sup>[2]</sup> Platinum-based drugs, such as cisplatin

(CDDP), are often used as chemotherapy agents.<sup>[3,4]</sup> However, their high nephrotoxicity limits their use as an anti-cancer drug, except for the treatment of recurrent tumors. Combination therapy is essential for cancer treatment and is a superior strategy.<sup>[5-7]</sup> To minimize its toxicity, cisplatin is combined with other drugs and administered at lower doses.<sup>[8]</sup> For example, a randomized clinical trial found that low-dose cisplatin improved the efficacy of 89Sr therapy for painful bone metastases from prostate cancer.<sup>[9]</sup> Another study revealed that aspirin enhanced the antitumoral effect of CDDP against colon cancer.<sup>[10]</sup> Many researchers are interested in the use of plant-derived chemical compounds, also known as phytochemicals, a source of new drugs. Phytochemicals can act on multiple targets, rendering them promising for drug development. Our previous research on antitumoral triterpenes has revealed that masticadienonic (AMD) and 3 $\alpha$ OH-hydroxy-masticadienonic acids (3 $\alpha$ OH-AMD), which are Tirucallane-type triterpenoids isolated from *Amphipterygium adstringens* are capable of inhibiting tumor growth *in vivo* and inducing cell death via apoptosis.<sup>[11]</sup>

Furthermore, AMD has been identified as the most potent inhibitor of Pol $\beta$ , an error-prone enzyme that contributes to genetic instability and cisplatin resistance in tumor cells.<sup>[12]</sup> Considering the above, we decided to perform a study to determine the effectiveness of using AMD plus CDDP or 3 $\alpha$ OH-AMD plus CDDP combinations as cytotoxic and antitumoral agents against PC3 (prostate) and HCT116 (colon) human cancer cell lines and tumors caused by these cells. In this study, various compound doses were tested to cover a range of equivalent concentrations based on their IC<sub>50</sub> values. We assessed three combinations of concentrations: A (half the IC<sub>50</sub> value), B (IC<sub>50</sub> value), and C (twice the IC<sub>50</sub> value) of the compounds in a 1:1 ratio.

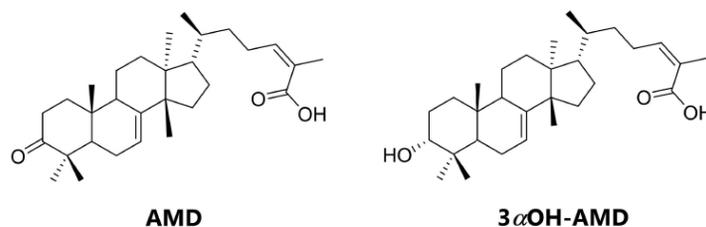
[a] L. Díaz-Sánchez, V. A. Castro-Torres, N. Silva-Jiménez, M. Martínez-Vázquez Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, C. Exterior, C. Universitaria, Coyoacán 04510, CDMX, México (MMV)  
E-mail: marvaz@unam.mx

[b] A. Zentella-Dehesa, N. J. Jacobo-Herrera Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán INCMNSZ. C. Vasco de Quiroga 15, Tlalpan 14080 CDMX, México (NJH)  
E-mail: nadia.jacobo@gmail.com

[c] A. Zentella-Dehesa Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, C. Mario de La Cueva, C. Universitaria, Coyoacán 04510, CDMX, México

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cbdv.202300893>

© 2023 The Authors. Chemistry & Biodiversity published by Wiley-VHCA AG. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



**Figure 1.** Chemical structures of masticadienonic (AMD) and 3 $\alpha$ OH-hydroxy-masticadienonic acids (3 $\alpha$ OH-AMD).

## Results and Discussion

Combination treatments have become necessary in cancer therapy because monotherapy can be less effective and can harm healthy cells. In particular, chemotherapy can be toxic and can weaken the immune system. By contrast, combination therapy targets different pathways, reduce toxicity and require a lower dosage. It also protects normal cells from cytotoxicity. In this study, we proposed combining the antitumoral masticadienonic (AMD) and 3 $\alpha$ OH-hydroxy-masticadienonic (3 $\alpha$ OH-AMD) acids (Figure 1) with *cis*-diamine dichloroplatinum (II) (CDDP).

We evaluated the effects of three different combinations, namely, A (half the IC<sub>50</sub> value), B (IC<sub>50</sub> value), and C (twice the IC<sub>50</sub> value), of each compound in a 1:1 ratio, while ensuring the

same potency of each compound on PC3 and HCT116 human cancer cell lines.

The IC<sub>50</sub> values of AMD, 3 $\alpha$ OH-AMD, and CDDP with respect to PC3 and HCT116 human cancer cell lines were determined using a dose-response curve (Table 1).

The concentrations of AMD plus CDDP and 3 $\alpha$ OH-AMD plus CDDP combinations used to examine the corresponding effects on PC3 and HCT116 human cancer cell lines are depicted in Tables 2 and 3.

### Cytotoxic activity of combinations against PC3 cancer cell lines

When the AMD + CDDP combination was tested at half the IC<sub>50</sub> concentration of each compound in PC3 cells, approximately 50% activity was observed. However, at the IC<sub>50</sub> concentration of each compound AMD (47.5  $\mu$ M) + CDDP (15.9  $\mu$ M), a 93% inhibition of proliferation was noted. These results suggest that AMD and CDDP had a synergistic effect in preventing cell growth. In contrast, the coadministration of 3 $\alpha$ OH-AMD in conjunction with CDDP at a concentration equivalent to half the IC<sub>50</sub> (3 $\alpha$ OH-AMD at 25.0  $\mu$ M and CDDP at 07.9  $\mu$ M) yielded only a modest 25% inhibition. Furthermore, when employing the IC<sub>50</sub> concentrations (3 $\alpha$ OH-AMD at 50.0  $\mu$ M and CDDP at 15.9  $\mu$ M), the combined treatment exhibited a marginal 50% activity, mirroring the identical percentage observed when these compounds were applied independently. Therefore, the results suggested that this combination was neither additive nor synergistic, as shown in Figure 2.

### Cytotoxic activity of combinations against HCT116 cancer cell lines

The AMD plus CDDP combination showed an increase in activity against HCT116 cells, compared to the compounds alone. At half the IC<sub>50</sub> for each compound in the combination, 50% activity was noted and at the IC<sub>50</sub> concentration of AMD (31.0  $\mu$ M) plus CDDP (15.9  $\mu$ M), an inhibitory of 91% was noted. These findings indicate that AMD and CDDP synergistically prevented cell growth. However, the activity decreased with all combinations of 3 $\alpha$ OH-AMD plus CDDP. The high-concentration combination of 3 $\alpha$ OH-AMD (100  $\mu$ M) plus CDDP (11.1  $\mu$ M) only

**Table 1.** The IC<sub>50</sub> values for masticadienonic (AMD), 3 $\alpha$ OH-hydroxy-masticadienonic acids (3 $\alpha$ OH-AMD) and cisplatin (CDDP).

Cell lines	Compound IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>		
	AMD	3 $\alpha$ OH-AMD	CDDP
PC3	47.5 $\pm$ 0.4	50.0 $\pm$ 1.0	15.9 $\pm$ 0.8
HCT116	31.0 $\pm$ 0.5	38.0 $\pm$ 0.8	05.6 $\pm$ 0.6

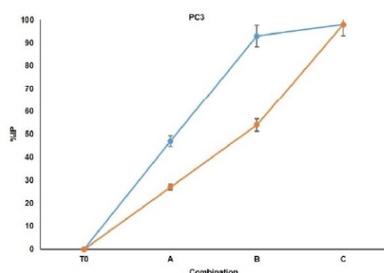
<sup>a</sup> The IC<sub>50</sub> values were calculated using the GraphPad Prism 6 program.

**Table 2.** Combinations evaluated on PC3 cell lines. A (half the IC<sub>50</sub> value), B (IC<sub>50</sub> value), and C (twice the IC<sub>50</sub> value).

Combination	AMD + CDDP ( $\mu$ M)	3 $\alpha$ OH-AMD + CDDP ( $\mu$ M)
A	23.8 + 07.9	25.0 07.9
B	47.5 + 15.9	50.0 + 15.9
C	95.0 + 31.7	100 + 31.7

**Table 3.** Combinations evaluated on HCT116 cell lines. A (half the IC<sub>50</sub> value), B (IC<sub>50</sub> value), and C (twice the IC<sub>50</sub> value).

Combination	AMD + CDDP ( $\mu$ M)	3 $\alpha$ OH-AMD + CDDP ( $\mu$ M)
A	15.5 + 02.8	19.0 + 02.8
B	31.0 + 05.6	38.0 + 05.6
C	62.0 + 11.1	76.0 + 11.1

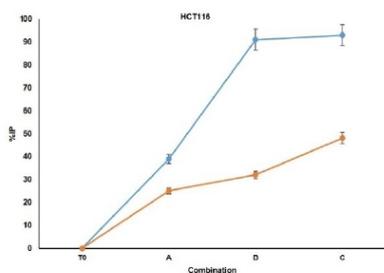


**Figure 2.** Percentage of the inhibition of proliferation (%IP) of PC3 cells induced by AMD plus CDDP combination (blue curve) and 3αOH-AMD plus CDDP combination (orange curve). ± SD.

showed approximately 50% inhibition. Therefore, these combinations were neither additive nor synergistic, as indicated by Figure 3.

The outcomes illustrated in Figures 2 and 3 are noteworthy due to their unexpected nature. This peculiarity arises from the structural disparity between AMD and 3αOH-AMD, where the former possesses a carbonyl group at C3, while the latter features a reduced functionality in the form of an α-oriented hydroxy group at the same position. Furthermore, upon cytotoxic evaluation of the three compounds (AMD, 3αOH-AMD, and CDDP), the HCT116 line had a higher sensitivity to all compounds tested than the PC3 cell lines (Table 1). However, combining these compounds did not enhance this sensitivity in HCT116 cells, as it did in PC3 cells, indicating that the combinations had antagonistic effects. A potential explanation is that 3αOH-AMD and CDDP could have a similar mechanism of action. However, the interaction with DNA and production of ROS are the main mechanisms attributed to CDDP<sup>[12]</sup> whereas the mitochondria have been proposed as the biological target of 3αOH-AMD.<sup>[13]</sup>

When the cytotoxic activity of cisplatin is too high compared to that of a second drug in combination, a decrease in the activity of the second drug is noted.<sup>[14]</sup> However, this was



**Figure 3.** Percentage of the inhibition of proliferation (%IP) of HCT116 cells induced by AMD plus CDDP combination (blue curve) and 3αOH-AMD plus CDDP combination (orange curve). ± SD.

not the case in this study since, considering the results shown in Table 1, the relative proportions of AMD plus CDDP and 3αOH-AMD plus CDDP were almost the same. Determining the complete mechanism of this phenomenon is beyond the scope of this study.

Nevertheless, these results should be considered, especially when the intention is to combine natural compounds with clinical drugs.

### Cell apoptosis analysis

Considering these results, we decided to continue the present study with only AMD plus CDDP combination and examined its effect against the PC3 cell lines. The type of death induced by the combination of AMD plus CDDP was determined by cytometric analysis.

Our results showed that when using combination B in the PC3 cancer cell lines, 11.1% and 79.8% rates of late and early apoptosis were noted. In contrast, when AMD and CDDP were administered separately at IC<sub>50</sub>, late apoptosis rates were 12.6% and 14.1%, respectively, and early apoptosis rates were 56.7% and 57.7%, respectively, as shown in Figure 4.

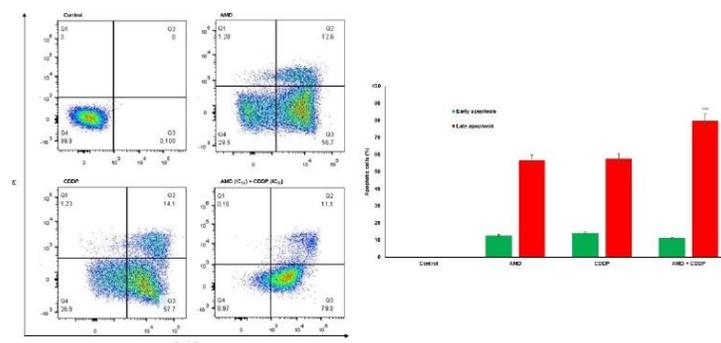
### Treatment of non-cancerous MCF10A cells with A, B, and C combinations

According to our findings, the combinations of AMD plus CDDP and 3αOH-AMD plus CDDP had an anti-proliferative effect on non-cancerous MCF10A cells. However, this effect was less potent than that observed in PC3 and HCT116 cells. Figure 5 displays the outcomes of the anti-proliferation assessments on MCF10A cells utilizing the same AMD plus CDDP combinations as in the previous cytotoxicity tests and the percentage of anti-proliferation effects against MCF10A cells mediated by the indistinguishable 3αOH-AMD plus CDDP combinations employed in the earlier cytotoxic activity assessment on PC3 cell lines.

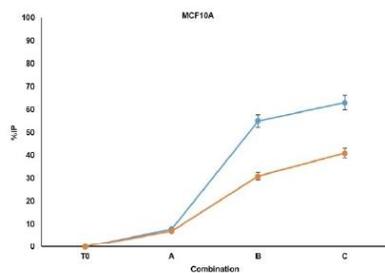
### Examination of the antitumor activity in a xenograft model using PC3 cells

The tumor growth inhibition effect of AMD and 3αOH-AMD was previously evaluated in nude mice transplanted with PC3 cells. The results showed that AMD and 3αOH-AMD triterpenes reduced tumor growth by 85% at a dose of 125 mg/kg administered weekly four times in twenty days.<sup>[11]</sup>

Next, we tested the effectiveness of AMD + CDDP in reducing tumor size using a xenograft model in nu/nu mice. We used seven groups of five mice, each, which are described as follows: 1. Control; 2. AMD (47.5 mg/kg) + CDDP (2.0 mg/kg); 3. CDDP (2.0 mg/kg); 4. AMD (95.0 mg/kg); 5. CDDP (4.0 mg/kg); 6. AMD (47.5 mg/kg); and 7. AMD (47.5 mg/kg) plus CDDP (2.0 mg/kg).



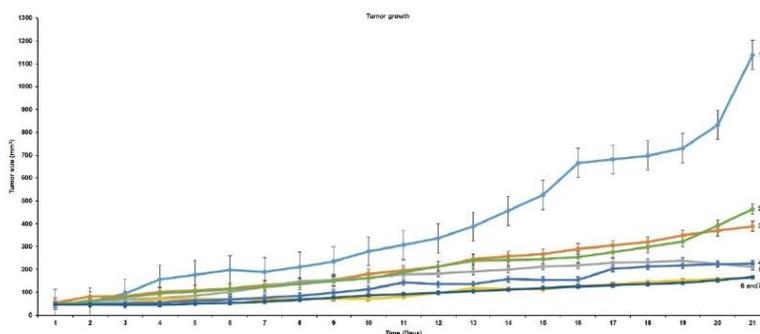
**Figure 4.** Dot plot of Annexin V/ Propidium iodide (PI)-stained PC3 cells stimulated with AMD ( $47.5 \pm 0.4 \mu\text{M}$ ), CDDP ( $15.9 \pm 0.8 \mu\text{M}$ ), and combination B [ $-\text{IC}_{50}$ -AMD ( $47.5 \pm 0.4 \mu\text{M}$ ) plus CDDP ( $15.9 \pm 0.8 \mu\text{M}$ )] for 48 h.  $***p < 0.0001$  vs. control.  $\pm$ SD.



**Figure 5.** Percentage of the inhibition of proliferation (%IP) of non-cancerous MCF10 A cells induced by AMD plus CDDP combination (blue curve) and 3αOH-AMD plus CDDP combination (orange curve).  $\pm$ SD. These combinations are the same as those used in evaluating cytotoxic activity against PC3 cells.

Our research findings revealed that administering AMD at doses of 47.5 and 95.0 mg/kg reduced the tumor size by 85% and 80%, respectively. Similarly, when administered at doses of 2.0 and 4.0 mg/kg, CDDP decreased tumor growth by 66% and 82%, respectively. Further tests were conducted to determine the most effective antitumor combination *in vivo*. The combination of AMD (47.5 mg/kg) plus CDDP (2.0 mg/kg), which was administered every third day for twenty-one days, resulted in an approximately 85% reduction in the tumor size. However, AMD alone, at the same dose (47.5 mg/kg), showed the same activity (Figure 6).

Animal Research Commission (Comisión de Investigación en Animales (CINVA)) approved the assays using mice under the BQO-1961-19-21-1 protocol.



**Figure 6.** Reducing tumor size ( $\text{mm}^3$ ) in a PC3 xenograft model of nu/nu mice. Administration: 1. Control. 2. AMD (47.5 mg/kg) plus CDDP (2.0 mg/kg) combination (59.2%).<sup>[W]</sup> 3. CDDP (2.0 mg/kg) (66.0%).<sup>[SD]</sup> 4. AMD (95.0 mg/kg) (80.1%).<sup>[W]</sup> 5. CDDP (4.0 mg/kg) (81.5%).<sup>[W]</sup> 6. AMD (47.5 mg/kg) (85.3%).<sup>[SD]</sup> 7. AMD (47.5 mg/kg) plus CDDP (2 mg/kg) combination (85.3%).<sup>[SD]</sup> The inhibitory activities of each group are depicted in bold. Administration once a week<sup>[W]</sup> and every third day.<sup>[SD]</sup>  $\pm$ SD.

## Conclusions

The coadministration of two bioactive compounds is of interest due to its potential to augment their pharmacological efficacy. However, it is essential to note that the effectiveness of the combination depends on various factors, including the appropriate dosages or concentrations of the drugs used. After careful consideration, we conducted a study to determine the cytotoxic and antitumor effects of various combinations of AMD, 3 $\alpha$ OH-AMD, and CDDP on two cancer cell lines: PC3 (prostate) and HCT116 (colon). To ensure that various compounds in the combination had the same bioequivalence, we selected the IC<sub>50</sub> value for each compound. Three combinations were tested: A (half the IC<sub>50</sub> value), B (IC<sub>50</sub> value), and C (twice the IC<sub>50</sub> value). The results demonstrated that the combination of AMD and CDDP was most effective in eliminating cancer cells in both tested cancer cell lines. The combination of 3 $\alpha$ OH-AMD plus CDDP acted as an antagonist against both cell lines. (Figures 2 and 3). In addition, during the xenotransplant test, the combination of AMD (47.5 mg/kg) plus CDDP (2.0 mg/kg) administered every third day was the most effective in inhibiting tumor growth in the PC3 cell lines, with an inhibition rate of 85.33%. However, AMD showed the same level of inhibition at the same concentration (Figure 6). This suggests that the inclusion of CDDP to the combination lacks utility or efficacy. However, administration of AMD (47.5 mg/kg) every third day showed almost the same inhibitory effect as AMD (125 mg/kg) administered weekly four times over 20 days.<sup>[11]</sup>

This result demonstrated the possibility of administering less AMD every third day.

In summary, while the combination of AMD plus CDDP demonstrated potent synergistic cytotoxicity against PC3 cells *in vitro* and induced apoptosis, this benefit did not translate to increased antitumor activity *in vivo* when combined with CDDP.

## Experimental Section

### Vegetal material

The bark of *Amphipterygium adstringens* was obtained from several specimens collected from Barranca Honda, municipality of Tlatzapán, Morelos, Mexico. The collection month was January 2021. The plant sample were deposited in the Herbarium of the Department of Botany of the Colegio de Postgraduados (Texcoco, CDMX). (Voucher (registration number) 1531. Identified by Dr. M. Soto.)

### Biological activity: In vitro anti-proliferative effect

Cytotoxicity in tumor and normal cell lines was determined according to the protocols established by the National Cancer Institute (NCI) of the United States.<sup>[15,16]</sup> Masticadienoic (AMD), 3 $\alpha$ -hydroxy-masticadienoic acids (3 $\alpha$ OH-AMD) (Figure 1), and cisplatin (CDDP) were evaluated. The assay was performed using prostate cancer (PC3), colorectal adenocarcinoma (HCT116), and breast epithelial cell lines (MCF10A). CDDP was used as reference drug.

### Biological activity: In vivo antitumor effects

For the *in vivo* experiments, six-to-eight-week-old-male mice of the nu/nu strain (immunosuppressed mice) with an average weight of 24  $\pm$  2 g were used. Mice were maintained in pathogen-free micro-isolators at a temperature of 22 °C in an atmosphere with 55% relative humidity, and a 12 h light/12 h dark cycle. *Ad libitum* access was provided to food and water. The Internal Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL) of the Salvador Zubirán National Institute of Medical Sciences and Nutrition (INCMNSZ) originally described the experimental procedures. (CICUAL number BQO-1961-19-21-1).

The general conditions for each experiment are described in the *Supporting Information*.

## Supporting Information

Additional references cited within the *Supporting Information* (Ref. [17–21]).

## Author Contributions

Nadia Judith Jacobo-Herrera, Lidia Díaz-Sánchez, and Mariano Martínez-Vázquez contributed to the conception and design of the study. Víctor Alberto Castro-Torres, Noemí Silva-Jiménez and Lidia Díaz-Sánchez collected data and performed the experimental assays. Alejandro Zentella-Dehesa, Nadia Judith Jacobo-Herrera and Mariano Martínez-Vázquez analyzed the data and wrote the article. All the authors have read and approved the final version of the manuscript.

## Acknowledgements

This study was partially supported by the IQ-UNAM 2023 institutional grant awarded to M. Martínez-Vázquez.

Lidia Díaz-Sánchez is a doctoral student at Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and has received a CONACYT fellowship (604694).

The authors thank INCMNSZ, bioterio staff (protocol CINVA: BQO-1961-19-21-1).

## Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interest.

## Data Availability Statement

Research data are not shared.

**Keywords:** antitumor · cisplatin · combinations · cytotoxic · antitumor · cisplatin · combinations · cytotoxic · triterpene · triterpenes

- [1] L. Wang, B. Lu, M. He, Y. Wang, Z. Wang, L. Du, *Front Public Health*. **2022**, *10*, 176.
- [2] R. Mahadevappa, H. Fai Kwok, *Comb. Chem. High Throughput Screening*. **2017**, *20* (5), 376–394.
- [3] N. Kemeny, K. Israel, D. Niedzwiecki, D. Chapman, J. Botet, B. Minsky, C. Cochran, *J. Clin. Oncol.* **1990**, *8* (2), 313–318.
- [4] P. Bragado, A. Armesilla, A. Silva, A. Porras, *Apoptosis*. **2007**, *12*, 1733–1742.
- [5] Y. L. Wu, C. Zhou, C. P. Hu, J. Feng, S. Lu, Y. Huang, S. L. Geater, *Lancet Oncol.* **2014**, *15* (2), 213–222.
- [6] M. Harada, J. Benito, S. Yamamoto, S. Kaur, D. Arslan, S. Ramirez, M. Konopleva, *Oncotarget*. **2015**, *6* (35), 37930.
- [7] P. Tétu, J. Mangana, R. Dummer, C. Dutriaux, N. Beneton, S. Dalle, C. Lebbe, *Eur. J. Cancer*. **2018**, *93*, 147–149.
- [8] S. Hager, C. J. Ackermann, M. Joerger, S. Gillesen, A. Omlin, *Ann. Oncol.* **2016**, *27* (6), 975–984.
- [9] R. Sciuto, A. Festa, S. Rea, R. Pasqualoni, S. Bergomi, G. Petrilli, C. L. Maini, *J. Nucl. Med.* **2002**, *43* (1), 79–86.
- [10] W. Jiang, Y. Yan, M. Chen, G. Luo, J. Hao, J. Pan, W. Guo, *Aging*. **2020**, *12* (1), 611.
- [11] M. B. Sánchez-Monroy, N. J. Jacobo-Herrera, A. Zentella-Dehesa, B. Hernández-Téllez, M. Martínez-Vázquez, *Molecules*. **2017**, *22* (9), 1479.
- [12] F. Boudsocq, P. Benaim, Y. Canitrot, M. Knibiehler, F. Ausseil, J. P. Capp, C. Cazaux, *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67* (5), 1485–1492.
- [13] L. Dalla Via, A. Braga, A. N. García-Argáez, M. Martínez-Vázquez, A. Toninello, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (4), 557–562.
- [14] Y. U. E. Qing-Xi, G. U. A. N. Shu-Hong, X. I. E. Fu-Bo, S. O. N. G. Xiao-Yi, M. A. Chao, F. E. N. G. Li-Xing, G. U. O. De An, *Chin. J. Nat. Med. (Amsterdam, Neth.)* **2008**, *6* (5), 367–371.
- [15] P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, M. R. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82* (13), 1107–1112.
- [16] A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, M. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83* (11), 757–766.
- [17] D. H. R. Barton, E. Seoane, *J. Chem. Soc.* **1956**, 4150–4157.
- [18] M. Soriano-García, R. A. Toscano, B. Ortiz, A. Navarrete, R. Sanchez-Obregon, H. Barrios, F. Yuste, *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* **1987**, *43* (5), 990–992.
- [19] A. Navarrete, R. Mata, G. Delgado, *Planta Med.* **1989**, *55* (06), 579–579.
- [20] D. A. Mulholland, J. J. Nair, *Phytochemistry (Elsevier)*. **1994**, *37* (5), 1409–1411.
- [21] V. P. Papageorgiou, M. N. Bakola-Christianopoulou, K. K. Apazidou, E. E. Psarros, *J. Chromatogr. A*. **1997**, *769* (2), 263–273.

Manuscript received: June 17, 2023

Accepted manuscript online: September 11, 2023

Version of record online: September 21, 2023

Hey! Llegaste al final...

In memoriam



¡Gracias totales!

“May the wind under your wings bear you where the sun sails and the moon walks.”

J. R. R. Tolkien  
*The Hobbit*, 1937