



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**Evaluación anti-neoplásica e inmunomoduladora *in vivo* e *in vitro* del  
extracto hidrosoluble del *Agave mapisaga* en cáncer de próstata murino**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO  
DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Pablo Hernández Peralta

Tutora principal.

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

Comité tutor.

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

Dr. Marco A. Velasco Velázquez- Facultad de Medicina. UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Noviembre 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC) de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Fue el producto de la colaboración entre el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, La Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos del Instituto Politécnico Nacional y de la UNIPREC de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## Dedicatoria

*A Eli...*

*Para afrontar la muerte, lo que queda es honrar la vida*

El objetivo fundamental de la ciencia es la libertad del ser humano. Producto de la observación y del entendimiento de lo que nos rodea y nos compone, la ciencia es una ruta natural para relacionarnos con la vida y los elementos que la permiten. Entender de manera humilde y acertada a *la naturaleza* y nuestra pertenencia a ella, nos dimensiona, lo que nos libera de lo que habitual y erróneamente se considera relevante. Para lograrlo es fundamental desmantelar a la ciencia como habitualmente se enseña: positivista, reduccionista, desvinculada y lo más grave... elitista.

Se necesita entender las causas político-económicas que sustentan a la ciencia y que han dado origen al desastre que hoy tenemos por mundo y que no deja de recrudecerse. “comprender las corrientes que forman las olas que podemos ver”. Necesitamos revertir buena parte del camino que nos han hecho emprender como humanidad, un camino que nos hace vernos entre nosotros como cosas desechables. Hemos de trazar una ciencia capaz de pensarse con agudeza mental, emocional y espiritual. Una ciencia **por** los seres humanos en vez de *para* los seres humanos.

Para lo anterior, la investigación a través de la universidad debe servir a la comunidad, debe existir en nuestras mentes un profundo sentimiento de responsabilidad por una patria donde la educación ha pasado de ser un derecho a ser un privilegio. Aquellos que hemos tenido la fortuna de recibirla, debemos ejercer la reciprocidad con nuestro pueblo, comenzando por los sectores más afectados por las decisiones, omisiones y abusos de un pequeño grupo que ha *desviado* el poder que debe residir las grandes mayorías. La realidad que vivimos se cimenta en la fragmentación, el miedo, la resignación y la habituación esparcidos a lo largo y ancho del país. La violencia y el despojo sistemáticos y progresivos invaden como el cáncer y destruye lo que queda del tejido social. Es nuestra labor la búsqueda de tratamientos para este cáncer.

El único camino para cambiar esta ruta suicida es con el ejemplo y la congruencia en el trabajo cotidiano por servir a los que más nos necesitan, asumamos que está en nuestras manos poder crear una forma libre y digna de vivir.

## Agradecimientos

A la Dra. Laura por su valentía y fungir como madre y amiga académica de años, alguien con quien se puede contar y de quien se aprende mucho en todo momento. Gracias por su constante respaldo en las actividades “ajenas” a la UNAM de las que formo parte (Y en todas las que me meto).

A la Dra. Isabel por su actitud imparable e implacable, lo que despierta la idea de que se puede hacer ciencia con objetivos humanos y sociales además de académico-científicos. Gracias por su transparencia y generosidad.

Al Dr. Marco por el apoyo constante y la vinculación en sus laboratorios para mi formación. Por sus señalamientos precisos y bien intencionados que permiten ver con claridad errores de necesidad en mí. De igual manera gracias por su apoyo y deseos de vincularse en las actividades extra académicas.

A todo el equipo de grandes personas de la UNIPREC: Marisol, Lucía, Mabel, Paco, Héctor, Abel, Quetzal, Ana Karem, Steph quienes con atención, paciencia, amabilidad y apoyo profesional hicieron posible este trabajo

Al Dr. Fausto de la Facultad de Química quien nos apoyó con la obtención del extracto

A Miguel Hernández de la UDIBI IPN por sus aportaciones en el modelo *in vivo*

Al Dr. Jesús Gracia de la Facultad de Química por su apoyo en el análisis de los compuestos

A mi familia del Departamento de Microbiología: Laurita, Marion, Naomi, Alicia, Erika, Araceli, Lalo, Hugo, José, Ari, Julia, Susana, Don Mario, Armando, Tere, Manuel, Lázaro, Nina, Isa, Yaya, Aldo, Alejandro, Yahel. Gracias a todos porque aprendo mucho de ustedes. Y nos divertimos harto.

A mis queridas guerreras de brigadas. Rebeca, Leslie y María.

A mis hermanos y hermanas de Jóvenes ante la Emergencia Nacional. Es un verdadero honor compartiros la vida y la sed de libertad así como el amor para construirla.

A mis hermanos y hermanas de Nos Hacen Falta. Pronto habremos de construir una universidad con apego a sus fundamentos. Gracias porque juntos enfrentamos con generosidad, cariño y convicción circunstancias muy graves que suceden en nuestra comunidad.

Por supuesto, una vez más a mi familia...Les amo más allá de lo evidente. Esteban, Renatito, Fátima, Valentina, Enrique, Renato, Daniel, Franco, Yun, mis tios y tías; primos y primas; adorados y adoradas. Mis carnales Jon, Díaz, Patricio, Gonzilla y Pausas. Gracias una vez más por ser parte del relieve de mi vida.

## Índice

Resumen .....	3
Introducción .....	5
Características geográficas y distribución vegetal en zonas áridas de México .....	5
Características geopolíticas y geoeconómicas de regiones áridas.....	5
Situación de la pobreza en el estado de Hidalgo.....	6
Etnobotánica .....	7
Etnobotánica del <i>Agave</i> .....	8
Medicina tradicional y Fitomedicina.....	8
Familia Agavaceae.....	10
Fitomedicina de los agaves .....	11
Saponinas esteroidales .....	11
Cáncer .....	12
Epidemiología del cáncer.....	13
Cáncer en México.....	13
Epidemiología del cáncer de próstata .....	14
Cáncer de próstata .....	14
Células PEC-Src.....	14
Modelo de isotransplatación.....	15
Respuesta inmune al cáncer .....	15
Macrófagos.....	16
Macrófagos en los procesos neoplásicos.....	16
Óxido nítrico .....	17
El óxido nítrico, proliferación y cáncer.....	17
Farmacología del cáncer .....	18
Quimioterapia .....	18
Origen vegetal de los quimioterapéuticos .....	19
Tratamientos alternativos para el cáncer.....	20
Etnofarmacología y nuevos tratamientos.....	21

Validación de tratamientos y su aprobación por la Comisión Federal para la Prevención de Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) .....	22
Justificación .....	22
Hipótesis .....	23
Objetivo general.....	23
Objetivos particulares .....	23
Material y métodos .....	24
Pruebas <i>in vitro</i> .....	24
Colección y determinación taxonómica del agave.....	24
Obtención del extracto acuoso.....	24
Obtención del extracto metanólico .....	24
Análisis preliminar de los extractos .....	25
Prueba de citotoxicidad.....	25
Determinación del óxido nítrico en el ensayo de citotoxicidad.....	26
Pruebas <i>in vivo</i> .....	27
Límite de prueba.....	27
Prueba de isotransplatación.....	28
Resultados.....	32
Resultados de las pruebas <i>in vitro</i> .....	32
Colección y determinación taxonómica del agave.....	32
Obtención del extracto acuoso.....	33
Obtención del extracto metanólico .....	33
Análisis preliminar de los extractos .....	34
Resultados de las pruebas <i>in vivo</i> .....	38
Prueba de citotoxicidad.....	38
Determinación del óxido nítrico en el ensayo de citotoxicidad.....	40
Resultados de las pruebas <i>in vivo</i> .....	41
Límite de prueba.....	41
Prueba de isotransplatación.....	41
Discusión y conclusiones .....	60
Conclusiones finales .....	65
Referencias .....	67

## Índice de abreviaturas

AIF	Factor inductor de la apoptosis
ANDEVA	Análisis de la varianza
AR	Artritis reumatoide
ARN	Ácido ribonucleico
CDDP(II)	<i>cis</i> -diaminocloroplatino(II)
CICUAL	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio
Cis Pt	<i>cis</i> -diaminocloroplatino(II)
COFEPRIS	Comisión Federal para la Prevención de Riesgos Sanitarios
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM	Medio esencial mínimo de Dulbecco
DNA	Ácido desoxiribonucleico
FA	Función antitumoral
FITC	Isotioscianato de fluoresceína
HIF-1 $\alpha$	Factor inducible por hipoxia 1 alfa
HPLC	Cromatografía líquida de alta definición
ID	identificación
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
kg	kilogramos
mg	miliigramos
ml	mililitros
MOMP	Mephalan, mtotrexato, vincristina y prednisona
MOPP	Mephalan, procarbazona, vincristina y prednisona
nm	Nanómetros
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
PARP	Poli ADP ribosa polimerasa
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PEC	Células epiteliales de próstata
PEC-Src	Células epiteliales de cáncer de próstata
RMP	Revoluciones por minuto
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa
TAMs	Macrófagos asociados a tumores
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta



TLRs	Receptores tipo Toll
TNFa	Fator de necrosis tumoral alfa
TRITC	isotioscianato de tetrametilrodamina
UDIBI	Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioprocesos
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UNIPREC	Unidad de Investigación Preclinica
USAI	Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria
UV	Ultravioleta
VAMP	Vincristina, metotrexato, 6-mercaptopurina y prednisona
VR	Volumen relativo
VT	volumen tumoral

## Evaluación anti-neoplásica e inmunomoduladora *in vivo* e *in vitro* del extracto hidrosoluble del *Agave mapisaga* en cáncer de próstata murino. Pablo Hernández Peralta

### Resumen

El presente trabajo consistió en la evaluación de la actividad antineoplásica e inmunomoduladora del extracto acuoso del *Agave mapisaga*, con el objetivo de dar sustento científico al uso que se ha hecho de esta planta desde hace cientos de años en la medicina tradicional ÑaÑhú. Fue necesario realizar la identificación taxonómica del agave en colaboración con el Instituto de Biología de la UNAM y se determinó que corresponde a la especie *Agave mapisaga* Trel. Se obtuvieron dos extractos crudos: acuoso y metanólico. A ambos se les realizaron análisis preliminares por espectrofotometría UV para conocer su estabilidad estructural general, se demostró que no presentaron cambios en la huella espectrofotométrica tras ser sometidos a distintas condiciones: exposición a un pH de 2, realización de 10 ciclos de congelación descongelación y a su dilución en agua de bebida clorada por 15 horas a temperatura ambiente. Se realizó un análisis de cromatografía líquida de alta definición (HPLC) para conocer a mayor detalle su composición, sólo fue posible hacerlo en el extracto acuoso, en el que se determinó la presencia de la saponina esteroidea hecogenina. Para evaluar su actividad antineoplásica *in vitro* se realizó la prueba de citotoxicidad en células de cáncer de próstata epitelial PEC- Src expuestas a diferentes concentraciones de los extractos (0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2mg/pozo). Se observó que ambos extractos poseen una actividad citotóxica; sin embargo, el extracto acuoso presentó diferencia significativa ( $\alpha=0.01$ ) con el grupo testigo desde una concentración de 0.125 mg/pozo ( $P=0.0001$ ), mientras que el metanólico presentó diferencia a partir de una concentración de 0.25 mg/pozo ( $P=0.0001$ ). Se evaluó la producción de óxido nítrico en los sobrenadantes celulares con el reactivo de Griess y no se encontraron niveles detectables de éste. Teniendo en cuenta la actividad citotóxica a menor concentración se decidió continuar con el extracto acuoso para las pruebas *in vivo*. Se utilizó el modelo de insotransplatación de las células de cáncer de próstata murino PEC-Src, para ello se emplearon 48 ratones macho FVB de de  $28 \pm 3$  gramos y 9-10 semanas a los que se les implantaron  $10^6$  células por vía subcutánea. Se les dividió en 4 grupos: 50mg/kg/día (14 animales), 100 mg/kg/día (14 animales), sin tratamiento (10 animales) y tratados con *cis*-diaminocloroplatino (II) (10 animales). La duración del estudio fue de 35 días, se evaluaron las siguientes variables: la implantación tumoral, el tamaño tumoral, el peso de los ratones, la actividad antimetastásica por bioluminiscencia y la actividad antimetastásica por histopatología. Se observó que el grupo tratado con 50 mg/kg presentó una menor implantación tumoral con respecto del testigo sin tratamiento ( $P=0.0404$ ). No se observó diferencia en el volumen tumoral, los volúmenes relativos ni en la función antitumoral, aunque cabe mencionar que en ésta última se

observó una tendencia a presentar menor volumen en el día 17 pos implantación para los animales que recibieron 50 mg/kg (función antitumoral de 60.133) y en los días 24 y 31 para el grupo que recibió 100 mg/kg (función antitumoral de 61.658 y 61.341 respectivamente). No se observaron diferencias significativas en el peso corporal con respecto al efecto del tratamiento. No fue posible detectar focos metastáticos por la técnica de bioluminiscencia o histopatología en ninguno de los animales del estudio. Se concluyó que el extracto acuoso de *Agave mapisaga* posee actividad citotóxica *in vitro* a partir de una concentración de 0.125 mg por pozo. Así mismo su administración vía oral a un dosis de 50 mg/kg por día, disminuyó la implantación de tumores subcutáneos de cáncer de próstata en ratones isotransplantados. Lo anterior nos permite visualizar al *Agave mapisaga* como una posible fuente de tratamientos antineoplásicos, sin embargo aun se tienen hallazgos iniciales por lo que se necesita realizar más estudios que validen su actividad.

## Introducción

### Características geográficas y distribución vegetal en zonas áridas de México

México tiene una superficie continental de 1.9 millones de kilómetros cuadrados, es un país mega diverso al encontrarse entre los diez del mundo con mayor cantidad de especies animales y vegetales. En apenas 1.4% de la superficie terrestre del planeta, México posee el 10% de las especies totales de éste. La vegetación terrestre de México, así como sus estados de sucesión secundaria, han sido descritos y clasificados de múltiples formas<sup>1-4</sup>. De entre los cuales destaca la clasificación de la vegetación en 10 tipos con la siguientes comunidades vegetales: bosque tropical perennifolio, bosque tropical subcaducifolio, bosque tropical caducifolio, bosque espinoso, pastizal, matorral xerófilo, bosque de *Quercus*, bosque de coníferas, bosque mesófilo de montaña y vegetación acuática y subacuática<sup>5</sup>. De las anteriores comunidades vegetales la más abundante es la de matorral xerófilo la cual se desarrolla en los climas árido y semiárido, éste tipo de ecosistema abarca el 29.7% con 70.49 millones de hectáreas de la superficie nacional. Aunque pareciera que dichos climas y su comunidad vegetal estarían asociados a una menor diversidad debido a las dificultades climáticas, es todo lo contrario. A pesar de su escasa riqueza de especies por kilómetro cuadrado, su contribución a la flora de México se estima en 6000 especies, lo que coloca al matorral xerófilo por encima de las selvas húmedas en cuanto a biodiversidad<sup>6</sup>. Los matorrales xerófilos tienen una fisonomía en la que predominan los arbustos de baja estatura y con baja densidad. Se pueden agrupar en tres variantes, de acuerdo con la forma de vida de los componentes vegetales dominantes: leñosos, suculentos y herbáceos<sup>7,8</sup>. Las suculentas se integran en gran medida por las especies de ciertas familias botánicas estrechamente vinculadas a las zonas áridas y semiáridas de México, ya que aquí se encuentran sus centros de origen y de diversificación; incluyen a las Cactaceae, Crassulaceae y Agavaceae, todas con porcentajes de endemismo específico extremadamente altos<sup>9</sup>.

### *Características geopolíticas y geoeconómicas de regiones áridas*

Bajo las condiciones climáticas antes descritas, las prácticas agrícolas y pecuarias clásicas se ven sumamente limitadas debido a la escasez de agua, biomasa, por la poca profundidad y la salinidad-alcalinidad de los suelos<sup>10</sup>, por lo que una tercera parte del país presenta un difícil aprovechamiento de los recursos naturales y supervivencia para el ser humano bajo los esquemas actuales de producción agrícola y pecuaria. Sin embargo, el desarrollo de comunidades humanas se encuentra distribuido en todos los climas y se han valido de la obtención de recursos disponibles para su supervivencia durante cientos de años. La relación ser humano-territorio ha dado origen a una amplia diversidad de grupos sociales con culturas e identidades construidas a lo largo de cientos o miles de años. Y que si bien hoy persisten con formas de organización política

y económica autóctona, son sumamente vulnerables a factores macroeconómicos y a la llegada de agentes comerciales externos.

Las zonas áridas actualmente muestran fuertes contrastes en cuanto a sistemas de producción agrícola, los cuales van desde la agricultura comercial altamente tecnificada hasta actividades de subsistencia. La agricultura comercial se localiza en pequeñas regiones bien definidas, en ellas existen condiciones favorables como riego, buen temporal y niveles tecnológicos altos. Por lo regular, los productores son propietarios particulares que cuentan con financiamiento; los terrenos cuentan con mejores condiciones de profundidad y de menor inclinación. Los principales cultivos son: algodón, trigo, ajonjolí, soya, uva, y hortalizas de exportación. La agricultura de subsistencia está representada por campesinos temporales que ocupan suelos someros, con altos niveles de pedregosidad, ubicados en laderas o áreas con precipitación pluvial muy irregular. Éstos están expuestos a constantes siniestros que ocasionan pérdidas a las cosechas como heladas o seguías<sup>11</sup>.

La población estimada de zona árida y semiárida de México para 2005 fue de cerca de 26 millones de personas, alrededor del 23.21% de la población nacional<sup>11-13</sup>, la densidad de población es baja, de 1 a 20 habitantes por kilómetro cuadrado. En los últimos 30 años ha habido flujos migratorios importantes hacia Estados Unidos provocando la descampesinización del campo mexicano a causa del empobrecimiento de las áreas rurales<sup>11</sup>, lo anterior principalmente como producto de acuerdos económicos nacionales como el Tratado de Libre Comercio de América del Norte y la asimetría comercial que ha traído consigo<sup>14</sup>, un acuerdo que en diversas evaluaciones, fue desde un inicio poco equitativo y con riesgos importantes para la estabilidad económica nacional<sup>15</sup>.

### **Situación de la pobreza en el estado de Hidalgo**

El estado de Hidalgo cuenta con una población de 2,665,018 habitantes, de los cuales 1,468,263 se encuentran en situación de pobreza, lo que equivale al 54.9% del total de la población estatal. De ellos, el 13.5% está en pobreza extrema (360,799 personas). Según datos del 2010 el 31.7% de la población no tiene acceso a un servicio de salud, el 22.8% no tiene acceso a servicios básicos en la vivienda y 29% tiene carencia de acceso a la alimentación. El municipio del Cardonal es uno de los más pobres, así como uno de los tres con más desigualdad con un coeficiente de Gini de 0.48 a 0.51<sup>16</sup>. En este municipio, los servicios básicos son muy limitados, en cuanto a la educación, el grado educativo máximo promedio en los habitantes mayores de 15 años es quinto de primaria.

En la mayoría de las localidades campesinas del estado, uno de los principales cultivos desde hace cientos de años es la siembra de agaves, particularmente para la obtención de pulque y fibras textiles. Sin embargo, en los últimos años ha disminuido a más de la mitad la siembra de cultivos tradicionales, entre ellos el agave, pasando de 1800 hectáreas en 1980 a 900 en 2010<sup>17</sup>, a causa de cambios en los hábitos de consumo locales y extracomunitarios<sup>18</sup>.

San Andrés Daboxtha es una comunidad del municipio Cardonal en Hidalgo, su población conserva profundas raíces étnicas Nãñhús y un alto grado de marginación. Cuenta con 916 habitantes, de los cuales 594 hablan lengua indígena. Dentro de la riqueza y conocimientos prehispánicos que persisten en esta comunidad, se encuentra la medicina tradicional, basadas en la utilización de diversas plantas, entre ellas el *Agave mapisaga*. A partir de las pencas del agave y de manera empírica se han hecho infusiones que se administran por vía oral como tratamiento antiinflamatorio y antitumoral<sup>17,13</sup>.

## **Etnobotánica**

La etnobotánica es una disciplina interpretativa y asociativa que investiga utiliza y explica los sucesos de las interrelaciones entre las sociedades humanas y las plantas en vista de comprender y de explicar el nacimiento y el progreso de las civilizaciones desde el uso inicial de los vegetales hasta las más profundas transformaciones y utilidades de estos en las sociedades primitivas o evolucionadas<sup>19</sup>. También se ha definido de manera complementaria que la etnobotánica es el estudio de las mutuas relaciones entre el hombre y las plantas a través de las dimensiones tiempo (pasado, presente y futuro), espacio (regional, nacional, continental y mundial) y cultural. Así mismo se considera como el estudio de las diversas formas que ha utilizado el hombre para lograr el óptimo uso de los recursos naturales renovables con el fin de obtener los productos que surtan sus necesidades antropocéntricas para el beneficio del conjunto<sup>20</sup>.

De igual manera se ha señalado a la etnobotánica como una herramienta que ha servido a los países altamente desarrollados para penetrar en otras áreas para la explotación de los recursos naturales en regiones de pueblos subyugados económica, científica y tecnológicamente, los cuales conservan raíces muy acentuadas. Por lo anterior la etnobotánica posee un carácter explotativo en concordancia con las directrices imperialistas de sociedades avanzadas de aprovechar los recursos mundiales para sus propios beneficios por medio de la extracción de materias primas y la explotación de los grupos humanos de las culturas primitivas<sup>20</sup>.

## **Etnobotánica del Agave**

Se tiene evidencia de la ancestral relación coevolutiva entre las plantas del género *Agave* y el ser humano que datan de 10 000 años a. C. en Mesoamérica y Aridoamérica, acompañando el desarrollo de decenas de civilizaciones desde el norte de México con los Raramuris hasta más allá de la frontera sur con los mayas<sup>21</sup>. En estos asentamientos queda expresado el uso de estas plantas para la elaboración de papel, agujas, cuerdas, ropa, vivienda, bebida, alimento y medicina. Por lo anterior los agaves han sido considerados expresiones divinas regalos para la humanidad. Los Raramuris les llaman chahuí o tshawí refiriéndose a la primera planta creada por Dios y los Mexicas los asumen como la diosa Mayahuel representante de la casa, la comida y la fertilidad. Una nación profundamente relacionada con los agaves son los Ñañhus u Otomíes quienes en sus hábitos nómadas y en algunas ocasiones sedentarios, dependían en buena medida de los escasos recursos de las zonas semiáridas del valle del cardonal, región limítrofe entre Mesoamérica y Aridoamérica. Esta civilización subyugada al imperio Mexica en “la triple alianza” tenía dentro de sus deberes como nación conquistada la entrega de tejidos, cuerdas y 400 cantaros de aguamiel espesa, lo anterior producto de los agaves, por ello su conocimiento de la planta y relación a mayor profundidad<sup>22</sup>.

Se tienen observaciones de su efecto medicinal en descripciones del misionero jesuita austriaco Pferfferkorn, quien observó su uso por grupos Raramuris y describe el jugo de las pencas como un tratamiento infalible contra el escorbuto y un remedio eficaz ante trastornos gástricos y entéricos<sup>23</sup>. La aplicación de las pencas asadas como un remedio eficaz para los dolores articulares, musculares y productos de golpes<sup>20</sup>. Se describen actividades medicinales del aguamiel como diurético, como eliminador de urolitos e infecciones en vías urinarias.

## **Medicina tradicional y Fitomedicina**

La medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales.

La medicina tradicional se utiliza ampliamente en todo el mundo, contribuye a asegurar el acceso de todas las personas a la atención de salud y para miles de millones de personas representa la principal fuente de atención sanitaria, en muchos casos, la única. Ésta forma de atención está próxima a los hogares, es accesible, asequible y a menudo es parte de un sistema más amplio de creencias siendo considerada una parte integral de la vida diaria y del bienestar<sup>24</sup>.

La asequibilidad de la mayor parte de las medicinas tradicionales las hace más atractivas en el contexto del vertiginoso encarecimiento de la atención de salud y de la austeridad casi universal. La medicina tradicional se destaca también como un medio para afrontar el incesante aumento de las enfermedades crónicas degenerativas y es indudable que el interés por ellas ha aumentado, y seguramente seguirá aumentando en todo el mundo<sup>25</sup>.

A medida que la medicina tradicional se vuelve más popular, es importante equilibrar la necesidad de proteger los derechos de propiedad colectiva intelectual de los pueblos indígenas y las comunidades locales, así como sus tradiciones de cuidados de salud y al mismo tiempo promover la investigación y el desarrollo fundamentado en las necesidades verdaderas y la innovación.

A fin de mejorar la seguridad y la práctica calificada de la medicina tradicional, los Estados Miembros de la Organización Mundial de la Salud han elaborado reglamentos relativos a calidad, cantidad, acreditación y estructuras de formación de profesionales en el área en particular los profesionales de medicina convencional que utilizan la medicina tradicional. Bajo este esquema se ha creado licenciaturas, maestrías y doctorados: sin embargo aún ocupan un lugar marginal entre las formaciones del área médica<sup>24</sup>.

La fitomedicina es la rama de la ciencia médica que estudia el uso de las plantas y sus productos con la finalidad de prevenir y atender enfermedades. Se estima que en México alrededor del 90% de los habitantes emplean las plantas medicinales para atender problemas de salud<sup>26</sup>

#### *Medicamentos herbarios o herbolarios*

El concepto de medicamentos herbarios abarca hierbas, material herbario, preparaciones herbarias y productos herbarios acabados, que contienen como principios activos partes de plantas, u otros materiales vegetales, o combinaciones de esos elementos.

- **Hierbas:** comprenden materiales vegetales brutos, tales como hojas, flores, frutos, semillas, tallos, madera, corteza, raíces, rizomas y otras partes de plantas, enteros, fragmentados o pulverizados.
- **Materiales herbarios:** comprenden, además de hierbas, jugos frescos, gomas, aceites fijos, aceites esenciales, resinas y polvos secos de hierbas. En algunos países esos productos se pueden elaborar mediante diversos procedimientos locales, como el tratamiento con vapor, el tostado o el rehogado con miel, bebidas alcohólicas u otros materiales.
- **Preparaciones herbarias:** son la base de los productos herbarios acabados y pueden componerse de materiales herbarios triturados o pulverizados, o extractos, tinturas y aceites grasos de materiales herbarios. Se producen por extracción, fraccionamiento, purificación, concentración y otros procesos biológicos o físicos. También comprenden preparaciones obtenidas macerando o calentando materiales herbarios en bebidas alcohólicas o miel o en otros materiales.



- **Productos herbarios acabados:** se componen de preparaciones herbarias hechas a partir de una o más hierbas. Si se utiliza más de una hierba, se puede utilizar también la expresión «mezcla de productos herbarios». Los productos herbarios acabados y las mezclas de productos herbarios pueden contener excipientes, además de los principios activos. Sin embargo, no se consideran herbarios los productos acabados o en forma de mezcla a los que se hayan añadido sustancias activas químicamente definidas, incluidos compuestos sintéticos o constituyentes aislados de materiales herbarios<sup>25</sup>.

### **Familia Agavaceae**

La familia *Agavaceae* se distribuye desde el norte de México hasta Bolivia, teniendo su mayor concentración y diversidad en México. La familia *Agavaceae* es un grupo de angiospermas monocotiledóneas en forma de roseta, hojas acomodadas en espiral, sin rafidios, inflorescencias terminales y flores bisexuadas trilobuladas con 6 estambres, semillas negras por fitomelano y cariotipo  $x = 30$ <sup>27</sup>. Los agaves poseen características biológicas únicas, como una alta tolerancia al estrés biótico y abiótico que les permite crecer bajo condiciones ambientales extremas, entre las que se incluyen sus adaptaciones morfo-fisiológicas y el metabolismo ácido de las crasuláceas, así como un metabolismo secundario que los lleva a la producción de moléculas de interés biotecnológico<sup>28</sup>.

#### *Agave mapisaga*

La clasificación taxonómica del *Agave mapisaga* es:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Liliales

Orden: Asparagales

Familia: Agavaceae

Género: *Agave*

Especie: *mapisaga*, var Trel.

Es una rosetófila con inflorescencia de cinco metros de altura y 18 ramas; la hoja más larga mide 60 cm de largo con ramificación cuaternaria, posee frutos maduros verdes y es una planta cultivada. Su nombre común es: "Penca larga", "Maguey Blanco", "Maguey Bueno" y sus usos son: extracción de aguamiel y obtención de fibras de ixtle. Los médicos tradicionales refieren su uso medicinal antiinflamatorio, en lesiones musculares, articulares y heridas. Se ha descrito por parte de los médicos tradicionales la administración de infusiones del *A. mapisaga* ante la presencia de tumefacciones crónicas observando una disminución en su tamaño<sup>27</sup>.

El *Agave mapisaga* es una especie poco frecuente en las regiones de cultivo de agaváceas, desde hace miles de años se utiliza como fuente de fibras textiles (ixtle), alimenticias (aguamiel) y medicinal por naciones prehispánicas de la zona del altiplano principalmente la Ñañhú mal llamada Otomí. La disminución en su cultivo desde los años veintes obedece a la caída del consumo de pulque producto del desprestigio y la campaña sucia empleada por la industria cervecera, ya que hasta los primeros años del siglo XX era consumido por cerca del 94% de la población mexicana<sup>18</sup>. A partir de este punto inició el declive en el consumo y con ello en la siembra. Esta disminución de cultivo fue más marcada en el *Agave mapisaga*, dado que su periodo de crecimiento previo al consumo para la producción de ixtle y aguamiel es más largo que el de otras especies utilizadas como el *Agave salmiana*, siendo de entre 9 y 11 años para el *A. mapisaga* y entre 5 y 8 años para el *A. salmiana*. Únicamente se conservó el proceso de producción por aquellos grupos que tienen conocimiento de su importante valor medicinal como es el caso de la comunidad de San Andrés Daboxtha<sup>18</sup>.

#### *Fitomedicina de los agaves*

Estudios en la actividad biológica de compuestos en varias especies de agave como *A. macroacantha*, *A. americana*, *A. barbadensis* y *A. utahensis* revelaron la presencia de saponinas esteroidales con actividad citotóxica<sup>29</sup>, capaces de estimular la producción de óxido nítrico (NO) y otras especies reactivas de oxígeno (ROS)<sup>30</sup>, así como la liberación de Ca<sup>++</sup> en células humanas de cáncer de colon (HCT-116, LoVo, CaCo-2, SW620 y LS), y de cáncer de mama<sup>31,32</sup>. También existen estudios que demostraron que los extractos del agave poseen actividad antimicótica<sup>33</sup>, antiinflamatoria y analgésica en modelos murinos, a través de la disminución en la expresión de las enzimas ciclooxigenasa 1 y 2<sup>34</sup>. Sin embargo, no se cuenta con datos recientes que aporten información de su efecto sobre la actividad del sistema inmune<sup>35</sup>.

#### **Saponinas esteroidales**

Son glucósidos esteroidales comunes en un gran número de plantas y sus productos. Su estructura consiste en una aglicona no polar llamada sapogenina (triterpénicas o estereoidales) unida a uno o más restos de azúcares que forman una, dos o tres cadenas laterales<sup>30</sup>.

Son producidos por muchas plantas de múltiples familias con la finalidad de defensa, especialmente contra infecciones micóticas y bacterianas<sup>36</sup>. Alcanzan su máxima concentración en las hojas durante la etapa vegetativa y se llega a observar una disminución de hasta el 66% cuando llegan a la etapa reproductiva<sup>37</sup>.

Estos compuestos estructuralmente diversos han demostrado actividad para matar protozoarios, hongos y virus<sup>33,38</sup>. Se les ha encontrado múltiples efectos biológicos en sistemas animales como permeabilización de las membranas, inmunoestimulación, hipocolesterolémicos, hipoglucemiantes así como importantes propiedades anticarcinogénicas<sup>30,27,28,33</sup>.

## **Cáncer**

La palabra cáncer se utiliza para denominar a las neoplasias malignas. Esta entidad patológica, involucra diferentes alteraciones heredables a nivel celular como: mutaciones genéticas y cambios epigenéticos en protooncogenes, genes supresores de tumor, genes de reparación celular y microRNAs, que resultan en la destrucción de la sociedad celular a partir de la generación de características ventajosas, que le dan la capacidad de ser independiente, evadir la respuesta inmune y hacer metástasis. Estos eventos son causados por exposición a mutágenos endógenos y ambientales físicos, químicos y biológicos<sup>39</sup>.

Recientemente se han investigado a mayor profundidad las modificaciones y conductas que adquieren las células alteradas para el desarrollo de las neoplasias, a partir de ello se han descrito ocho capacidades adquiridas que permiten que suceda el cáncer: el mantenimiento de la señal proliferativa, la evasión de los supresores del crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la activación de la inmortalidad replicativa, la inducción de angiogénesis, la activación de la invasión y metástasis, así como la reprogramación en el metabolismo energético y la evasión de la destrucción por el sistema inmune. Para la obtención de éstas características la célula neoplásica establece una compleja red de comunicación, señalización y síntesis de moléculas con el entorno celular lo cual permite la formación del “microambiente tumoral”<sup>40</sup>.

Por los descubrimientos anteriores sabemos que el cáncer es más que una simple masa tisular o la desorganización genética de una célula con consecuencias sobreproliferativas; día con día se vuelven visibles nuevas y complejas redes que relacionan múltiples rutas metabólicas a nivel celular, tisular y orgánico. En lo anterior participan células neoplásicas, células “sanas” del estroma tumoral así como células del sistema inmunológico. Para entender y explicar el microambiente tumoral deben tenerse en cuenta las complejas “piezas del rompecabezas” que existen y la que se piensa construir.

## *Epidemiología del cáncer*

El cáncer es uno de los problemas de salud pública más relevantes que se afrontará en el presente siglo y una línea de investigación prioritaria en el mundo. En los últimos años se han hecho evidentes las alteraciones genético-moleculares en múltiples neoplasias, permitiendo ahora encontrar nuevas alternativas para el diagnóstico temprano, la predicción de la conducta biológica de ciertos tipos de cáncer y el tratamiento de algunos otros.

A nivel mundial, el cáncer es un problema prioritario, en el año 2002 se cuantificaron 6.7 millones de muertes, en el año 2008 7.6 millones y en 2012 causó 8,2 millones de defunciones<sup>41</sup>. Lo anterior permite visibilizar un incremento en la tasa de mortalidad por esta enfermedad, se prevé que la incidencia de cáncer puede aumentar en un 70% los siguientes 20 años. El tipo de cáncer más frecuente es el de pulmón, con una incidencia del 16.7 % del total de casos de cáncer en hombres y 9.2% en mujeres y una mortalidad del 19.4% del total de los casos (1.59 millones de muertes al año). El de mama es la segunda causa de cáncer a nivel mundial, con una incidencia del 25% del total de casos en mujeres y un 14.3% de mortalidad (522,000 muertes)<sup>41</sup>.

### *Cáncer en México*

Durante el 2012 en nuestro país se tiene reportada una incidencia de 161,164 casos nuevos de cáncer: 65, 540 en hombres y 82,445 en mujeres, una mortalidad de 78,719, de los cuales 38,666 corresponden a defunciones de hombres y 40,053 a mujeres. En México se tiene el estimado de que el 13.4% de los habitantes tendrán cáncer antes de los 75 años.

Los tres tipos de cáncer con mayor incidencia en hombres son el de próstata con 14,016 casos, pulmón con 5,471 casos y el colorectal con 4,656 casos. Y los que contribuyen mayormente a la mortalidad por cáncer son el de próstata con 6 367 defunciones, el de pulmón con 4,945 defunciones y el de estómago con 3,368 defunciones.

En la mujeres mexicanas durante el 2012 los tres tipos de cáncer con mayor incidencia fueron el de mama con 20,444 casos, el cérvico-uterino con 13,960 casos y el colorectal con 3,995 casos. Los de mayor mortalidad son el de mama con 5,680 defunciones, el cérvico-uterino con 4,769 y el de hígado con 3,149 defunciones<sup>41</sup>.

Es importante señalar que México aparece a nivel mundial como uno de los países con menor incidencia-mortalidad de cáncer. Sin embargo, no se cuenta con cifras oficiales actuales dado que los sistemas de información nacionales referentes a esta patología dejaron de operar en el 2006, con lo que fue el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas, un esfuerzo de registro hospitalario que tenía la intención de evolucionar hacia un registro con base poblacional mediante el cual fuera posible conocer la magnitud real de la enfermedad; compromiso aún pendiente<sup>42</sup>.

### *Epidemiología del cáncer de próstata*

A nivel mundial el cáncer de próstata es el cuarto más diagnosticado en el mundo, la sexta causa de muerte y el 14% (903,500) del total de nuevos casos en 2012. En los últimos 5 años la incidencia de casos ha aumentado significativamente en países desarrollados. En México, el cáncer de próstata ocupa el primer lugar en incidencia (21.4% de los casos) y mortalidad (16.5% de los decesos) en los hombres<sup>41</sup>.

De 1990 al 2008 se observa una tendencia a la alta con tasas que van de 14.6 a 19.5 por 100,000 habitantes, lo que representa un incremento del 33.5%<sup>41</sup>.

Dentro de las causas genéticas involucradas en la generación del cáncer de próstata se han encontrado los genes BRCA1 y 2; estos codifican para proteínas de reparación del DNA, por lo que su alteración puede traer consigo modificaciones genéticas que llevan al cáncer<sup>43,44</sup>. El gen que codifica para el receptor de andrógenos (AR, por sus siglas en inglés) y para la ciclina D1b<sup>45</sup>. Así como cambios epigenéticos como la modificación de la histona H2A.Z<sup>46</sup>.

### *Cáncer de próstata*

Esta entidad patológica es una neoplasia proveniente de las células epiteliales de la próstata. En una próstata sana el crecimiento y la supervivencia celular depende del estímulo constante de andrógenos, por ello cuando las células se vuelven neoplásicas uno de los primeros tratamientos es la eliminación del estímulo androgénico para con ello disminuir la señal proliferativa. Sin embargo, la eliminación del estímulo androgénico no es suficiente para detener el desarrollo tumoral cuando se trata de cáncer de próstata metastático, lo anterior debido a que en el proceso de proliferación neoplásica se generan múltiples linajes celulares genéticamente distintos y con variaciones en los protooncogenes y genes supresores de tumor, sobreexpresados y subexpresados respectivamente. Lo anterior, da origen a clonas celulares independientes del estímulo androgénico, a este cáncer se le define clínicamente como refractario a las hormonas y sin respuesta<sup>47,48</sup>.

### *Células PEC-Src*

Las células epiteliales de próstata (PEC por sus siglas en inglés) son células transformadas con el oncogen v-Src, obteniendo las denominadas PEC-Src. Éstas fueron transducidas con un vector lentiviral que contiene los genes de luciferasa 2 (luc2) y los genes de la proteína roja fluorescente (Tomato Red) con lo cual la línea PEC-Src son células bioluminiscentes (ante la presencia de luciferina) y fluorescentes al recibir una longitud de onda de 557 nm<sup>49</sup>.

Las células PEC-Src provienen del epitelio prostático de ratones de la cepa FVB (haplotipo Q), por lo cual pueden ser isotransplantadas en ratones de la misma cepa, éste modelo permite evaluar un

proceso neoplásico en animales inmunocompetentes y con ello conocer mecanismos de participación del sistema inmune durante la patología.

En diversos estudios se ha observado que la inoculación subcutánea de un millón de células PEC- Src posee la capacidad de generar tumores subcutáneos y realizar metástasis hacia los pulmones a los 30 días de progresión del tumor<sup>50,49</sup>.

### **Modelo de isotransplatación**

El modelo de isotransplatación es una prueba que permite evaluar el efecto de un tratamiento antineoplásico en un animal inmunocompetente y clínicamente sano, al cual se le implantan células que darán origen a un proceso carcinogénico. Para llevar a cabo el procedimiento, se implantan células transformadas con capacidad carcinogénica o bien provenientes de algún tumor, en un animal que posea el mismo haplotipo que las células a implantar, la similitud en el haplotipo evita que las células sean rechazadas (y con ello el tumor) por el individuo receptor. De manera habitual se implanta un mínimo de  $1 \times 10^6$  células y las vías empleadas son la subcutánea, la intraperitoneal y la intracardiaca. La aparición del proceso neoplásico depende de la vía y el tipo celular. Se reportan tumores subcutáneos perceptibles al tacto a los 3 días postimplantación<sup>49,50</sup>.

### **Respuesta inmune al cáncer**

Durante la mayoría del siglo XX se pensó que los procesos neoplásicos eran únicamente el resultado de alteraciones genéticas en las células de origen, sin embargo ha sido en la últimas dos décadas que se ha construido una estructura de conocimientos para la comprensión de los mecanismos que regulan el desarrollo, la progresión y la metástasis de los tumores. Con ello se ha clarificado ampliamente la complejidad de las anormalidades moleculares y celulares en el microambiente tumoral. Dentro de éste, se da una relación molecular entre células neoplásicas, células del estroma tisular y células del sistema inmune. En múltiples estudios se señala a las células del sistema inmune en una respuesta anómala como elementos que promueven el crecimiento tumoral a través la actividad de citocinas proinflamatorias. Sin embargo, en una respuesta efectiva permiten la resolución de procesos neoplásicos dependiendo del tipo de cáncer y el momento en el que se encuentre<sup>51</sup>.

Las células del sistema inmune significan posiblemente el elemento más crítico del microambiente tumoral, pues su participación y presencia está relacionada con la progresión del tumor, la angiogénesis, la señal proliferativa, así como la invasión y metástasis.

### *Macrófagos*

Los macrófagos son células de origen mieloide distribuidas en casi todos los tejidos del organismo, éstos poseen capacidad fagocítica, son células presentadoras de antígenos e importantes productores de citocinas. Se han descrito una gran variedad de subtipos según el sitio donde se encuentren y la función que desempeñen<sup>52</sup>. Por lo que son considerados como las células posiblemente más plásticas del organismo, contribuyen en la organogénesis, la homeostasis de los tejidos y regulan el equilibrio entre las respuestas pro y antiinflamatorias. Para llevar a cabo lo anterior, los macrófagos son ampliamente heterogéneos y son capaces de adoptar diferentes estados de activación como respuesta a las circunstancias del microambiente en el que se encuentren<sup>53</sup>.

### *Macrófagos en los procesos neoplásicos*

La evidencia acumulada demuestra que los macrófagos contribuyen en todas las fases del proceso del cáncer. Estas células son elementos fundamentales en la carcinogénesis asociada a la inflamación, participan en la inmunovigilancia de los tumores y están relacionados con el fenómeno de la invasión y metástasis. Dentro de los tumores se les ha nombrado “macrófagos asociados a tumores” (TAMs por sus siglas en inglés). Debido a la relevancia que tienen en el mantenimiento de los procesos neoplásicos se han vuelto objetivo de nuevas terapias en la búsqueda de modificar el micro ambiente tumoral y con ello detener el desarrollo tumoral<sup>53</sup>.

Los macrófagos tienen una participación clave en la biología del desarrollo de tumores debido a la contribución que hacen a la red de señales dentro del microambiente que les rodea. El complejo microambiente es producto de la secreción de citocinas, alarminas, metabolitos y hormonas entre otras moléculas de señalización. Éstas provienen de células neoplásicas, células del estroma tumoral y células del sistema inmune. Dependiendo de la combinación anterior los macrófagos son conducidos a múltiples fases y fenotipos. De éstos se han caracterizado dos poblaciones: los clásicos inflamatorios M1, que se forman al ser estimulados a través de TLRs y producen citocinas como IL-1, IL6, TNF $\alpha$ , IL-12, así como cantidades altas de óxido nítrico y los macrófagos M2 los cuales se forman al ser estimulados por IL-4 e IL-13 y producen IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ). Estas poblaciones de macrófagos generan un microambiente dinámico que puede ser de utilidad para algunos tipos de cáncer en diferentes etapas del desarrollo de la patología. Al inicio de la proliferación celular en el cáncer, las citocinas del M1 favorecen la vascularización y el crecimiento de los tumores, al momento de hacer metástasis (si es el caso) se requiere de una supresión inmune, por lo que el fenotipo conveniente para el tumor es el M2. El

cambio entre estos fenotipos puede estar influenciado por citocinas producto de las células neoplásicas<sup>52,54</sup>.

#### *Oxido nítrico*

El óxido nítrico (NO por su nomenclatura química) es una especie reactiva de oxígeno que participa en funciones en el organismo como la vasodilatación<sup>55</sup>, agregación plaquetaria, neurotransmisión y en rutas oxidativas de células fagocíticas como los macrófagos necesarias para la fagocitosis y la actividad citotóxica<sup>56</sup>. Esta molécula se sintetiza a partir de la arginina por la enzima óxido nítrico sintasa (NOSs, por sus siglas en inglés), hasta el momento se han descrito tres distintas: NOS1, NOS2 y NOS3. La NOS1 se le conoce también como nNOS, la “n” hace referencia a que es producida por neuronas. La NOS3 se le conoce con el nombre de eNOS, la “e” significa que es producida principalmente por las células del endotelio vascular. Por último NOS2 es conocida como iNOS, siendo la “i” de inducible, ésta es la responsable de la respuesta ante la infección y la inflamación<sup>56</sup>. Se ha observado que el proceso neoplásico involucra eventos tanto inflamatorios como inmunosupresores y con ello existe una relación entre el NO y la respuesta inmune al cáncer<sup>40</sup>.

#### *El óxido nítrico, proliferación y cáncer*

El óxido nítrico se ha asociado con lesiones en el DNA y en la regulación de angiogénesis del crecimiento celular tumoral e invasión. Se ha encontrado un incremento en la iNOS en distintos tipos de cáncer y se sabe que modula diferentes eventos relacionados con el cáncer. La expresión de NOS varía entre distintos tejidos y tipos de cáncer. En presencia de donadores de NO (nitroglicerina, dinitrato de isosorbida y nitroprusiato de sodio) disminuye HIF-1 $\alpha$  y la angiogénesis. También se ha observado que el NO tiene un efecto antineoplásico a través de la estimulación en la formación del receptor Fas, el cuál al recibir el estímulo de su ligando (FasL) desencadena la apoptosis mediada por caspasa 8 y caspasa 3. La presencia de NO también estimula la síntesis de P53 que es una proteína supresora de la proliferación celular a diferentes niveles<sup>57,58</sup>. Con la información anterior se sabe que la presencia del NO tiene efectos antineoplásicos a varios niveles y en diferentes tejidos. Se ha encontrado que la presencia del NO estimula parthanatos en las células neoplásicas, ésta es una forma de muerte celular dependiente de la acumulación de PAR producto de la sobreexpresión de PARP (Poli ADP Ribosa Polimersa) y la traslocación de del factor inductor de apoptosis (AIF), lo anterior ocasiona la fragmentación del DNA independiente de caspasas<sup>59</sup>.



## Farmacología del cáncer

### Quimioterapia

Actualmente la quimioterapia es uno de los métodos más comunes para la eliminación de las células neoplásicas. El objetivo de la quimioterapia es la prevención de la proliferación, protección contra la metástasis y finalmente la eliminación tumoral<sup>60</sup>. A lo largo de la historia se han descubierto y sintetizado distintos compuestos altamente tóxicos que incluyen derivados de armas químicas como el gas mostaza en los años 40's<sup>61</sup>, posteriormente se sintetizaron compuestos que afectan a las síntesis de ácidos nucleicos durante la replicación celular como el 5-fluorouracilo, más adelante se desarrollaron otros inhibidores de la mitosis de la familia de los alcaloides como la vincristina, vinblastina y la procarbazona. En 1967 un nuevo compuesto, el paclitaxel mostró tener un extraordinario horizonte en su actividad antineoplásica, este tratamiento no actúa directamente en la síntesis de ácidos nucleicos pero interfiere en la mitosis a través de la alteración en la estabilidad de los microtúbulos al momento de la formación del huso mitótico y la división celular. El paclitaxel fue la primera droga de la familia de los taxanos, al final de los años 60's se inició con tratamientos mixtos de quimioterapéuticos, dentro de éstos se encuentran combinaciones altamente efectivas como la mezcla de vincristina, metotrexato, 6-mercaptopurina y prednisona (VAMP). Otra mezcla comúnmente utilizada es la de melphalan, metotrexato, vincristina y prednisona (MOMP). O bien MOPP en la cual el metotrexato es sustituido por procarbazona<sup>62</sup>.

El cisplatino o *cis*-diaminocloroplatino(II) (CDDP(II)) es un complejo de platino con estructura plana que consiste en dos átomos de cloruro saliente en la posición *cis* alrededor de un átomo de platino. La estereo química de este compuesto es crítica para sus efectos terapéuticos ya que el isómero *trans* no es citotóxico. El CDDP(II) es un agente citotóxico alquilante bifuncional que forma enlaces intra e intercatenarios en el ADN y ARN, con ello inhibe la actividad de las ADN y ARN polimerasas así como de la translocación del ARN. La citotoxicidad se incrementa con la exposición durante la fase S del ciclo celular, provoca la detención de del ciclo celular en G2 e induce la muerte celular por apoptosis<sup>63</sup>.

Los fármacos quimioterapéuticos tienen como objetivo afectar la proliferación de las células neoplásicas y estimular su muerte. Sin embargo, no son capaces de discriminar células sanas de enfermas, por lo que producen importantes efectos secundarios como anemia, pérdida del apetito, trombocitopenia, diarrea, edema, fatiga, alopecia, infecciones, náusea, vómito, dolor, disfunción sexual y de fertilidad, problemas para dormir, ansiedad y problemas de olfato y percepción del sabor<sup>62,64,65</sup>. Por lo anterior, es fundamental para la ciencia médica la búsqueda de nuevos tratamientos alternativos o complementarios que no produzcan o disminuyan los graves efectos secundarios que implican la mayoría de los tratamientos para el cáncer<sup>66</sup>.

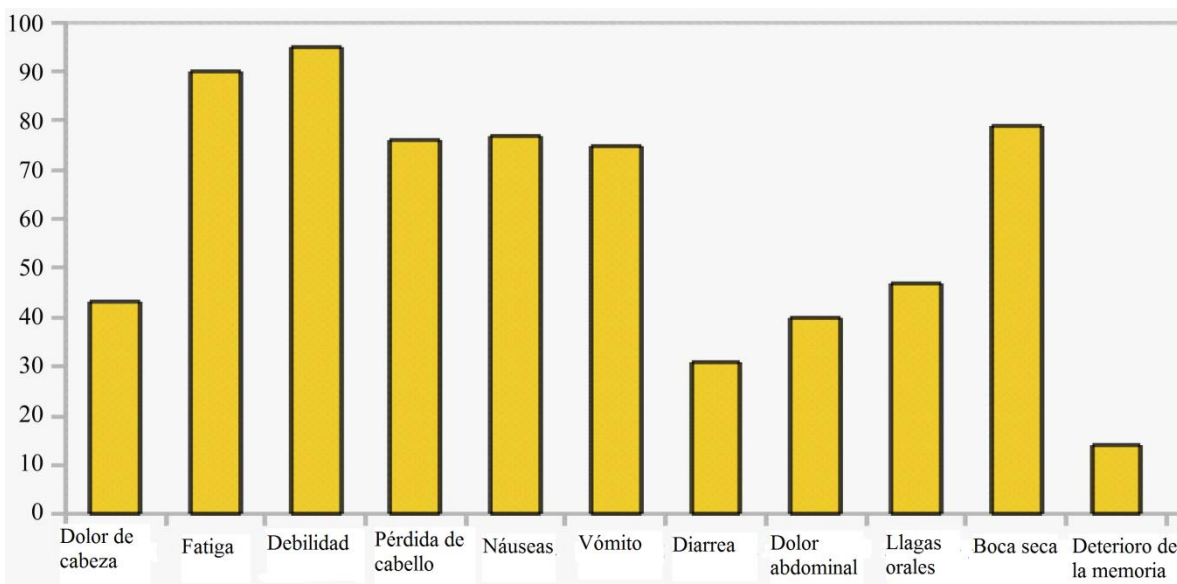


Figura 1. Gráfica que muestra la prevalencia de distintos efectos secundarios de tratamientos quimioterapéuticos en pacientes de cáncer con múltiples carcinomas. Tomado y modificado de (Aslam 2014)<sup>67</sup>.

#### Origen vegetal de los quimioterapéuticos

Es importante señalar que alrededor del 75% de los medicamentos utilizados para tratar cáncer y algunas enfermedades infecciosas provienen de productos naturales. Entre los años 2007 y 2008 salieron al mercado 55 nuevos medicamentos derivados de productos naturales, de los cuales, 16 fueron aislados de fuentes naturales y 39 derivados de estructuras químicas obtenidas de ellas<sup>68, 69</sup>.

No olvidemos que múltiples tratamientos antineoplásicos empleados actualmente, tienen su origen en compuestos aislados de plantas como es el ejemplo de los alcaloides de *Vinca rosea* o *cantharanthus roseus*, planta comúnmente ornamental de la que se extrajo inicialmente la vincristina, la vinblastina, vindesina, vinorelbina, vinflunina, y la procarbazona<sup>70</sup>; La camptotecina derivada de la corteza del árbol *Camptotheca acuminata*<sup>71</sup>; La homoharringtonina aislada del árbol de hoja perenne *Cephalotaxus harringtonia* K. Koch var. *Harringtonia*; Dentro de los compuestos de tipo lignano se encuentran el ácido nordihidroguayaretico aislado de la especie *Larrea tridentata* y la podofilotoxina aislada de especies vegetales del género *Podophyllum*, principalmente *Podophyllum peltatum* y *Podophyllum notatum*, a partir de la cual se obtuvieron los derivados etopósido y tenipósido, utilizados para el tratamiento de diferentes tipos de linfomas y leucemias<sup>72</sup>. También se han reportado estilbenos como las combrestatinas, aisladas de la especie vegetal *Combretum caffrum* donde a partir de la combrestatina A se obtuvo el análogo combrestatina A4-fosfato que es soluble en agua y que mostró tener actividad promisorio contra el cáncer de tiroides en los ensayos clínicos preliminares<sup>72</sup>; por último los taxanos donde se

encuentran el paclitaxel, el docetaxel y el ortataxel provienen de la especie vegetal *Taxus brevifolia*<sup>73</sup>.

### **Tratamientos alternativos para el cáncer**

Es un tema complejo y polémico, del cual se pudiera escribir, cuestionar, aceptar o negar de acuerdo con los diferentes enfoques con que se analice. Lo cierto es que hay un hecho irrefutable que es la creciente demanda de estos tratamientos en los pacientes cancerosos, y esto obliga a las ciencias médicas a estudiar y conocer sobre estas modalidades terapéuticas que pueden alternar y/o complementar los tratamientos oncoespecíficos ya conocidos<sup>74</sup>.

En este momento muchos profesionales no aceptan la utilización de tratamientos no validados totalmente por el sistema médico occidental, lo cual constituye un error al poder estar omitiendo o negando una serie de compuestos con capacidad antineoplásica, por lo que es necesario conocer y profundizar en todo aquello que pueda beneficiar a las personas enfermas, tener elementos para dar respuestas bien documentadas que garanticen una la construcción de herramientas útiles sin caer en la formulación de expectativas no alcanzables. Corrientes médicas plantean la jerarquización de los recursos terapéuticos, utilizándolos de menos a más agresivos, sin desestimar ninguna opción de tratamiento si está científicamente probado, con lo cual se puede ayudar a mejorar o restablecer la salud<sup>75</sup>. No se trata de dejar a un lado los tratamientos convencionales, se trata de incrementar nuestro arsenal terapéutico y las posibilidades en prevención de la patología oncológica<sup>74</sup>.

El uso de terapias herbales complementaras aunadas a la quimioterapia han mostrado disminuir el detrimento de la salud ocasionado por las segundas; sin embargo deben ser empleadas con cuidado y bajo reserva de evidencias científicas de inocuidad y eficacia. Existen múltiples extractos crudos de plantas considerados como tratamientos alternativos que se han empleado como complemento a la radioterapia o bien como tratamientos antineoplásicos de actividad probada. Lo anterior se observa en casos como el del extracto del hongo *Ganoderma lucidum*, de las hojas de *Houttuynia cordata* Thunb y raíces de *Boesenbergia Pandurata* para el cáncer cérvico-uterino con resultados favorables al disminuir la recurrencia pélvica y los focos de metástasis distantes, así como las afecciones nefríticas y cistíticas asociadas a la radiación<sup>76</sup>; otros son los extractos de *Embelia ribes* empleados en la medicina tradicional china han y que mostrado actividad importante en cáncer de próstata y mama<sup>77</sup>. Los extractos crudos de *Chelidonium majus* una planta empleada en la medicina alternativa, ha mostrado recientemente actividad citotóxica en células de cáncer humano A549, H460, HCT 116, SW480, MDA-MB 231 and MCF-7<sup>78</sup>.

Queda claro que los conocimientos producto de las medicinas alternativas pueden significar herramientas terapéuticas por sí solas o complementarias a los tratamientos existentes contra el cáncer, estos conocimientos han provenidos en muchos casos de la observación de cientos o miles de años por parte de los médicos de distintas civilizaciones y grupos humanos que aún en la época actual persisten<sup>20,79</sup>.

## **Etnofarmacología y nuevos tratamientos**

La relación de los seres humanos con las plantas es en buena medida la historia de la humanidad; es de esta relación que nuestra especie ha podido sobrevivir y adaptarse a técnicamente todos los ecosistemas del planeta. Desde la aparición del ser humano sobre la tierra se inició el proceso de co-evolución que la interacción de las especies permite. De ellas hemos obtenido alimento, vestido, vivienda y medicina.

La etnofarmacología es un concepto reciente, surgido en la década de los 60's en el ámbito de los agentes psicoactivos, definiéndose como "la exploración interdisciplinaria de los agentes biológicamente activos tradicionalmente empleados por el hombre". Recibe la característica de interdisciplinariedad dado que abarca las observaciones en campo, la descripción del uso y preparación de remedios, la determinación botánica del material obtenido, los estudios fitoquímicos importantes para describir y aislar los compuestos, los estudios farmacológicos y la integración de elementos socioculturales, costumbres y tradiciones que constituyen el folklore de un pueblo o nación<sup>79</sup>.

Los conocimientos referentes a las propiedades medicinales de las plantas se han transmitido de generación en generación y se ha acumulado hasta nuestros tiempos. Desafortunadamente debido a la imposición del modelo occidental de la medicina, la pérdida de relatos y documentos prehispánicos y la discriminación de los conocimientos tradicionales, han dado a la medicina tradicional un lugar secundario y de eficacia cuestionable. Por lo anterior, aunado a la devastación de múltiples ecosistemas, se han perdido muchos de estos conocimientos e inclusive se han extinguido de innumerables especies vegetales.

A pesar de las dificultades y desafíos que implica la farmacología a gran escala y del modelo económico globalizado del mercado, más de un tercio de la población de los países "en vías de desarrollo" continúa con prácticas médicas tradicionales principalmente en África, Asia y América Latina<sup>24</sup>. Alrededor de 70 países tienen regulaciones con respecto al uso de las plantas medicinales, sin embargo aun existen vacíos legislativos controversiales producto de los distintos

nombres que puede llegar a recibir una misma especie, discrepancias en la taxonomía, temas de licencia, manufactura, dispensación e intercambio<sup>80</sup>.

El aumento de la incidencia, así como el número absoluto de casos de cáncer, constituyen un problema para los servicios de salud pública, en su mayoría colapsados ante la demanda creciente de los pacientes. La atención a dicho problema no depende únicamente de los esfuerzos que se realizan en el campo clínico epidemiológico para la prevención, diagnóstico precoz y tratamiento adecuado. Sino que involucra a las personas cuya función es ampliar el rango de herramientas terapéuticas<sup>74</sup>.

Es por lo anterior que la investigación científica médica en México se ha enfocado en buscar información en diversos espacios del conocimiento, entre ellos la medicina tradicional prehispánica y en particular a la herbolaria, fundamentada en la observación de muchas generaciones. La profundización de estos conocimientos en la práctica clínica puede significar un aporte relevante en los tratamientos disponibles.

#### *Validación de tratamientos y su aprobación por la Comisión Federal para la Prevención de Riesgos Sanitarios (COFEPRIS)*

La COFEPRIS es un órgano desconcentrado con autonomía administrativa, técnica y operativa, que se encarga de la regulación sanitaria, es decir llevar a cabo el conjunto de disposiciones emitidas de conformidad con los ordenamientos aplicables, tendientes a normar los procesos, productos, métodos, instalaciones, servicios o actividades relacionados con las materias de competencia de Comisión Federal. Dentro de la materia de competencia se encuentran los medicamentos, remedios herbolarios y otros insumos para la salud.

Para el registro sanitario de remedios herbolarios de fabricación nacional existen una serie de requisitos documentales (ver anexo 1), entre ellos el certificado de autenticación taxonómica por cada componente o el documento en el que conste la información sobre la identidad de los componentes, la denominación científica y popular de la(s) planta(s) empleada(s), así como las indicaciones y tiempo para su uso.

## **Justificación**

Con los hallazgos encontrados en pruebas piloto con la línea celular PEC-Src y los resultados de diferentes estudios de la literatura científica, hay elementos para pensar que el

extracto de *Agave mapisaga* puede ser un tratamiento eficaz para el cáncer de próstata, al aumentar los niveles de óxido nítrico en las células neoplásicas y estimular a poblaciones de macrófagos M1 que participan en el control del cáncer. Para ello se necesitan realizar pruebas que validen su efectividad y en caso de tenerla, puede significar otra opción en los tratamientos disponibles para el cáncer. Con lo anterior también se podría fomentar la siembra y comercialización por parte de los pobladores de la comunidad de San Andrés Daboxtha, trayendo consigo un beneficio económico directo a las familias.

## **Hipótesis**

El extracto de *Agave mapisaga* tiene actividad antineoplásica significativa en la prueba de citotoxicidad en células de cáncer de próstata murino PEC-Src, reflejada en la disminución en los conteos celulares y el incremento en la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS).

La administración del extracto de *Agave mapisaga* produce cambios en el proceso neoplásico, que son benéficos para los ratones isotransplantados con células de cáncer de próstata PEC-Src y aumenta las poblaciones del fenotipo M1 de macrófagos en el microambiente tumoral.

## **Objetivo general**

Demostrar la eficacia del extracto del *Agave mapisaga* mediante la determinación del efecto antineoplásico e inmunomodulador en la prueba de citotoxicidad y en el ensayo de isotransplantación en el modelo murino para sustentar su uso como un medicamento herbolario.

## **Objetivos particulares**

Recolección *in situ* del *Agave mapisaga* para hacer su identificación taxonómica y obtener a partir de las pencas los extractos acuosos y metanólicos, mediante la técnica de infusión, macerado y rotaevaporación para extraer y concentrar los componentes de la planta.

Determinar el efecto antineoplásico de los extractos hidrosolubles y metanólicos del *Agave mapisaga*, mediante la realización de la prueba de citotoxicidad en células de cáncer de próstata PEC-Src, para elegir cuál de los dos tiene el mejor efecto *in vitro*.

Determinar *in vitro*, la producción de NO en células de cáncer de próstata PEC-Src en presencia del extracto del *Agave mapisaga* mediante la cuantificación por el reactivo de Griess, para relacionar la actividad citotóxica con la presencia de NO.

Evaluar la actividad antineoplásica del extracto de *Agave mapisaga* en el modelo de isotransplatación, a través de la evaluación de la implantación y el crecimiento tumoral, para determinar si el extracto de *Agave mapisaga* posee un efecto antineoplásico *in vivo*.

Evaluar la actividad inmunomoduladora del extracto de *Agave mapisaga* mediante la determinación de las poblaciones de macrófagos dentro del microambiente tumoral, para determinar si el extracto de *Agave mapisaga* posee un efecto inmunomodulador dentro del microambiente tumoral *in vivo*

## **Material y métodos**

### **Pruebas *in vitro***

#### *Colección y determinación taxonómica del agave*

Para el desarrollo del proyecto fue necesaria la identificación taxonómica del maguey mexicano, a partir de la recolección *in situ*. Después de clasificar la planta se realizó la extracción acuosa y metanólica a partir de la penca, por la técnica de infusión y macerado. Una vez obtenida se procedió a concentrarla mediante la técnica de rotaevaporación.

#### *Obtención del extracto acuoso*

Se retiró la epidermis de la planta para obtener la pulpa, ésta se cortó en fragmentos de entre uno y dos cm<sup>3</sup>, posteriormente se colocó un kilogramo de pulpa en un recipiente y se le agregaron dos litros de agua en punto de ebullición. Se dejó reposar por 24 horas, después se colectó el líquido y se concentró en un roto evaporador a 70 RPM, 87 mbar y 58°C.

#### *Obtención del extracto metanólico*

Se retiró la epidermis de la planta para obtener la pulpa, ésta se cortó en fragmentos de entre uno y dos cm<sup>3</sup>, posteriormente se colocó un kilogramo de pulpa en un recipiente y se le agregaron dos litros de metanol absoluto y se dejó reposar por siete días, después se colectó el líquido y se concentró en un roto evaporador a 70 RPM, 337 mbar y 40°C.

### *Análisis preliminar de los extractos*

Se realizó espectrofotometría UV (Labomed, UVS-2700) de 200 a 300 nm con la finalidad de conocer la huella espectrofotométrica de cada uno de los extractos y poder observar cambios en los patrones de absorbancia entre ellos, bajo tres condiciones por separado: protonación (exposición a una solución de ácido clorhídrico a un pH de 2), exposición a 10 ciclos de congelación-descongelación y su permanencia en agua de bebida a temperatura ambiente durante 24 horas, para saber si estas condiciones producen cambios en su estructura general.

Se realizó una cromatografía líquida de alta eficacia de masas (HPLC masas por sus siglas en inglés) para determinar los compuestos presentes en los extractos. Lo anterior se llevó a cabo en las instalaciones de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII), Facultad de Química, UNAM.

### *Prueba de citotoxicidad*

Las células PEC-Src fueron sembradas en una microplaca de 96 pozos de poliestireno a razón de 10 000 células por pozo. Se incubaron con 100  $\mu$ l de medio de cultivo (DMEM Gibbco<sup>®</sup>) por pozo durante 24 horas, posteriormente se retiró el medio de cultivo se sustituyó por un volumen de 90  $\mu$ l de DMEM, se agregó cada extracto de *A. mapisaga* a las concentraciones de 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 mg/pozo en un volumen de 10  $\mu$ l. Cada concentración de los extractos se colocó por cuadruplicado. Los testigos negativos recibieron 10  $\mu$ l de agua destilada y los testigos positivos recibieron CDDP(II) a las concentraciones de 0.34, 0.78, 1.56, 3.15 y 6.25  $\mu$ g/pozo en un volumen de 10  $\mu$ l. Las células se incubaron durante 24 horas. Después del periodo de incubación se retiró el sobrenadante y fueron fijadas con ácido tricloroacético al 10% por una hora a 4°C. Una vez realizado esto se hicieron cinco lavados con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente fueron teñidas con sulforrodamina B al 0.4% en ácido acético al 1% durante 30 minutos, después se realizaron 5 lavados con ácido acético al 1% en agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Para realizar la lectura se agregaron 100  $\mu$ l de tris-base 10mM (pH 10.5), se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente en agitación y se realizó la lectura por espectrofotometría a una longitud de onda de 564 nm<sup>66</sup>. Los resultados fueron analizados con los programas estadísticos IBM SPSS Statistics 20<sup>®</sup> y con el JMP 5.1<sup>®</sup>.



Agave H2O	Agave Met
CDDP(II)	Sin dato
Test H2O	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd
B	sd	2 mg/p	2 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p	0.25 mg/p	0.25 mg/p	0.125 mg/p	0.125 mg/p	sd
C	sd	2 mg/p	2 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p	0.25 mg/p	0.25 mg/p	0.125 mg/p	0.125 mg/p	sd
D	sd	25 ug/p	12.5 ug/p	6.25 ug/p	T -	T -	T -	3.15 ug/p	1.56 ug/p	0.78 ug/p	0.34 ug/p	sd
E	sd	25 ug/p	12.5 ug/p	6.25 ug/p	T -	T -	T -	3.15 ug/p	1.56 ug/p	0.78 ug/p	0.34 ug/p	sd
F	sd	2 mg/p	2 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p	0.25 mg/p	0.25 mg/p	0.125 mg/p	0.125 mg/p	sd
G	sd	2 mg/p	2 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p	0.25 mg/p	0.25 mg/p	0.125 mg/p	0.125 mg/p	sd
H	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd	sd

Figura 2. Acomodo de las concentraciones de extractos, CDDP(II) y testigos negativos en las placas para la prueba de citotoxicidad, Agave H<sub>2</sub>O: extracto acuoso de *Agave mapisaga*, Agave Met: extracto metanólico de *Agave mapisaga*, CDDP(II): cisplatino, Test H<sub>2</sub>O testigo de agua.

#### Determinación del óxido nítrico en el ensayo de citotoxicidad

Para la determinación del NO se realizaron las siguientes condiciones experimentales para la prueba de citotoxicidad en placas de 96 pozos:

20,000 y 40,000 células, expuestas a las concentraciones de 2, 1 y 0.5 mg/pozo del extracto acuoso, los sobrenadantes fueron analizados a las 4, 8, 24 y 48 horas.

	4 hrs	8 hrs	24 hrs	48 hrs	4 hrs	8 hrs	24 hrs	48 hrs	4 hrs	8 hrs	24 hrs	48 hrs
20 mil cels	2 mg/p	2 mg/p	2 mg/p	2 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p
	2 mg/p	2 mg/p	2 mg/p	2 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p
	2 mg/p	2 mg/p	2 mg/p	2 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p
	T -	T -	T -	T -	T -	T -	T -	T -	T -	T -	T -	T -
40 mil cels	T -	T -	T -	T -	T -	T -	T -	T -	T -	T -	T -	T -
	2 mg/p	2 mg/p	2 mg/p	2 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p
	2 mg/p	2 mg/p	2 mg/p	2 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p
	2 mg/p	2 mg/p	2 mg/p	2 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	1 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p	0.5 mg/p
	2 mg				1 mg				0.5 mg			

Figura 3. Acomodo de las concentraciones del extracto acuoso del *Agave mapisaga* y testigos negativos sin tratamiento, con dos concentraciones de células en las placas para la prueba de citotoxicidad y la determinación del óxido nítrico.

La determinación del NO a partir de los sobrenadantes se hicieron mediante el reactivo de Griess para la determinación del óxido nítrico en el medio de cultivo de cada uno de los pozos a través del kit Griess Reagent System® siguiendo las instrucciones del fabricante, para relacionar la actividad citotóxica con la síntesis de NO por parte de la célula neoplásica.

### Pruebas *in vivo*

La utilización de todos los animales empleados en este estudio, cuentan con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL), de la Facultad de Química, UNAM.

### Límite de prueba

A partir de los resultados en la prueba de citotoxicidad se decidió continuar únicamente con el extracto acuoso.

Cuando no se tiene información del producto de prueba respecto a la dosis a la cual se presentan signos de toxicidad es necesario realizar un perfil farmacológico que nos ayude a identificar la

dosis que cause letalidad, por lo cual se plantea la determinación de la toxicidad aguda del extracto acuoso de agave.

#### Animales empleados y condiciones de alojamiento

Para la prueba de toxicidad aguda se utilizaron seis ratones Hsd:ICR, adquiridos de Harlan Laboratories. Fueron alojados en contenedores con cama, alimento e hidrogel. Fueron alojados en jaulas de polisulfonato con las siguientes dimensiones: 27 cm de largo x 16 cm de ancho x 12 cm de alto y distribuidos en grupos de tres hembras y tres machos.

#### Procedimiento de la prueba de límite de prueba

Se llevó a cabo la sujeción del animal colocándolo en decúbito dorsal y se administró el tratamiento correspondiente a cada grupo por vía endogástrica a una dosis de 3000mg/kg en un volumen de 0.5ml. Los animales se observaron individualmente durante los primeros 30 minutos después de dosificar y periódicamente durante las primeras 24 horas (con especial atención durante las primeras 4 horas). Posteriormente diario por 7 días (protocolo con base en el Procedimiento Normalizado de Operación FC-UNAM-UNIPREC-02)

#### *Prueba de isotransplatación*

#### Animales Empleados y condiciones de alojamiento

Se utilizaron 48 ratones machos línea FVB de  $28 \pm 3$  gramos y 9-10 semanas obtenidos de Harlan Laboratories. Fueron alojados en jaulas de polisulfonato con las siguientes dimensiones: 27 cm de largo x 16 cm de ancho x 12 cm de alto y distribuidos de manera individual por caja para evitar agresiones. El tamaño de muestra fue determinado con el método de los escenarios de la prueba de Tang (curvas de potencia para la prueba de F) obteniendo una potencia de la prueba  $\pi=0.84$  ( $\beta = 0.16$ ).

## Diseño experimental

Diseño completamente aleatorio de un factor (extracto acuoso) con 2 niveles, 14 por grupo, 10 animales como testigos negativos (sin tratamiento) y 10 testigos positivos (CDDP(II)) 48 animales en total.

### Grupos del procedimiento

- 50mg/kg Qd\* 1-35. (14 ratones identificados con las letras A del 1 al 7 y B del 1 al 7 )
- 100 mg/kg Qd 1-35 (14 ratones identificados con las letras C del 1 al 7 y D del 1 al 7)
- 2 Grupos testigo:
  - Sin tratamiento (10 ratones identificados con las letras TA del 1al 5 y TB del 1 al 5)
  - CDDP(II): los días 1, 3 y 9 por vía intraperitoneal a razón de 3.5 mg/kg.(10 ratones identificados con las letras CptA del 1al 5 y CptB del 1 al 5)

\*Qd: diariamente

## Procedimiento

Se llevó a cabo la sujeción del animal colocándolo en decúbito ventral y se inocularon por vía subcutánea  $1 \times 10^6$  células neoplásicas PEC-*Src* en un volumen de 80  $\mu$ l, en la piel laxa de la región sacro-lumbar con un 20% de matrigel (BD bioscience), el día de la inoculación de las células fue considerado el día uno del experimento. La administración del tratamiento en los grupos tratados se hizo por vía oral diariamente del día 1 al 34 en el agua de bebida a una dosis de 50 mg/kg en un volumen de 4 ml. Para el grupo testigo se hará la administración de CDDP(II) los días 1, 3 y 9 por vía intraperitoneal a razón de 2.5 mg/kg

Para llevar a cabo la administración del extracto en el agua de bebida, fue necesario probar su estabilidad en el agua de bebida a través de espectrofotometría UV.

Los animales se observaron diariamente de manera individual por un total de 35 días

Al finalizar el estudio todos los ratones fueron sacrificados utilizando una cámara de bióxido de carbono, método permitido en la NOM-062-ZOO- 1999. el cual consistió en colocar en una caja con un poco de cama alrededor de 5 animales para contenerlos en la cámara de CO<sub>2</sub>, cerrarla y abrir el

tanque para dejar pasar el CO<sub>2</sub> y esperar hasta que los animales estuvieran postrados y sin movimientos.

#### Necropsias y toma de muestras

Después de la eutanasia a los ratones se les practicó la necropsia para la obtención de los tumores, así como órganos blanco de metástasis: pulmón, cerebro, riñones, bazo, huesos (miembros pélvicos).

#### VARIABLES RESPUESTA A EVALUAR

- a) **Implantación tumoral.** Se evaluó la diferencia en la implantación tumoral en relación con el tratamiento recibido, a través de la comparación del número de ratones por grupo con presencia o ausencia del tumor con referencia al grupo testigo negativo.
- b) **Tamaño tumoral.** Con un vernier se midieron los tumores los días 17, 24 y 31 del ensayo. Los tumores fueron medidos a lo largo y a lo ancho con un Vernier y la fórmula establecida para calcular el tamaño aproximado del tumor fue:

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

Usando las medias de los volúmenes de los tumores se pueden obtener los volúmenes relativos tumorales (VRT) por grupo:

$$\text{VRT} = \left( \frac{\text{media Vol. día } x}{\text{media Vol. día } 0} \right) \times 100$$

Con los datos anteriores se puede calcular la función antitumoral de un tratamiento:

$$\text{Función antitumoral} = \left( \frac{\text{VRT tratado}}{\text{VRT testigo}} \right) \times 100$$

Este índice debe ser menor a 42 para considerar que el fármaco tiene actividad antineoplásica, valor establecido por el National Cancer Institute.

- c) **Peso de los ratones.** Se llevó a cabo el pesaje de los animales los días 3, 10, 17, 24 y 35 del ensayo. Se evaluaron las diferencias de peso promedio entre los grupos de tratamiento, así como el peso promedio de los individuos que desarrollaron tumor.
- d) **Actividad anti metastásica por bioluminiscencia.** Se realizó la búsqueda *ex vivo* de células neoplásicas bioluminiscentes en diversos órganos: cerebro, pulmones, hígado,

riñones, bazo y huesos de los miembros pélvicos. Éstos fueron sumergidos en una solución de d-luciferina a una concentración de 15 mg/ml de PBS por 2 – 3 minutos y posteriormente fueron observadas con el sistema IVIS LUMINA XR<sup>®</sup> (Caliper Life Sciences) de la UDIBI del Instituto Politécnico Nacional.

- e) **Actividad anti metastásica por histopatología.** Una vez observada la bioluminiscencia de los tejidos se procedió a fijarlos en formol al 10% durante 24 horas, para su posterior inclusión en parafina. A partir de estos bloques se realizaron los cortes para teñirlos con la técnica de hematoxilina - eosina para su análisis histopatológico.
- f) **Evaluación del microambiente tumoral.** A partir de los bloques parafina de los tumores subcutáneos se realizaron cortes de tejido de 3 µm de grosor, en los cuales se evaluaron las poblaciones de macrófagos fenotipo M1(CD163+, CD206-) macrófagos fenotipo M2 (CD163+, CD206+)<sup>54</sup> presentes en el microambiente tumoral por medio de la técnica de inmunofluorescencia y el equipo Imagexpress<sup>®</sup>.

El protocolo de inmunofluorescencia fue el siguiente:

- Posterior a la realización del corte fijar el laminillas electrocargadas y dejar secar por mínimo 48 horas
- Desparafinado:
  - Xilol al 100%, 10 min en dos ocasiones
  - Etanol al 100%, 5 min en dos ocasiones
  - Etanol al 96%, 1 min en dos ocasiones
  - Etanol al 70%, 1 min en dos ocasiones
  - Etanol al 50%, 1 min en dos ocasiones
  - Agua destilada, 5 min en una ocasión
- Exposición antigénica en amortiguador de citratos (citrato de sodio 10mM, pH 6) en olla de presión 100°C, 10 min
- 3 Lavados con PBS 1X (pH 8)
- Agregar amortiguador de bloqueo e incubar 1hr a temperatura ambiente (18-23°C)
- 3 Lavados con PBS 1X (pH 8)
- Agregar el primer anticuerpo, incubar a 4 °C por 24 hrs
- 3 Lavados con PBS 1X (pH 8)
- Agregar el segundo anticuerpo, incubar a 37 °C en oscuridad por 30min
- 3 Lavados con PBS 1X (pH 8)
- Contra tinción de DAPI solución de trabajo (1ug/ml) incubar a temperatura ambiente (18-23°C) en oscuridad por 15 min

- 3 Lavados con PBS 1X (pH 8)
- Lectura con el equipo Imagexpress®

#### Anticuerpos utilizados

- Anticuerpo policlonal IgG , anti CD163 de ratón, producido en conejo. Éste reconoce la región comprendida de los aminoácidos 1026-1121 ubicados en la porción C-terminal.
- Fracción F(ab')<sub>2</sub> de IgG, anti IgG de conejo marcado con isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), producido en cabra.

## Resultados

### Resultados de las pruebas *in vitro*

#### *Colección y determinación taxonómica del agave*

Se llevó a cabo el procesamiento de las muestras de hojas e inflorescencias y la identificación del agave en las instalaciones del Herbario Nacional (MEXU) del Departamento de Botánica del Instituto de Biología UNAM, con la asesoría del doctor Abisaí Josué García Mendoza y con base en los manuales de identificación taxonómica<sup>27</sup>. Se determinó que la planta es *Agave mapisaga* Trel. Se elaboró la ficha de identificación correspondiente de acuerdo a los criterios del herbario nacional.

<p><b>HERBARIO NACIONAL DE MÉXICO (MEXU)</b></p> <p>PLANTAS DE MÉXICO.</p> <p><i>Agave mapisaga</i> Trel.</p> <p>AGAVACEAE</p> <p>HIDALGO. Loc. San Andrés Daboxtha. Mpio. Cardonal. Calle. Lázaro Cárdenas, 10 km NO de Ixmiquilpan, laderas pedregosas 20°52'41.6"N, 99°06'38.8"W. Rosetófila con infrutescencia de 5 m de altura; con 18 ramas, la hoja más larga de 60 cm de largo con ramificación cuaternaria. Con frutos maduros verdes. Planta cultivada. N. común: "Penca larga", "Magüey Blanco", "Magüey Bueno", Usos: extracción de aguamiel, obtención de fibras de ixtle, el médico tradicional refiere sus uso medicinal para lesiones musculares, articulares y heridas</p> <p>Col. Manuel Cruz, Isabel Gracia. No 1. 18 de octubre del 2013</p>
--

Cuadro 1. Ficha de identificación taxonómica del Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM

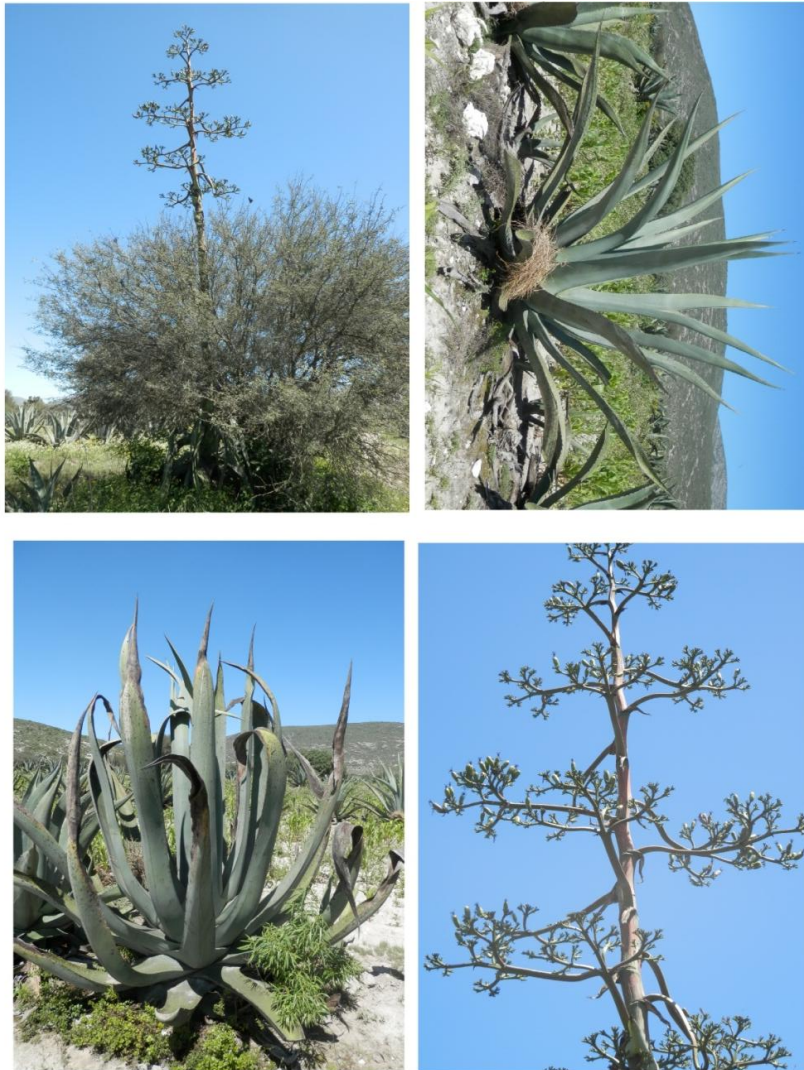


Imagen 1. Fotografía *in situ* del *Agave mapisaga* tomada en la comunidad de San Andrés Daboxtha. Se observan las pencas y la inflorescencia.

#### *Obtención del extracto acuoso*

Posterior a la rotaevaporación se obtuvieron 95 ml de concentrado de una consistencia viscosa que no fue posible liofilizar, se envasaron en alícuotas de 3 ml y se pusieron en ultracongelación a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### *Obtención del extracto metanólico*

Después de la rotaevaporación se obtuvieron 179 ml de concentrado de una consistencia viscosa que no fue posible liofilizar, se envasaron en alícuotas de 5 y 10 ml y se pusieron en ultracongelación a  $-70^{\circ}\text{C}$ .



## Análisis preliminar de los extractos

### Espectrofotometría UV

Se observó similitud entre los patrones de las curvas correspondientes al extracto acuoso y metanólico, aunque diferencias en la intensidad de la lectura en la que el extracto acuoso mostró mayor absorbancia: un primer pico de las curvas a una longitud de onda de 211 nanómetros (nm) y 1.607 densidades ópticas (DO) para el acuoso y de 210 nm y 1.066 para el metanólico, un segundo pico a los 219 nm con 1.51 DO para el acuoso, en contraste a 220 nm y 0.87 DO del metanólico, así como un tercer pico a 272 nm con 0.55 DO para el acuoso contra 272 nm y 0.35 DO del metanólico.

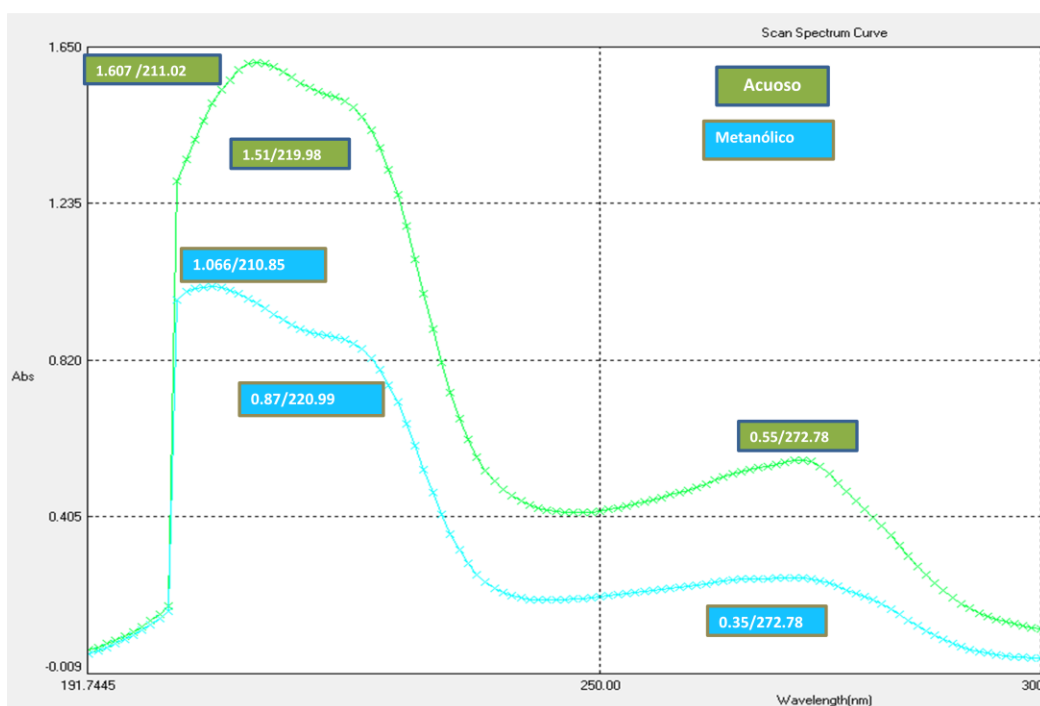


Figura 4. Espectrofotometría UV comparativa entre el extracto acuoso y el metanólico de *Agave mapisaga*.

Se realizaron espectrofotometrías UV para el extracto acuoso bajo condiciones de protonación a un pH de 2 en HCl, donde no se observaron diferencias en los patrones bajo condiciones de protonación, por lo que se determina aptitud para su administración oral.

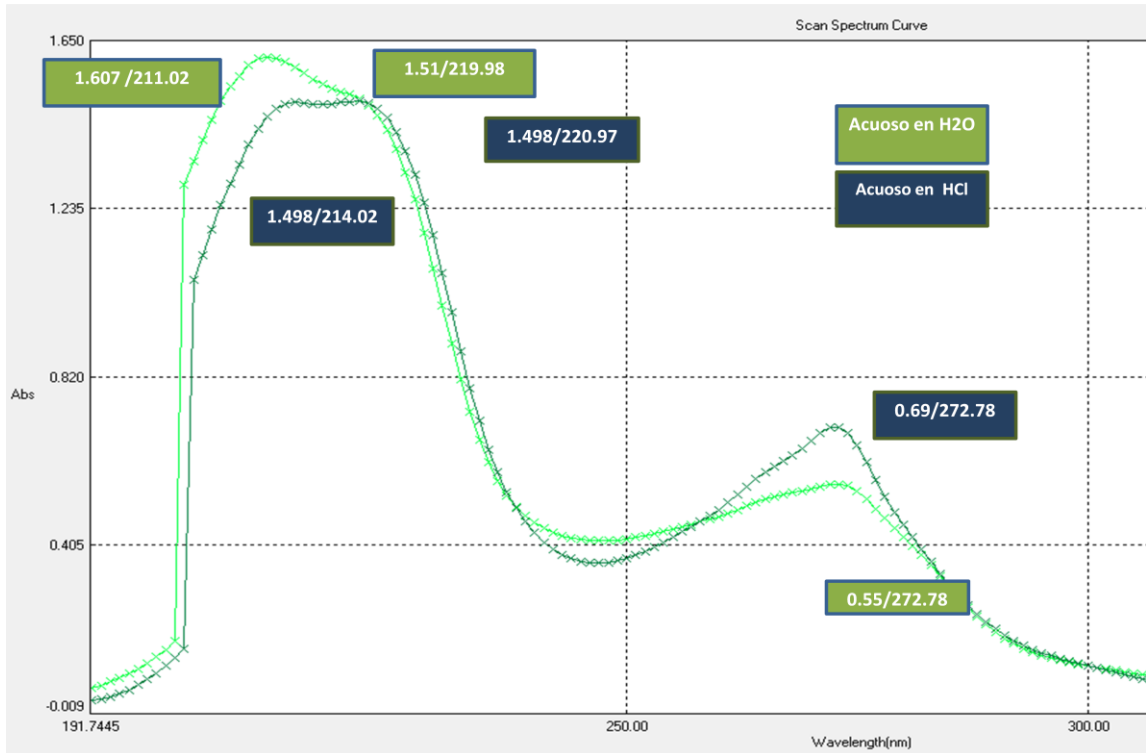


Figura 5. Espectrofotometría UV comparativa entre el extracto acuoso de *Agave mapisaga* a pH de 7 y a 2.5 en HCl.

Se realizaron pruebas para determinar la estabilidad de los extractos ante el congelamiento y descongelamiento. No se encontraron cambios.

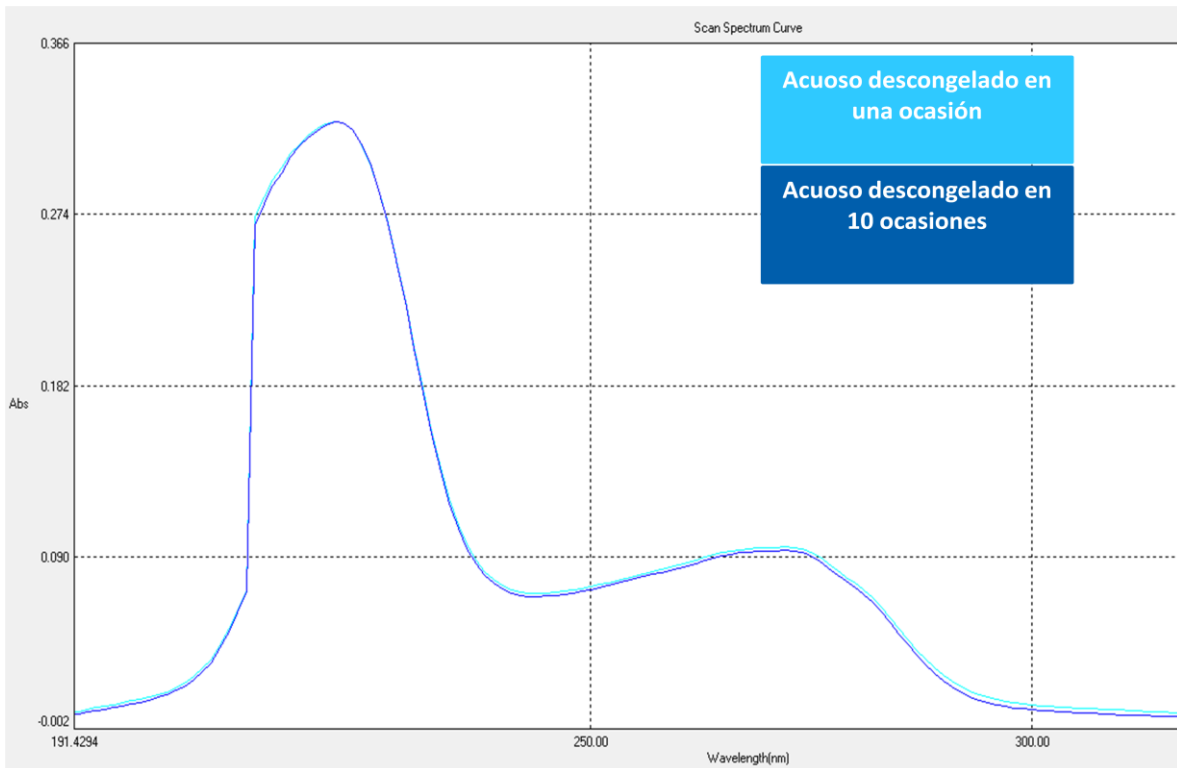


Figura 6. Espectrofotometría UV comparativa entre el extracto acuoso de *Agave mapisaga* descongelado por primera vez en comparación por uno descongelado en 10 ocasiones.

Se realizaron espectrofotometrías de los extractos diluidos en el agua de bebida filtrada y a temperatura ambiente durante 24 horas para determinar su estabilidad en bebederos. Se observó un cambio en la estructura de los compuestos de los extractos entre las 15 y las 24 hrs. Por lo anterior se consideró la permanencia del extracto en agua de bebida por máximo 12 horas.

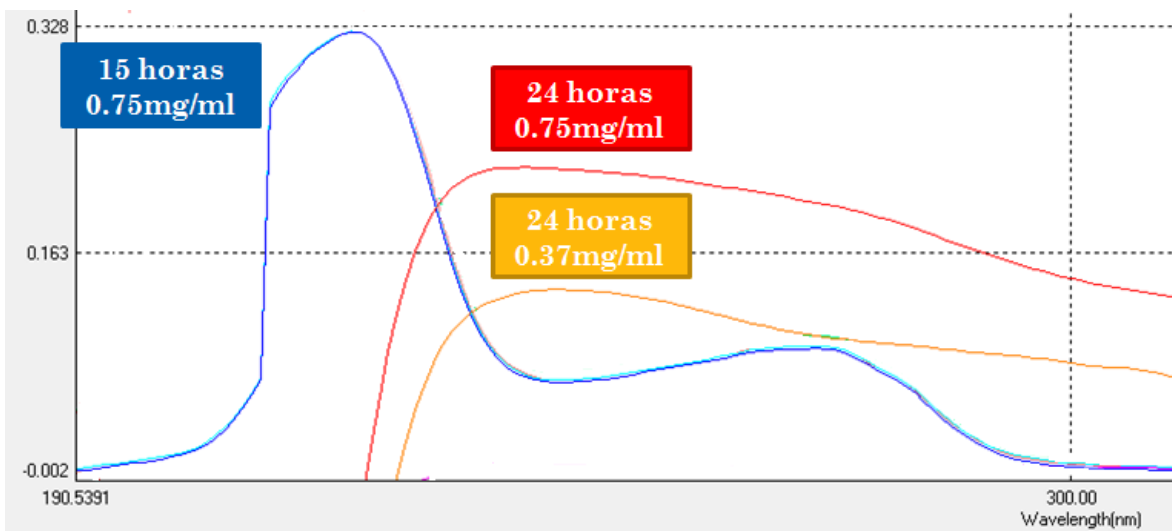


Figura 7. Espectrofotometría UV comparativa entre el extracto acuoso de *Agave mapisaga* diluido en agua de bebida a temperatura ambiente durante 15 horas (línea azul) y durante 24 horas a dos concentraciones distintas, 0.75mg/ml (línea roja) y 0.37mg/ml (línea anaranjada).

Cromatografía líquida de alta definición–masas (HPLC por sus siglas en inglés) .

Únicamente fue posible analizar el extracto acuoso dado que el metanólico formó precipitados. Se observaron aproximadamente 30 compuestos distintos entre el minuto 3 y el 18 de la prueba. Las curvas obtenidas se aprecian en la siguiente gráfica.

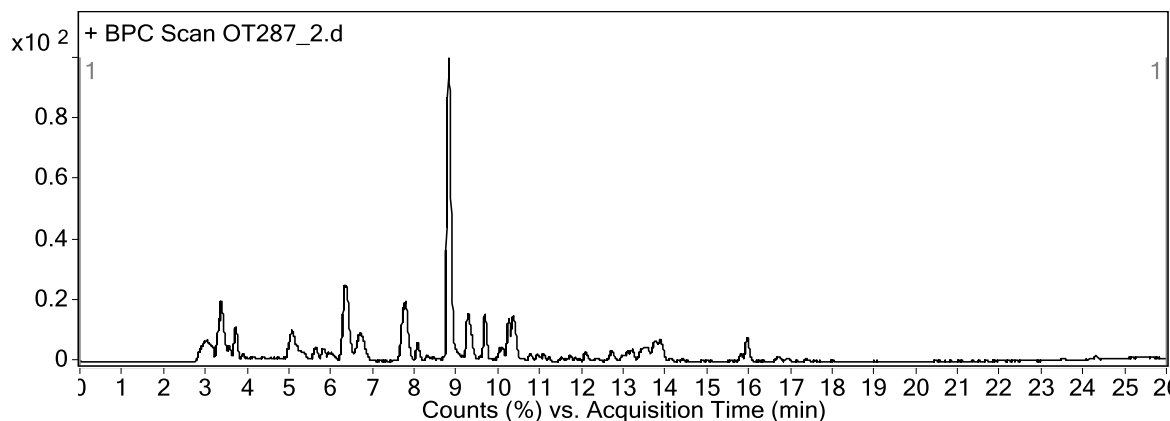


Figura 8. Gráfica producto del HPLC masas del extracto acuoso del *Agave mapisaga*.

Se llevó a cabo una búsqueda en la literatura en relación a los patrones isotópicos descritos en HPLC-masas de extractos de otros agaves. En la gráfica de patrones isotópicos correspondiente al periodo de 13.629 al 13.984 min se observó un patrón isotópico concordante con el de la hecogenina<sup>37</sup>.

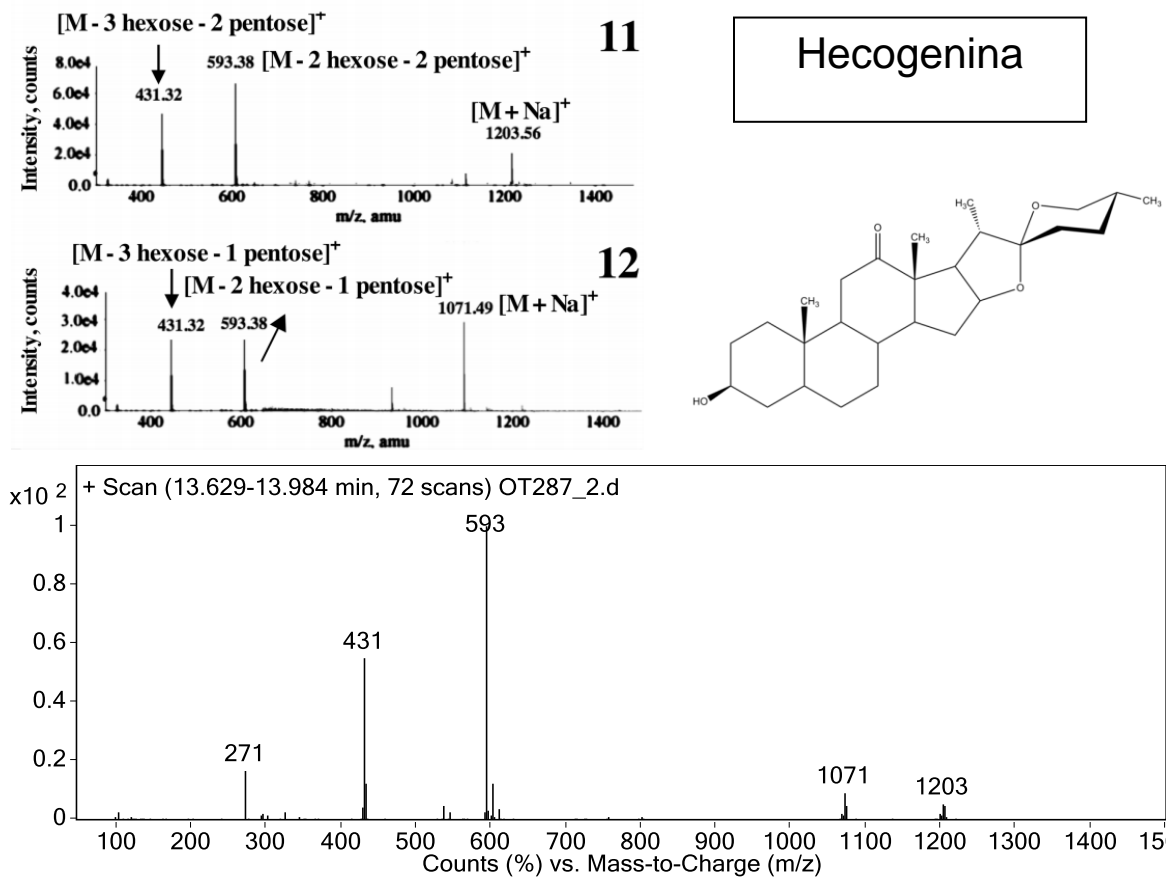


Figura 9. Patrón isotópico proveniente del cromatograma del HPLC-masas del periodo 13.629 al 13.984 min del extracto acuoso de *Agave mapisaga*, y su comparativo compatible con el patrón reportado de la hecogenina.

## Resultados de las pruebas *in vitro*

### Prueba de citotoxicidad

La distribución de los datos cumplió con los principios de normalidad y homogeneidad de varianzas ( $P > 0.05$ ), por lo que se realizó un análisis de la varianza (ANDEVA) y la prueba de comparación de medias de Dunnett. Se observó que ambos extractos poseen una actividad citotóxica; sin embargo, el extracto acuoso presentó diferencia significativa ( $\alpha = 0.01$ ) con el grupo testigo desde una concentración de 1.25 mg/pozo ( $P = 0.0001$ ), mientras que el metanólico presentó diferencia a partir de una concentración de 2.5 mg/pozo ( $P = 0.0001$ ).

### Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1.068	5	18	.410

### Pruebas de normalidad

	Tx	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
sobrevida	2 mg/pozo	.215	4	.	.979	4	.895
	1 mg/pozo	.250	4	.	.919	4	.533
	0.5 mg/pozo	.364	4	.	.840	4	.195
	0.25 mg/pozo	.291	4	.	.859	4	.257
	0.125 mg/pozo	.241	4	.	.880	4	.339
	Test H2O	.260	4	.	.944	4	.678

Cuadro 2. Pruebas de homogeneidad de varianza y de normalidad para los valores obtenidos de la prueba de citotoxicidad.

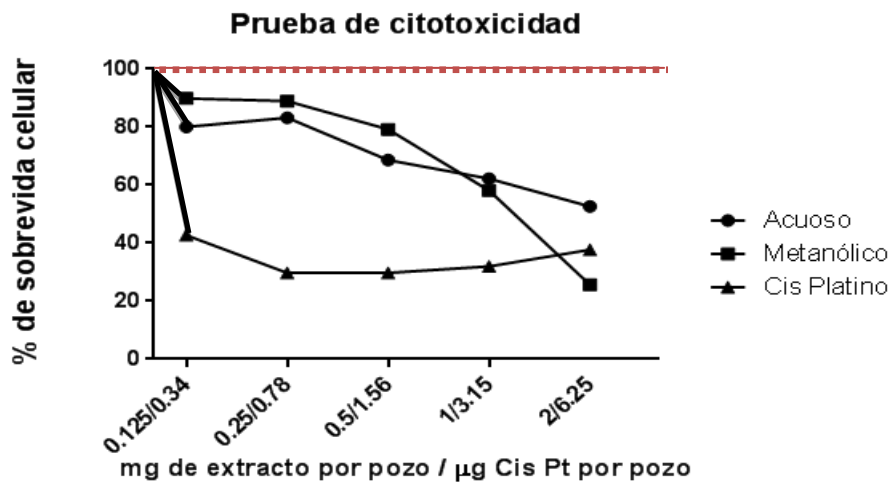


Figura 10. Porcentaje de sobrevivida celular de células PEC-Src expuestas por 24 horas a diferentes concentraciones de los extractos acuoso y metanólico de *Agave mapisaga*. La línea roja corresponde al crecimiento celular de los pozos sin tratamiento.

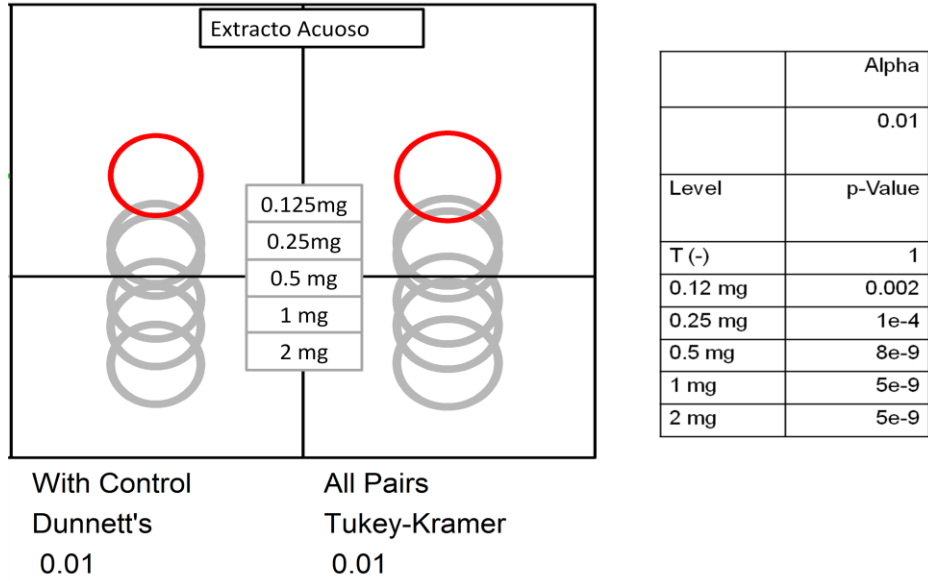


Figura 11. Resultados del ANDEVA y la prueba de comparación de medias de Dunnett para las diferencias en la sobrevivencia entre las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Agave mapisaga* en relación con el testigo negativo.

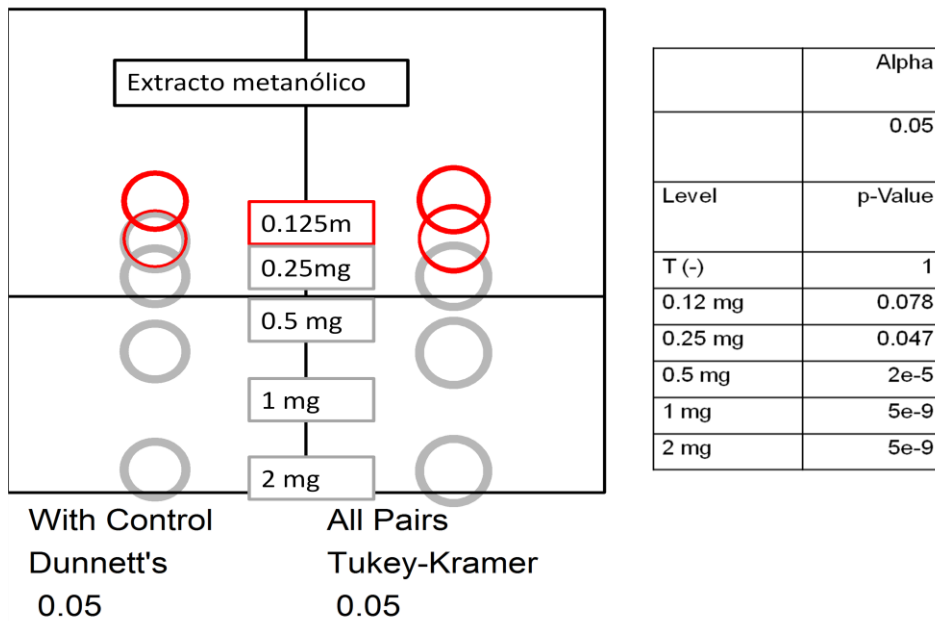


Figura 12. Resultados del ANDEVA y la prueba de comparación de medias de Dunnett para las diferencias en la sobrevivencia entre las diferentes concentraciones del extracto metanólico de *Agave mapisaga* en relación con el testigo negativo.

*Determinación del óxido nítrico en el ensayo de citotoxicidad*

No se encontraron valores detectables de óxido nítrico en los sobrenadantes celulares provenientes de pozos en presencia de los extractos de *Agave mapisaga* en ninguno de los tiempos de colección, el límite inferior de detección de NO<sub>2</sub> por esta prueba es de 6.25 uM.

**Detección de óxido nítrico en células Pec en presencia del extracto acuoso de *A. mapisaga***

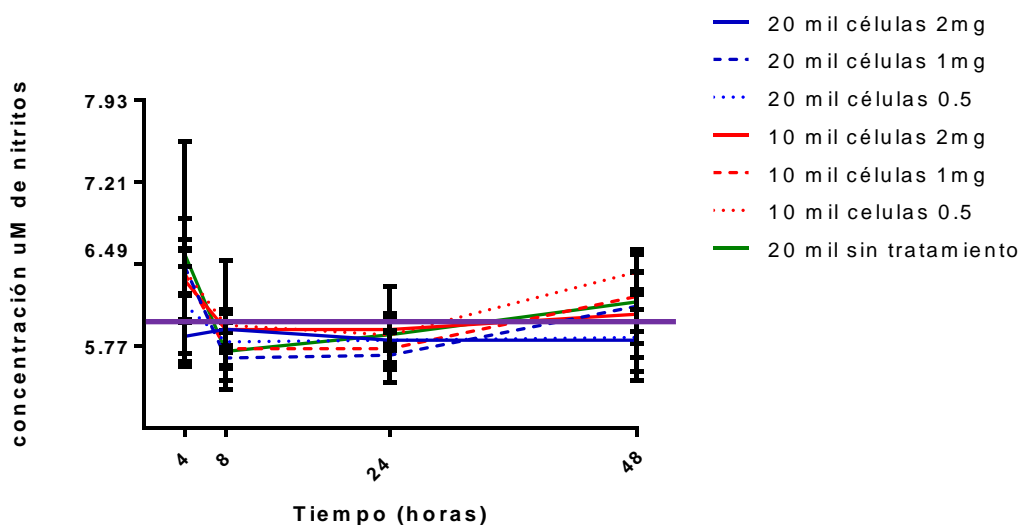


Figura 13. Detección de óxido nítrico en el sobrenadante de células Pec-src a diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Agave mapisaga*. La línea violeta corresponde a la concentración mínima de NO<sub>2</sub> detectada por el reactivo de Griess (6.26uM).

**Resultados de las pruebas *in vivo***

*Límite de prueba*

No se observaron signos de toxicidad en ningún animal sometido al procedimiento, lo que indica inocuidad del extracto.

*Prueba de isotransplatación*

El ensayo se llevó a cabo del 19 de mayo al 22 y 23 de junio del 2015. Durante el procedimiento murieron 7 individuos por motivos no relacionados al tratamiento: 2 del grupo que recibió la dosis de 100 mg/kg, 2 del grupo que recibió la dosis de 50 mg/kg, 2 del grupo testigo negativo y 1 del testigo de CDDP(II), quedando una población de 41 ratones.



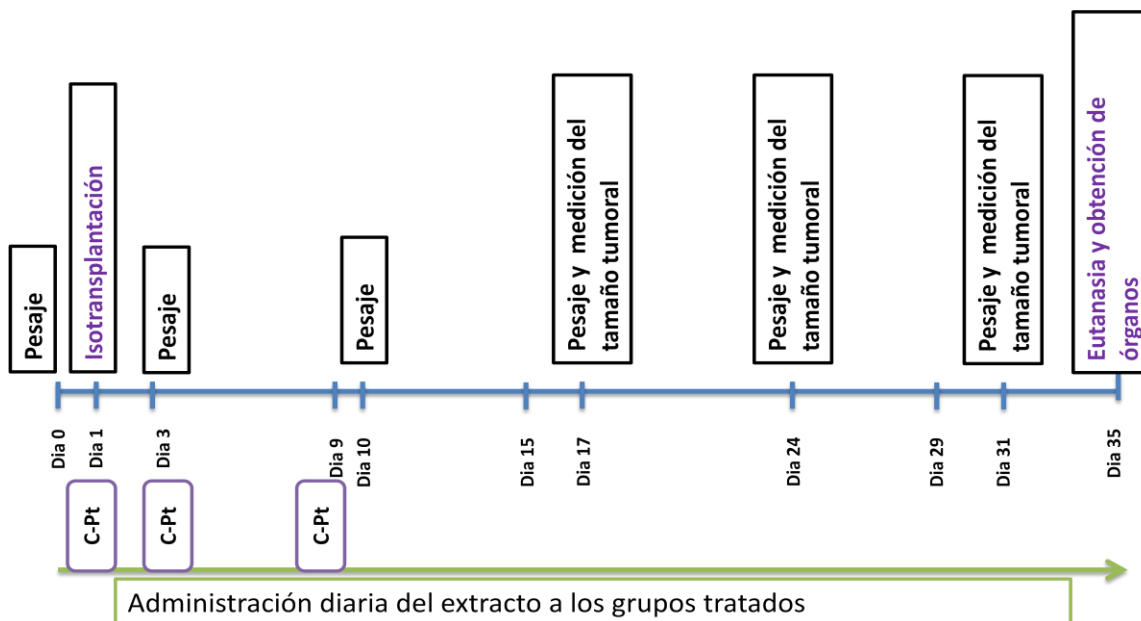


Figura 14. Línea del tiempo de los procedimientos llevados a cabo durante el periodo del experimento *in vivo*. C-Pt: administración de CDDP(II).

### **Implantación tumoral**

Los tumores fueron perceptibles al tacto a partir del día 15 post implantación. Se encontró una diferencia significativa en la implantación tumoral entre los animales del grupo testigo (sin tratamiento) en comparación con los del grupo tratado con CDDP(II) ( $P=0.0016$ ), así como en los animales del grupo que recibieron 50 mg/kg del extracto de *A. mapisaga* ( $P=0.0404$ ).

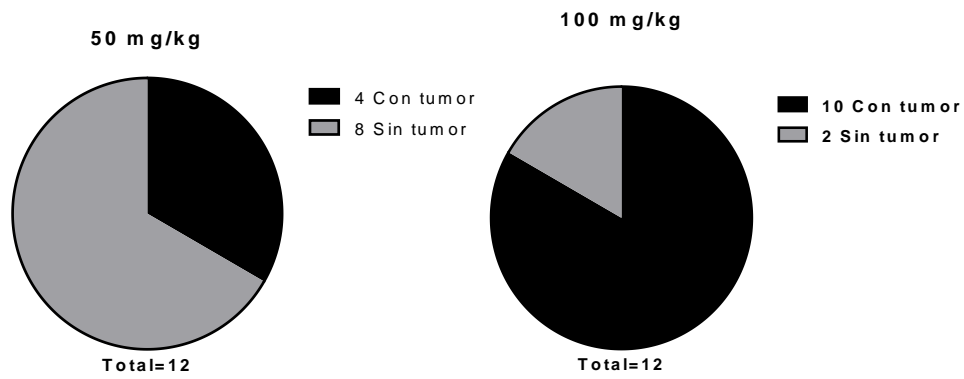


Figura 15. Número de ratones con presencia o ausencia de tumores por grupos.

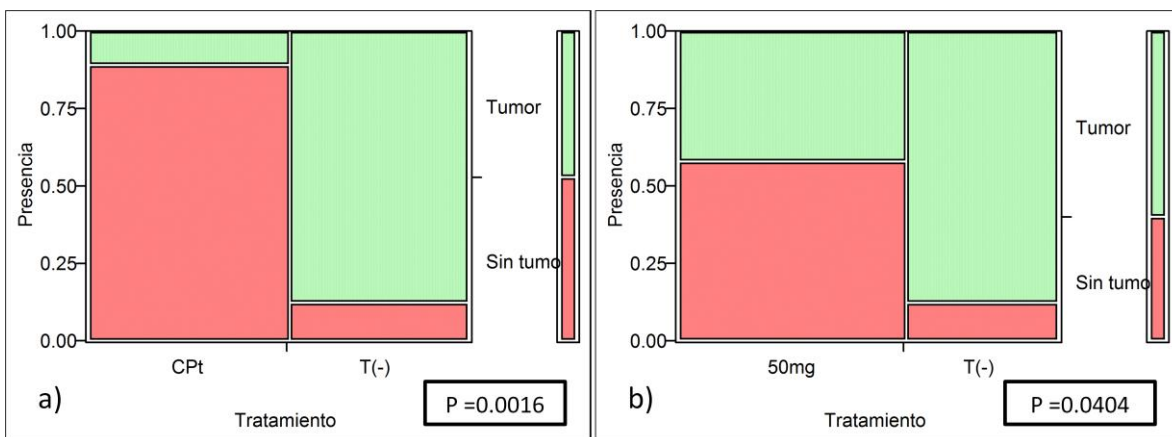


Figura 15. Diferencia entre la implantación tumoral los grupos tratados en relación con el grupo testigo. a) Cpt: CDDP(II) (P=0.0016). b) 50mg/kg del extracto acuoso del *Agave mapisaga*.

### Tamaño tumoral

Se obtuvieron los volúmenes tumorales (VT), los volúmenes relativos (VR) así como la función antitumoral (FA) por grupo en los días 17, 24 y 31. Se encontró actividad antineoplásica en las 3 mediciones del grupo que recibió CDDP(II) (FA<42), en el grupo tratado con 50 mg/kg del extracto acuoso de *A. mapisaga* se obtuvo un valor de FA de 60.133 en el primer muestreo y en el grupo tratado con 100 mg/kg del extracto acuoso de *A. mapisaga* se obtuvieron en el segundo y tercer muestreo las lecturas de 61.658 y 61.341 respectivamente.

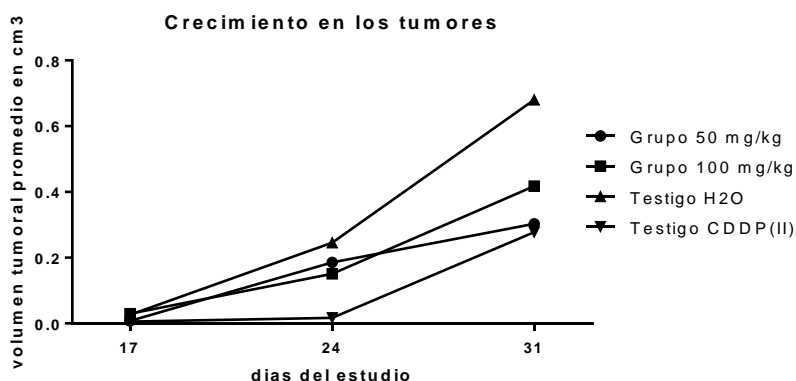


Figura 16. Volumen promedio de los tumores de cada uno de los grupos al día 17, 24 y 31 del estudio.

Volumen tumoral (VT cm <sup>2</sup> )			
Grupo	VT día 17	VT día 24	VT día 31
50 mg/kg	0.008	0.186	0.303
100 mg/kg	0.029	0.151	0.418
H <sub>2</sub> O	0.026	0.246	0.681
CDDP(II)	0.006	0.017	0.278
Volumen relativo total (VRT)			
Grupo	VRT día 17	VRT día 24	VRT día 31
50 mg/kg	1560.000	35448.480	57811.380
100 mg/kg	2944.128	15142.548	41750.608
H <sub>2</sub> O	2594.256	24558.865	68063.418
CDDP(II)	637.067	1715.741	27826.384
Función antitumoral (FA)			
Grupo	FA día 17	FA día 24	FA día 31
50 mg/kg	60.133	144.341	84.938
100 mg/kg	113.486	61.658	61.341
CDDP(II)	24.557*	6.986*	40.883*

Cuadro 3. Valores del volumen tumoral (VT), volumen relativo (VR) y función antineoplásica (FA) del crecimiento de los tumores con relación al tratamiento recibido. \* Para la FA valores iguales o inferiores 42 indican función antitumoral.



Imagen 2. Ratón FVB con un tumor de células PEC- Src implantado en la región sacro-lumbar, al día 24 post implantación, animal testigo sin tratamiento.

**Peso de los ratones**

Se realizó el pesaje de los ratones los días 3, 10, 17, 24, 31 y 35 del estudio. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en ninguno de los pesajes.

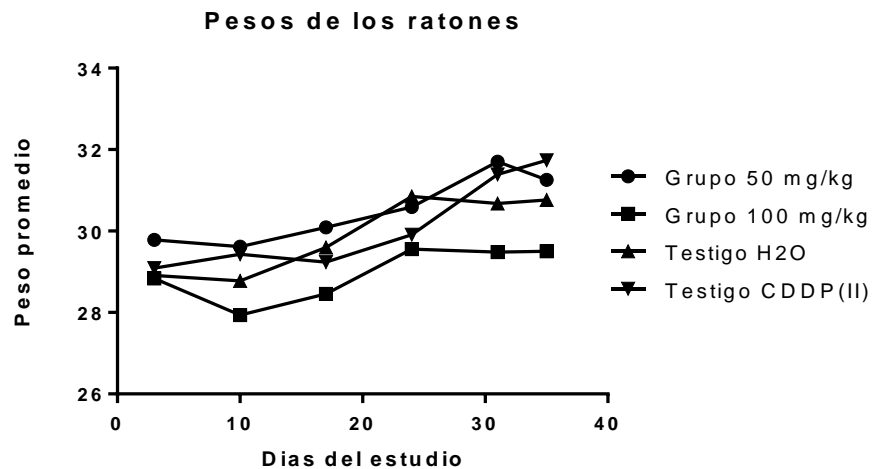


Figura 17. Pesos promedio de los ratones por grupo durante el estudio. Grupo 50 y 100 mg/kg: tratados con las concentraciones respectivas del extracto acuoso de *Agave mapisaga*. Testigo H<sub>2</sub>O: ratones que recibieron únicamente agua de bebida. Testigo CDDP(II): ratones que recibieron cisplatino los días 1, 3 y 9 por vía intraperitoneal a razón de 3.5 mg/kg.

### Peso de los ratones que desarrollaron tumores

No se observó diferencia significativa en los pesajes promedio por grupo en los ratones con tumor implantado.

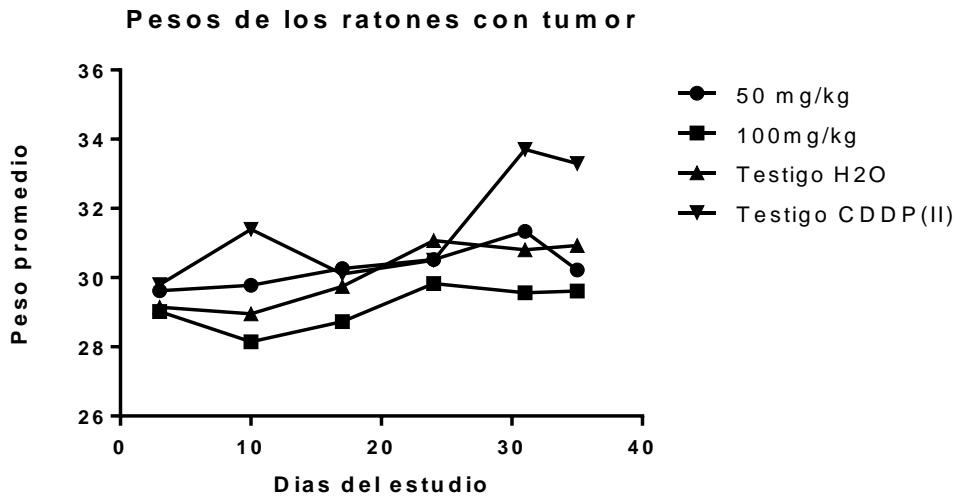


Figura 18. Pesos promedio de los ratones con tumores implantados por grupo durante el estudio. Grupo 50 y 100 mg/kg: tratados con las concentraciones respectivas del extracto acuoso de *Agave mapisaga*. Testigo H<sub>2</sub>O: ratones que recibieron únicamente agua de bebida. Testigo CDDP(II): ratones que recibieron cisplatino los días 1, 3 y 9 por vía intraperitoneal a razón de 3.5 mg/kg.

### Eutanasia y obtención de muestras

Se practicó la eutanasia a todos los animales el día 35 del estudio, se tomaron las muestras planteadas. En dos de los ratones se encontró esplenomegalia.

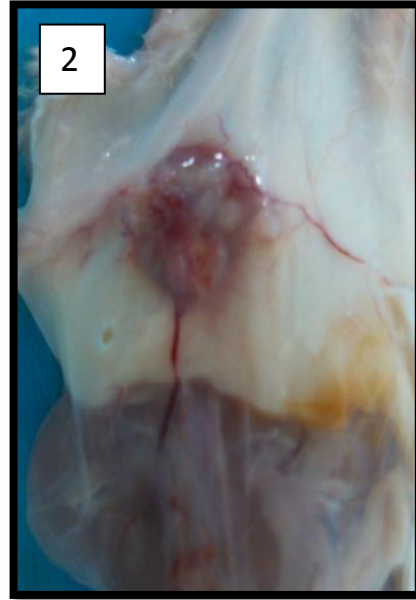


Imagen 3. 1: vista dorso-ventral de un ratón sacrificado con un tumor desarrollado en la región lumbo-sacra. 2: Vista del tumor subcutáneo al retirar la piel de la región lumbo-sacra. 3: Vista ventro-dorsal de un ratón al que se le ha practicado la necropsia.

#### ***Actividad antimetastásica por bioluminiscencia***

Se observó la bioluminiscencia esperada en los tumores subcutáneos, sin embargo, no se encontraron muestras de órganos positivas en ningún grupo del estudio.

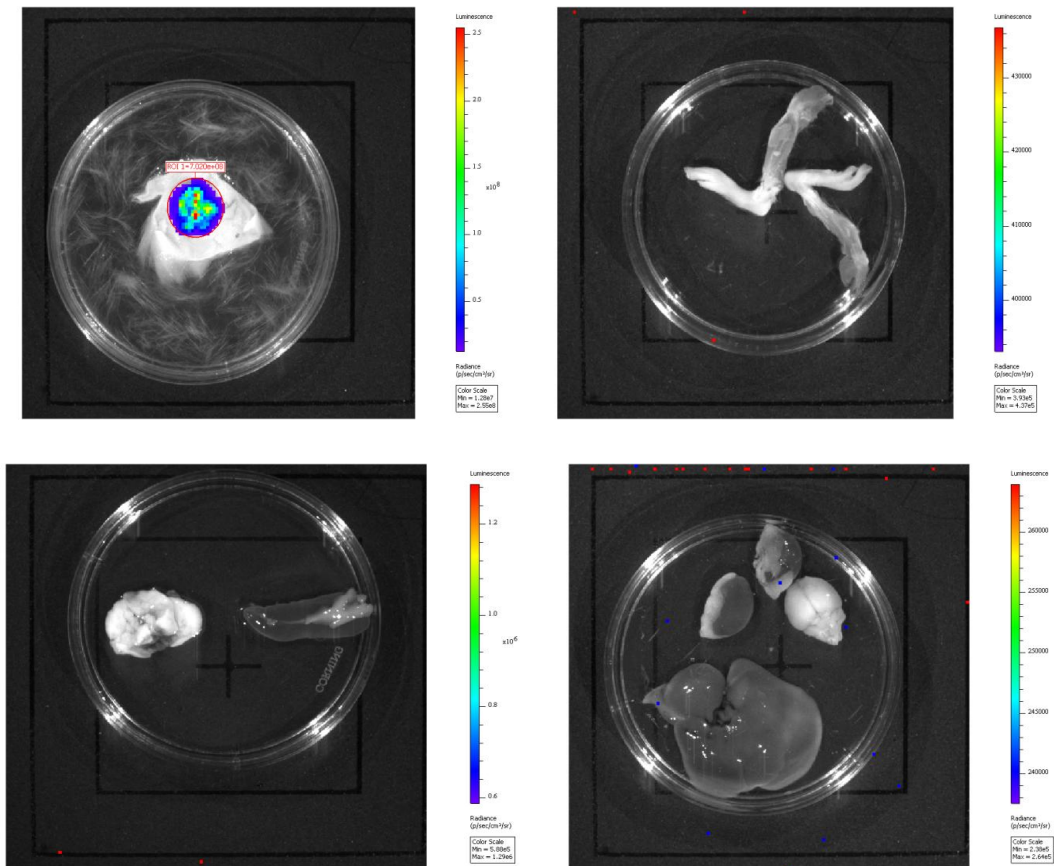


Imagen 4. Lecturas bioluminiscencia de las muestras obtenidas. 1: Muestra de piel de la región lumbo-sacra con el tumor adosado. 2: Miembros pélvicos. 3: pulmones y bazo. 4: hígado, riñones y cerebro.

#### **Actividad antimetastásica por histopatología**

No se encontraron células metastásicas en ninguna de las muestras de los órganos analizados en ninguno de los grupos del estudio.

Como hallazgos macroscópicos en la necropsia e histopatología se encontraron casos de esplenomegalia, focos de necrosis en el hígado, un absceso pulmonar, hemorragias pulmonares leves, no se encontró relación de estos hallazgos con alguno de los tratamientos administrados.

Como hallazgos microscópicos se encontraron focos de hemorragia dentro de los alveolos, se encontró en todos los ejemplares ligera hiperplasia del tejido linfoide, en los tumores se observaron células compatibles con adenocarcinoma en algunos casos con distribución en forma folicular.

## **Descripción macroscópica de las necropsias**

### **Grupo que recibió 50mg/kg**

Todos los ejemplares presentaron buena condición corporal y buen estado de conservación. Las mucosas de todos los animales eran rosa pálidas y no presentaron lesiones relevantes. En los ratones A1, A2, A4, A7 y el B1 se observaron nódulos subcutáneos a nivel lumbar de distintas dimensiones. Los nódulos encontrados en los ejemplares A7 y en B1 se encontraban extensamente ulcerados. Al corte, la superficie interna era blanca, lobulada con zonas friables multifocales (necrosis).

A la inspección interna se observó incremento en el volumen del bazo de los ratones A4 y A5. En este último, además, se observó un marcado incremento del linfonodo mandibular izquierdo, el cual presentaba consistencia firme y se encontraba reemplazado por exudado purulento. El ratón A2, exhibió coloración rojo oscura difusa, de la vesícula seminal izquierda, la cual contrastaba con su contraparte derecha. Los ratones B2 y B4 presentaron hemorragias multifocales en la superficie dorsal del pulmón. El resto de los órganos no presentaron alteraciones macroscópicas relevantes.

### **Grupo que recibió 100mg/kg**

Todos los ejemplares presentaron buena condición corporal y buen estado de conservación. Las mucosas de todos los animales eran rosa pálidas y no presentaron lesiones relevantes. En los ratones C3, C5, C6, C7, D1, D2, D3, D4, D6 y D7 se observaron nódulos subcutáneos a nivel lumbar de distintos tamaños. El nódulo encontrado en los ejemplares C6 y C7, se encontraban extensamente ulcerado. Al corte, la superficie interna era blanca, lobulada con zonas friables multifocales (necrosis).

A la inspección interna se observó incremento en el volumen del bazo de los ratones C7 y D7, así como también múltiples focos blanco sólidos. En el ratón D7 se observó incremento de volumen del linfonodo mandibular izquierdo, el cual presentaba consistencia firme y se encontraba reemplazado por exudado purulento. El resto de los órganos no presentaron alteraciones macroscópicas relevantes.

### **Grupo testigo sin tratamiento**

Todos los ejemplares presentaron buena condición corporal y buen estado de conservación. Las mucosas de todos los animales eran rosa pálidas y no presentaron lesiones relevantes. Los ratones TA4, TA5, TB1, TB2, TB3, TB4 y TB5 exhibieron nódulos subcutáneos a nivel lumbar de distintos tamaños, los cuales se encontraban completamente ulcerados. Al corte, la superficie interna era blanca, lobulada con zonas friables multifocales (necrosis).



El ejemplar TB2 presentó una lesión nodular blanca lisa, a nivel de la porción ventral de los pulmones, dicha lesión ocupaba aproximadamente el 25% de la cavidad torácica. Al corte era blanco y contenía exudado purulento. En los ratones TA5, TB2 y TB5 se observó incremento en el volumen del bazo. El ratón TA2, exhibió hemorragias multifocales en la superficie dorsal del pulmón. El resto de los órganos no presentaron alteraciones macroscópicas relevantes

Grupo testigo que recibió CDDP(II).

Todos los ejemplares presentaron buena condición corporal y buen estado de conservación. Las mucosas de todos los animales eran rosa pálidas y no presentaron lesiones relevantes. El ratón Cpt B3 exhibió un nódulo subcutáneo a nivel lumbar de aproximadamente 1 cm de eje mayor. Al corte, la superficie interna era blanca, lobulada con zonas friables multifocales (necrosis). El ratón Cpt A4 presentó un extenso hematoma a nivel de la región carpal derecha. A la inspección interna, en el ejemplar Cpt A1 se observó un incremento moderado del linfonodo popliteo derecho, el cual presentaba consistencia firme y se encontraba reemplazado por exudado purulento. El resto de los órganos no presentaron alteraciones macroscópicas relevantes.

A continuación se anexa un cuadro con los hallazgos macroscópicos por ratón:

ID Ratón	TUMOR		Encéfalo	Pulmón	Bazo	Hígado	Riñón	MPs	Otros
	Presente	Ulcerado							
A1	X	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	X	-	-	-	-	-	-	-	Vesícula seminal izquierda enrojecida
A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A4	X	-	-	-	Esplmeg. ++	-	-	-	-
A5	-	-	-	-	Esplmeg. +	-	-	-	Linfonodo mandibular izq. aumentado
A6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A7	X	X	-	-	-	-	-	-	-
TA2	-	-	-	Hemorragia multifocal	-	-	-	-	-

ID Ratón	TUMOR		Encéfalo	Pulmón	Bazo	Hígado	Riñón	MPs	Otros
	Presente	Ulcerado							
TA4	X	X	-	-	-	-	-	-	-
TA5	X	X	-	-	-	-	-	-	-
Cpt B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cpt B3	X	-	-	-	-	-	-	-	-
Cpt B4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cpt B5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	X	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C5	X	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	X	X	-	-	-	-	-	-	-
C7	X	X	-	-	Esplmeg. ++	Necrosis multifocal	-	-	-
Cpt A1	-	-	-	-	-	-	-	-	Linfonodo poplíteo derecho aumentado
Cpt A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cpt A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cpt A4	-	-	-	-	-	-	-	-	Hematoma carpal derecho
Cpt A5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TB1	X	X	-	-	-	-	-	-	-
TB2	X	X	-	Absceso	Esplmeg. +++	-	-	-	-

ID Ratón	TUMOR		Encéfalo	Pulmón	Bazo	Hígado	Riñón	MPs	Otros
	Presente	Ulcerado							
TB3	X	X	-	-	-	-	-	-	-
TB4	X	X	-	-	-	-	-	-	-
TB5	X	X	-	-	Esplmeg. ++	-	-	-	-
B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	-	-	-	Hemorragia multifocal	-	-	-	-	-
B4	-	-	-	Hemorragia multifocal	-	-	-	-	-
B7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D1	X	-	-	-	-	-	-	-	-
D2	X	-	-	-	-	-	-	-	-
D3	X	-	-	-	Esplmeg. +	-	-	-	-
D4	X	-	-	-	-	-	-	-	-
D6	X	-	-	-	-	-	-	-	-
D7	X	X	-	-	Esplmeg. +	-	-	-	Linfonodo mandibular izq. aumentado

Cuadro 4. Hallazgos a las necropsias y lesiones macroscópicas encontradas por órgano y por ratón del estudio. **Esplmeg:** esplenomegalia

#### Descripción microscópica de los órganos

Grupo que recibió 50mg/kg

**Piel:** los ratones A1, A2, A4 y A7 presentaron un tejido hiper celular subcutáneo, el cual se encontró delimitado por una cápsula fibrosa compuesto por células epiteliales sostenidas por escaso estroma fibrovascular. Dichas células exhibieron un acomodo en mantos densos y en algunas áreas forman lóbulos con una luz central, las células neoplásicas presentaron citoplasma eosinofílico claro, bordes definidos, núcleos grandes, redondos a ovales con cromatina fina

granular y al menos un nucléolo prominente. Se observó marcada anisocitosis, anisocariosis, pleomorfismo nuclear y alto índice mitótico (3 a 11 por campo aleatorio 40x). La porción central de la neoplasia se encontró reemplazada por áreas de necrosis caracterizadas por la presencia de neutrófilos degenerados y restos celulares necróticos.

**Pulmón:** en los ratones A2, A3, A5 y A6, se aprecian focos de hemorragia dentro de los alveolos, así como congestión muy discreta de los capilares del área . En el ejemplar A6, dichas hemorragias son ligeramente más extensas.

**Riñón:** el ratón A4, presentó pequeños agregados de linfocitos y células plasmáticas en el intersticio, los glomérulos adyacentes a estos focos presentaban el ovillo glomerular retraído o bien, la membrana basal hialina y evidente.

**Bazo:** en todos los ejemplares se observó discreta hiperplasia de la pulpa blanca, así como numerosos megacariocitos y otros precursores hematopoyéticos, lo anterior fue más evidente en los ratones A4 y A5, asimismo se aprecian hemosiderófagos dispersos.

**Linfonodo mandibular :** en el ratón A5 el parénquima se aprecia notablemente expandido y comprimido por una lesión inflamatoria piogranulomatosa, caracterizada por estar encapsulada y rodeada por fibroblastos reactivos y fibras de colágena. En su interior se aprecian numerosos macrófagos epitelioides, linfocitos, neutrófilos degenerados y restos celulares necróticos. Inmersos en esta reacción inflamatoria se observan residuos de material vegetal infiltrando las fibras musculares y glándulas salivales adyacentes se aprecia extensión de la inflamación antes descrita.

No se observaron alteraciones relevantes en las secciones de encéfalo, riñón, hígado y miembros posteriores

Grupo que recibió 100 mg/kg

**Piel:** los ratones C3, C5, C6, C7, D1, D2, D3, D4, D6 y D7 presentaron un tejido hiper celular subcutáneo, el cual se encuentra delimitado por una cápsula fibrosa y se compone por células epiteliales sostenidas por escaso estroma fibrovascular. Dichas células exhiben un acomodo en mantos densos y en algunas áreas forman lóbulos con una luz central, las células neoplásicas presentan citoplasma eosinofílico claro, bordes definidos, núcleos grandes, redondos a ovales con cromatina fina granular y al menos un nucléolo prominente. Se observa marcada anisocitosis, anisocariosis, pleomorfismo nuclear y alto índice mitótico (3 a 11 por campo aleatorio 40x). La porción central de la neoplasia se encuentra reemplazada por áreas de necrosis caracterizadas por la presencia de neutrófilos degenerados y restos celulares necróticos. En el ejemplar C3, se observa un área en dermis y que se extiende al panículo, infiltrada por linfocitos, histiocitos, algunos de ellos con hemosiderina en su interior y fibroblastos reactivos.

**Pulmón:** en los ratones C2, C3, C4, C6, C7, D1, D2, D3 y D7 se aprecian focos de hemorragia dentro de los alveolos, así como muy discreta congestión de los capilares del área.

**Hígado:** el ratón C7, exhibió múltiples focos de necrosis caracterizados por áreas con pérdida del detalle celular rodeadas por neutrófilos degenerados, linfocitos y macrófagos.

**Bazo:** en todos los ejemplares se observó hiperplasia discreta de la pulpa blanca, así como numerosos megacariocitos y otros precursores hematopoyéticos, lo anterior fue ligeramente más evidente en los ratones C6 y C7, asimismo se aprecian hemosiderófagos dispersos.

No se observaron alteraciones relevantes en las secciones de encéfalo, riñón, hígado y miembros posteriores

Grupo testigo sin tratamiento

**Piel:** Los ratones TA4, TA5, TB1, TB2, TB3, TB4 y TB5 presentan un tejido hipercelular subcutáneo, el cual se encuentra delimitado por una cápsula fibrosa y se compone por células epiteliales sostenidas por escaso estroma fibrovascular. Dichas células exhiben un acomodo en mantos densos y en algunas áreas forman lóbulos con una luz central, las células neoplásicas presentan citoplasma eosinofílico claro, bordes definidos, núcleos grandes, redondos a ovales con cromatina fina granular y al menos un nucléolo prominente. Se observa marcada anisocitosis, anisocariosis, pleomorfismo nuclear y alto índice mitótico (3 a 11 por campo aleatorio 40x). La porción central de la neoplasia se encuentra reemplazada por áreas de necrosis caracterizadas por la presencia de neutrófilos degenerados y restos celulares necróticos. En el ejemplar TA4, se observa un área subcutánea infiltrada por linfocitos, histiocitos y algunos fibroblastos reactivos.

**Pulmón:** los ratones TA2, TA4, TB1, TB3 y TB5, se aprecian focos de hemorragia dentro de los alveolos, así como muy discreta congestión de los capilares del área.

**Bazo:** en todos los ejemplares se observó hiperplasia discreta de la pulpa blanca, así como numerosos megacariocitos y otros precursores hematopoyéticos, lo anterior fue ligeramente más evidente en los ratones TA5, TB2 y TB5, así mismo se aprecian hemosiderófagos dispersos.

No se observaron alteraciones relevantes en las secciones de encéfalo, riñón, hígado y miembros posteriores.

Grupo testigo que recibió CDDP(II)

**Piel:** el ratón Cpt B3 presentó un tejido hipercelular subcutáneo, el cual se encuentra delimitado por una cápsula fibrosa y se compone por células epiteliales sostenidas por escaso estroma fibrovascular. Dichas células exhiben un acomodo en mantos densos y en algunas áreas forman lóbulos con una luz central, las células neoplásicas presentan citoplasma eosinofílico claro, bordes

definidos, núcleos grandes, redondos a ovales con cromatina fina granular y al menos un nucléolo prominente. Se observa marcada anisocitosis, anisocariosis, pleomorfismo nuclear y alto índice mitótico (3 a 11 por campo aleatorio 40x). La porción central de la neoplasia se encuentra reemplazada por áreas de necrosis caracterizadas por la presencia de neutrófilos degenerados y restos celulares necróticos. En el ejemplar Cpt B4, se observa un área en dermis y que se extiende al panículo, infiltrada por linfocitos, histiocitos y algunos fibroblastos reactivos.

**Pulmón:** en los ratones Cpt A2, Cpt A5, Cpt B4 y Cpt B5 se aprecian focos de hemorragia dentro de los alveolos, así como muy discreta congestión de los capilares del área.

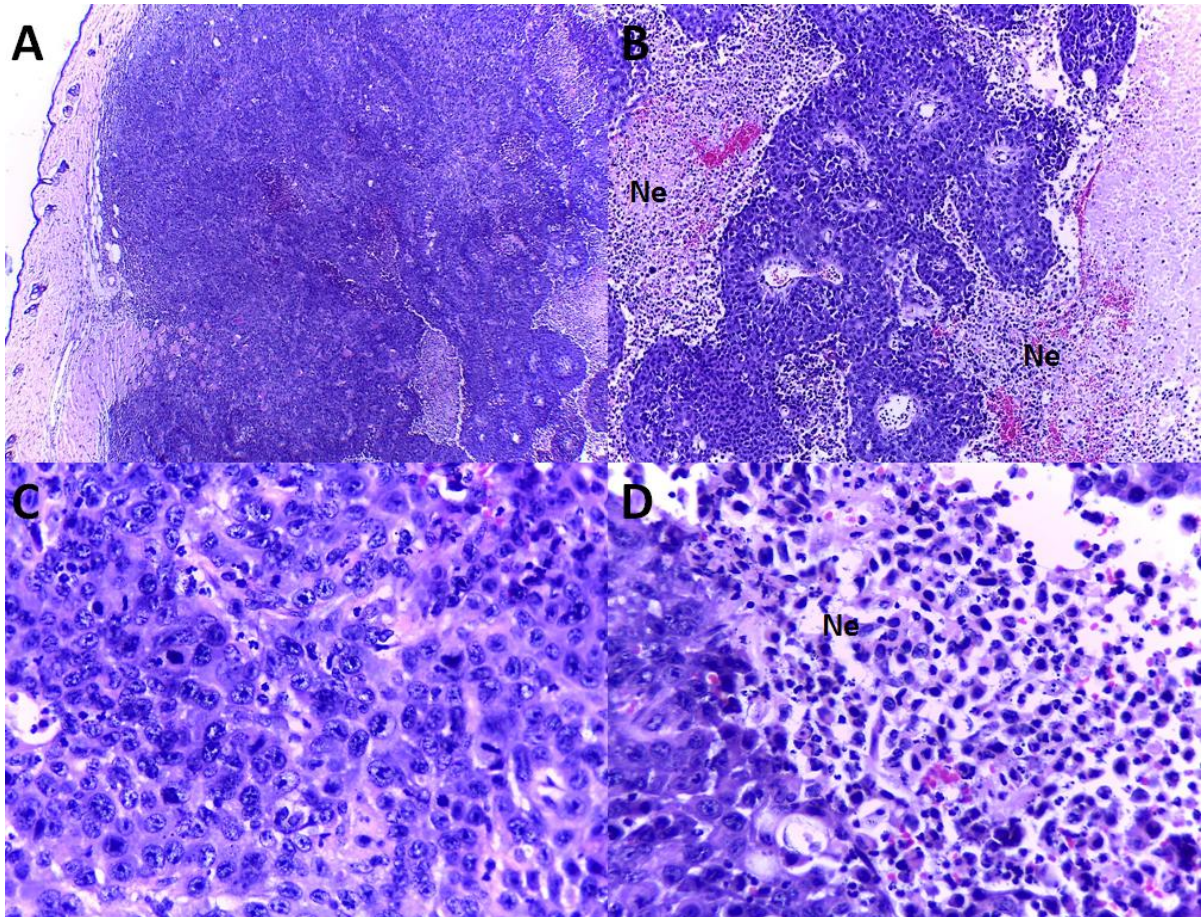
**Hígado:** el ratón Cpt A4, exhibió un foco de degeneración caracterizado por la presencia de vacuolas claras dentro del citoplasma de los hepatocitos. En el ratón Cpt A5, se observaron numerosos agregados de precursores hematopoyéticos (hematopoyesis extramedular).

**Bazo:** en todos los ejemplares se observó discreta hiperplasia de la pulpa blanca, así como numerosos megacariocitos y otros precursores hematopoyéticos.

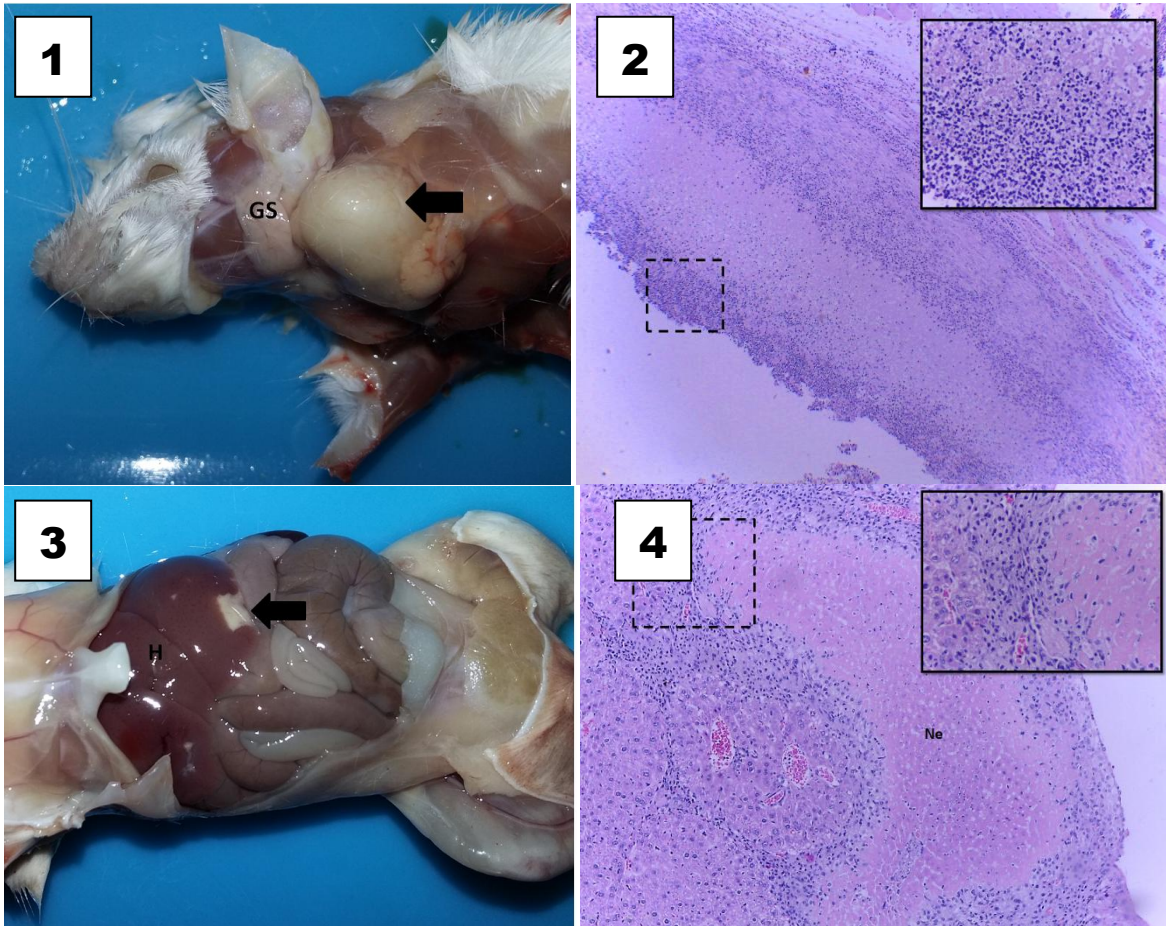
**Hueso (miembros posteriores):** en el ejemplar Cpt A5, el hueso compacto exhibe un área reemplazada por fibroblastos reactivos, colágena madura y numerosos osteoclastos.



**Imagen 5. Ratón C5.** Neoplasia subcutánea en dorso. 2. Ratón TB5 con una neoplasia subcutánea en dorso, completamente ulcerada y cubierta por sangre. 3. Ratón TB5. Vista de la superficie del nódulo. Nótese la marcada neovascularización de la neoplasia (flechas).



**Imagen 6. Carcinoma subcutáneo, ratón A7.** **A.** Se observa un crecimiento nodular, delimitado por una cápsula fibrosa comprimiendo la dermis. **B.** La neoplasia se organizan en lóbulos y rosetas rodeando vasos sanguíneos, se aprecian numerosos focos coalescentes de necrosis (Ne). **C.** Las células exhiben marcada anisocitosis, anisocariosis, pleomorfismo nuclear y numerosas mitosis. **D.** Focos de necrosis alternando con la neoplasia, caracterizados por la presencia de neutrófilos degenerados, macrófagos y detritos celulares. Tinción H&E.



**Imagen 7. 1.** Ratón A5. Se observa un notable incremento en el tamaño del linfonodo mandibular izquierdo (flecha), al corte se observó abundante exudado purulento. GS: glándula salival. **2.** Ratón A5. El linfonodo se encuentra reemplazado prácticamente en su totalidad, por una lesión encapsulada que en su interior exhibe extensas áreas de necrosis licuefactiva (recuadro). Tinción H&E. **3.** Ratón B1. Cavidad abdominal expuesta en donde se aprecia una lesión blanca, deprimida en el borde del lóbulo lateral izquierdo (flecha) del hígado (H). **4.** Ratón B1. Hígado con una lesión delimitada conformada por una extensa área de necrosis coagulativa (Ne), rodeada por numerosos linfocitos y macrófagos (recuadro).



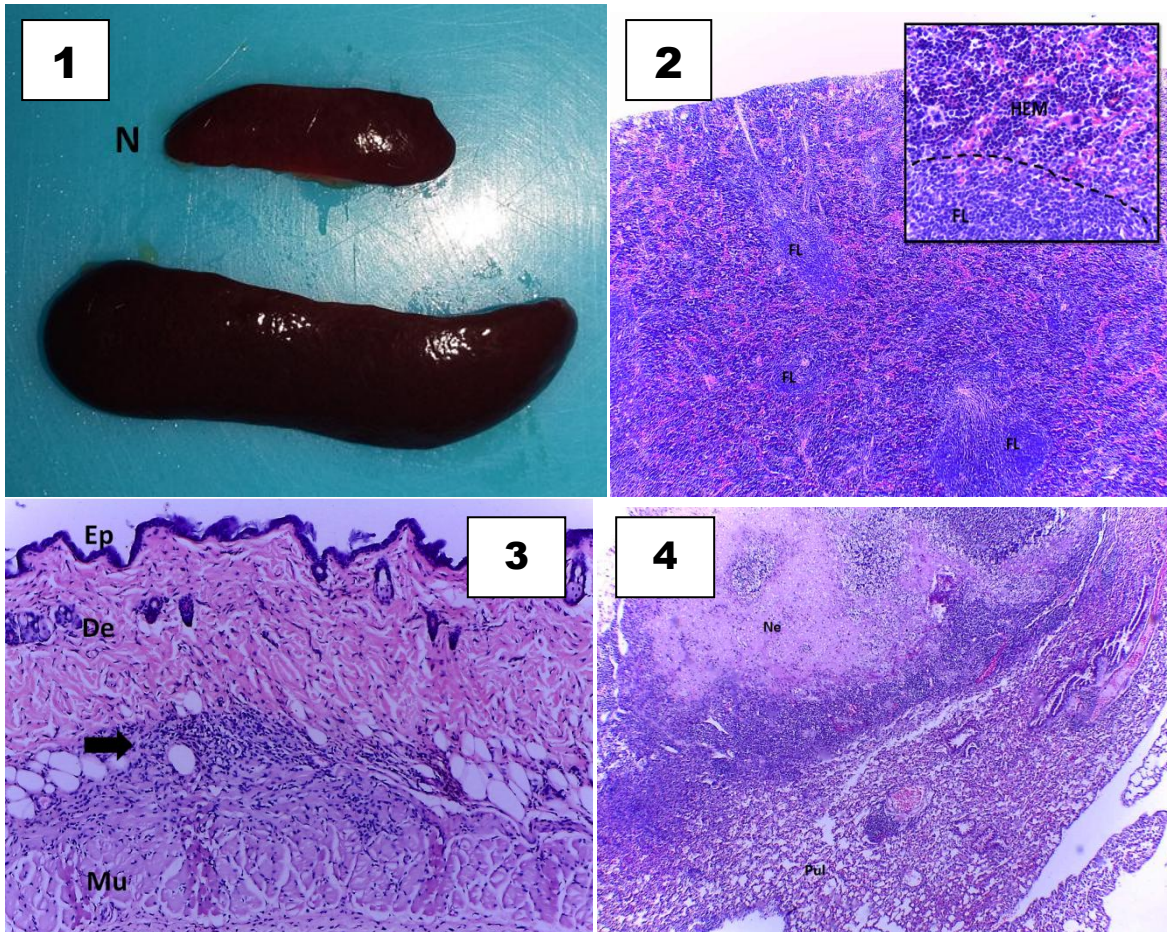


Imagen 8. 1. Esplenomegalia, se observa notable incremento en el volumen del bazo en comparación con uno normal (N). 2. Ratón TB2. Bazo con esplenomegalia, se observa que la pulpa roja se encuentra expandida por numerosos precursores hematopoyéticos, indicativo de hematopoyesis extramedular (HEM). FL: folículos linfoides. Tinción H&E. 3. Ratón TA4. Piel, el panículo (flecha), se encuentra infiltrado por numerosos histiocitos, linfocitos y células plasmáticas, focalmente se observa extensión de este infiltrado a la dermis contigua. Ep: epidermis, De: dermis, Mu: músculo. Tinción H&E. 4. Ratón TB2. Pulmón (Pul), con una lesión delimitada conformada por una extensa área de necrosis licuefactiva (Ne), rodeada por numerosos linfocitos, neutrófilos y macrófagos.

### ***Evaluación del microambiente tumoral***

El acomodamiento de los tejidos en la laminilla fue un corte del tumor subcutáneo, acompañado de uno de bazo (testigo positivo de macrófagos) y uno de piel (testigo negativo de contenido de macrófagos).

Se realizaron los cortes a partir de los cuales se realizó el procedimiento de desparafinado y la tinción correspondiente.

Las tinciones muestran una importante autofluorescencia inespecífica, producto de la presencia de parafina.

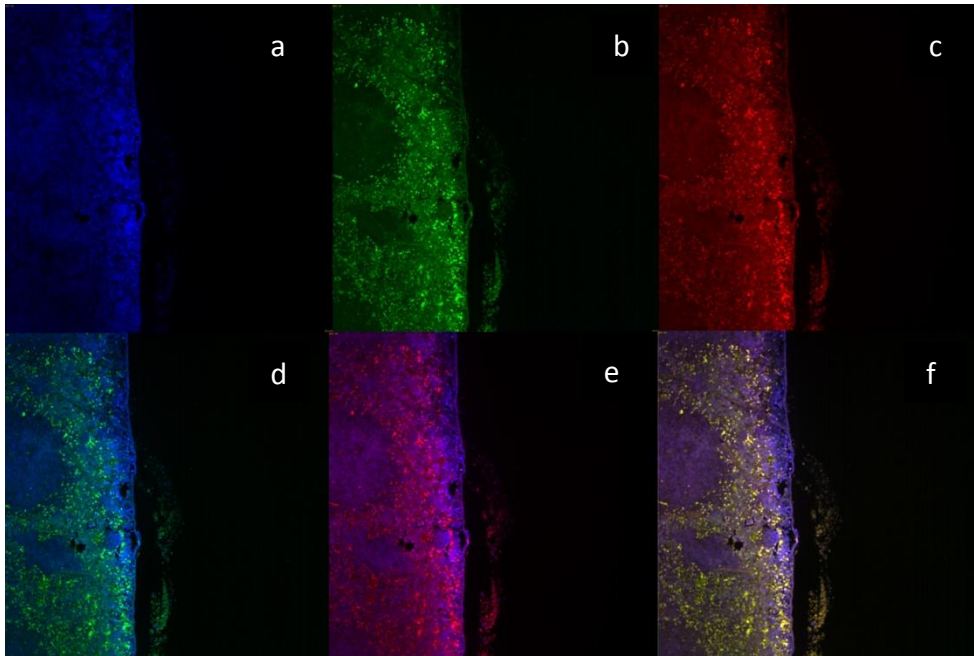


Imagen 9. Tinción de cortes de bazo murino de un ratón sano como testigo, de tinción. a. contra tinción con diaminofenilindol (DAPI). b. anticuerpo anti CD163 marcado con Isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC). c. anticuerpo anti CD206 marcado con Isotioscianato de fluoresceína (FITC).

## Discusión y conclusiones

La clasificación por parte de los profesores e investigadores del Instituto de Biología y del Jardín Botánico aporta a su archivo un espécimen con el que no contaban, es importante remarcar que el Jardín Botánico de Ciudad Universitaria cuenta con una de las colecciones más abundantes del país en cuanto a especies de agaves, sin embargo no cuenta con un ejemplar vivo de *Agave mapisaga*.

Podemos concluir que es fundamental preservar y entender a mayor profundidad el conocimiento acerca de las plantas nativas y el entorno natural y social que permite su cultivo y domesticación, hacerlo nos permite comprender distintas pero no nuevas formas al proceso de observación médica científica en la historia de la humanidad. Para ello se vuelve prioritario enfocar la investigación en hallazgos y necesidades de la comunidad nacional actual y ancestral a través de un enfoque crítico a la medicina occidental, así como a los objetivos de la academia en docencia e investigación. De esta manera es y será posible construir un pensamiento científico alejado de los dogmas, que pueda conciliar distintas maneras de entender la complejidad del mundo natural del cual el ser humano formamos parte.

Bajo el anterior concepto de pertenencia de y para la cultura nacional. Todo conocimiento producto de la universidad al servicio de la población debe ser protegido por la misma comunidad universitaria y no universitaria, para no ser un nuevo motivo de despojo saqueo e inequidad.

La obtención de los extractos resulta un procedimiento relativamente sencillo, sin embargo, posterior a la rotaevaporación no fue posible realizar la liofilización, se observó una incapacidad para sublimar el agua contenida en la muestra. Lo anterior se puede explicar por las propiedades coligativas en una disolución, la alta concentración de solutos provoca un descenso del punto de congelación y disminuye la presión de vapor<sup>81</sup> lo cual modifica el punto sublimación necesario para la liofilización.

A pesar de que en este estudio se realizaron todas las pruebas a partir de los extractos pesados en miligramos, lo ideal es realizar el pesaje de sustancias sólidas, teniendo en cuenta que esto además ofrecería la máxima concentración de los compuestos. Por ello concluimos que, en estudios posteriores sería pertinente intentar la liofilización antes de que alcance concentraciones altas y texturas viscosas.

A partir de la espectrofotometría UV únicamente podemos describir de manera muy general la huella de los extractos, lo cual nos sirve para saber si suceden cambios "evidentes" en la suma de todos los compuestos contenidos. Por lo anterior se utilizó esta prueba para conocer si existían afecciones en la composición general del extracto acuoso, bajo condiciones de congelación-

descongelación y cambios de pH. En las condiciones anteriores, ambos extractos mostraron estabilidad lo cual nos hace concluir la aptitud de los compuestos contenidos para su administración por vía oral y su resistencia a cambios frecuentes de temperatura. Se observó que el extracto tuvo cambios importantes en la huella espectrofotométrica cuando permaneció entre 15 y 24 horas en agua de bebida filtrada, es importante señalar que el extracto demostró estabilidad a temperatura ambiente en agua destilada. Los cambios en la huella espectrofotométrica se pueden explicar por la cloración del agua de consumo, compuesto que no se elimina por el proceso de filtración para potabilizarla. Es por lo anterior que para el ensayo *in vivo* se realizó el cambio de agua con los extractos cada 12 h.

Para realizar una descripción más detallada de los compuestos presentes en el extracto acuoso se utilizó la cromatografía líquida de alta eficiencia-masas (HPLC-masas), no fue posible analizar el extracto metanólico debido a que éste se precipitó al momento de diluirlo. De los aproximadamente 30 compuestos encontrados en mayor concentración se realizó una búsqueda bibliográfica de los patrones isotópicos producto de los espectros de masas. En múltiples estudios como los realizados por Chen en el 2011, por Francis 2002 y Shao en 1996 se ha demostrado la actividad antineoplásica *in vitro* e *in vivo* de las saponinas esteroidales, es por ello que nos enfocamos en la búsqueda de patrones antes descritos de éstas<sup>32,38,82</sup>.

Existe evidencia de que tanto por extracción metanólica como acuosa se pueden obtener saponinas esteroidales a partir de pulpa de agave, sin embargo, en infusión se obtienen de manera más directa<sup>83</sup>, lo anterior puede ser causal de que hayamos encontrado efecto en el extracto acuoso.

Se determinó la presencia de hecogenina en el extracto acuoso, Fernández-Herrera en el 2010 la determinó como precursora de compuestos con actividad antineoplásica apoptótica específica en células de cáncer cervical; además de no producir citotoxicidad en células no transformadas<sup>84</sup>. Lo anterior puede explicar el por qué en nuestro trabajo no se observaron signos de toxicidad en el límite de prueba. Se ha encontrado también que la hecogenina posee actividad antiinflamatoria igual y en algunos casos más potente que la producida por la administración de dexametasona 21-fosfato, sin observar efectos adversos como el daño gástrico e inmunosupresión<sup>35</sup>. A pesar de ser un tema controversial, autores como Erdman en 2010 señalan que el proceso inflamatorio es esencial para el crecimiento tumoral y que la actividad antiinflamatoria de células del sistema inmune tiene un efecto antineoplásico<sup>85</sup>. Teniendo en cuenta lo anterior, es posible que la inhibición de la implantación tumoral observada en nuestro estudio pueda deberse al efecto antiinflamatorio de la hecogenina presente en el extracto acuoso, para demostrar ello, tendríamos que determinar la relevancia del proceso inflamatorio en la implantación tumoral de nuestro modelo, así como la participación antiinflamatoria de las células del sistema inmune y el efecto del extracto sobre ellas. Por otra parte autores han demostrado un efecto antiproliferativo benéfico en procesos patológicos

como en el caso de artritis reumatoide (AR), en la cual Liagre en 2007 señala que la hecogenina establece un control mitogénico inhibiendo la MAPK y desencadenando la apoptosis por la sobreexpresión de COX-2 y PGE<sub>2</sub> en los sinoviocitos tipo fibroblasto, células necesarias para el proceso patológico de la AR<sup>86</sup>. De igual manera Hirano en 1994 demostró que la hecogenina entre otros compuestos esteroidales de origen vegetal es capaz de modificar el metabolismo del sodio-potasio en células prostáticas con hiperplasia benigna, disminuyendo su crecimiento<sup>87</sup>. Lo anterior puede sustentar el indicio de disminución en el crecimiento tumoral observado en el presente estudio.

Al ser el extracto empleado en esta estudio una mezcla compleja de compuestos aun no descritos, no podemos afirmar que la actividad citotóxica *in vitro* e inhibitoria de la implantación tumoral *In vivo* observada se deba únicamente a la presencia de la hecogenina, se sabe que las plantas de la familia Agavaceae poseen una amplia variedad de saponinas y sapogeninas esteroidales las cuales presentan variaciones entre las especies del género *Agave*, en ningún estudio analítico se ha observado solamente un tipo de saponinas por especie<sup>29,32</sup>. Por lo anterior, suponemos debe de haber otras variedades de saponinas esteroidales en el *Agave mapisaga* lo que abre un camino para la descripción química del extracto. Si bien el patrón isotópico de la hecogenina encontrada coincide con los descritos en otras investigaciones, es posible que presente isoformas distintas o cambios de sitio en los grupos funcionales, para saberlo será necesario ocupar otras técnicas de descripción molecular como cristalografía o resonancia magnética. Es importante recordar que en los compuestos esteroidales, diferencias estructurales sutiles se traducen en importantes cambios en el efecto farmacológico y la potencia terapéutica<sup>88</sup>. Lo anterior refuerza la necesidad de describir a mayor profundidad la estructura de los compuestos contenidos en la pulpa del *A. mapisaga* pues hay elementos para pensar que las singularidades moleculares de sus saponinas esteroidales pudieran estar aportando el efecto farmacológico *in vivo* observado en el presente trabajo.

Podemos concluir que con la información obtenida en la composición del extracto acuoso de *Agave mapisaga*, se pueden explicar los resultados obtenidos en cuanto a su actividad citotóxica y antineoplásica. Sin embargo es fundamental continuar con su separación y análisis, ya que fue posible observar respuestas significativas partiendo de una mezcla ampliamente heterogénea y sin purificar, por lo que se podría suponer que en caso de aislarse y concentrarse los compuestos activos el efecto antineoplásico sería mayor.

Ambos extractos de *Agave mapisaga* mostraron actividad citotóxica en el metanólico se encontró una mayor actividad en la concentración más alta (2mg/pozo), la cual dio efectos incluso comparable con las células expuestas a CDDP(II). Sin embargo, se observó que en la concentración más baja (0.125mg/pozo) fue el extracto acuoso el que conservó actividad citotóxica con respecto del testigo negativo. Ante estos resultados, consideramos que el extracto acuoso tenía mayor posibilidad de mostrar efectos en el modelo *in vivo*, ya que de usar el extracto

metanólico para observar el efecto antes descrito de 2 mg para 10 mil células en un individuo completo se necesitarían concentraciones muy elevadas de extracto. Por otra parte, teniendo en cuenta la actividad significativa del extracto acuoso a bajas concentraciones consideramos probable, alcanzar una concentración con efectos significativos con en un individuo completo usando el extracto acuoso.

La citotoxicidad *in vitro* contra células de origen neoplásico encontrada en nuestra investigación coincide con lo reportado por distintos autores, donde se han probado saponinas esteroidales extraídas de distintas especies de agaves con actividad citotóxica, Chen en el 2011 encontró que el compuesto del *Agave sisalana* tiene actividad en células neoplásicas de cáncer de mama (MCF-7), glioblastoma (SF-268) y cáncer de pulmón (NCI-H460) observando citotoxicidad significativa<sup>32</sup>. De igual manera Yokosuka en 2009 demostró que compuestos extraídos del *Agave utahensis* tienen actividad citotóxica en células de leucemia promielocítica humana<sup>29</sup> y Gutiérrez-Urbe en 2013 encontró que la mezcla del jugo de varias especies de agave posee actividad anti cancerígena en células de cáncer de colon, de próstata y de hígado<sup>89</sup>. Podemos concluir que las células de cáncer de próstata epitelial empleadas en esta investigación mostraron susceptibilidad a los extractos del *Agave mapisaga* en un modelo *in vitro*.

En estudios *in vitro*, se ha demostrado que la actividad citotóxica de las saponinas esteroidales derivadas del agave, está relacionada con la síntesis de óxido nítrico a través de la enzima óxido nítrico sintetasa 2 (NOS2, iNOS)<sup>31</sup>. Se sabe que el óxido nítrico es un mediador de múltiples rutas metabólicas y con una importante participación en la activación de mecanismos de muerte celular, su actividad citotóxica en células neoplásicas se lleva a cabo por varias rutas. A través de su efecto de nitrosilación de grupos tiol provoca los siguientes efectos: inhibe la actividad de la citocromo oxidasa disminuyendo el metabolismo energético<sup>90,91</sup>, inhibe la unión del factor nuclear kappa B (NF-kB) al DNA y con ello disminuye la producción de moléculas antiapoptóticas<sup>92</sup>, evita la unión de p53 al DNA y promueve su salida al citosol posibilitando su unión a la membrana mitocondrial externa, desencadenando la salida de citocromo C y la activación de la apoptosis, inhibe la polimerización y activación de HIF-1 $\alpha$  y con ello disminuye la angiogénesis. Otra forma en la que actúa es a través de su efecto oxidante sobre el DNA, produciendo daño al material genético y desencadenando la activación de la apoptosis.

Teniendo en cuenta los efectos descritos en la literatura es que decidimos como ruta lógica de la fase *in vitro* del estudio, poder demostrar la actividad citotóxica de los extractos y su correlación con la presencia del óxido nítrico en el sobrenadante del cultivo celular. Sin embargo, no fue posible detectarlo mediante el reactivo de Griess a pesar de hacer una cinética de su presencia a las 4, 8, 24 y 48 horas. El no haberlo encontrado en esos tiempos vuelve pertinente su búsqueda de manera indirecta, a través de la enzima NOS2 por RT-PCR o inmunofluorescencia, así como realizar una cinética a tiempos más cortos y con un mayor número de células por pozo. De no

encontrar la participación del óxido nítrico será necesaria la búsqueda de otros fenómenos celulares de inducción de muerte celular o de inhibición de la proliferación, bajo este supuesto, para identificar la causalidad del efecto citotóxico *in vitro* observado sería necesario realizar la búsqueda señales de muerte celular como la traslocación extracelular de fosfatidil serina, la permeabilización de membranas, la segmentación del DNA, la activación de caspasas o la salida de citocromo C hacia el citosol entre otros eventos relacionados a la muerte celular.

Uno de los hallazgos más relevantes fue el efecto del tratamiento sobre la implantación tumoral, donde se observó que del grupo de animales que recibieron 50 mg/kg del extracto acuoso del *Agave mapisaga*, una menor cantidad de ellos desarrolló el tumor subcutáneo. Existen evidencias de actividad antineoplásica de extractos acuoso y metanólico de *Agave pacifica* en el sistema de Walker carcinosarcoma 256 en ratas. Es importante señalar que a partir de estos extractos fue posible aislar hecogenina así como tiogenina<sup>83</sup>.

Resulta interesante que el extracto acuoso de *Agave mapisaga* demostró ser activo para disminuir la implantación tumoral a una concentración de 50mg/kg, pero no lo hizo a una concentración de 100 mg/kg. De igual manera, en la evaluación la función antitumoral del tratamiento, se observó una tendencia de actividad antineoplásica: los tumores en los animales del grupo que recibió 50 mg/kg crecieron más lento durante los primeros 17 días, y después tuvieron un crecimiento normal. Mientras que los tumores en los animales del grupo que recibió 100 mg/kg tuvieron un crecimiento normal durante los primeros 17 días, pero a partir del día 24 se observó la tendencia antes mencionada de desaceleración en el crecimiento tumoral.

Lo anterior da indicios de la existencia de un rango de actividad terapéutica, lo cual coincide con lo reportado por Shao en 1996 donde se encontró que la actividad antineoplásica de saponinas esteroidales, muestra un efecto citostático en rangos de concentración intermedios, en caso de exceder las concentraciones citostáticas la célula neoplásica muere o puede expresar otros mecanismos de resistencia a la apoptosis<sup>82</sup>.

En nuestra investigación se observó que la aparición y el crecimiento de los tumores de la línea Pec-src por inoculación subcutánea ocurrió de manera distinta a lo reportado, ya que en nuestro estudio fue posible detectar los tumores hasta el día 13 post inoculación, los cuales, al momento del sacrificio (día 32) presentaron volúmenes 0.8 cm<sup>3</sup> y no se detectó metástasis a ningún órgano, mientras que en lo reportado por Xiaoming Ju en el 2012, fue posible detectar los tumores desde el día 4 post inoculación y al día 30 se obtuvieron tumores de 4.1 cm<sup>3</sup>, así como metástasis en pulmones<sup>50</sup>.

El extracto acuoso de *Agave mapisaga* demostró ser inocuo ingerido a concentraciones de límite de prueba (3000 mg/kg), como a lo largo del experimento en el grupo testigo (toxicidad crónica),

será necesario realizar otros estudios como el de genotoxicidad para tener un panorama más amplio acerca de la seguridad del uso del extracto.

Si bien lo que ha indicado como tratamiento en cáncer de próstata para seres humanos es el docetaxel, en este estudio utilizamos como testigo positivo el *cis*-diaminocloroplatino(II) (CDDP(II)) el cual demostró poseer actividad en nuestro modelo, es sabido que el cáncer de próstata es afectado por el cisplatino aunque existen algunos tipos de cáncer que pueden desarrollar resistencia<sup>93</sup>.

Se llevó a cabo la descripción anatomopatológica de los animales *post mortem*, en búsqueda de focos metastásicos así como lesiones o cambios que pudieran estar relacionados con el procedimiento experimental. Sin embargo, en ninguno de los animales fue posible observar células neoplásicas en los órganos analizados. Se observaron anomalías patológicas entre las que destacan esplenomegalia y algunos linfonodos aumentados de tamaño; sin embargo, los casos se observaron en distintos grupos incluyendo los testigos, por lo que no se le puede atribuir al efecto de los tratamientos.

Teniendo en cuenta el efecto reportado por Chen en el 2014 acerca de la capacidad de las saponinas esteroidales producto de los extractos de agave para inducir la síntesis de NO<sup>31</sup>, así como la relevancia de los macrófagos de fenotipo M1 productores de NO en el microambiente tumoral<sup>94</sup>, fue que consideramos necesario describir los fenotipos de macrófagos dentro de los tumores a partir de cortes de tejido incluidos en parafina. Se realizaron los procedimientos correspondientes con base en protocolos probados para inmunofluorescencia<sup>95</sup> sin embargo no fue posible controlar la autofluorescencia de la muestra debido a la presencia de parafina.

## Conclusiones finales

1. El extracto acuoso de *Agave mapisaga* demostró no tener cambios generales en su composición ante condiciones de pH de 2, así como al permanecer a temperatura ambiente ni por acción de congelación y descongelación. Se encontró la presencia de la saponina esteroideal hecogenina.
2. En nuestro modelo se observó que el extracto acuoso de *Agave mapisaga* a una concentración de 0.125 mg por pozo fue capaz de inhibir la viabilidad de células de cáncer de próstata PEC-Src.
3. Encontramos que la administración del extracto acuoso de *Agave mapisaga* a una dosis de 50 mg/kg por día durante 34 días inhibió la implantación tumoral a partir de células de cáncer de próstata PEC-Src en un modelo murino.



4. El extracto demostró no ser tóxico a nivel de individuo, recibiendo una dosis de 3000 mg/kg ni recibiendo 100 mg/kg por día durante 34 días lo cual hasta el momento indica seguridad.

## PROSPECTIVA

Es necesario realizar las pruebas de citotoxicidad en células no transformadas para determinar si la actividad citotóxica es selectiva.

Teniendo en cuenta que no nos fue posible determinar la presencia de macrófagos por inmunofluorescencia será necesario determinarlos por la técnica de inmunohistoquímica dado que ya se cuenta con los tejidos incluidos en parafina.

Es necesario obtener más evidencia de la actividad citotóxica *in vitro* e inhibidora de la implantación *in vivo* demostrada en este estudio, por lo que será necesario realizarlo con otros tipos de neoplasias y de ser posible con una duración mayor que permita observar eventos metastásicos y el efecto del extracto en éstos.

En caso de encontrar actividad antineoplásica del extracto de *Agave mapisaga* en otros modelos de cáncer que refuercen la evidencia encontrada en este estudio, se tiene la posibilidad de dar de alta un remedio herbolario ante la COFEPRIS.

Con base en los requisitos que establece la COFEPRIS para dar de alta un producto como remedio herbolario, el presente trabajo aporta la cobertura de los incisos.

- d) Descripción del proceso de fabricación
- e) Certificado de autenticación taxonómica por cada componente o el documento en el que conste la información sobre la identidad de los componentes
- f) Denominación científica y popular de la(s) planta(s) empleada(s). Indicaciones y tiempo para su uso
- h) Fórmula cuali-cuantitativa de los componentes y aditivos

Quedando pendiente el llenado del formato de autorizaciones y certificados. El pago de derechos. El certificado de análisis del producto terminado de aspectos organolépticos, físicos, microbiológicos y ausencia de residuos tóxicos. El proyecto de marbete o etiqueta.

## Referencias

- 1 Miranda, F. *Vegetación de la vertiente del Pacífico de la Sierra Madre de Chiapas (México) y sus relaciones florísticas*. (National Research Council of the Philippines, University of the Philippines, 1957).
- 2 Miranda, F. & Xolocotzi, E. H. Los tipos de vegetación de México y su clasificación. (Colegio de Postgraduados, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, 1963).
- 3 Flores Mata, G. Memoria del mapa de tipos de vegetación de la República Mexicana. (1971).
- 4 Sarukhán, J. *Estudio sucesional de un área talada en Tuxtepec, Oax.* (Comisión de Estudios sobre la Ecología de Dioscóreas, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, SAG México, 1964).
- 5 Rzedowski, J. & Huerta, L. *vegetación de México*. Vol. 432 (Limusa México, 1978).
- 6 Rzedowski, J. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta botánica mexicana*, 3-21 (1991).
- 7 Instituto Nacional de Estadística, G. e. I. *Guía para la interpretación de cartografía uso del suelo y de vegetación: Escala 1: 250 000*. (INEGI, 2009).
- 8 García-Mora, T. J. & Mas, J.-F. Evaluación de imágenes del sensor MODIS para la cartografía de la cobertura del suelo en una región altamente diversa de México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* **63**, 83-94 (2011).
- 9 Sarukhán, J. Capital natural y bienestar social. *México DF: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad* (2006).
- 10 Caldas, E. F. & Quantin, P. *Suelos de regiones volcánicas: Tenerife, Islas Canarias*. Vol. 4 (Editorial CSIC-CSIC Press, 1982).
- 11 Cervantes Ramírez, M. C. Plantas de importancia económica en las zonas áridas y semiáridas de México. (2002).
- 12 Luis, G.-R. J. in *Seminario de información estadística y geográfica para prevenir y mitigar los efectos de la sequía e inundaciones en la población y la economía*. (ed Comisión Nacional Forestal) 30 (SEMARNAT).
- 13 Geografía, I. N. d. E. y.
- 14 Marañón, B. & Fritscher, M. La agricultura mexicana y el TLC: El desencanto neoliberal. *Debate Agrario* (1988).
- 15 De Janvry, A. & Sadoulet, E. El TLC y la agricultura: evaluación inicial. *Investigación económica*, 13-60 (1997).
- 16 Social, C. n. d. E. d. I. P. d. D. (ed CONEVAL) (México, D. F., 2012).
- 17 Federal, A. P. (2012).
- 18 Paredes, V. *Pulque y cerveza la guerra de campañas publicitarias*, <<http://mundoejecutivo.com.mx/management/2014/08/28/pulque-cerveza-guerra-campanas-publicitarias>> (2016).
- 19 Portères, R. L'ethnobotanique: place-objet-méthode-philosophie. *Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée* **8**, 102-109 (1961).
- 20 Xolocotzi, H. in *Congreso Mexicano de Botánica (6: 1975: Jalapa, Ver.)*.
- 21 Gentry, H. S. & Sauck, J. R. The stomatal complex in Agave: groups Deserticolae, Campaniflorae, Umbelliflorae. *Proc. Calif. Acad. Sci* **41**, 371-387 (1978).
- 22 Medina, A. & Quezada, N. Panorama de las artesanías otomíes del Valle del Mezquital: ensayo metodológico. (1975).
- 23 Bahre, C. J. & Bradbury, D. E. Manufacture of mescal in Sonora, Mexico. *Economic Botany* **34**, 391-400 (1980).

- 24 Organization, W. H. Medicina tradicional: necesidades crecientes y potencial. (2002).
- 25 Salud, O. M. d. I. (OMS Ginebra, 2013).
- 26 Patricia, M. P. Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. E. *Volumen 10* (2009).
- 27 México., I. d. B. U. N. A. d. Vol. "Agave sp. - IBUNAM:MEXU:AGA7874". 1 (2010).
- 28 Martínez-Hernández, A., Mena-Espino, M., Herrera-Estrella, A. H. & Martínez-Hernández, P. Construcción de bibliotecas de ADNc y análisis de expresión génica por RT-PCR en agaves. *Revista latinoamericana de química* **38**, 21-44 (2010).
- 29 Yokosuka, A. & Mimaki, Y. Steroidal saponins from the whole plants of Agave utahensis and their cytotoxic activity. *Phytochemistry* **70**, 807-815 (2009).
- 30 Eskander, J., Lavaud, C. & Harakat, D. Steroidal saponins from the leaves of Agave macroacantha. *Fitoterapia* **81**, 371-374 (2010).
- 31 Chen, H. *et al.* iTRAQ-based proteomic analysis of dioscin on human HCT-116 colon cancer cells. *Proteomics* **14**, 51-73 (2014).
- 32 Chen, P.-Y. *et al.* Cytotoxic steroidal saponins from Agave sisalana. *Planta Medica-Natural Products and Medicinal Plant Research* **77**, 929 (2011).
- 33 Yang, C.-R. *et al.* Antifungal activity of C-27 steroidal saponins. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **50**, 1710-1714 (2006).
- 34 Dunder, R. J. *et al.* Applications of the hexanic fraction of Agave sisalana Perrine ex Engelm (Asparagaceae): control of inflammation and pain screening. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **108**, 263-271 (2013).
- 35 Peana, A. T., Moretti, M. D. L., Manconi, V., Desole, G. & Pippia, P. Anti-Inflammatory Activity of Aqueous Extracts and Steroidal Sapogenins of Agave americana. *Planta Med* **63**, 199-202, doi:10.1055/s-2006-957652 (1997).
- 36 Osbourn, A. Saponins and plant defence—a soap story. *Trends in plant science* **1**, 4-9 (1996).
- 37 Leal-Díaz, A. M. *et al.* Effect of Agave americana and Agave salmiana Ripeness on Saponin Content from Aguamiel (Agave Sap). *Journal of agricultural and food chemistry* **63**, 3924-3930 (2015).
- 38 Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. & Becker, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British journal of Nutrition* **88**, 587-605 (2002).
- 39 Jemal, A. *et al.* Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **61**, 69-90, doi:10.3322/caac.20107 (2011).
- 40 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell* **144**, 646-674 (2011).
- 41 World Health Organization, I. A. f. R. o. C. (2012).
- 42 Reynoso-Noverón, N. & Mohar, A. El cáncer en México: propuestas para su control. *salud pública de méxico* **56**, 418-420 (2014).
- 43 Ford, D., Easton, D. F., Bishop, D. T., Narod, S. A. & Goldgar, D. E. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *The Lancet* **343**, 692-695 (1994).
- 44 Lee, J., Ledermann, J. & Kohn, E. PARP Inhibitors for BRCA1/2 mutation-associated and BRCA-like malignancies. *Annals of oncology*, mdt384 (2013).
- 45 Augello, M. A., Den, R. B. & Knudsen, K. E. AR function in promoting metastatic prostate cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 1-13 (2014).
- 46 Dryhurst, D. & Ausió, J. Histone H2A. Z deregulation in prostate cancer. Cause or effect? *Cancer and Metastasis Reviews*, 1-11 (2014).
- 47 Gundem, G. *et al.* The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature* **520**, 353-357 (2015).

- 48 Arnold, J. & Isaacs, J. Mechanisms involved in the progression of androgen-independent prostate cancers: it is not only the cancer cell's fault. *Endocrine-related cancer* **9**, 61-73 (2002).
- 49 Sicoli, D. *et al.* CCR5 Receptor Antagonists Block Metastasis to Bone of v-Src Oncogene-Transformed Metastatic Prostate Cancer Cell Lines. *Cancer research* **74**, 7103-7114 (2014).
- 50 Ju, X. *et al.* Novel Oncogene-Induced Metastatic Prostate Cancer Cell Lines Define Human Prostate Cancer Progression Signatures. *Cancer research* **73**, 978-989 (2013).
- 51 Shurin, M. R., Umansky, V., Malyguine, A. & Scientist, P. *The tumor immunoenvironment*. (Springer, 2013).
- 52 Sica, A. *et al.* in *Seminars in cancer biology*. 349-355 (Elsevier).
- 53 Van Ginderachter, J. A. in *The Tumor Immunoenvironment* 405-430 (Springer, 2013).
- 54 Noy, R. & Pollard, J. W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* **41**, 49-61 (2014).
- 55 Palmer, R. M., Ferrige, A. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. (1987).
- 56 MacMicking, J., Xie, Q.-w. & Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology* **15**, 323-350 (1997).
- 57 Muntané, J., De la Rosa, A. J., Marín, L. M. & Padillo, F. J. Nitric oxide and cell death in liver Cancer cells. *Mitochondrion* **13**, 257-262 (2013).
- 58 Maharath, A., Fucharoen, S. & Tanyong, D. I. p53 and nitric oxide are involved in cytokine-induced apoptosis in Kasumi-1 and Molt-4 Leukemias cells. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* **32**, DOI 10.12932/AP10378. 12932.12932. 12013 (2013).
- 59 Maciag, A. E. *et al.* Nitric Oxide (NO) Releasing Poly ADP-ribose Polymerase 1 (PARP-1) Inhibitors Targeted to Glutathione S-Transferase P1-Overexpressing Cancer Cells. *Journal of medicinal chemistry* **57**, 2292-2302 (2014).
- 60 McKnight, J. A. Principles of chemotherapy. *Clinical techniques in small animal practice* **18**, 67-72 (2003).
- 61 Joensuu, H. Systemic chemotherapy for cancer: from weapon to treatment. *The Lancet Oncology* **9**, 304 (2008).
- 62 Krukiewicz, K. & Zak, J. K. Biomaterial-based regional chemotherapy: Local anticancer drug delivery to enhance chemotherapy and minimize its side-effects. *Materials Science and Engineering: C* **62**, 927-942 (2016).
- 63 McGuire, W. P. *et al.* Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *New England Journal of Medicine* **334**, 1-6 (1996).
- 64 Tosti, A., Piraccini, B., Vincenzi, C. & Misciali, C. Permanent alopecia after busulfan chemotherapy. *British Journal of Dermatology* **152**, 1056-1058 (2005).
- 65 Sun, C. C. *et al.* Rankings and symptom assessments of side effects from chemotherapy: insights from experienced patients with ovarian cancer. *Supportive Care in Cancer* **13**, 219-227 (2005).
- 66 Boyd, M. R. in *2.4. Cell Line Panel* (ed National Cancer Institute) (NCI, 1995).
- 67 Aslam, M. S. *et al.* Side Effects of Chemotherapy in Cancer Patients and Evaluation of Patients Opinion about Starvation Based Differential Chemotherapy. *Journal of Cancer Therapy* **2014** (2014).
- 68 Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of natural products* **70**, 461-477 (2007).

- 69 Cendales, D. R. M. & Suárez, L. E. C. Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibitoras de apoptosis (IAP). *Revista Colombiana de Cancerología* **20**, 124-134 (2016).
- 70 DeVita, V. T. & Schein, P. S. The use of drugs in combination for the treatment of cancer: rationale and results. *New England Journal of Medicine* **288**, 998-1006 (1973).
- 71 Hitt, E. Homoharringtonine effective in CML patients. *The lancet oncology* **3**, 259 (2002).
- 72 Cragg, G. M., Grothaus, P. G. & Newman, D. J. Impact of Natural products on developing new anti-cancer agents†. *Chemical reviews* **109**, 3012-3043 (2009).
- 73 Biganzoli, L. *et al.* Taxanes in the elderly: Can we gain as much and be less toxic? *Critical reviews in oncology/hematology* **70**, 262-271 (2009).
- 74 Peñalver, I. M. Cáncer y medicina alternativa. *Rev Cubana Oncol* **15**, 77-80 (1999).
- 75 Maher, E., Young, T. & Feigel, I. Complementary therapies used by patients with cancer. *BMJ: British Medical Journal* **309**, 671 (1994).
- 76 PRATHNADI, P. TRATAMIENTO PALIATIVO DEL CÁNCER CERVICAL AVANZADO MEDIANTE RADIOTERAPIA Y FITOTERAPIA TAILANDESA COMO TRATAMIENTO DE APOYO.
- 77 Nobili, S. *et al.* Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research* **59**, 365-378 (2009).
- 78 Deljanin, M. *et al.* Chelidonium majus crude extract inhibits migration and induces cell cycle arrest and apoptosis in tumor cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* **190**, 362-371 (2016).
- 79 Waizel Bucay, J. & Bucay, J. W. *Las Plantas medicinales y las ciencias: una visión multidisciplinaria.* (2006).
- 80 Salud, O. M. d. I. in *56 Asamblea Mundial de Salud.* (ed Informe de la secretaria) 1-5 (OMS).
- 81 Whitten, K. W., Gailey, K. D., Davis, R. E., Ortega, M. T. A. & Muradás, R. M. G. *Química general.* (McGraw-Hill Madrid, 1992).
- 82 Shao, Y. *et al.* Anti-tumor activity of the crude saponins obtained from asparagus. *Cancer letters* **104**, 31-36 (1996).
- 83 Jado, A. I. Potential Anti-tumor Agents from Agave Pacifica (Trelease) Family Amaryllidaceae. (1971).
- 84 Fernández-Herrera, M. A. *et al.* Synthesis of 26-hydroxy-22-oxocholestanic frameworks from diosgenin and hecogenin and their in vitro antiproliferative and apoptotic activity on human cervical cancer CaSki cells. *Bioorganic & medicinal chemistry* **18**, 2474-2484 (2010).
- 85 Erdman, S. E. & Poutahidis, T. Cancer inflammation and regulatory T cells. *International journal of cancer* **127**, 768-779 (2010).
- 86 Liagre, B., Vergne-Salle, P., Leger, D. Y. & Beneytout, J.-L. Inhibition of human rheumatoid arthritis synovial cell survival by hecogenin and tigogenin is associated with increased apoptosis, p38 mitogen-activated protein kinase activity and upregulation of cyclooxygenase-2. *International journal of molecular medicine* **20**, 451-460 (2007).
- 87 Hirano, T., Homma, M. & Oka, K. Effects of Stinging Nettle Root Extracts and Their Steroidal Components on the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase of the Benign Prostatic Hyperplasia1. *Planta medica* **60**, 30-33 (1994).
- 88 Serra, H. A., Roganovich, J. M. & Rizzo, L. Glucocorticoides: paradigma de medicina traslacional. De lo molecular al uso clínico. *Medicina* **72**, 5-10 (2012).
- 89 Gutierrez-Urbe, J. A. & Serna-Saldivar, S. (Google Patents, 2013).

- 90 Brown, G. C. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS letters* **369**, 136-139 (1995).
- 91 Jaffrey, S. R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C. D., Tempst, P. & Snyder, S. H. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nature cell biology* **3**, 193-197 (2001).
- 92 MARSHALL, H. E., Merchant, K. & Stamler, J. S. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *The FASEB Journal* **14**, 1889-1900 (2000).
- 93 Nomura, T., Yamasaki, M., Nomura, Y. & Mimata, H. Expression of the inhibitors of apoptosis proteins in cisplatin-resistant prostate cancer cells. *Oncology reports* **14**, 993-997 (2005).
- 94 Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E. I. & Munder, M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *M1/M2 Macrophages: The Arginine Fork in the Road to Health and Disease*, 13 (2015).
- 95 Tecnology, C. S. *Immunofluorescence General Protocol*, 2013).

## ANEXOS

### Anexo1. Requisitos documentales para dar de alta un remedio herbolario ante la COFEPRIS

- a) Formato de Autorizaciones, Certificados y Visitas, debidamente requisitado.
- b) Original y dos copias del comprobante de pago de derechos, en términos de la Ley Federal de Derechos
- c) Certificado de análisis de producto terminado de aspectos organolépticos, físicos y microbiológicos y ausencia de residuos tóxicos
- d) Descripción del proceso de fabricación
- e) Certificado de autenticación taxonómica por cada componente o el documento en el que conste la información sobre la identidad de los componentes
- f) Denominación científica y popular de la(s) planta(s) empleada(s). Indicaciones y tiempo para su uso
- g) Proyectos de marbete o etiqueta
- h) Fórmula cuali-cuantitativa de los componentes y aditivos (deberá ir firmada por el responsable sanitario)

COFEPRIS-04-009-A Solicitud de Clave Alfanumérica de Remedios Herbolarios. Modalidad A.- Solicitud de Clave Alfanumérica de Remedios Herbolarios de Fabricación Nacional.