



## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS  
BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA

ESTUDIO DEL EFECTO ANTITUMORAL DE LOS ÁCIDOS  
MASTICADIENÓNICO Y 3 -OH MASTICADIENOICO EN UN  
MODELO DE XENOTRASPLANTES DE CÉLULAS PC-3 Y  
MDA-MB 231

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA  
QBP. MA. BEATRIZ SÁNCHEZ MONROY

TUTOR PRINCIPAL  
DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ  
INSTITUTO DE QUÍMICA

COMITÉ TUTOR  
DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA  
DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.

MAYO DE 2018.



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.

INSTITUTO DE QUÍMICA

PDCB/grad/IQ/2018

**C. P. AGUSTÍN MERCADO**

Director de Certificación y Control  
Documental Escolar, UNAM  
Presente

Nos permitimos informarle que el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión **422<sup>a</sup>** del 17 de enero de 2018 designó el siguiente jurado para el examen de **DOCTORA EN CIENCIAS** de MA. BEATRIZ SÁNCHEZ MONROY con número de cuenta **512012108**, con la tesis titulada **"ESTUDIO DEL EFECTO ANTITUMORAL DE LOS ÁCIDOS MASTICADIENÓNICO Y 3 $\alpha$ -OH MASTICADIENOICO EN UN MODELO DE XENOTRASPLANTES DE CÉLULAS PC-3 Y MDA-MB 231"** dirigida por el Dr. **Mariano Martínez Vázquez**.

Presidente: Dra. Leticia Rocha Zavaleta  
Secretario: Dr. Mariano Martínez Vázquez  
Vocal: Dr. Alejandro Manuel García Carrancá  
Vocal: Dra. Martha Lydia Macías Ruvalcaba  
Vocal: Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizará a solicitud del alumno, **con cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base a lo establecido en el **Artículo 31** del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Atentamente  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, a 17 de enero de 2018



**DRA. AUREA OROZCO RIVAS**  
COORDINADORA

c.c.p. Expediente alumno

---

---

## AGRADECIMIENTOS

---

---

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio 1-4 de productos naturales, del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México en colaboración con:

- ) El Laboratorio de Inmunoterapia Experimental e Ingeniería de Tejidos. Departamento de Biología Celular y Tisular. Facultad de Medicina. UNAM.
- ) El Laboratorio de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

En calidad de gratitud, la autora de esta obra reconoce al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los apoyos financieros otorgados por el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), proyecto 152650 y beca 264325. Así como los apoyos tipo 1 y 2 complementarios para Mujeres Indígenas Becarias CONACyT.

A la Fundación Carlos Slim por el otorgamiento de la distinción de Excelencia en Enfermería, Medicina y Nutrición.

A los integrantes del Comité Tutor:

Dr. Mariano Martínez Vázquez

Dra. Marcela Lizano Soberón

Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo

A los colaboradores de este trabajo:

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Dra. Nadia Jacobo Herrera

Dr. Andrés E. Castell Rodríguez

M en C. Ed. Hortensia Segura Silva

M en C. Antonio Nieto Camacho

Dra. Maritza García García

Biol. Beatriz Hernández Téllez

Biol. Fernanda Reyes Riquelme

A los integrantes del jurado del examen de grado por sus importantes aportaciones al realizar la revisión de la tesis.

---

---

## DEDICATORIA

---

---

Esta tesis doctoral, ha requerido de mucho esfuerzo y dedicación. No obstante, el apoyo integral que requiere un ser humano para la culminación de un proyecto de esta envergadura, va más allá del soporte académico. En este sentido, dedico este trabajo a:

- Mi hija, Alitzel Montañez Sánchez, por ser parte de mi vida y fortalecerme cada día, en tu compañía he aprendido a desarrollar todas las metas que me proponga. Te amo princesa hermosa.
  
- Mi compañero, Gustavo Montañez Cruz, por tu apoyo incondicional, paciencia y calidad humana. Gracias por compartir juntos en espacio y tiempo la música de la vida.
  
- Mi hermana, María I. Sánchez Monroy. Gracias por enseñarme a luchar sin descanso.
  
- A mis padres, María Dolores Monroy de la Vega y Pascual Sánchez Morán, un agradecimiento especial.

---

---

## ÍNDICE GENERAL

---

---

TEMA	PÁGINA
ÍNDICE GENERAL.....	iii-v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vi-vii
ÍNDICE DE CUADROS .....	viii
RESUMEN.....	xix-xi
ABSTRACT.....	xii-xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1-18
1.1. Cáncer.....	1
1.2. Epidemiología.....	1
1.3 Factores de riesgo para los cánceres de mama y próstata.....	2
1.4 Estrategias de tratamiento para el cáncer.....	3
1.5 La quimioterapia antitumoral.....	3-6
1.6 La inmunoterapia antitumoral: aspectos de interés en este estudio.....	7-12
1.6.1 Anticuerpos monoclonales.....	7
1.6.2 Inmunotoxinas.....	7
1.6.3 Conjugados de anticuerpos monoclonales y fármacos citotóxicos.....	7-8
1.6.4 Vacunas con células presentadoras de antígenos.....	8-9
1.6.5 Inmunomoduladores.....	10-12
1.7 Marcadores moleculares de proliferación celular.....	13
1.7.1 Antígeno nuclear de células en proliferación.....	13
1.7.2 Proteína nuclear Ki67.....	13
1.8 Marcadores moleculares de la maduración de células dendríticas.....	13-14
1.8.1 Complejo principal de histocompatibilidad I y II.....	15
1.8.2. CD40.....	16
1.8.3 CD80 y CD86.....	16-17
2. ANTECEDENTES.....	18-22
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
4.HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVOS.....	24
5.1 Objetivo general	
5.2 Objetivos específicos	
6. MATERIALES Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	26-48
6.1 Material vegetal.....	26

6.2 Aislamiento de los ácidos masticadienónico (AMD) y 3 -hidroxi masticadienoico (3 $\beta$ -OH AMD).....	26-28
6.3 Solubilidad de los triterpenos AMD y 3 -OH AMD.....	27-28
6.4 Selección de las líneas celulares tumorales.....	28-30
6.5 Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares.....	30-31
6.6 Ensayos de citotoxicidad y determinación de la viabilidad celular mediante el método del cristal violeta.....	31-33
6.7 Determinación de células viables mediante el método de tinción por exclusión.....	33-34
6.8 Determinación de la DL <sub>50</sub> de los ácidos masticadienónico y 3 $\beta$ -OH masticadienoico.....	34-35
6.9 Ensayo de inhibición del crecimiento tumoral sobre xenotrasplantes de carcinoma de mama y próstata en un modelo murino.....	35-38
6.9.1 Xenotrasplantes de células PC-3.....	36
6.9.2 Xenotrasplantes de células MDA-MB-231.....	36-38
6.10 Preservación de los tejidos tumorales y tinción por la técnica hematoxolina-eosina.....	49-40
6.11 Inmunolocalización de factores de proliferación celular en tejidos tumorales de carcinoma de próstata.....	40-42
6.12 Determinación de apoptosis celular por la técnica de TUNEL.....	42-43
6.13 Análisis microscópico de las muestras y adquisición de fotomicrografías.....	43-44
6.14 Análisis cuantitativo de las fotomicrografías.....	44-47
6.15 Efecto de los ácidos AMD y 3 -OH AMD sobre la maduración de células dendríticas .....	47
6.15.1 Obtención y caracterización de células dendríticas a partir de médula ósea.....	47-48
6.16 Análisis estadístico.....	48
7. RESULTADOS.....	49-72
7.1 Aislamiento y purificación de los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD.....	49-51
7.2 Efecto de los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD sobre la viabilidad de las líneas celulares PC-3 y MDA-MB 231.....	51-52

7.2.1 Efecto de los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD sobre la viabilidad de células no tumorales .....	52
7.3 Determinación de la dosis letal 50 de los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD.....	53-54
7.4 Actividad antitumoral de los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD en xenotrasplantes de células PC-3.....	54-58
7.5 Efecto antitumoral de los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD en xenotrasplantes de células MDA-MB-231 .....	59-61
7.6 Análisis histológico de los tejidos tumorales.....	62
7.7 Efecto antiproliferativo de los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD.....	63-67
7.8 Los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD inducen apoptosis <i>in vivo</i> .....	67-69
7.9 Efecto de los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD sobre la maduración de células dendríticas.....	69-72
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	73-79
9. CONCLUSIONES.....	80
10. LITERATURA CONSULTADA.....	81-91
11. APÉNDICE ARTÍCULO.....	92-104
12. APÉNDICE ESPECTROSCOPIA.....	105-113



---



---

## ÍNDICE DE FIGURAS

---



---

Figura	Título	Página
1	Blancos terapéuticos del cáncer descritos por Hanahan y Weinberg	3
2	Inducción de la inmunidad de células T contra cáncer de mama <i>in vivo</i>	9
3	Moléculas involucradas en el mecanismo de los adyuvantes	11
4	Las hierbas medicinales chinas (CHM) como agentes de la maduración de las CD	12
5	Funciones efectoras de las CD	14
6	Características estructurales MHC I y II	15
7	Principales moléculas de la familia B7 y receptores de la familia TNF expresadas en células dendríticas y sus pares de unión en las células T durante la presentación antigénica	17
8	Los productos naturales como fuente de nuevos fármacos	18
9	Estructura química de los ácidos masticadienónico (AMD) y 3 $\alpha$ -OH masticadienoico (3 $\alpha$ -OH AMD)	22
10	Flujograma para detectar la viabilidad celular mediante el ensayo de cristal violeta	33
11	Evaluación del efecto antitumoral de los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD sobre xenotrasplantes de células MDA-MB-231	38
12a	Ventana de aplicación de la calibración espacial de 50 $\mu$ m	45
12b	Aplicación de la calibración de intensidad para determinar la densidad óptica	45
12c	Fragmentación de los colores a analizar en la cuantificación de productos inmunoreactivos de las tinciones por TUNEL	46
12d	Generación de resultados sobre áreas y DOI en cada fotomicrografía	47
13	Efecto antitumoral de los ácidos AMD (A) y 3 $\beta$ -OH AMD (B) <i>in vivo</i>	55
14	Efecto antitumoral de los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD sobre xenotrasplantes de células de carcinoma de mama triple negativo	59
15	Fotomicrografías representativas de los xenotrasplantes de células PC-3 (A) y MDA-MB-231 (B) teñidos con hematoxilina-eosina (HE)	62
16	Fotomicrografías representativas de la inmunotinción específica para Ki67.	63
17	Fotomicrografías representativas de la inmunotinción específica para PCNA	64
18	Efecto anti-proliferativo de los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD sobre los marcadores de proliferación celular PCNA (a) y Ki67 (b) en xenotrasplantes de células PC-3	65
19	Disminución de la expresión de los marcadores de proliferación celular PCNA y Ki67 determinada en función de la intensidad de la marca, a los	67

	21 días de tratamiento con los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD en xenotrasplantes de células PC-3	
20	Fotomicrografías representativas de la fragmentación del ADN determinada mediante el ensayo de TUNEL	68
21	Los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD inducen apoptosis en xenotrasplantes de células PC-3 (a) y MDA-MB-231(b)	69
22	Los ácidos AMD y 3 -OH AMD aumentan significativamente la expresión de la proteína CD80 en CD	70
23	Efecto de los triterpenos AMD y 3 -OH AMD sobre la expresión de CD86 en CD.	71
24	Los triterpenos AMD y 3 -OH AMD aumentan significativamente el porcentaje de CD positivas a CD40	72

---

---

## ÍNDICE DE CUADROS

---

---

Cuadro	Título	Página
1	Condiciones de tratamiento para algunos triterpenos que inhiben el crecimiento tumoral en modelos murinos	19-20
2	Características de la línea celular MDA-MB-231 (CRM-HTB-26)	29
3	Características de la línea celular PC-3 (ATCC CRL-1435).	30
4a	Resultados de la extracción de la corteza de <i>A. adstringens</i> con hexano y acetato de etilo	50
4b	Rendimiento de los triterpenos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD en los extractos de hexano y acetato de etilo de la corteza de <i>A. adstringens</i>	50
5	Efecto citotóxico a las 48 horas después del tratamiento con AMD y 3 $\beta$ -OH AMD sobre la línea celular MDA-MB-231	51
6	Efecto citotóxico a las 48 horas después del tratamiento con AMD y 3 $\beta$ -OH AMD sobre la línea celular PC-3	52
7	Efecto de los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD sobre la viabilidad celular de cuatro líneas celulares no tumorales	52
8	Determinación de la DL <sub>50</sub> para los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD	53
9	Efectos tóxicos de los triterpenos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD observados a dosis superiores a la DL <sub>50</sub>	54
10	Efecto de los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD sobre el peso corporal de ratones xenotrasplantados con células PC-3	56
11	Efectos tóxicos de los triterpenos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD a nivel sistémico en ratones ministrados de forma subcrónica y xenotrasplantados con células PC-3	58
12	Efecto de los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD sobre el peso corporal de ratones xenotrasplantados con células MDA-MB-231	60
13	Efectos tóxicos de los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD a nivel sistémico en ratones xenotrasplantados con células MDA-MB-231.	61

---

---

## RESUMEN

---

---

### Exordio

Los triterpenos tetracíclicos son un grupo de metabolitos secundarios aislados de plantas, algunos de ellos han mostrado potencial terapéutico como agentes antitumorales. La literatura muestra evidencias de que algunos tipos estructurales de triterpenos, en particular los del tipo ursano, inhiben la proliferación de células tumorales humanas y el crecimiento tumoral *in vivo*. Las plantas medicinales, por ejemplo; *Amphipterygium adstringens* conocido comúnmente como cuachalalate, resultan en una fuente importante de triterpenos como los ácidos masticadienónico (AMD) y 3 -OH masticadienico (3 -OH AMD). Los antecedentes indican que AMD y 3 -OH AMD son agentes antiinflamatorios e inhibidores de la proliferación de algunas líneas de cáncer humano, tales como: HCT-15 (colon), MCF-7 (mama), U-251 (sistema nervioso central), PC-3 (prostata), K-562 (leucemia), HeLa (cérvix), HepG2 (hígado) y A-431 (carcinoma epidermoide). No obstante, a pesar de las investigaciones que se han realizado sobre las propiedades antitumorales de dichas moléculas se desconoce su actividad antitumoral *in vivo*, así como sus blancos moleculares. Así, se decidió evaluar los triterpenos AMD y 3 -OH AMD, como agentes antitumorales *in vivo*, por medio de técnicas inmunohistoquímicas en los tejidos tumorales de ratones tratados con estos triterpenos.

### Materiales y métodos

Inicialmente se aislaron los ácidos AMD y 3 -OH AMD de los extractos orgánicos de la corteza de *A. adstringens*. Posteriormente, se determinó la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de los ácidos de prueba por el método de Lorke. El efecto antitumoral *in vivo* se demostró en un modelo murino de xenotrasplantes de células PC-3 y MDA-MB-231 en ratones de la cepa nu/nu. Los ratones fueron inoculados con 3 x 10<sup>6</sup> células PC-3 o 5 x 10<sup>6</sup> MDA-MB 231, respectivamente, en el zona escapular derecha. Una vez que los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 50 mm<sup>3</sup>, los ratones recibieron tratamiento con AMD, 3 $\beta$ -OH AMD o los fármacos de referencia

(cisplatino o doxorubicina, correspondientemente). Después del tratamiento, se realizó el análisis comparativo del peso corporal y los efectos tóxicos de los compuestos de prueba a nivel hematológico, hepático y renal en muestras de sangre periférica.

Por otro lado, ensayos de inmunohistoquímica se utilizaron para evaluar el decremento en la expresión del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) y Ki67 inducido por AMD y 3 -OH AMD. El ensayo de marcado de corte final de la desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) se realizó para demostrar la fragmentación del ADN.

Finalmente, se analizó el efecto de los ácidos AMD y 3 -OH AMD sobre la maduración de células dendríticas derivadas de médula ósea (MOCDs). Las células de la médula ósea se inocularon en medio RPMI-1640 y se diferenciaron con 20% de sobrenadante de un cultivo de células CHO-K1 (CRL-9618), el cual contiene aproximadamente 20 U/L del factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos (GM-SCF). Para conocer el grado de maduración de las células se marcaron con anticuerpos anti-CD40, anti-CD80 y anti-CD86 y se determinaron las células positivas así como la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo.

## **Resultados**

El tratamiento con los ácidos tirucálicos AMD y 3 -OH AMD, inhibió la proliferación de las células PC-3 y MDA-MB 231 *in vitro* y el crecimiento tumoral tanto de xenotrasplantes de carcinoma prostático como de glándula mamaria. Adicionalmente, el efecto antiproliferativo de los ácidos se demostró por un decremento significativo en el número de células positivas a PCNA y Ki67. La fragmentación del ADN fue una evidencia de la muerte celular por apoptosis, inducida por los ácidos AMD y 3 -OH AMD.

Asimismo, los triterpenos mostraron un perfil de menor toxicidad que los fármacos de referencia, doxorubicina y cisplatino. La evaluación de los datos de toxicidad preclínica sistémica indicó que los triterpenos AMD y 3 -OH AMD, a las dosis de ministradas, no indujeron algún cambio significativo en las enzimas hepáticas y los

parámetros renales tales como, el nitrógeno ureico en sangre y la creatinina. Además, las cuentas totales de los parámetros hematológicos, leucocitos, linfocitos y eritrocitos no mostraron cambios en los grupos tratados con los triterpenos.

Es de notar que, en células dendríticas (CD) el AMD indujo incremento en la expresión de las moléculas CD40 y CD80 mientras que 3 -OH AMD además incrementó CD86, lo que sugiere que el 3 -OH AMD es más efectivo como agente de maduración de CD.

### **Conclusiones**

En conjunto estos resultados sugieren que el mecanismo antitumoral de los ácidos masticadienónico y 3 -OH masticadienoico involucra más de un blanco molecular relacionado con vías de proliferación celular y apoptosis, en un contexto de inmunosupresión y cáncer. Mientras que, los ácidos AMD y 3 -OH AMD como agentes de la maduración de CD, podrían favorecer la presentación de antígenos tumorales.

Una de las ventajas de dichos compuestos como agentes antitumorales es su baja toxicidad comparados con los fármacos citotóxicos, cisplatino y doxorubicina.

---

---

## ABSTRACT

---

---

### Exordium

Tetracyclic triterpenes are a group of secondary metabolites isolated from plants, some of them have shown therapeutic potential as antitumor agents. Literature shows evidence that some structural types of triterpene, outstanding, those of ursane-type, inhibit the proliferation of human tumor cells and tumor growth *in vivo*. Medicinal plants, for example *Amphipterygium adstringens* popular known as cuachalalate, is an important source of triterpenes, such as masticadienonic acid (MDA) and 3 -OH MDA (3 -OH MDA). Literature background indicates that, MDA and 3 -OH MDA are anti-inflammatory agents and inhibitors of the proliferation in some human cancer cell lines, such as: HCT-15 (colon), MCF-7 (breast), U-251 (central nervous system) , PC-3 (prostate), K-562 (leukemia), HeLa (cervix), HepG2 (liver) and A-431 (epidermoid carcinoma). Despite the investigations that have been carried out on the antitumor properties of these molecules, their antitumor activity *in vivo* is unknown, as well as their molecular targets also. Considering the above, we decided to evaluate MDA and 3 -OH MDA as antitumor agents *in vivo*, as well as perform histochemical evaluations of the tumor tissues treated with these triterpenes.

### Materials and methods

Initially MDA and 3 -OH MDA acids were isolated from the organic extracts of the bark from *A. adstringens*. The acute toxicity assay was performed in 6- to 8-week-old CD-1 female mice. The three mice groups were treated with 10, 100 and 1000 mg/kg of MDA or 3 -OH MDA, and the lethal dose 50 (LD<sub>50</sub>) was determined by the Lorke method.

The effect on tumor growth in breast and prostate cancer xenografts *in vivo*, was determined in a mouse cancer xenograft model. The mice were implanted with  $3 \times 10^6$  PC-3 or  $5 \times 10^6$  MDA-MB 231 cells respectively. The cells were inoculated

subcutaneously on the right flank. Once the tumors reached a mean size of 50 mm<sup>3</sup> the mice were treated with MDA, 3 -OH MDA or the reference drugs (cisplatin or doxorubicin correspondingly).

After treatment it was done, the comparative analysis of the body weight and the toxic effects between treated and control groups at hematological, hepatic and renal levels in blood serum samples was performed.

In addition, immunohistochemical assays were used to evaluate the decrease in the expression of the nuclear antigen of cells in proliferation (PCNA) and the Ki-67 induced by MDA and 3 -OH MDA. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay was performed to demonstrate DNA fragmentation in tumor tissues.

Finally, the effect of triterpenes on differentiation of dendritic cells derived from bone marrow was analyzed. The bone marrow cells were inoculated in RPMI-1640 medium and differentiated with 20% supernatant from a culture of CHO-K1 cells (CRL-9618), which contains approximately 20 U/L of granulocyte and macrophage growth factor (GM-SCF). To determine the degree of maturation of the cells, they were labeled with antibodies anti-CD40, anti-CD80 and anti-CD86 antibodies, the positive cells and fluorescence intensity were determined by flow cytometry.

## **Results**

The treatment with the tirucallic acids MDA and 3 -OH MDA inhibited the proliferation of PC-3 and MDA-MB 231 cells, and the tumor growth in prostate and breast cancer xenografts.

Additionally, the antiproliferative effect of MDA and 3 -OH MDA in tumor tissues was demonstrated by a significant decrement in the number of Ki67-positive cells and PCNA-positive cells. The DNA fragmentation induced by tirucallanes was an evidence of apoptotic cell death.

The triterpenes showed a lower toxicity profile than the reference drugs, cisplatin and doxorubicin. The evaluation of the preclinical data for systemic toxicity



indicated that both, MDA and 3 -OH MDA at the administered doses did not produce any significant change in the levels of serum hepatic enzymes and renal parameters such as blood urea nitrogen and creatinine. Furthermore, hematological parameters including leukocyte, eritrocytes, and lymphocyte counts did not change in the groups treated with the triterpenes.

Interestingly, MDA induced an increase in the expression of CD40 and CD80 molecules while 3 -OH MDA in addition for CD86, which suggests that 3 -OH MDA is more effective as a maturing agent of dendritic cells.

### **Conclusions**

Our results suggest that, the antitumor mechanism of masticadienonic and 3 -OH masticadienoic acids, involves more than one molecular target related to proliferation and apoptosis pathways, in a context of immunosuppression and cancer. While, the MDA and 3 -OH MDA as maturing agents of dendritic cells, could favor the presentation of tumor antigens.

One of the advantages of these compounds as antitumor agents is their low toxicity compared with the cytotoxic drugs, cisplatin, and doxorubicin.

---

---

# 1. INTRODUCCIÓN

---

---

## 1.1 Cáncer

El término cáncer se refiere a un grupo de más de un centenar de enfermedades, que se caracterizan por seis alteraciones esenciales en la fisiología celular, que son la autosuficiencia en las señales de crecimiento, alteraciones en las señales de inhibición del crecimiento, evasión del programa de muerte celular, potencial de replicación ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión y metástasis del tejido (Hanahan, 2011).

## 1.2 Epidemiología

De acuerdo con la carga global de enfermedades (GBD), en 2015, se informó de 17.5 millones de nuevos casos y 8.7 millones de muertes por cáncer.

En México, de 1990 a 2013, se investigó la incidencia y mortalidad de 28 tipos de cáncer tanto por nivel socioeconómico, como por grupos de edad y género. Los datos mostraron una tendencia decreciente para algunos tipos de cáncer, como el de pulmón y el cervicouterino, mientras que, en los cánceres de próstata, mama, estómago, colon e hígado se observó un incremento tanto en la incidencia como en la mortalidad (Gómez, 2015). Las estadísticas de mortalidad indican que el cáncer de mama es uno de los tipos de cáncer que causa más muertes en mujeres a nivel mundial, de la misma forma el cáncer de próstata es uno de los tipos de cáncer que causa más muertes en hombres. Además, la tasa de incidencia estandarizada por edad, por cada 100,000 habitantes indica que en nuestro país el cáncer de mama (35.5) y el de próstata (23.6) son los de mayor incidencia (Siegel, 2016).

### 1.3 Factores de riesgo para cáncer de mama y próstata

Se conoce que, no existe solamente un factor determinante para el desarrollo de cáncer, es la combinación del estilo de vida y factores genéticos, químicos y/o físicos. Así, para el cáncer de glándula mamaria se ha propuesto que la exposición a la radiación usada en la mamografía, la falta de actividad física, una dieta rica en grasas, el consumo de alcohol (etanol) y el consumo de fármacos hormonales pueden favorecer su desarrollo (Wei, 2010).

Además, las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* predisponen notablemente al desarrollo del cáncer de mama (Walsh, 2016).

En relación al cáncer de próstata, se conoce que la edad es uno de los factores más importantes que contribuyen al desarrollo de la enfermedad, aproximadamente el 85% de los casos se diagnostican después de los 65 años de edad. La incidencia del cáncer de próstata muestra diferencias entre distintas poblaciones étnicas y países, las tasas más bajas (1.9 casos nuevos por cada 100, 000 habitantes) se han encontrado en países de Asia, específicamente China, India y Japón. En contraste, las tasas mayores se han observado en Estados Unidos de América, en la población afroamericana se han documentado 272 casos nuevos por cada 100, 000 habitantes por año. Adicionalmente, se observa un cambio importante de la incidencia y mortalidad respecto a la variación geográfica, por ejemplo, las poblaciones caucásicas nativas presentan mayor incidencia y mortalidad por cáncer de próstata que las poblaciones inmigrantes (Cuzick, 2014). Además, la historia familiar ha mostrado que hay un componente hereditario que aumenta el riesgo de padecer la enfermedad, los hombres que presentan un paciente de primer grado con cáncer de próstata tienen mayor riesgo relativo de padecer cáncer de próstata, comparados con aquellos cuya relación hereditaria es secundaria. Aunado a lo anterior, se han reportado algunas mutaciones raras, como *BRCA1*, *OGG1*, y *CHEK2* las cuales incrementan el riesgo de desarrollo del cáncer de próstata (Patel, 2009).

## 1.4 Estrategias de tratamiento para el cáncer

Las opciones de tratamiento en la mayoría de los tumores son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia (Sociedad Americana del Cáncer “ACS”, 2016). Desde un enfoque molecular, los tratamientos antitumorales se han dirigido hacia los blancos de las características o “Hallmarks” del cáncer (figura 1).

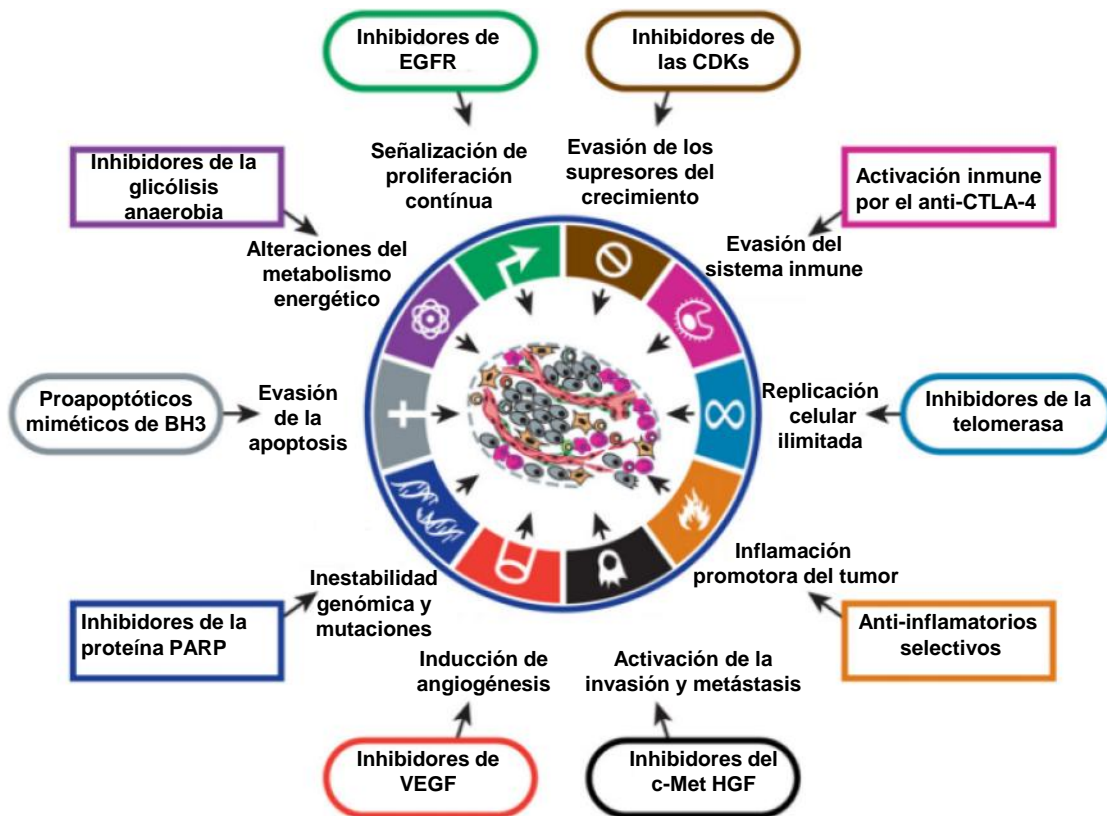


Figura 1. Blancos terapéuticos del cáncer descritos por Hanahan y Weinberg en 2011. En las figuras de colores, se observan los inhibidores que interfieren con cada una de las capacidades adquiridas, necesarias para el crecimiento y la progresión tumoral. Los vectores en color negro indican su respectivo blanco molecular.

## 1.5 La quimioterapia antitumoral

Una de las estrategias empleadas en el tratamiento de la enfermedad es el uso de la quimioterapia, que inició en el siglo XX (Neidle, 2005). En las primeras cuatro décadas de este siglo, las investigaciones se enfocaron al desarrollo de modelos

que permitieran estudiar sustancias con posible actividad contra ciertos tipos de cáncer humano. Por ejemplo los estudios realizados por Louis S. Goodman y Alfred G. Gilman, en 1943, al tratar con mostazas de nitrógeno ratones con trasplantes de linfoma, observaron regresión tumoral. Después de los estudios preclínicos, se ministraron mostazas de nitrógeno a pacientes con linfoma no Hodking's, resultando en una regresión tumoral incompleta y remisión parcial de los tumores humanos (DeVita, 2008). Los hallazgos anteriores, condujeron a la síntesis de varios agentes alquilantes como el clorambucilo y ciclofosfamida, cuyo mecanismo propuesto es su unión covalente al ADN, produciendo entrecruzamientos intracatenarios (entre la misma cadena) e intercatenarios (en cadenas diferentes) en las células tumorales (Chabner, 2005).

Posteriormente, en el año 1948, se sintetizaron una serie de antimetabolitos, inhibidores de la síntesis del ADN tales como los antifolatos, análogos de las bases puricas y pirimídicas (Tiwari, 2012).

En 1951, se desarrollaron las mercaptopurinas, que requieren ser activadas intracelularmente por la enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT) para ejercer su efecto citotóxico, mediante un efecto antimetabolito e inducción de apoptosis (Cara, 2004). En cáncer, las mercaptopurinas se han usado en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda (Lennard, 1989).

A finales de la década de los cincuenta, se iniciaron los estudios con las antraciclinas, fármacos que interaccionan con el ADN intercalándose o induciendo rompimiento de las cadenas, además se ha demostrado que dichas antraciclinas inhiben la topoisomerasa II y por lo tanto impiden la replicación del ADN (Sim nek, 2009). Dentro de estos agentes citotóxicos destacan la doxorubicina y daunorubicina. La primera ampliamente usada en el tratamiento de los tumores sólidos (glándula mamaria), sarcomas y linfomas. Mientras que, la daunorubicina se usa en el tratamiento de leucemia mieloblástica o linfoblástica aguda (Minotti, 2004).

De la misma forma, en la década de 1950's se descubrieron los alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina y vinorelbina), metabolitos de origen vegetal, aislados de la especie *Catharanthus roseus*. El mecanismo de acción de estos alcaloides, consiste en incidir sobre el ciclo celular inhibiendo la polimerización de los microtúbulos, a través de la unión a la subunidad  $\beta$  de la tubulina, cerca del sitio de unión al trifosfato de guanosina (GTP) (Moudi, 2013). Los alcaloides de la vinca, se han aplicado en estrategias de terapia combinatoria para algunos tumores sólidos, tales como neuroblastoma, nefroblastoma, sarcoma de Ewing y mieloma múltiple (Ehrhardt, 2013).

Son de notar los hallazgos obtenidos en 1960, cuando se descubrió el principio activo de *Taxus brevifolia*. El taxol, es un terpenoide que se emplea hasta la fecha, para el tratamiento de varios tumores sólidos como los de mama, ovario y próstata. El mecanismo de acción del taxol se descubrió hasta 1980, cuando se demostró que se une al sitio C terminal, de la subunidad  $\beta$  de la tubulina y tiende a estabilizar la red de dicha proteína inhibiendo la despolimerización de los microtúbulos (Stanton, 2012).

Los dos ejemplos anteriores, son fármacos antitumorales aislados de especies vegetales con aplicación clínica en el tratamiento contra el cáncer.

Posteriormente, con el conocimiento de la biología del cáncer se investigaron las terapias dirigidas hacia los blancos de la señalización celular; entre los fármacos diseñados para este fin, se encuentran los inhibidores de las tirosinas cinasas, las pequeñas moléculas inhibidoras (SMIs), por ejemplo el Imatinib (Gleevec), que fue aprobado en 2001 para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (Levitzki, 2010). Los resultados observados con el Imatinib condujeron a la síntesis de una serie de inhibidores selectivos hacia su blanco molecular. Actualmente, se realiza investigación preclínica de inhibidores cada vez más específicos para tumores que presentan mutaciones en algunos genes que regulan vías de transducción de señales clave, esencialmente aquellos nodos de convergencia entre diversas funciones celulares. La familia de las cinasas activadas por p21 (pak), son un

ejemplo de este tipo de blancos moleculares. La serina treonina cinasa pak1, se sobreexpresa y/o hiperactiva en diferentes tipos de cáncer humano, tales como mama, ovario, próstata y cerebro (Wang, 2013). En este sentido, recientemente se informó del efecto inhibitorio del crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo* del inhibidor FRAX 1036 (C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>ClN<sub>7</sub>O), una molécula que presenta algunas modificaciones estructurales respecto al Imatinib (C<sub>29</sub>H<sub>31</sub>N<sub>7</sub>O), un átomo de carbono menos y se adiciona un átomo de cloro, además del arreglo estructural diferente, sin embargo, sigue conservando la estructura general de las pequeñas moléculas inhibitoras. El estudio concluye que el inhibidor FRAX1036 es el más efectivo *in vivo*, en tumores de ovario que sobreexpresan pak1, específicamente aquellos con la amplificación 11q13 (Prudnikova, 2016).

No obstante, la principal problemática de las terapias dirigidas es el desarrollo de células quimio-resistentes al tratamiento. Por lo que surgió la necesidad de agentes que inhiban más de un blanco molecular en las células tumorales, o el uso de combinaciones de fármacos cada uno con un blanco molecular diferente (Faivre, 2006, Petrelli, 2009).

Es de destacar, que el conjunto de fármacos descritos anteriormente, se han diseñado sin tomar en cuenta el paradigma de la heterogeneidad celular en las masas tumorales. Los diferentes tipos celulares que se han descrito en las masas tumorales son fibroblastos asociados al tumor, células endoteliales, pericitos, células cancerosas invasivas, células que contribuyen a la respuesta inflamatoria, macrófagos asociados al tumor, células troncales mesenquimales y cancerosas (Hanahan, 2011). Estos múltiples tipos celulares mantienen una comunicación química a través de interacciones moleculares contribuyendo a mantener el microambiente tumoral. El conocimiento de la biología de los tumores ha llevado a replantear los enfoques terapéuticos. Hoy por hoy, la perspectiva terapéutica es hacia el control de las células cancerosas y el estroma tumoral, así como los factores que influyen en la progresión tumoral (Bussard, 2016).

## **1.6 La inmunoterapia en el tratamiento del cáncer: aspectos de interés para este estudio**

### **1.6.1 Anticuerpos monoclonales**

El uso de anticuerpos monoclonales se ha implementado como una alternativa de tratamiento en algunos tumores sólidos. Por ejemplo, el Trastuzumab (Herceptin®) se aprobó para los tumores de mama HER2 positivos y el Ipilimumab (Yervoy®) cuyo blanco molecular es el antígeno CTLA-4, fue aprobado para melanoma metastásico (Scott, 2012). Para el carcinoma de próstata metastásico resistente a la castración, se ha estudiado en fase clínica II el agente antiangiogénico, llamado Intetumumab (Heidenreich, 2013).

### **1.6.2 Inmunotoxinas**

Las inmunotoxinas son moléculas quiméricas, que consisten en una toxina de naturaleza proteica, más un fragmento diana que comúnmente es la fracción de un anticuerpo monoclonal. Esta estrategia se dirigió específicamente a localizar los receptores que se sobre-expresan en las células tumorales. Su mecanismo de acción, depende de que la internalización de la molécula se lleve a cabo con una cinética adecuada y que exista una expresión diferencial de la molécula diana entre las células tumorales y no tumorales. Se han descrito estudios con la toxina diftérica y exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, en las fases clínicas I a III y algunas en estudios preclínicos (Alewine, 2015).

### **1.6.3 Conjugados de anticuerpos monoclonales y fármacos citotóxicos**

Los conjugados anticuerpos-fármaco citotóxico, han sido otro intento para el tratamiento del cáncer. Dichos conjugados, están compuestos de un anticuerpo monoclonal dirigido a un antígeno tumoral específico y el fármaco citotóxico, por ejemplo: antramicina, captotecina y amanitina. Los dos elementos descritos anteriormente, están unidos por un enlazador o "linker", pueden ser enlaces amida o disulfuro, estos enlaces se rompen frente a cambios de pH, reacciones de reducción e incluso hidrólisis por proteasas y de esta forma liberar el fármaco



(Polakis, 2016). La mayoría de estos conjugados se encuentran en investigación clínica y preclínica, excepto el conjugado Adcetris dirigido contra la proteína CD30 y aprobado para el tratamiento de linfoma de Hodgkin y cáncer de mama (Lu, 2016).

#### **1.6.4 Vacunas con células presentadoras de antígenos**

Este tipo de inmunoterapia abarca las vacunas dirigidas a crear una respuesta contra antígenos asociados al tumor, así como aquellas con las que se busca bloquear puntos de control y anticuerpos que suprimen la respuesta inmune, éstas últimas mediadas por linfocitos T citotóxicos asociados a los antígenos de muerte programada (PD-1) y el ligando de muerte programada (PD-L1) (Garg, 2017). En el primer caso, las vacunas monovalentes que inducen o potencian la respuesta hacia un antígeno específico asociado al tumor, mientras que las vacunas polivalentes realizan el mismo proceso contra múltiples antígenos asociados al tumor. Por otro lado, se han investigado las vacunas celulares, que mejoran la presentación de antígenos, empleando células presentadoras de antígenos cargadas con antígenos tumorales (McArthur, 2016). Por ejemplo, las células dendríticas (CD), fundamentales en la integración de la respuesta inmunológica, por su capacidad de presentar antígenos, inducir o suprimir la proliferación y diferenciación de subpoblaciones de linfocitos T, las convierten en elementos clave para el desarrollo de inmunoterapias contra el cáncer (Palucka, 2013, Mac, 2015).

Las tres estrategias anteriormente citadas se han experimentado en la inmunoterapia contra el cáncer de mama. La Figura 2 ejemplifica la presentación de la proteína HER2, mediante un sistema de liberación a través del anticuerpo DEC205 y presentada como un antígeno tumoral a las células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> respectivamente, a través del complejo principal de histocompatibilidad I y II (MHC I, II). Es importante notar, que para mejorar la presentación del antígeno se usa un adyuvante, el ácido poliribosidílico, Poli C (Wang, 2012).

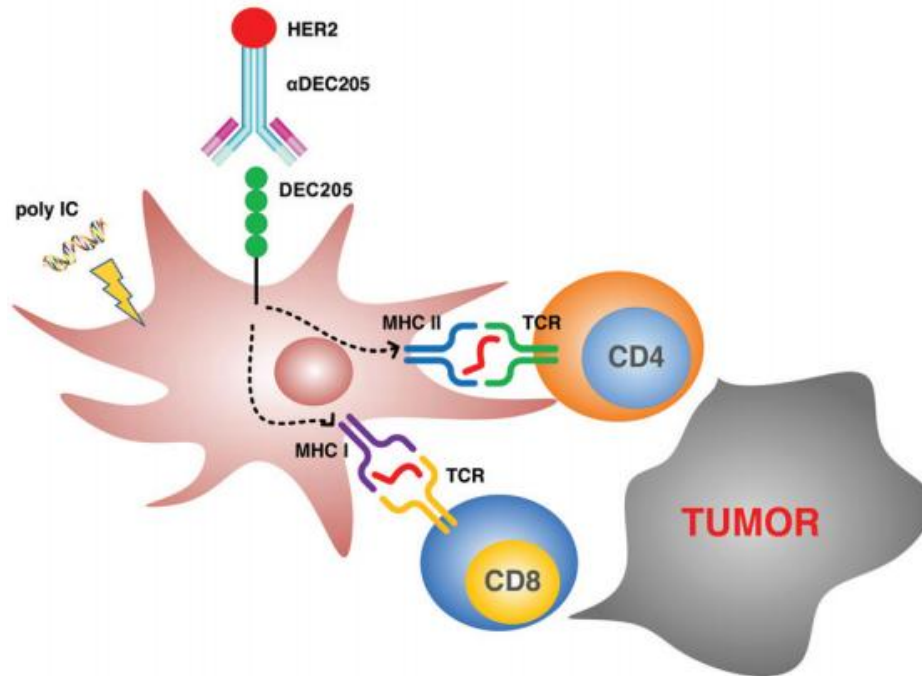


Figura 2. Inducción de la inmunidad de células T contra cáncer de mama *in vivo*. Adaptada de Wang, 2012.

Otro hallazgo importante en esta área fue la aprobación de la vacuna Sipuleucel-T (AP08015), contra el cáncer de próstata metastásico resistente a la castración. Esta vacuna terapéutica es un tipo de inmunoterapia celular activa que consiste en células mononucleares de sangre periférica, incluyendo células presentadoras de antígenos, que se han cargado *ex vivo* con una proteína de fusión recombinante (PA2024). La proteína recombinante, se fusionó con la fosfatasa ácida y alcalina y el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-SCF) (Kantoff, 2010). Sin embargo, a pesar del incremento en la migración de linfocitos T a la próstata y supervivencia de los pacientes con cáncer de próstata, se presentaron eventos como fiebre durante el tratamiento y no se excluyó el uso de agentes quimioterapéuticos. Lo anterior, muestra un ejemplo de inmunoterapia antitumoral de éxito limitado; por lo que es necesario incrementar la efectividad de las vacunas antitumorales en términos de mejorar la respuesta inmunológica al realizar la presentación antigénica, así como disminuir los efectos colaterales.

Para potenciar la respuesta antigénica específica, se ha propuesto usar herramientas moleculares como los adyuvantes e inmunomoduladores.

### **1.6.6 Inmunomoduladores**

Los inmunomoduladores son moléculas biológicas o sintéticas que pueden estimular, suprimir o modular el sistema inmunológico. Los inmunomoduladores se han clasificado en tres tipos:

#### 1) Inmunoadyuvantes

El término adyuvante viene de la palabra latina “*adyuvare*” que significa ayuda. Por lo tanto, los adyuvantes son materiales o complejos macromoleculares que mejoran la respuesta inmune antigénica-específica (Lim, 2015). El mecanismo de dichas moléculas consiste en auxiliar a las vacunas a mejorar la respuesta inmune específica. Alternativamente, pueden funcionar como sistemas que ministran el antígeno a las células presentadoras de antígenos para promover una respuesta inmune específica del antígeno (Temizoz, 2016). Los adyuvantes se clasifican con base en su mecanismo de acción. Según la hipótesis de las dos señales, para que se lleve a cabo la inducción de una respuesta Th, se requiere de tres señales, denominadas 0, 1, 2. Los adyuvantes pueden actuar en estas tres señales y dependiendo de donde actúen se clasifican en adyuvantes A, B y C. Los adyuvantes tipo A son agonistas de los receptores tipo Toll, por lo tanto pueden actuar sobre la señal 0. Los adyuvantes del grupo B interactúan con las células presentadoras de antígenos y el reconocimiento de antígenos amplificando la señal 1, en tanto que los del tipo C, actúan a través de la interacción de moléculas coestimuladoras sobre las células presentadoras de antígenos, Figura 3 (Brunner, 2010).

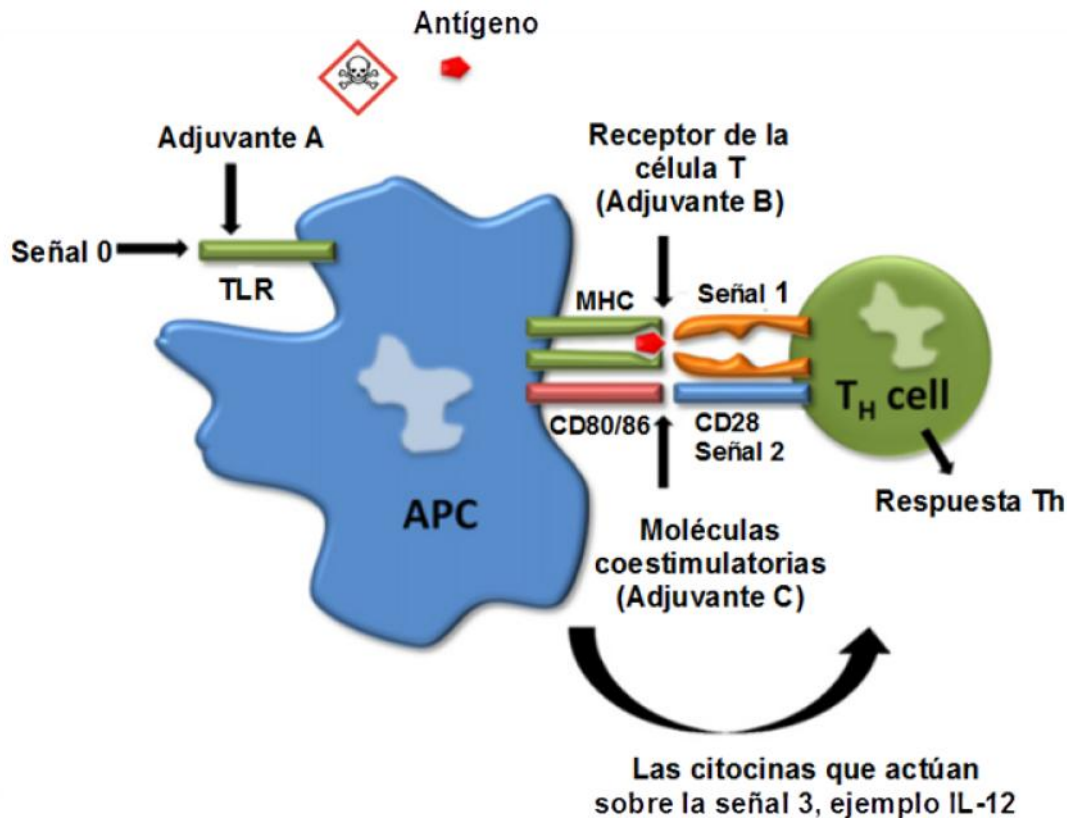


Figura 3. Moléculas involucradas en el mecanismo de los adyuvantes. La iniciación de la respuesta Th requiere tres señales indicadas como 0, 1, 2 donde pueden actuar los adyuvantes A, B, C respectivamente. La señal 3 representa mediadores liberados por las células presentadoras de antígenos (APC) a las células T. Adaptada de Brunner, 2010.

## 2) Inmunoestimulantes

Son inherentemente inespecíficos, es decir pueden actuar a través de la respuesta inmune innata o adaptativa. En individuos sanos los inmunoestimulantes incrementan el nivel de respuesta inmune basal, en tanto que en individuos con algún padecimiento funcionan como agentes inmunoterapéuticos.

## 3) Inmunosupresores

Son un grupo de fármacos estructuralmente muy heterogéneos, frecuentemente se prescriben en combinación con otros tratamientos para evitar el rechazo a trasplantes de órganos o tejidos y en enfermedades del sistema inmunológico (Kumar, 2012).

Las plantas medicinales resultan ser una fuente de metabolitos secundarios con propiedades inmunoregulatoras, se ha documentado que algunas moléculas aisladas de dicha fuente pueden interactuar con elementos del sistema inmunológico a través de la maduración de células dendríticas y generando una respuesta de tipo Th1 o Th2. La Figura 4 representa los dos posibles mecanismos que se han descrito para algunas hierbas medicinales chinas (CHM) sobre la maduración y función de células dendríticas (Li, 2015).

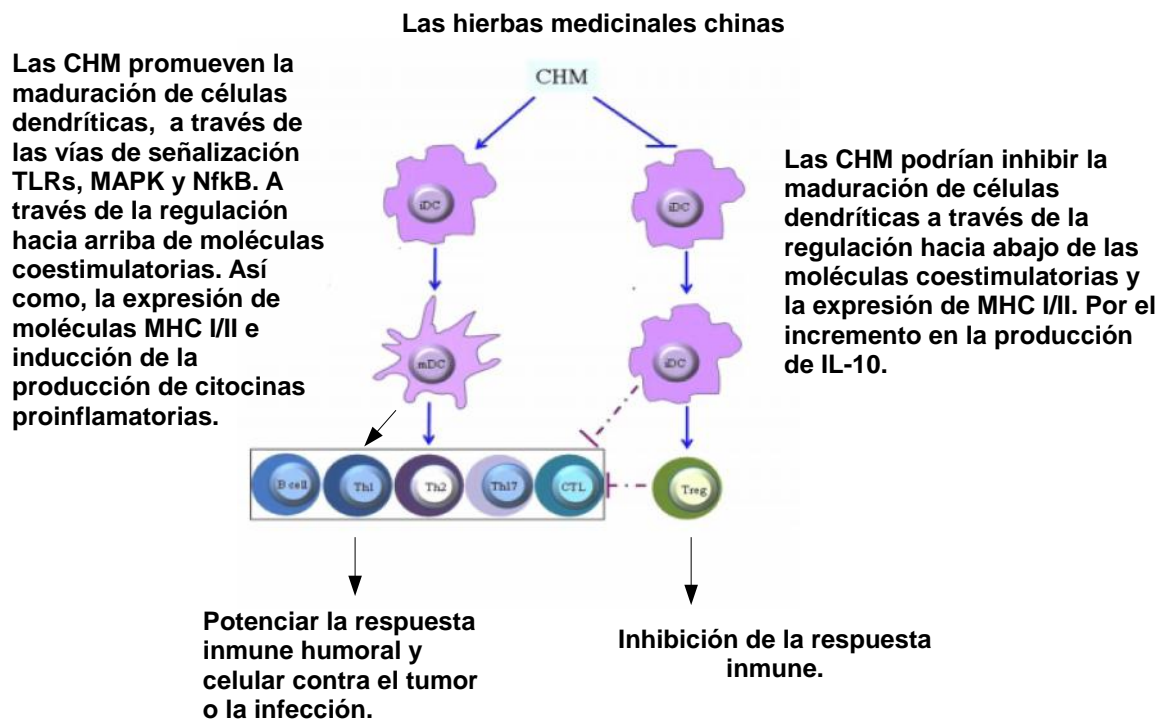


Figura 4. Las hierbas medicinales chinas (CHM) como agentes de la maduración de las CD. Algunas CHM podrían promover la maduración de células dendríticas a través de moléculas coestimuladoras y MHC I/II e incremento de citocinas pro-inflamatorias, tales como IL-6, IL-12, IL-1, TNF- $\alpha$ , lo cual potenciaría la respuesta inmune humoral y celular contra el tumor. En contraste, algunas CHM podrían inhibir la maduración de células dendríticas por incremento de la IL-10 y producción de células T reguladoras o inhibición de la respuesta inflamatoria. Corregida de Li, 2015.

## **1.7 Marcadores moleculares de proliferación celular**

La proliferación celular es una de las características fundamentales del cáncer y representa un marcador de pronóstico y blanco terapéutico (Feitelson, 2015).

Uno de los métodos para evaluar la proliferación celular, es mediante la detección de los marcadores de proliferación celular, como el PCNA, las proteínas de mantenimiento de los minicromosomas (MCM) y la proteína nuclear Ki67 (Jurícová, 2016).

### **1.7.1 Antígeno nuclear de células en proliferación**

El PCNA se conoce como un marcador de proliferación dada su implicación en el proceso de replicación del ADN. La función del PCNA, es crucial para el mantenimiento de la integridad genómica. Esta proteína originalmente se identificó como el antígeno de un anticuerpo autoinmune presente en un grupo de pacientes con lupus eritematoso sistémico (Wang, 2014). PCNA se expresa preferentemente en células normales y tumorales en proliferación activa, con un pico máximo en la fase G1 tardía y S del ciclo celular (Zerjatke, 2017).

### **1.7.2 Proteína nuclear Ki67**

La proteína nuclear presenta dos isoformas, Ki67, pKi67, con pesos moleculares 345 y 395 kDa, respectivamente las cuales fueron identificadas por Scholzer y Gerdes en 1980. La proteína se expresa en las fases activas del ciclo celular, G1, G2, S y M, sin embargo, no se expresa en las células quiescentes (G0). Se usa ampliamente en patología para detectar las células en proliferación. Clínicamente, se ha visto que la proteína fosforilada (pKi67) correlaciona con la metástasis y se sobreexpresa en las células tumorales (LI, 2015).

## **1.8 Marcadores moleculares de la maduración de células dendríticas**

Las células dendríticas tienen dos estados funcionales básicos, maduro e inmaduro. La estrategia para reconocer a dichas formas celulares es a través de la expresión de moléculas que presentan en su superficie. La maduración, se refiere

a los cambios que acompañan a la célula dendrítica inmadura (CDi) en su transición al estado maduro (CDm), frente a estímulos ambientales de origen exógenos (microorganismos) y endógenos (hormonas, citosinas y células en proceso de muerte). Aunque también se sabe que la maduración de dichos tipos celulares ocurre espontáneamente por tiempos definidos (Paluka, 2012). Este panorama tan diverso muestra diferentes funciones efectoras para este tipo celular (Figura 5). El fenotipo maduro de las CD se caracteriza por expresar niveles altos del complejo principal de histocompatibilidad clase I y II (MHC I y II), CD40, CD80, CD83 y CD86 (Reis e Sousa, 2006).

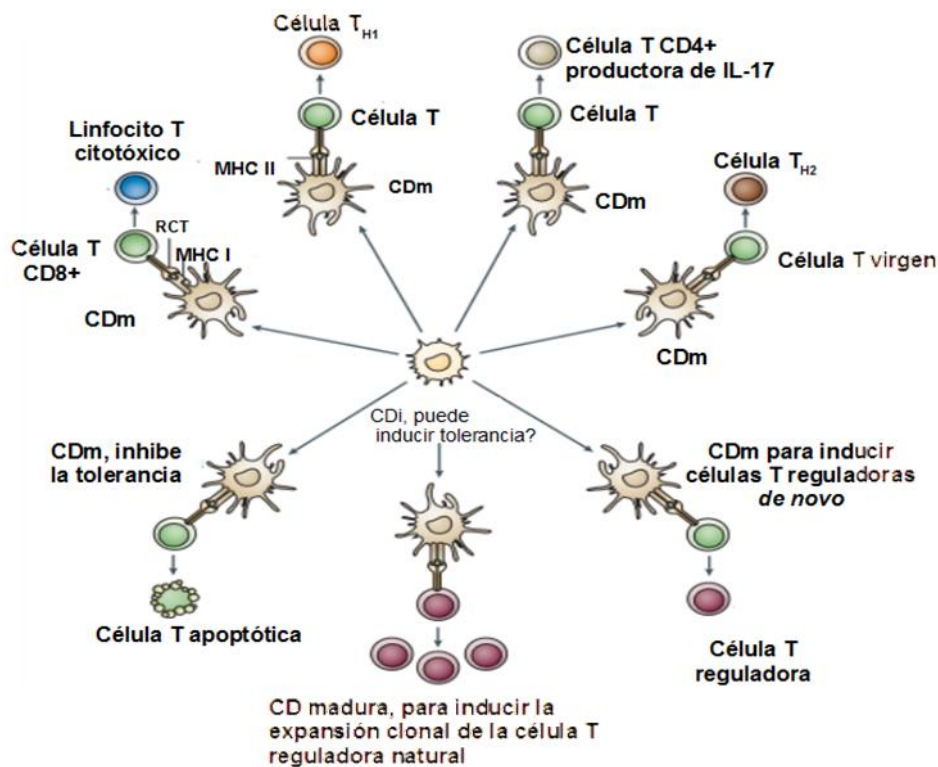
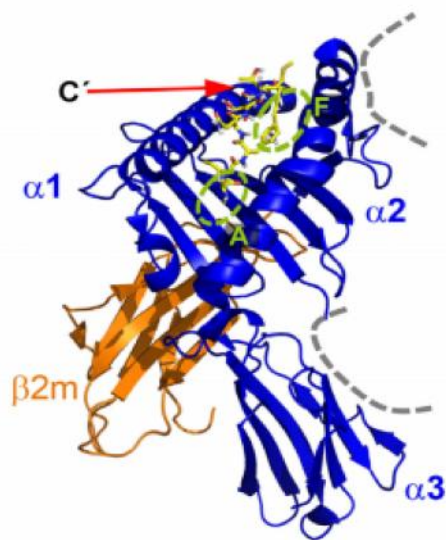


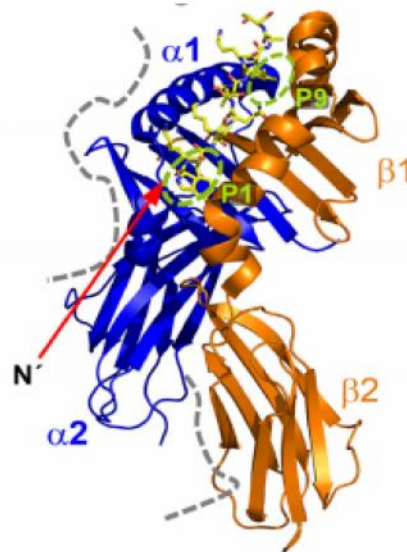
Figura 5. Funciones efectoras de las CD. Este panorama describe que las células dendríticas inmaduras (CDi) dan origen a distintos tipos de CD efectoras, las cuales instruyen los diferentes destinos de las células T, incluyendo inmunidad, tolerancia y desviación inmune. En otras palabras algunos estímulos de maduración pueden inducir CD tolerogénicas. CDi: célula dendrítica inmadura. CDm: célula dendrítica madura. linfocito TH2: T cooperador. RCT: receptor del linfocito T. MHC I: complejo principal de histocompatibilidad clase I; MHC II: complejo principal de histocompatibilidad clase II. Adaptado de Reis e Sousa, 2006.

### 1.8.1 Complejo principal de histocompatibilidad I y II

El complejo principal de histocompatibilidad I (MHC I) se encuentran en la superficie de todas las células nucleadas y las MHC II en macrófagos, CD y células B. Comparten la misma función, presentar antígenos a los linfocitos T. Ambos tipos de moléculas MHC son glicoproteínas transmembranales (Neefjes, 2011). Las moléculas de MHC I están compuestas de una hélice más larga acoplada con la microglobulina  $\beta 2m$  (  $\beta 2m$ ) y solo la hélice atraviesa la membrana citoplásmica. La cadena de la molécula MHC I se pliega en tres dominios separados como  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ . Las moléculas MHC II están compuestas de dos cadenas de proteínas (una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ ) que son aproximadamente similares en longitud. Ambas cadenas de la molécula MHC II poseen dominios transmembranales y cada cadena se pliega en dos dominios separados:  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , y  $\beta 1$  y  $\beta 2$ . Las moléculas del MHC tienen una hendidura que sirve como el sitio de unión al antígeno, para MHC I, la hendidura está formada por los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , mientras que para MHC II se forma con dos dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ , como se muestra en la Figura 6 (Wiecsorec, 2017).



**El MHC I se encuentra en la superficie de las células nucleadas**



**El MHC II se encuentra en la superficie de las células presentadoras de antígenos**

Figura 6. Características estructurales MHC I y II. Adaptada de Wiecsorek 2017.



### **1.8.2 CD40**

La vía CD40/CD154 regula tanto la inmunidad celular como humoral y presenta un papel fundamental en la diferenciación de células T. La interacción de CD40 con su ligando en células dendríticas aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras, de adhesión, MHC y promueve la producción de citocinas estimuladoras de células T, tales como la IL-12 (Haessle, 2008). Sin embargo, la efectividad de la respuesta dependerá estrictamente de las señales que favorecen la activación de las células T, así como la producción del IFN- $\gamma$  producido durante la presentación antigénica entre las CD y las células T (Figura 7). El ligando de CD40 (CD40-L) se ha encontrado en una variedad de células dendríticas, incluyendo células de Langerhans de bazo y pulmón. La unión de CD40 con su ligando modula la expresión de moléculas de adhesión (E-selectina, VCAM-1 y CD54) y activa macrófagos y células NK (Fonsati, 2010). En cáncer, CD40 también se expresa en muchos varios tipos de tumores sólidos como los de vejiga, mama, ovario y melanoma (Alexandroff, 2000).

### **1.8.3 CD80 y CD86**

Las proteínas CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) son ampliamente usadas para identificar a las CD completamente maduras. Como se observa en la Figura 7, son los ligandos a los receptores CTLA-4 y CD28 en los linfocitos T. Las moléculas CTLA-4 y CD28 son homodímeros unidos por puentes disulfuros y en cada parte del homodímero presentan un sitio de unión a CD80 y CD86, respectivamente (Greene, 1996). A pesar de las similitudes estructurales de dichas uniones, se ha observado la unión de CTLA-4, con CD80 y CD86, se traduce como inhibición de la proliferación de los linfocitos T. Por el contrario, la unión de los ligandos a CD28 aumenta la activación de los linfocitos T. Aparentemente, CD80 y CD86 realizan la misma función. Sin embargo, las diferencias funcionales entre CD80 y CD86 parecen reflejarse en la expresión diferencial, en varios tipos de células o en diferentes momentos durante una respuesta inmune, pero puede haber algunas diferencias funcionales intrínsecas. Así, CD80 y CD86 proporcionan señales

coestimuladoras importantes para aumentar y mantener una respuesta de células T a través de la interacción con CD28. Se ha observado que cuando un antígeno se une al TCR de las células T, éste adquiere una conformación espacial diferente, lo que hace que CD28 tenga una unión más afín a CD80. Además, se ha descrito que CD80 es un dímero divalente, mientras que CD86 es un dímero monovalente, dada la diferencia estructural CD80 interacciona favorablemente con CTLA-4(CD152) mientras que las interacciones de CD86 son preferentemente con CD28 (Sansom, 2003).

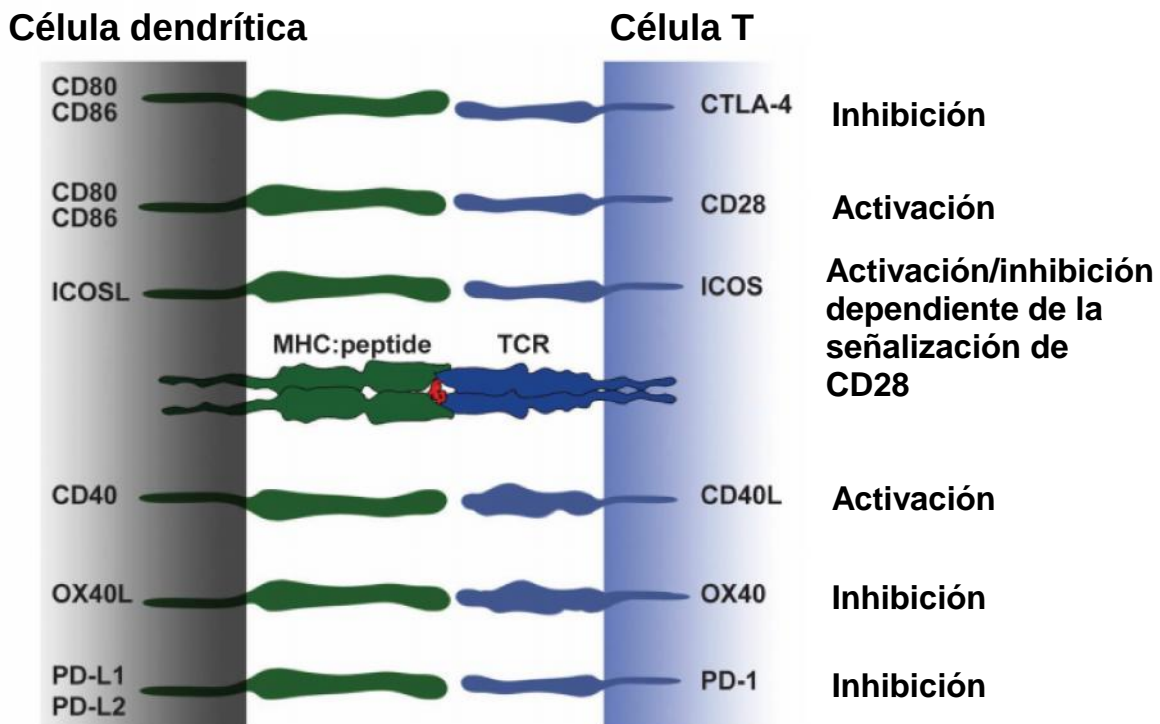


Figura 7. Principales moléculas de la familia B7 y receptores de la familia TNF expresadas en células dendríticas y sus pares de unión en las células T durante la presentación antigénica. Adaptada de Hubo 2013.

---

---

## 2. ANTECEDENTES

---

---

La quimioterapia, es el método más empleado para el tratamiento contra diversos tipos de tumores. Durante el periodo de 1981 a 2014 se aprobaron por la Agencia Regulatoria para la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA), 174 fármacos antitumorales (Figura 8), de los cuales el 17.12% son productos naturales sin modificaciones químicas y 38.28% son derivados de metabolitos de origen natural (Newman, 2016).

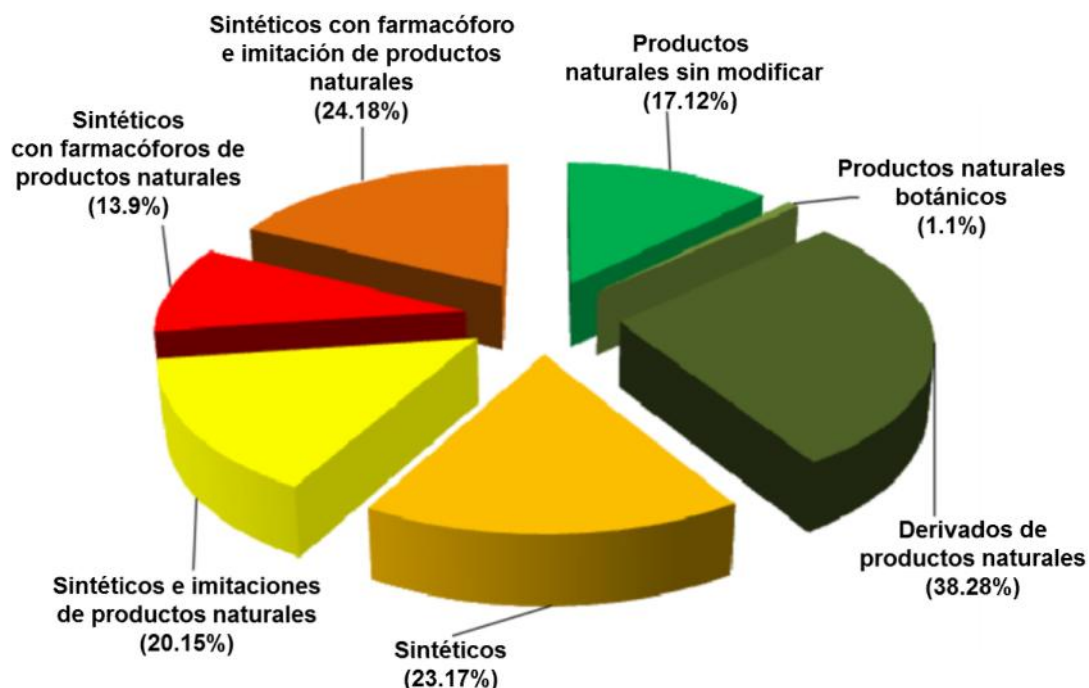
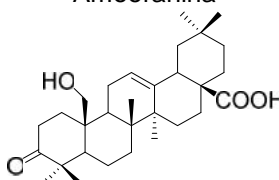
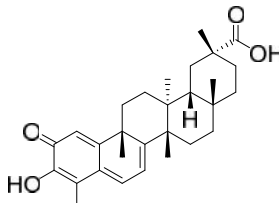
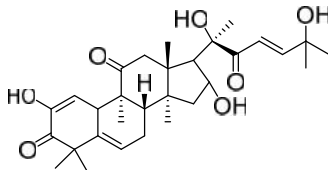
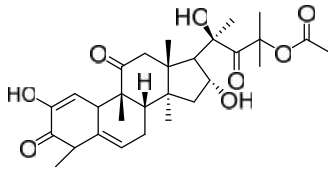
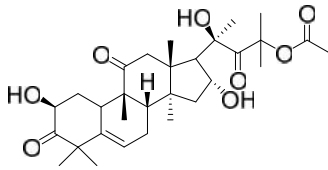


Figura 8. Los productos naturales como fuente de nuevos fármacos. Se muestran las pequeñas moléculas aprobadas como antitumorales de 1981 a 2014. Imagen adaptada de Newman 2016.

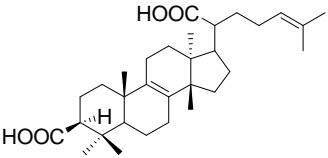
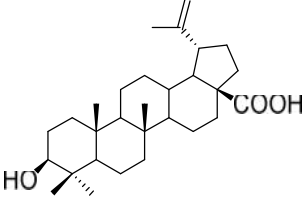
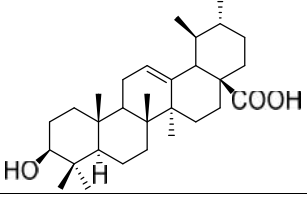
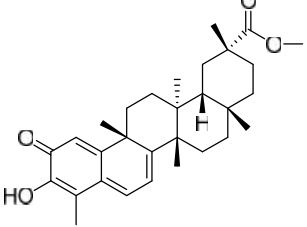
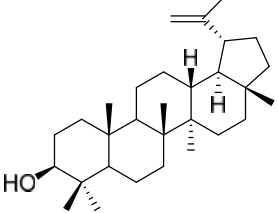
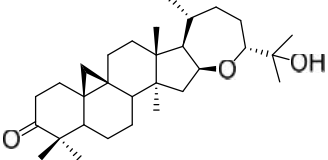
Como se puede observar (Figura 8), las plantas medicinales son una excelente fuente de moléculas con actividad antitumoral “*per se*”, o como precursores de fracciones moleculares bioactivas. En este sentido, algunos estudios han informado de una gama de metabolitos secundarios de origen vegetal con propiedades antitumorales, entre ellos algunos triterpenos como: el ácido

betulínico, el resveratrol, celastrol, cucurbitacina, los ácidos oleanólico y ursólico. La mayoría de los triterpenos citados (Cuadro 1) se encuentran en estudios a nivel preclínico, sólo el ácido betulínico y algunos derivados del ácido oleanólico se han estudiado en la fase clínica I (Petrelli, 2009. Parikh, 2014).

Cuadro 1. Condiciones de tratamiento para algunos triterpenos que inhiben el crecimiento tumoral en modelos murinos.

<b>Triterpeno</b>	<b>Dosis</b>	<b>Vía de administración</b>	<b>Tiempo de tratamiento</b>	<b>Tipo de xenotrasplante</b>	<b>Referencia</b>
<b>Amooranina</b> 	5 mg/kg/ cada cinco días	Intraperitoneal	Ocho semanas	Células SW620	Ramachandran (2006)
<b>Celastrol</b> 	3 mg/kg/día	Intraperitoneal	Dos semanas	Células PC-3 y C4-2B	Yang, (2006)
<b>Cucurbitacina I</b> 	1.3 mg/kg/día	Intraperitoneal	Dos semanas	Células LMP1 y CNE2	Lui, (2009)
<b>Cucurbitacina E</b> 	3 mg/kg/ cada dos días	Intraperitoneal	Seis semanas	Células PC-3	Dong, (2010)
<b>Cucurbitacina B</b> 	1 mg/kg/ tres veces por semana	Intraperitoneal	Seis semanas	Células Panc-1	Iwanski, (2010)

Continuación del Cuadro 1

<p>Ácido 3-acetoxy-tirucálico (-ATA)</p> 	5 mg/kg/día	Intraperitoneal	Dos semanas	Células PC-3	Estrada, (2010)
<p>Ácido betulínico</p> 	25 mg/kg/día	Oral	Tres semanas	Células RKO	Chintharlapalli, (2011)
<p>Ácido ursólico</p> 	50 mg/kg/día	Intraperitoneal	Tres semanas	Células U937	Gao, (2012).
<p>Pristimerina</p> 	3 mg/kg/día	Subcutánea	Dos semanas	Células MDA-MB-231	Mu, (2012)
<p>Lupeol</p> 	20 mg/kg/ tres veces por semana	Intraperitoneal	Tres semanas	Células SMMC7721	Liu, (2013)
<p>Argentatina B</p> 	125, 250 y 500 mg/kg una vez por semana	Intraperitoneal	Tres semanas	Células PC-3 y HCT-15	Alcántara, (2015)

Entre las fuentes de metabolitos secundarios destacan las plantas medicinales. En esta investigación se estudiaron dos de los principales metabolitos secundarios del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* (Schltdl.), un árbol endémico de México

y Centroamérica. Para este árbol, se han reportado alrededor 40 usos en la medicina tradicional entre los que destacan el tratamiento de úlceras gástricas, cáncer gastrointestinal y en algunas condiciones de inflamación (Olivera, 1999, Guzmán, 2014). Las aplicaciones del extracto acuoso en la medicina tradicional, desencadenaron una serie de investigaciones sobre las propiedades biológicas de los principales constituyentes de los extractos orgánicos de la corteza de *A. adstringens*, los triterpenos, ácido masticadienónico (AMD) y el 3 $\alpha$ -OH masticadienico (3 -OH AMD). Inicialmente, estos trabajos se enfocaron a investigar las propiedades antiinflamatorias de dichos compuestos mediante la inhibición del edema inducido por carragenina y la producción de óxido nítrico en macrófagos activados con lipopolisacárido (Oviedo, 2004). Posteriormente, se evaluó la citotoxicidad en cinco líneas celulares de cáncer humano, HCT-15 (colon), MCF-7 (mama), U-251 (sistema nervioso central), PC-3 (prostata), K-562 (leucemia), (Oviedo, 2005). Recientemente, se informó el efecto del ácido 3 $\alpha$ -OH masticadienico sobre las funciones bioenergéticas y la inducción de la transición de la permeabilidad membranal (MPT) en mitocondrias aisladas de hígado de rata. Observando, actividad citotóxica en las líneas celulares de cáncer humano HeLa (cérnix), HepG2 (hígado) y A-431 (carcinoma epidermoide) (Dalla, 2012).

Por otro lado, se tienen evidencias sobre el efecto inmunoestimulante de algunas plantas medicinales de México, Centroamérica y el Caribe, entre ellas *A. adstringens* (Alonso, 2016). Adicionalmente, un estudio en el cual se observó que el tratamiento oral del extracto acuoso de la corteza de *A. adstringens* en ratones inmunodeprimidos (por la inducción de melanoma) aumentaba significativamente la tasa de proliferación de esplenocitos, mediante una prueba de hipersensibilidad tipo retardada. Se observó que a una dosis de 10 mg/kg, el extracto de cuachalalate es capaz de aumentar la respuesta inmune celular *in vivo* sugiriendo que el extracto acuoso de *A. adstringens* podrían restaurar la inmunidad celular de los ratones inmunosuprimidos a niveles de ratones sanos (Ramírez, 2013). La hipersensibilidad de tipo retardada se caracteriza porque intervienen múltiples células como los linfocitos T, células dendríticas, queratinocitos, células

endoteliales, macrófagos y células polimorfonucleares (Akiba, 2002). Además, Rodríguez y su grupo de trabajo en 2016 reportó que el extracto etanólico de la corteza de *A. adstringens* disminuyó los niveles de las citocinas TNF , IFN $\gamma$ , y IL1 $\beta$  y el infiltrado de células de la respuesta inflamatoria en un modelo de colitis experimental (Rodríguez, 2016).

### Triterpenos aislados de la corteza de *A. adstringens*

El AMD ( $C_{30}H_{46}O_3$ ; PM = 454 g/mol) es un triterpeno (C30) que se aísla principalmente del extracto hexánico de *A. adstringens*. La estructura química de dicho compuesto se compone del esqueleto hidrocarbonado de ciclo-pentano-perhidro-fenantreno y se caracteriza porque en C3 presenta un grupo carbonilo. Una cadena alifática de ocho carbonos que inicia en el átomo C-17, la cual incluye un ácido carboxílico en el extremo de ésta (Figura 9). El 3 ZOH AMD ( $C_{30}H_{45}O_3$ ; PM = 453 g/mol). , es un triterpeno (C30) tipo tirucalano. En este trabajo se aisló preferentemente del extracto de acetato de etilo de la corteza de *A. adstringens*. La única diferencia estructural de 3 ZOH AMD y AMD es la presencia de un grupo hidroxilo en C3 en el 3ZOH AMD y un grupo carbonilo en el AMD (Figura 9).

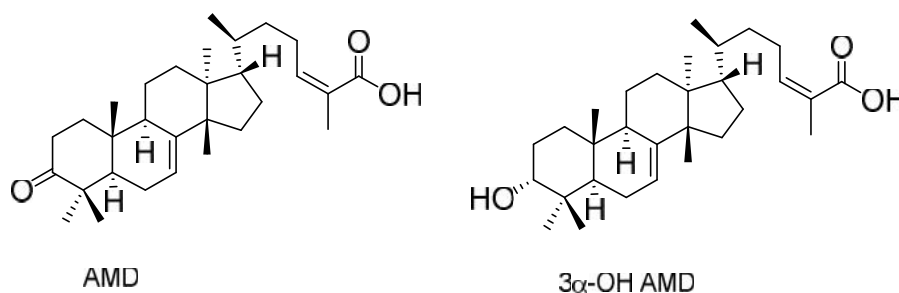


Figura 9. Estructura química de los ácidos masticadienónico (AMD) y 3 -OH masticadienoico (3 $\alpha$ -OH AMD).

---

---

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

---

El tratamiento contra el cáncer ha implicado la exploración de varias líneas de tratamiento, tales como la cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia. En el caso de la quimioterapia, se han usado fármacos tanto de origen vegetal como sintético. Las plantas medicinales, se han constituido como fuente de compuestos antitumorales, por lo tanto en esta investigación se planteó estudiar el efecto antitumoral de dos metabolitos secundarios aislados de *A. adstringens*, los ácidos triterpénicos, AMD y 3 -OH AMD.

Estudios anteriores realizados por nuestro grupo de trabajo, han demostrado que AMD y 3 -OH AMD son antiinflamatorios e inhiben la proliferación de las líneas celulares de cáncer humano HCT-15 (colon), MCF-7 (mama), U-251 (sistema nervioso central), PC-3 (próstata), K-562 (leucemia). No obstante, se desconoce su efecto antitumoral *in vivo* y se tienen limitadas evidencias sobre su mecanismo de acción, por lo que es necesario indagar si el mecanismo de dichos triterpenos es directo sobre las vías de supervivencia o muerte celular, o bien podrían tener un efecto sobre la maduración de células dendríticas.



---

---

## 4. HIPÓTESIS

---

---

Sí algunos triterpenos del tipo tirucalano inhiben la proliferación de células de cáncer humano *in vitro* e implantadas en modelos murinos, entonces los ácidos AMD y 3 -OH AMD inhibirán el crecimiento de los tumores inducidos con las células PC-3 y MDA-MB 231 en un modelo murino.

---

---

## 5. OBJETIVOS

---

---

### 5.1 GENERAL

Estudiar el efecto antitumoral de los ácidos masticadienónico (AMD) y 3 -OH masticadienico (3 -OH AMD) en un modelo murino.

### 5.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Obtener los extractos de hexano y acetato de etilo a partir de la corteza de *A. adstringens* y aislar AMD y 3 -OH AMD por métodos cromatográficos.
- ✓ Corroborar la estructura química de los triterpenos AMD y 3 -OH AMD por técnicas espectroscópicas y análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).
- ✓ Realizar las pruebas de toxicidad aguda y determinar la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) del AMD y 3 -OH AMD.
- ✓ Realizar los ensayos de inhibición del crecimiento tumoral en ratones atímicos xenotrasplantados con células MDA-MB-231 y PC-3.
- ✓ Analizar el efecto de los triterpenos AMD y 3 -OH AMD sobre la proliferación celular usando los marcadores de proliferación Ki67 y PCNA en un modelo murino.
- ✓ Analizar el posible mecanismo de muerte celular inducido por los ácidos AMD y 3 -OH AMD en xenotrasplantes de células MDA-MB-231 y PC-3.
- ✓ Monitorear los posibles efectos tóxicos de los ácidos AMD y 3 -OH AMD a nivel hematológico, hepático y renal.
- ✓ Evaluar el efecto de los ácidos AMD y 3 -OH AMD sobre la viabilidad de células no tumorales, macrófagos, linfocitos, cardiomiocitos y células de colon.
- ✓ Analizar el efecto de los ácidos AMD y 3 -OH AMD sobre la maduración de células dendríticas.

---

---

## 6. MATERIALES Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

---

---

### 6.1 Material vegetal

La corteza de *A. adstringens* se colectó durante en el mes de enero de 2012, en el estado de Morelos en el municipio de Tlaltizapán, el cual se localiza geográficamente al norte 18°, 49', 50" al sur a 18°34'41", al este a una longitud de 98°59'44" y 99°11'58" al oeste. Dicho municipio se encuentra entre 700 a 1700 msnm. La temperatura media anual en esta localidad se ha reportado en el rango de 22 a 24 °C y la precipitación promedio de lluvia es de 1060.4 mm anuales (INEGI, 2015). La corteza (5.97 kg) se cortó en piezas de 2 cm aproximadamente, los cuales se colocaron sobre papel periódico para su secado sin exposición al sol. La maceración de la corteza se hizo en 5 matraces y se realizó la extracción con hexano de 3 a 4 veces por ciclos de 48 horas a temperatura ambiente. La extracción con acetato de etilo se obtuvo en las mismas condiciones de temperatura y después de secar el material vegetal una vez concluida la extracción con hexano. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida para obtener los extractos concentrados.

### 6.2 Aislamiento de los ácidos masticadienónico (AMD) y 3 -hidroxi masticadienoico (3 $\alpha$ -OH AMD)

Los ácidos se aislaron y purificaron en el Laboratorio 1-4 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México de acuerdo con la metodología descrita por Oviedo en 2007, con las modificaciones que se precisan en este texto. Los extractos de hexano (residuo aceitoso color miel) y acetato de etilo (residuo verde oscuro) se separaron por cromatografía en columna (CC) a presión reducida, utilizando gel de sílice 60 (mesh 230-400 ASTM) de Merck® en una columna de vidrio. Se prepararon mezclas de dos disolventes uno polar, otro de mediana polaridad para usarse como eluyentes, hexano y acetato de etilo de 1:0 a 7:3, respectivamente. Se colectaron 66 fracciones de 100 mL cada una, de la

fracción 1 a la 18 fueron eluidas con hexano y se obtuvieron los ácidos anacárdicos, de la 19 a la 48 se obtuvieron con una mezcla 90:10 (hexano-AcOEt) donde se aisló el ácido masticadienónico, de las fracciones 49 a 58, 59-62 y 63-64 se utilizó como fase móvil una mezcla 85:15, 80:20 y 70:30 (hexano-AcOEt) aislándose el ácido 3 -OH masticadienoico. Finalmente, la columna se lavó con acetato de etilo y se obtuvieron mezclas complejas de compuestos más polares. El proceso de purificación se monitoreó por cromatografía en capa fina (CCF) en placas de gel de sílice con indicador de luz UV y como revelador una disolución de sulfato cérico en disolución ácida. Se reunieron las muestras con desplazamiento similar en CCF y se obtuvieron cinco fracciones principales (F1-F5). La fracción F2 se purificó por recristalización mediante la técnica de par de disolventes, el sólido se filtró a presión reducida y se lavó con una mezcla hexano-acetato de etilo (9:1) para obtener el AMD como un polvo blanco amorfo. Las fracciones de la F3 a F4 se purificaron igualmente por recristalización seguida de la filtración y el filtrado se lavó con una mezcla hexano-acetato de etilo (4:1), obteniendo el compuesto 3 -OH AMD como un sólido blanco amorfo. La pureza de los triterpenos fue determinada por análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en las siguientes condiciones experimentales: una columna Zorbax Eclipse Plus C-18, fase móvil metanol/agua (4:1), el tiempo por ciclo de experimentación fue de 15 minutos a un flujo de 0.2 mL/minutos, la determinación de UV fue a 240 nm.

### **6.3 Solubilidad de los triterpenos AMD y 3 -OH AMD**

Los triterpenos en general, son moléculas poco solubles o insolubles en disolución acuosa, debido a su naturaleza química, pero la solubilidad de dichas moléculas se favorece en disolventes orgánicos, tales como acetato de etilo, etanol y metanol con un rango de solubilidad entre 10 y 14 de acuerdo con los parámetros de Hildebrand (Schneider, 2009). El hecho anterior, dificulta la ministración de dichos compuestos tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* al estudiar sus propiedades biológicas. En este trabajo fue necesario evaluar la solubilidad de los triterpenos AMD y 3 ZOH AMD en diferentes disolventes; para seleccionar el que presentara baja o nula toxicidad para las líneas celulares o animales de experimentación.

Para el desarrollo de los experimentos se usó una disolución inicial 25 mg/mL en los siguientes disolventes: etanol, tween 80, PBS, carboximetilcelulosa (CMC), sulfóxido de dimetilo (SODM), SODM-aceite de maíz (5% v/v), SODM-aceite de ajonjolí (5% v/v). Los disolventes que favorecieron el proceso de disolución de los ácidos fueron las mezclas SODM-aceite de maíz y SODM-aceite de ajonjolí.

#### **6.4 Selección de las líneas celulares tumorales**

La selección de las líneas celulares para ser utilizadas en los experimentos *in vivo* se hizo con base en los datos de los estudios *in vitro* correspondientes a los ácidos AMD y 3 -OH AMD. Con el fin de complementar los datos de la literatura, en este estudio se analizó el efecto de los ácidos AMD y 3 ZOH AMD sobre la viabilidad celular de las líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231) y próstata (PC-3) y cuatro líneas celulares no tumorales. Las líneas celulares fueron donadas por el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCNSZ), México, CDMX.

Las características asignadas por Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC) para las líneas celulares tumorales se muestran en los Cuadros 2 y 3.

Cuadro 2. Características de la línea celular MDA-MB-231 (CRM-HTB-26).

<b>Característica</b>	<b>Descripción</b>
Morfología	Epitelial
Propiedades de crecimiento	Adherente en cultivo celular y tumorigénica en modelos murinos, por inoculación subcutánea. En ratones desnudos induce masas tumorales pocas diferenciadas (grado III)
Órgano de procedencia	Glándula mamaria. La línea celular se deriva de un sitio metastásico pleural
Enfermedad descrita	Adenocarcinoma
Expresión de receptores	Factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF $\beta$ ). No expresa el receptor de estrógenos (RE), el receptor de andrógenos (RA) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her2)
Tiempo de duplicación de la población celular	38 horas aproximadamente
Observaciones	La línea celular expresa el oncogen WNT7B

Cuadro 3. Características de la línea celular PC-3 (ATCC CRL-1435).

<b>Característica</b>	<b>Descripción</b>
Morfología	Epitelial
Propiedades de crecimiento	Adherente. La línea celular es tumorigénica en modelos murinos por inoculación subcutánea.
Órgano de procedencia	Próstata derivada de un sitio metastásico óseo
Enfermedad descrita	Adenocarcinoma grado IV
Expresión de receptores	No expresa el receptor de andrógenos (RA)
Tiempo de duplicación de la población celular	25 horas aproximadamente
Observaciones	La línea celular tiene expresión disminuida de la actividad de fosfatasa y testosterona-5 $\alpha$ reductasa

### **6.5 Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares**

Para el mantenimiento de las líneas celulares se utilizó el medio del Instituto Memorial Roswell Park variedad 1640 (RPMI-1640). El medio de cultivo fue adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado a 56 °C en baño de agua, sulfato de estreptomycin (250  $\mu$ g/mL), penicilina (250 U/mL), anfotericina B (0.625  $\mu$ g/mL) y L-glutamina (2 mM). Las condiciones de incubación fueron temperatura de 37 °C, una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y cámara de humedad. Cabe precisar que todo el manejo de los cultivos celulares se llevó a cabo en

condiciones de esterilidad. Cuando los cultivos alcanzaron 80% de confluencia se realizaron resiembras siguiendo el procedimiento que se muestra a continuación:

- 1) El medio de cultivo se eliminó por el método de presión reducida y la monocapa celular se lavó tres veces con disolución amortiguadora de fosfatos (PBS) a pH de 7.2 con el fin de remover los residuos de medio y celulares
- 2) Para cosechar las células se agregaron de 2 a 3 mL de una disolución de tripsina 1% en verseno. Los cultivos se observaron mediante un microscopio invertido hasta que perdieran la adherencia a la superficie de la caja de cultivo
- 3) Para inhibir la acción de la tripsina se adicionaron 3 mL de medio de cultivo con suero fetal bovino
- 4) Las células se lavaron por centrifugación a 1,500 rpm durante 5 minutos
- 5) Se eliminó el sobrenadante y las células se suspendieron en medio de cultivo completo
- 6) Se realizó la cuantificación celular y se inocularon  $7.5 \times 10^4$  células PC-3 o  $2 \times 10^6$  células MDA-MB-231 en cajas que contenían 10 mL de medio de cultivo fresco.

La crioconservación de las células se realizó en SFB adicionado con 10% v/v de SODM; se congelaron alícuotas de 1 mL a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **6.6 Ensayos de citotoxicidad y determinación de la viabilidad celular mediante el método del cristal violeta**

Las células en cultivo se separan de la superficie de las placas de cultivo durante la muerte celular. Esta característica puede utilizarse como medida indirecta de la muerte celular y para establecer las diferencias después de la estimulación con agentes citotóxicos. Un método sencillo para determinar las células que han mantenido su adherencia después de cierto estímulo, es la tinción con el colorante



cristal violeta el cual se une a las proteínas y ADN (Feoktistova, 2016). Las células que mueren pierden su adherencia y son eliminadas de las poblaciones celulares totales, reduciéndose así la cantidad de colorante que se une a las células. Este método es adecuado para medir el impacto de los quimioterapéuticos sobre la viabilidad celular, no obstante, la determinación de los mecanismos requiere otras determinaciones que complementen el ensayo.

Con el fin de determinar el efecto citotóxico de los triterpenos AMD y 3 ZOH AMD sobre las líneas celulares PC-3 y MDA-MB-231, se sembraron  $4 \times 10^4$  células por centímetro cuadrado en 0.5 mL de medio RPMI-1640 adicionado con 10% de SFB, en placas de cultivo de 48 pozos. Las células se incubaron durante 24 h a 37 °C, con cámara de humedad y 5% de CO<sub>2</sub> para formar la monocapa. Se continuó con dos lavados con 0.5 mL de PBS en cada pozo y se colocaron 0.5 mL de cada una de las concentraciones 12.5, 25, 50 y 100  $\mu$ M de AMD o 3 ZOH AMD. Los compuestos fueron disueltos en SODM y diluidos 1:100 en RPMI-1640 adicionado con 10% SFB, a partir de la dilución anterior se prepararon concentraciones seriadas para realizar las curvas concentración-respuesta. El control de la proliferación celular (control negativo) se mantuvo con RPMI-1640 adicionado con 10% SFB o medio más SODM. El *cis*-diaminodicloro platino II (cisplatino, número de catálogo 479306 de sigma-aldrich®) se usó como fármaco de referencia a las concentraciones de 2.5, 5, 10 y 20  $\mu$ M en los cultivos de células PC-3. El clorhidrato de doxorubicina (número de catálogo D1515 sigma-aldrich®) fue el fármaco de referencia para los cultivos de células MDA-MB-231 a las concentraciones de 0.05, 0.1, 0.2 0.4, 0.8  $\mu$ M. La detección de la viabilidad celular se desarrolló de acuerdo con la Figura 10. Para la determinación del efecto de los triterpenos AMD y 3 ZOH AMD sobre la viabilidad celular de las líneas no tumorales, se usaron las mismas condiciones experimentales, con la particularidad de que los compuestos se aplicaron a la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) encontrada para las líneas tumorales.

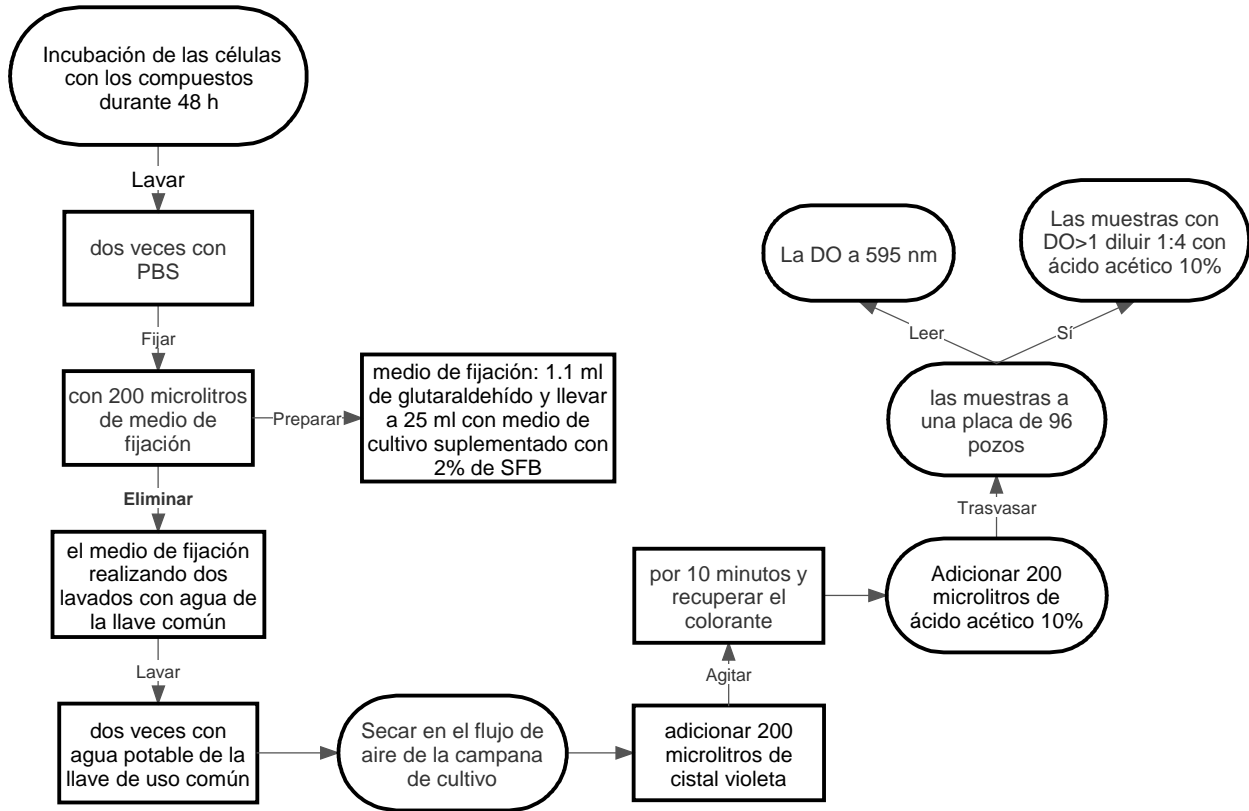


Figura 10. Flujograma para detectar la viabilidad celular mediante el ensayo de cristal violeta. DO: densidad óptica.

### 6.7 Determinación de células viables mediante el método de tinción por exclusión

El método de tinción por exclusión se utiliza para determinar el número de células viables en una suspensión celular. Se basa en el principio en el que las células vivas tienen sus membranas integra y excluyen el ingreso de ciertos colorantes como el azul de tripano mientras que las células muertas no. En este ensayo se mezcla la suspensión celular con el colorante y se hace la observación microscópica, así las células vivas son refringentes (no se tiñen) y las células muertas se tiñen de color azul (Louis, 2011).

La fase cuantitativa de la prueba implica contar tanto las células vivas como muertas. En este estudio se mezclaron 900  $\mu$ L de la suspensión celular con 100

μL de una disolución de azul de tripano 0.25% en PBS a pH 7.2. Las células se contaron en los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer y el número total de células se obtuvo de acuerdo con la siguiente relación matemática:

$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = \frac{\text{NDCC}}{4} (10,000)(\text{FD})$$

Dónde:

NDCC: número de células contadas

FD: factor de dilución

Para determinar el porcentaje de viabilidad, se tomó el número de células en los cuatro cuadrantes y se comparó con la cuenta de células refringentes al azul de tripano obteniendo así su porcentaje. Tanto para los ensayos de citotoxicidad como para los xenotransplantes de células PC-3 y MDA-MB-231 en ratones nu/nu, el porcentaje de viabilidad fue siempre mayor a 90%.

### **6.8 Determinación de la DL<sub>50</sub> de los ácidos masticadienónico y 3 -OH masticadienoico**

Se evaluó una de las propiedades farmacológicas más importantes para considerar a una molécula en el desarrollo de nuevos fármacos. En el caso de los fármacos antitumorales este aspecto es crucial, ya que en muchos ejemplos la dosis efectiva es numéricamente muy cercana a la dosis tóxica. Para los triterpenos AMD y 3 ZOH AMD esta información es representativa ya que dichas moléculas tienen potencial terapéutico como agentes antitumorales.

La determinación de la DL<sub>50</sub> se hizo mediante el método de Lorke (Lorke, 1983) en ratones hembras de la cepa CD1. Inicialmente, tres grupos (n = 3) recibieron una dosis única con 10, 100 y 1000 mg/kg de cada uno de los triterpenos. Con el objetivo de validar el experimento se adicionaron dos grupos: el primero se ministró con el vehículo, aceite de ajonjolí más 5% de sulfóxido de dimetilo

(SODM) y el segundo grupo permaneció sin tratamiento. La segunda fase del experimento consistió en la evaluación de las dosis 125, 250, 500 y 750 mg/kg para el AMD y 125, 170, 210, 250 y 500 mg/kg para el 3 ZOH AMD. Los tratamientos se ministraron por la vía intraperitoneal y los animales permanecieron en ayuno de cuatro horas después del tratamiento. Los decesos se observaron durante las primeras cuatro horas y el peso se monitoreo por catorce días en los individuos sobrevivientes. Los animales que murieron por el efecto de los compuestos fueron enviados al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (las observaciones morfológicas se informan en el Cuadro 9).

La  $DL_{50}$  fue calculada como la raíz cuadrada del producto, de la dosis menor que causa la muerte de al menos un individuo de la población, por la dosis mayor que no es letal (ver en sección de resultados el cálculo para cada triterpeno).

### **6.9 Ensayo de inhibición del crecimiento tumoral sobre xenotrasplantes de carcinoma de mama y próstata en un modelo murino**

Los experimentos que involucraron animales se desarrollaron de acuerdo con el protocolo con número de referencia CINVA 1488 y clave BQO 1488-15/17-1 aprobado por la Comisión de Investigación en Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

Los ratones machos de la cepa nu/nu, de 4 a 6 semanas de edad, cuyo peso fue de 20 a 25 g fueron proporcionados por el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del (INCMNSZ).

Los animales se hospedaron en microaisladores a temperatura de  $22 \pm 2$  °C y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Una de las características de la cepa nu/nu es su alta susceptibilidad a las infecciones bacterianas, parasitarias y virales por lo que fue necesario proporcionar alimento, agua y cama de aserrín estériles. Adicionalmente, el manejo de los animales se hizo en condiciones de asepsia y en

los puntos críticos se atendieron condiciones de esterilidad; tales como la inoculación de la suspensión celular, ministración de los tratamientos y la disección de los tejidos tumorales (Fogh, 1982).

### **6.9.1 Xenotrasplantes de células PC-3**

Los ratones se inocularon con  $3 \times 10^6$  células PC-3/100  $\mu$ L de medio blanco, por vía subcutánea. Tres semanas después de la inoculación de las células, cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de 50  $\text{mm}^3$ , los ratones se aleatorizaron en ocho grupos con 6 ratones cada uno. Los grupos de tratamiento se organizaron de la siguiente forma: el control negativo fue ministrado sólo con el vehículo (aceite de ajonjolí más 5% SODM), el control positivo, con el fármaco de referencia (*cis*-diaminodicloro platino II, 2 o 4 mg/kg) y los otros cinco grupos restantes se les dio tratamiento con las dosis de 250, 125 y 60 mg/kg de AMD o 60, 125 mg/kg de 3 -OH AMD. El esquema de tratamiento fue una dosis única cada semana, durante tres semanas por vía i.p. La predicción de las dosis de los dos triterpenos para aplicase en el modelo de xenotrasplantes, se hizo tomando como base la dosis letal 50 ( $\text{LD}_{50}$ ) determinada por la vía intraperitoneal.

El experimento se monitoreó por tres semanas, tomando las medidas del tumor (diámetro mayor y menor) y el peso de los animales. Después de 21 días de tratamiento los animales de experimentación se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg) por la vía intraperitoneal, con el objetivo de coleccionar muestras sanguíneas por punción intracardiaca. Finalmente, los animales anestesiados se sacrificaron mediante una cámara de éter etílico para realizar la disección de los tejidos tumorales; los cuales se conservaron en formol al 10% en PBS. Los diámetros mayor y menor se midieron con un calibrador digital de Vernier, el volumen tumoral se calculó de acuerdo con el siguiente algoritmo matemático:  $V = \frac{4}{3} \times (\text{diámetro mayor} \times [\text{diámetro menor}]^2)$  (Medina, 2008).

### **6.9.2 Xenotrasplantes de células MDA-MB-231**

En este ensayo se emplearon ratones hembras de la cepa nu/nu, de tres a cuatro semanas de edad y peso aproximado de 15 g. Los ratones se inocularon con  $5 \times 10^6$  células MDA-MB-231 en un volumen de 100  $\mu$ L de medio blanco (RPMI-1640 sin SFB y rojo de fenol). El experimento de inhibición del crecimiento tumoral de los triterpenos AMD y 3-OH AMD sobre xenotrasplantes de células MDA-MB-231, se desarrolló siguiendo la secuencia del flujograma indicado en la Figura 11. Este experimento se concluyó a los 12 días de tratamiento y se conservaron los tejidos tumorales en formaldehído al 10% en PBS así como por el método de criofijación.

Las muestras de los tejidos fijados en formaldehído al 10% fueron enviadas al Laboratorio de Histología, Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM para realizar la conservación de las muestras por la técnica de deshidratación e inclusión en parafina.

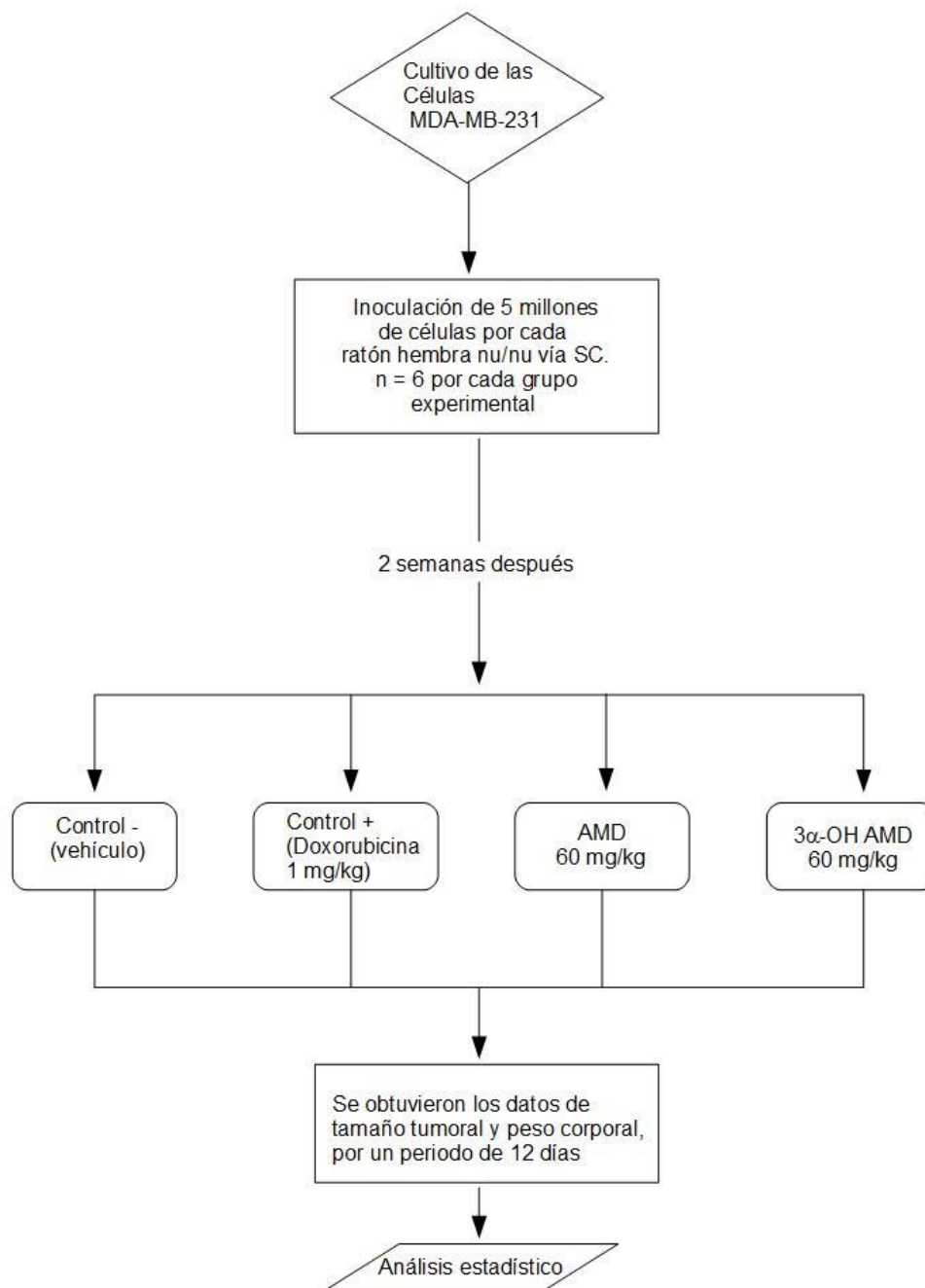


Figura 11. Evaluación del efecto antitumoral de los ácidos AMD y 3 -OH AMD sobre xenotrasplantes de células MDA-MB-231. SC: subcutánea. Los tratamientos se inyectaron por la vía intraperitoneal.

### **6.10 Preservación de los tejidos tumorales y tinción por la técnica hematoxilina-eosina.**

La preparación histológica para la observación microscópica debe contener las siguientes etapas (Welsch, 2013).

- ) Fijación de la muestra, la cual tiene como objetivo mantener en la medida de lo posible el estado natural de la misma evitando la desintegración y su autólisis. Además de eliminar agentes contaminantes.
- ) Lavado para eliminar el exceso de disolución fijadora
- ) Deshidratación con etanol en concentraciones decrecientes (etanol absoluto, al 90%, 80%, 70% y 60%)
- ) Inclusión: las muestras de tejido fijadas se colocan en un disolvente orgánico como xilol, para poder incluirlas en parafina líquida y posteriormente cortarlas una vez que la parafina pasó del estado líquido al sólido.
- ) Realización de los cortes tiene como objetivo obtener fragmentos que sean adecuados para su posterior coloración. Para la microscopía óptica rutinaria los cortes que se utilizan miden de 5 a 8  $\mu\text{m}$  de grosor, no obstante, en este experimento fue necesario trabajar con cortes de 4  $\mu\text{m}$  para tener una mejor visualización de los marcadores nucleares.
- ) Coloración o tinción, este procedimiento tiene como objetivo evidenciar diferencialmente los componentes celulares; para tener mayor detalle en la observación microscópica.

El primer acercamiento sobre la observación de la estructura tisular de las muestras de xenotrasplantes, de células PC-3 y MDA-MB-231 fue mediante la tinción con hematoxilina y eosina. El resultado de la tinción con estos dos colorantes son los núcleos celulares teñidos de azul a morado y los citoplasmas celulares en rosa (Feldman, 2014). Químicamente, la hematoxilina es considerada un colorante básico debido a que la fracción molecular que se une a los



componentes celulares tiene carga positiva, así este colorante se une electrostáticamente a los grupos fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) de los ácidos nucleicos, los grupos sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) de los glucosaminoglucanos y los grupos carboxilato ( $\text{R-COO}^-$ ) de las proteínas. La eosina, el colorante de contraste, es considerado un colorante ácido porque se une a grupos catiónicos de los componentes celulares (Fortoul, 2010). Como se ha reseñado antes, esta tinción es inespecífica, pero funcionó como un primer acercamiento a la observación de la estructura tisular de los xenotrasplantes.

### **6.11 Inmunolocalización de factores de proliferación celular en tejidos tumorales de carcinoma de próstata**

El análisis por inmunohistoquímica como su nombre lo sugiere es la combinación de técnicas histológicas, inmunológicas y químicas, para la identificación de antígenos celulares específicos. La técnica permite identificar la localización y distribución de moléculas específicas mediante una reacción antígeno-anticuerpo en células o tejidos. La inmunohistoquímica se utiliza en una variedad de disciplinas tales como la patología, bioquímica y medicina. Esta metodología es una herramienta de apoyo diagnóstico y búsqueda de marcadores de pronóstico, así como la predicción de la respuesta al tratamiento en cáncer (Taylor, 2014).

Para el análisis inmunohistoquímico de los tejidos tumorales conservados en el experimento 6.10, los tumores se cortaron en rebanadas de 4  $\mu\text{m}$  de grosor y se colocaron sobre portaobjetos cargados con poly-L-lisina. Los cortes se conservaron por el método de inclusión en parafina, por lo que fue necesario llevar a cabo la desparafinación a 56-60 °C por 30 minutos con xilol, etanol absoluto, al 90%, 80% y 70%, agua destilada y disolución amortiguadora de fosfatos (PBS).

Este exordio describe la preparación de las muestras antes las determinaciones por inmunohistoquímica. La secuencia experimental se resume en los siguientes pasos:

1. Recuperación antigénica: en amortiguador de citratos a pH de 6, a 120 °C en olla de presión durante 3 minutos. Posteriormente, se realizan tres lavados con PBS, durante cinco minutos cada uno.
2. Bloqueo de la peroxidasa endógena: el bloqueo se hizo exponiendo los tejidos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% durante 10 minutos, seguido de tres lavados con PBS de 3 minutos cada uno.
3. Permeabilización: se realizó por tratamiento con una disolución de tritón X-100 al 0.2% durante 10 minutos.
4. Bloqueo de señal inespecífica: consistió en exponer los tejidos a una disolución de albúmina al 0.1% en PBS durante 10 minutos, el exceso de albúmina se eliminó con lavados de PBS.
5. Incubación con el anticuerpo primario: se utilizaron los anticuerpos anti-PCNA, hecho en cabra (1:200) y anti-Ki67 (1:100) hecho en conejo. Los anticuerpos fueron adquiridos de la compañía Santa Cruz Biotechnology, Inc. PCNA (sc-9857) y Ki67 (sc-15402). La incubación se realizó durante toda la noche a 4 °C, seguida de tres lavados con PBS (3 minutos cada uno).
6. Bloqueo de la señal inespecífica: se hizo nuevamente el tratamiento con disolución de albúmina al 0.1% en PBS durante 10 minutos.
7. Incubación con el anticuerpo secundario: el anticuerpo secundario unido a biotina anti-IgG anti-cabra y anti-conejo respectivamente. La incubación se realizó a 37 °C durante 30 minutos, con tres lavados posteriores con PBS.
8. Incubación con el complejo estreptavidina-peroxidasa (HRP): a 37 °C durante 30 minutos.
9. Revelado: la detección de las señales inmunohistoquímicas se realizó con diaminobenzidina (DAB) por 3 minutos.
10. Contraintinción: con el fin de diferenciar los núcleos marcados con productos inmunoreactivos o con hematoxilina; se realizó una tinción con hematoxilina de Harris durante tres a cinco minutos en cada tejido.

11. Deshidratación de los tejidos: se hizo con un gradiente etanol al 70%, 80%, y 90% (30 lavados instantáneos en cada caso), etanol absoluto (por 3 minutos), xilol (por cinco minutos).
12. Montaje con resina hidrofóbica.

### **6.12 Determinación de apoptosis celular por la técnica de TUNEL**

La fragmentación del DNA es una característica de la apoptosis. En este ensayo se utiliza la transferasa terminal (rTdT) que añade nucleótidos (dUTPs) marcados con biotina a los extremos 3' libres en el DNA, lo que permite detectar la fragmentación del DNA producida por la muerte por apoptosis. La biotina es un sustrato del complejo HRP y el revelado para evidenciar la marca apoptótica se hace mediante una reacción con diaminobenzidina (DAB), un sustrato cromogénico (Figuroa, 2017).

Para desarrollar el experimento se utilizó el kit Promega® (G7131) para detección de la fragmentación del DNA *in situ*. Se obtuvieron cortes seriados de 4 µm de los tejidos incluidos en parafina. Después se les retiró la parafina a 56-60 °C por 30 minutos y con un gradiente desde xilol, etanol absoluto, al 90%, 80%, 70%, agua destilada y disolución amortiguadora de fosfatos (PBS). El desarrollo experimental se realizó según el manual de procedimientos indicado en G7131 y se describe en la siguiente secuencia:

1. Tratamiento con NaCl al 0.85% por 5 minutos
2. Lavado con PBS por 3 minutos
3. Fijación de los tejidos con formol al 10% por 10 minutos. Seguido de tres lavados con PBS, durante 3 minutos cada uno.
4. Permeabilización de la membrana nuclear: se realizó por exposición de los tejidos con proteinasa K diluida 1:500 por 10 minutos, el exceso de proteinasa K se eliminó con lavados de PBS por 3 minutos cada uno.
5. Fijación nuevamente con formaldehído al 10% durante 5 minutos
6. Tratamiento con el buffer de equilibrio durante 10 minutos

7. Incubación con los nucleótidos biotinilados y la rTdT a 37 °C por 60 minutos (es importante proteger de la luz).
8. Concluir la reacción adicionando solución salina 20x y lavar tres veces con PBS.
9. La Inhibición de la peroxidasa endógena se realizó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% durante 5 minutos y sus respectivos lavados con disolución amortiguadora (PBS).
10. Incubación con el complejo HRP (1:500), a 37 °C durante 30 minutos y tres lavados con PBS.
11. Las señales de apoptosis se visualizaron mediante la reacción con diaminobenzidina (DAB), la exposición de los tejidos con este reactivo fue durante 10 minutos. Finalizar la reacción con un lavado con agua destilada
12. Contraintinción con hematoxilina de Harris.
13. Deshidratación con un gradiente desde etanol al 70%, 80% y 90% (30 lavados instantáneos en cada caso), etanol absoluto (por 3 minutos), xilol por cinco minutos.
14. La conservación de las muestras se realizó por montaje con resina hidrofóbica.

### **6.13 Análisis microscópico de las muestras y adquisición de fotomicrografías.**

Las fotomicrografías del análisis histológico, inmunotinciones y resultados del ensayo TUNEL se tomaron con una cámara digital Nikon DS-U2, acoplada a un microscopio Nikon Eclipse 80i; usando el software de captura Nis Elements-F versión 3.0, instalado en un equipo cuyo sistema operativo es Windows XP. Para tomar las fotomicrografías, se seleccionaron los parámetros de iluminación más adecuados desde el microscopio y se cuidó minuciosamente tomar todas las fotografías con la misma intensidad de luz, así como los elementos digitales. De cada corte se hizo la observación microscópica total y se tomaron 10 fotomicrografías con la lente objetiva de 40x y 10 con la lente de 20x; con el

objetivo de tener mayor área de visualización. Las imágenes fueron digitalizadas a 2560 × 1920 píxeles en formato TIF.

#### **6.14 Análisis cuantitativo de las fotomicrografías**

El análisis cuantitativo se llevó a cabo con el software de análisis de imagen Image Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics). Las áreas en color café correspondientes a la inmunotinción se cuantificaron como la suma de las áreas o el número de núcleos así como la densidad óptica integrada (DOI). Primeramente, se estandarizaron los rangos de calibración espacial (50  $\mu\text{m}$ ), la DOI (0-10,000 unidades), tamaño de área de los objetos que se cuantificaron (1-300,000  $\mu^2$ ) y definieron los colores a analizar. Este último rango, se seleccionó realizando un análisis primario en 10 fotografías, para encontrar el ejemplar con la menor marca (color más claro) y donde se observó mayor marca (café más oscuro); utilizando el criterio de tonalidad, saturación e intensidad por sus siglas en el idioma inglés (HSI). Finalmente, se diseñó una secuencia de instrucciones informáticas “macro” para analizar todas las fotomicrografías de forma automática. Dicha programación se formó con las siguientes instrucciones:

- a) Importar cada una de las fotomicrografías: desde el menú file > open seleccionar la carpeta donde se guardaron las imágenes y desplegarlas desde la plataforma del programa Image Pro Plus 7.0. La aplicación de la calibración espacial de 50  $\mu\text{m}$ : el programa de forma predeterminada emite los resultados del análisis en píxeles, por lo que fue necesario diseñar una conversión a micras que es la escala microscópica a la que se tomaron las imágenes. Esta opción se encuentra en la barra de herramientas superior siguiendo el algoritmo: “measure > calibration > Spatial Calibration. En esta última opción se abre una ventana donde se muestra la calibración guardada previamente, seleccionar y se configurará automáticamente en cada fotografía que se trabaje (Figura 12a).

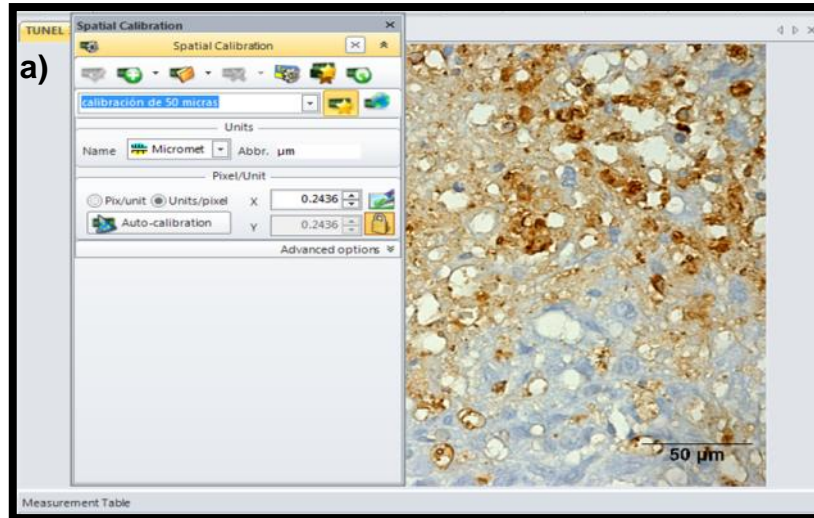


Figura 12a. Ventana de aplicación de la calibración espacial de 50 µm.

- b) Calibración de intensidad: este parámetro se programa con el fin de definir los colores que el programa cuantificará como “claro” u “oscuro” para calcular la densidad óptica. Igualmente, el algoritmo es: “Measure > Calibration > Intensity Calibration > ajustar a la curva: std: Optical Density” con la fotografía que presentó la mayor intensidad de la marca; indicando manualmente las áreas más oscuras y claras en dicha imagen (Figura 12b).

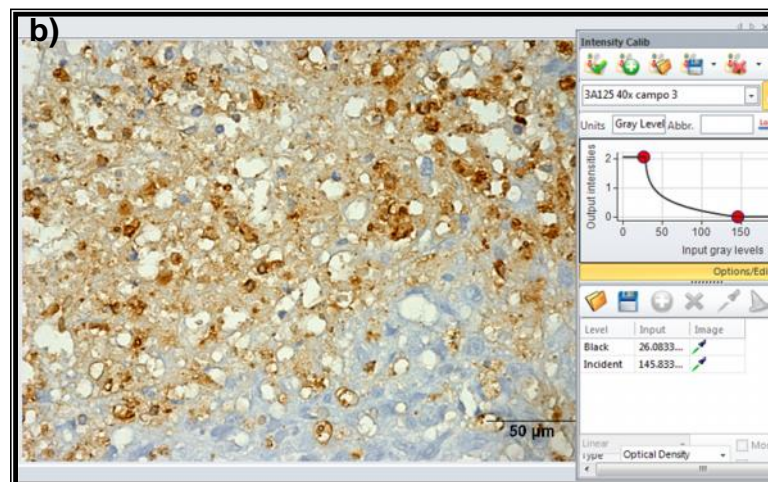


Figura 12b. Aplicación de la calibración de intensidad para determinar la densidad óptica.

c) Segmentación de los colores: esta herramienta permitió seleccionar el rango de colores que se determinó como marca positiva para los ensayos de inmunohistoquímica o TUNEL. Las instrucciones son las siguientes: “count/size > Intensity range selection > manual” con lo cual se despliega la ventana de segmentación de colores. El análisis se desarrolló usando el histograma de colores y el criterio HSI. Finalmente, se definieron los valores máximos y mínimos para H, después de analizar 10 fotomicrografías de cada tipo de tinción, oscilando el valor mínimo de 2 a 4 y máximo 36 a 53. Los valores de S e I se consideraron variables para cada imagen como se indica en el manual de operación del programa.

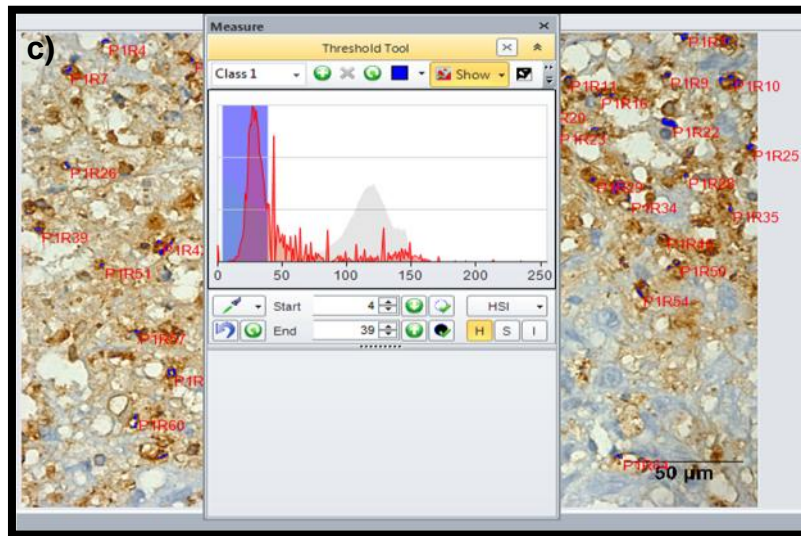


Figura 12c. Fragmentación de los colores a analizar en la cuantificación de productos inmunoreactivos de las tinciones por TUNEL.

d) Análisis de las áreas totales y DOI: “count/size > measure > select measurements” finalmente, se genera una ventana donde se muestran todas las variables que el programa puede medir. En este caso sólo se seleccionaron la suma de las áreas y DOI como parámetros representativos del análisis. Los datos se exportaron al programa excel

para su análisis estadístico. Un ejemplo se puede observar en la Figura 12d.

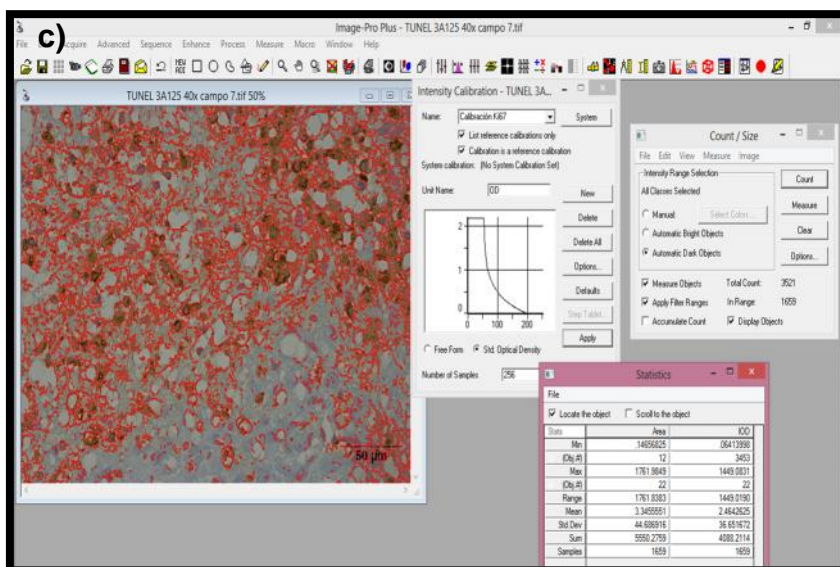


Figura 12d. Generación de resultados sobre áreas y DOI en cada fotomicrografía.

## 6.15 Efecto de los ácidos AMD y 3 -OH AMD sobre la maduración de células dendríticas.

Para complementar la indagación sobre el efecto antitumoral de los triterpenos AMD y 3 -OH AMD, se planteó la hipótesis de que dichas moléculas potencian una respuesta inmune antitumoral, a través de la maduración de células dendríticas.

### 6.15.1 Obtención y caracterización de células dendríticas a partir de médula ósea

Se obtuvieron células dendríticas derivadas de médula ósea, de acuerdo con la metodología descrita previamente descrita con algunas modificaciones (Lutz, 1999). El método consistió en obtener los huesos fémur y tibia de ratones C57BL/6, se remueve el músculo y los huesos se desinfectan con lavados de etanol al 70%. Las epífisis y diáfisis de los huesos se remueven con disolución salina de fosfatos (0.4 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.726 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 9 g/L de NaCl y 0.2 g/L de KCl). Las células se sembraron en medio RPMI-1640 el cual fue



adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB), sulfato de estreptomicina (250 µg/mL), penicilina (250 U/mL), anfotericina B (0.625 µg/mL) y L-glutamina (2 mM) y mercaptoetanol (50 µM). Las condiciones de incubación fueron temperatura de 37 °C, atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y cámara de humedad.

Es importante precisar, que el medio RPMI-1640 se suplementa con 20% de sobrenadante de un cultivo de células CHO-K1 (CRL-9618), el cual contiene aproximadamente 20 U/L del factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos (GM-SCF). Cada 48 h se reemplaza el medio RPMI-1640 complementado con GM-SCF. Con el fin de conocer el grado de diferenciación de las células dendríticas a partir de MOCs se marcaron con anticuerpos anti-CD40, anti-CD80 y anti-CD86. Posteriormente, el cultivo de dichas células se trató con 30 µM de AMD o 3 -OH AMD por 24 horas. El grado de maduración de las células dendríticas después del tratamiento se evaluó a través de la expresión de las moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 y CD86) determinadas por citometría de flujo, analizando tanto las células positivas como la intensidad de fluorescencia.

### **6.17 Análisis estadístico**

Los resultados de esta investigación se reportan como los valores promedio  $\pm$  error estándar (EE) o desviación estándar del promedio  $\pm$  (DE). El análisis estadístico consistió en ejecutar una prueba de Kolmogorov-Sminnov (KS) para determinar la distribución de los datos. Si los datos mostraron una distribución normal, se realizó un Análisis de Varianza de dos Vías (ANADEVA) seguido de una prueba e comparación múltiple (Tukey), por ejemplo: efecto antitumoral y la toxicidad a nivel sistémico.

En las pruebas donde los datos no mostraron una distribución normal, después de realizar la prueba de KS se experimentó un ANADEVA de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunnett T3. Las diferencias estadísticas se reportan con los valores de  $p < 0.05$ . Las pruebas estadísticas se realizaron en el programa Graph Pad Prism 6 y las gráficas fueron diseñadas en Origin Pro 8.

---

---

## 7. RESULTADOS

---

---

### Descripción

Al estudio se incorporaron los triterpenos AMD y 3 -OH AMD y se evaluó su efecto sobre xenotrasplantes inducidos con células PC-3 y MDA-MB-231. Los experimentos *in vivo*, se desarrollaron con una n = 6 en cada grupo experimental e *in vitro* se llevaron a cabo por cuadruplicado.

El análisis histológico de los xenotrasplantes, se hizo con el fin de demostrar el efecto antiproliferativo e inducción de apoptosis como uno de los posibles mecanismos asociados a la inhibición del crecimiento tumoral en los ratones desnudos (nu/nu). En este caso, se analizaron tres cortes por cada grupo experimental, los cortes se seleccionaron aleatoriamente entre las seis muestras tumorales generadas en cada grupo. Por otro lado, se analizó el efecto de los ácidos AMD y 3 -OH AMD sobre la maduración de CD.

También se estudiaron los efectos tóxicos de los compuestos AMD y 3 -OH AMD en ratones a nivel hematológico, hepático y renal.

Los resultados generados en esta investigación se informan en cuadros, gráficas y fotomicrografías para una mejor comprensión por parte del lector.

### 7.1 Aislamiento y purificación de los ácidos AMD y 3 -OH AMD

Para el aislamiento y purificación de los triterpenos se trabajaron 5.97 kg de la corteza de *A. adstringens*, de la cual el extracto hexánico dio un rendimiento de 3-3.5% y el extracto de acetato de etilo 4.9-5.7%. El Cuadro 4a muestra los resultados de la purificación por lote de 30 g de extracto, y en el Cuadro 4b el análisis del análisis cromatográfico de ambos extractos.

Cuadro 4a. Resultados de la extracción de la corteza de *A. adstringens* con hexano y acetato de etilo. Los resultados muestran los valores promedio de cinco experimentos independientes  $\pm$  DE.

Extracto hexánico				
Matraz	Cantidad de corteza (g)	Cantidad de extracto (g)	Rendimiento del extracto (%)	Promedio $\pm$ DE
1	1235.26	37.17	3.0	3.2 $\pm$ 0.18
2	881.0	27.51	3.1	
3	1252.9	43.23	3.5	
4	1239.4	39.86	3.2	
5	1291.6	40.95	3.2	
Extracto de acetato de etilo				
1	1107.4	63.67	5.7	5.46 $\pm$ 0.32
2	1214.20	69.81	5.7	
3	1175.7	57.27	4.9	
4	1241.1	68.53	5.5	
5	749.7	41.32	5.5	

Cuadro 4b. Rendimiento de los triterpenos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD en los extractos de hexano y acetato de etilo de la corteza de *A. adstringens*.

Compuesto	Fuente	Gradiente de elución Hex: AcOEt	Punto de fusión (°C)	Cantidad (g)	Rendimiento por 1000 g de corteza (%)	Pureza %
AMD	Extracto hexánico	90:10 85:15	176-178	2.3	0.23	98.15
3 ZOH AMD	Extracto de acetato de etilo	80:20 70:30	149-150	3.1	0.31	98.12

La pureza de AMD y 3 $\beta$ -OH AMD se analizó por CLAR (Apéndices 4 y 8). Las estructuras químicas de los ácidos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD se corroboraron por comparación de los datos físicos y espectroscópicos con los reportados en la

literatura (Oviedo, 2007, Revelo, 2010) y se informan los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Apéndice 1, 5), IR (Apéndice 2, 6) y la espectrometría de masas (Apéndice 3 y 7) para cada uno de los ácidos.

## 7.2 Efecto de los ácidos AMD y 3 -OH AMD sobre la viabilidad de las líneas celulares MDA-MB 231 y PC-3.

Con el objetivo de complementar los datos descritos en la literatura se obtuvieron las curvas de concentración-respuesta del efecto de los ácidos AMD y 3 -OH AMD sobre la viabilidad de las líneas celulares de carcinoma de glándula mamaria (MDA-MB-231) y próstata (PC-3), con un tiempo de experimentación de 48 horas.

Las concentraciones inhibitorias medias ( $\text{CI}_{50}$ ) se obtuvieron con el método de cristal violeta y comparando con la doxorubicina o cisplatino como fármacos de referencia (Cuadros 5 y 6).

Cuadro 5. Efecto citotóxico a las 48 horas después del tratamiento con AMD y 3 -OH AMD sobre la línea celular MDA-MB-231. Los datos se reportan como el promedio  $\pm$  DE obtenidos por tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Tratamiento	$\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
AMD	$59.47 \pm 2.28$
3 -OH AMD	$53.49 \pm 1.90$
Doxorubicina	$0.28 \pm 0.01$

Los resultados muestran que los dos triterpenos son menos citotóxicos que el cisplatino y la doxorubicina. La  $\text{CI}_{50}$  concuerda con los datos publicados en la literatura, donde el rango reportado independientemente de las líneas celulares o el método de determinación oscila entre 40 y 70  $\mu\text{M}$ .

Cuadro 6. Efecto citotóxico a las 48 horas después del tratamiento con AMD y 3 -OH AMD sobre la línea celular PC-3. Los datos se reportan como el promedio  $\pm$  DE obtenidos por tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

<b>Tratamiento</b>	<b>Cl<sub>50</sub> (<math>\mu</math>M)</b>
AMD	56.51 $\pm$ 2.31
3 -OH AMD	54.52 $\pm$ 4.95
Cisplatino	15.56 $\pm$ 1.14

### 7.2.1 Efecto de los ácidos AMD y 3 -OH AMD sobre la viabilidad de células no tumorales

Con el objetivo de determinar si los ácidos AMD y 3 -OH AMD tienen alguna especificidad por las células tumorales, se analizó el efecto de dichos compuestos sobre cuatro líneas celulares no tumorales, J774 (macrófagos murinos), MT2 (linfocitos humanos), CLR-1790 (células de colon humano) y H9C2 (cardiomiocitos murinos) y los resultados se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Efecto de los ácidos AMD y 3 -OH AMD sobre la viabilidad celular de cuatro líneas celulares no tumorales. Los datos se reportan como el promedio  $\pm$  DE obtenidos por tres experimentos independientes.

<b>Tratamiento</b>	<b>% de inhibición de la viabilidad celular</b>			
	<b>J774</b>	<b>H9C2</b>	<b>MT2</b>	<b>CLR-1790</b>
AMD	13.45 $\pm$ 3.7	30.7 $\pm$ 5.7	NA	NA
3 -OH AMD	16.00 $\pm$ 4.39	41.91 $\pm$ 0.69	54.55 $\pm$ 4.75	NA

NA: no activo

### 7.3 Determinación de la dosis letal 50 de los ácidos AMD y 3 -OH AMD

La dosis letal media (DL<sub>50</sub>) se calculó mediante los siguientes algoritmos matemáticos:

$$\text{AMD} = \sqrt{500 \times 250}$$

$$3 \text{ -OH AMD} = \sqrt{210 \times 170}$$

Con el objetivo de analizar el efecto de los ácidos en individuos sanos, se realizó la prueba de toxicidad aguda, en ratones CD1, los resultados se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Determinación de la DL<sub>50</sub> para los ácidos AMD y 3 -OH AMD. Los datos muestran el resultado de una n = 3 por cada grupo de tratamiento.

Triterpeno	Primera parte de la prueba		Segunda parte de la prueba		DL <sub>50</sub>
	Dosis (mg/kg)	Mortalidad	Dosis	Mortalidad	
AMD	10	0/3	250	0/3	353.55 mg/kg
	100	0/3	500	1/3	
	1000	3/3	750	3/3	
3 -OH AMD	10	0/3	170	0/3	188.94 mg/kg
	100	0/3	210	1/3	
	1000	3/3	250	2/3	
			500	3/3	

Las dosis donde no hubo decesos fueron de 250 mg/kg (AMD) y 170 mg/kg (3 -OH AMD), los animales sobrevivientes no presentaron pérdida de peso durante los 14 días de observación posteriores al tratamiento. Por otro lado, en las dosis más altas de cada triterpeno, donde se observó muerte en la segunda fase del método de Lorke se realizaron las necropsias correspondientes y los resultados del análisis morfológico se muestran en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Efectos tóxicos de los triterpenos AMD y 3 -OH AMD observados a dosis superiores a la DL<sub>50</sub>. Los resultados por órgano describen las observaciones del análisis morfológico realizado *posmortem*.

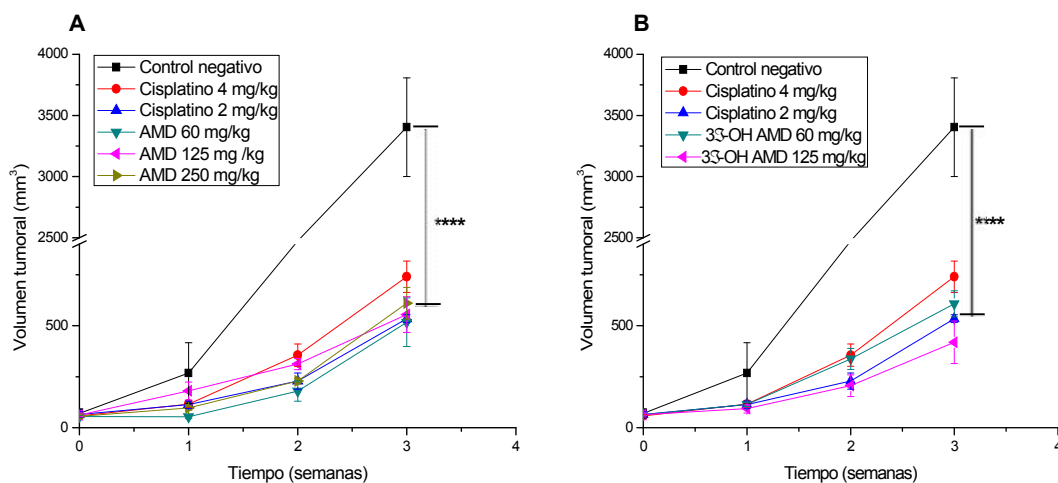
Triterpeno y dosis	Síntomas de toxicidad *	Análisis morfológico por órganos			
		Pulmón	Riñón	Intestino	Bazo
AMD (700 mg/kg)	Fenómeno de Straub, estiramientos y piloerección	Congestión y edema pulmonar moderados difusos.	Congestión cortico-medular y degeneración tubular moderada difusa.  Las células de los túbulos renales muestran un citoplasma fragmentado y granular.	Proliferación del tejido linfoide asociado a mucosas, con evaginación hacia las criptas intestinales	Hematopoyesis extramedular
3 -OH AMD (500 mg/kg)	Fenómeno de Straub, tremor y piloerección	Hemorragias	Pielitis linfoplasmocítica leve focal.	Hiperplasia del tejido linfoide grave zonal	Folículos linfoides despoblados y células blásticas en el parénquima

\* Observaciones 10 minutos después de la ministración de los triterpenos

#### 7.4 Actividad antitumoral de los ácidos AMD y 3 -OH AMD en xenotrasplantes de células PC-3

El análisis del efecto antitumoral de los triterpenos AMD y 3 -OH AMD, constituye un hallazgo importante sobre el potencial terapéutico de dichos compuestos en la quimioterapia contra el cáncer. La singularidad de este estudio conlleva al replanteamiento de los paradigmas para la búsqueda de nuevos fármacos antitumorales; ya que ambos triterpenos muestran potencial como agentes antitumorales. Los resultados de este experimento muestran que los tumores correspondientes al grupo control (sin tratamiento), alcanzaron un volumen tumoral promedio de 3,500 mm<sup>3</sup>. Mientras que, aquellos que recibieron tratamientos con AMD (60, 125 y 250 mg/kg), 3 -OH AMD (60, 125 mg/kg) y cisplatino (2 y 4 mg/kg) crecieron en promedio 500 mm<sup>3</sup>, durante un experimento con duración de 21 días. Como se muestra en la Figura 13, hay diferencias estadísticas significativas entre los grupos de tratamiento respecto al control,

disminuyendo seis veces el crecimiento de la masa tumoral. El AMD presentó un índice de inhibición del crecimiento tumoral de 88.76 % a la dosis de 60 mg/kg, 83.42 % (125 mg/kg) y 79.02% (250 mg/kg). El 3 $\beta$ -OH AMD 79.62% a 60 mg/kg, y 125 mg/kg (81.19%) respecto al control negativo.



Figuras 13. Efecto antitumoral de los ácidos AMD (A) y 3-OH AMD (B) *in vivo*. La actividad antitumoral de los compuestos AMD y 3 $\beta$ -OH AMD fue evaluada en ratones nu/nu trasplantados con células de carcinoma prostático (PC-3). Los ratones fueron inoculados con  $3 \times 10^6$  células PC-3 en el lado escapular derecho. Una vez que los tumores alcanzaron el tamaño promedio de 50 mm<sup>3</sup>, los ratones recibieron las dosis indicadas de AMD, 3-OH AMD o cisplatino. Los datos se muestran como el promedio del volumen tumoral  $\pm$  EE para una n = 6 por cada grupo experimental. \*\*\*\*p<0.0001 indica las diferencias estadísticas de los grupos que recibieron tratamiento respecto al control negativo. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANAEVA) de dos vías seguido de una prueba de comparación múltiple (Tukey).

El peso corporal de los animales que recibieron tratamientos con los ácidos AMD y 3-OH AMD no cambió significativamente. No obstante, los grupos que se ministraron con cisplatino perdieron 29% de su peso corporal a la dosis de 4 mg/kg y 13.54% cuando reciben tratamiento con 2 mg/kg del mismo fármaco. Las diferencias en la pérdida de peso desde el inicio del tratamiento al final del mismo, fueron comprobadas al realizar el análisis estadístico determinado mediante un análisis de varianza (ANAEVA) de medidas repetidas, encontrando que, el único



grupo que presentó una diferencia estadística significativa (\*\*p<0.01) fue el tratado con cisplatino 4 mg/kg (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efecto de los ácidos AMD y 3 OH AMD sobre el peso corporal de ratones xenotrasplantados con células PC-3. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  EE (error estándar de la media) para n = 6 por cada grupo experimental. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANADEVA) de medidas repetidas. \*\*p<0.01 representa las diferencias estadísticas en el cambio de peso al inicio y respecto al final del tratamiento.

Tratamiento	Peso (g) Inicial	Peso (g) Final
Cisplatino 4 mg/kg	19.61 $\pm$ 0.61	13.80 $\pm$ 0.82**
Cisplatino 2 mg/kg	25.13 $\pm$ 0.68	21.73 $\pm$ 0.93
AMD 60 mg/kg	22.06 $\pm$ 0.98	20.96 $\pm$ 0.67
AMD 125 mg/kg	23.33 $\pm$ 1.01	22.25 $\pm$ 1.18
AMD 250 mg/kg	24.23 $\pm$ 0.88	24.31 $\pm$ 1.09
3 -OH AMD 60 mg/kg	23.90 $\pm$ 1.16	21.96 $\pm$ 1.05
3 -OH AMD 125 mg/kg	24.76 $\pm$ 1.76	22.46 $\pm$ 1.82
Control negativo	22.02 $\pm$ 1.45	19.72 $\pm$ 1.48

Por otro lado, los parámetros bioquímicos se analizaron en muestras de sangre al concluir los tratamientos con los triterpenos y los fármacos de referencia (cisplatino o doxorubicina). Para este fin, sólo se analizaron los grupos que recibieron las dosis menores tanto de los triterpenos como del fármaco de referencia, ya que dichas dosis fueron igualmente efectivas que las dosis mayores. El Cuadro 11 muestra los resultados para los grupos tratados con cisplatino 2 mg/kg, AMD 60 mg/kg, 3 -OH AMD, el control negativo y sano. Las alteraciones más evidentes en los resultados del hemograma del grupo que recibió cisplatino (2 mg/kg) son: la disminución significativa (\*p<0.05) en los leucocitos (leucopenia), linfocitos (linfopenia) los cuales sugieren indicios de toxicidad a nivel hematológico. En el caso de los grupos que se ministraron con los triterpenos no se observan cambios significativos tanto en los leucocitos como linfocitos.

En relación a la creatinina, un metabolito que permitió evaluar la función renal, en el grupo sano el valor promedio fue de 37.33  $\pm$  8.95 U/L comparado con el control negativo (con tumor y sin tratamiento) donde el valor fue de 29.33  $\pm$  1.33 U/L. Estos datos sugieren una disminución en la eliminación de la creatinina por la

inducción del tumor, lo cual podría estar relacionado a las alteraciones que las células tumorales presentan en su metabolismo. Específicamente, se ha observado la expresión de una variante de la enzima piruvato cinasa (PKM2) que desacopla la síntesis de piruvato, por desviar la transferencia del grupo fosfato de alta energía del fosfoenol piruvato a la enzima glicolítica fosfoglicerato mutasa (PGAM) en lugar de transferirse al ADP como ocurre en condiciones fisiológicas (Sciacovelli, 2014).

Respecto al grupo que recibió la dosis de 2 mg/kg de cisplatino el nivel de creatinina observado fue de 84 U/L, resultó en una diferencia significativa comparado con el grupo control negativo y sano (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ). En los grupos que recibieron tratamiento con los triterpenos se observaron niveles similares al grupo control negativo; estos datos indican que los compuestos no inducen nefrotoxicidad durante el tiempo de tratamiento.

Para monitorear la función hepática en los grupos de tratamiento se analizaron los niveles séricos de las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT). La AST, es una enzima que se usa como marcador bioquímico de la función hepática sobre todo en la ingesta de fármacos. Los resultados muestran que los animales que recibieron cisplatino (2 mg/kg) presentan un incremento de 130 U/L respecto al grupo sano y comparado con el control negativo el aumento es de 142 U/L, lo cual se consideró estadísticamente significativo (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ). Los niveles séricos de AST en el grupo que recibió AMD 60 mg/kg son similares al grupo sano y respecto al control negativo se observa una disminución de 10 U/L, dicha cantidad no representó una diferencia estadística significativa. En relación con el grupo que recibió 3 -OH AMD (60 mg/kg) se observa un aumento de 9 unidades, misma que tampoco representó una diferencia significativa contrastado con el control negativo. En cuanto a la determinación de ALT, una enzima propia de los hepatocitos, no se observaron cambios por la inducción del tumor y por la ministración de los diferentes tratamientos, lo que sugiere que los incrementos en la AST no correlacionan con

un daño en la estructura celular de las células hepáticas. En el Cuadro 11 se resumen los resultados de toxicidad.

Cuadro 11. Efectos tóxicos de los triterpenos AMD y 3 -OH AMD a nivel sistémico en ratones ministrados de forma subcrónica y xenotrasplantados con células PC-3. Los datos se muestran como los valores promedios  $\pm$  EE para n = 3 por cada grupo.

Parámetro bioquímico	Control sano	Control negativo	Cisplatino 2 mg/kg	AMD 60 mg/kg	3 -OH AMD 60 mg/kg
Leucocitos (x 10 <sup>9</sup> /L)	4.46 $\pm$ 0.13	3.73 $\pm$ 1.73	1.93 $\pm$ 0.12*	4.56 $\pm$ 0.92	3.80 $\pm$ 0.35
Linfocitos (x 10 <sup>9</sup> /L)	2.83 $\pm$ 0.76	2.2 $\pm$ 1.17	0.75 $\pm$ 0.27*	2.06 $\pm$ 1.28	1.46 $\pm$ 0.33
Eritrocitos (x 10 <sup>12</sup> /L)	7.66 $\pm$ 0.43	4.13 $\pm$ 1.27	7.16 $\pm$ 0.37	7.16 $\pm$ 1.0	8.53 $\pm$ 0.68
Hemoglobina (g/L)	149.0 $\pm$ 2.0	134 $\pm$ 6.08	120.66 $\pm$ 9.93	135.33 $\pm$ 13.24	153.66 $\pm$ 5.60
Glucosa (mmol/L)	9.37 $\pm$ 0.64	11.25 $\pm$ 0.66	7.80 $\pm$ 0.86	6.94 $\pm$ 1.97	8.39 $\pm$ 1.92
Urea (BUN) (mmol/L)	7.93 $\pm$ 0.68	7.86 $\pm$ 0.78	9.03 $\pm$ 0.94	8.46 $\pm$ 0.03	8.56 $\pm$ 1.04
Creatinina (mmol/L)	37.33 $\pm$ 8.95	29.33 $\pm$ 1.33	84.0 $\pm$ 3.21****	24.0 $\pm$ 6.02	26.66 $\pm$ 0.88
Alanina Transferasa ALT (U/L)	52.66 $\pm$ 5.81	53 $\pm$ 5.50	56.66 $\pm$ 6.69	53.33 $\pm$ 17.48	51.33 $\pm$ 7.42
Aspartato transferasa AST (U/L)	155.33 $\pm$ 2.40	143.66 $\pm$ 9.35	285.66 $\pm$ 13.37****	145.33 $\pm$ 18.66	164.66 $\pm$ 6.76

Valores para los grupos que mostraron diferencias estadísticas en comparación al grupo sano, control negativo, MDA 60 mg/kg y 3 -OH AMD. \*p<0.05 y \*\*\*\*p<0.0001.

### 7.5 Efecto antitumoral de los ácidos AMD y 3 -OH AMD en xenotrasplantes de células MDA-MB-231

Los antecedentes bibliográficos indican que el efecto inhibitorio de los triterpenos AMD y 3 -OH AMD sobre la viabilidad celular, es menor que el fármaco de referencia usado en este trabajo. Para comparar el efecto inhibitorio del crecimiento tumoral de los dos triterpenos con la doxorubicina, *in vivo*, se realizó el experimento sobre xenotrasplantes de células MDA-MB 231. Los resultados muestran que las masas tumorales crecieron en promedio 2100 mm<sup>3</sup> a los doce días en el grupo que no recibió tratamiento (control negativo). Comparativamente, los grupos que recibieron AMD y 3 -OH AMD a 60 mg/kg alcanzaron un promedio de 580 y 970 mm<sup>3</sup> respectivamente, y doxorubicina (1 mg/kg) 1600 mm<sup>3</sup>. Como se observa en los resultados, a los 12 días de tratamiento, el índice de inhibición del

crecimiento tumoral con ambos triterpenos representa una diferencia estadística significativa ( $*p < 0.05$ ) respecto al control, AMD (72.09%) y 3-OH AMD (53.26%). Mientras que la doxorubicina presentó un índice de inhibición del crecimiento tumoral de 22.88%, estos datos sugieren mayor eficacia de los triterpenos comparados con la doxorubicina a las dosis de prueba (Figura 14). La doxorubicina es un fármaco citotóxico y se ha utilizado ampliamente para comparar el efecto de varios compuestos estudiados como posibles agentes antitumorales. Es importante destacar, que para los estudios de los xenotrasplantes derivados de células MDA-MB 231, se probaron las dosis menores a las que se observó el efecto en los xenotrasplantes de células PC-3; debido a que el comportamiento de los compuestos de prueba en estas condiciones de trabajo es independiente de la dosis.

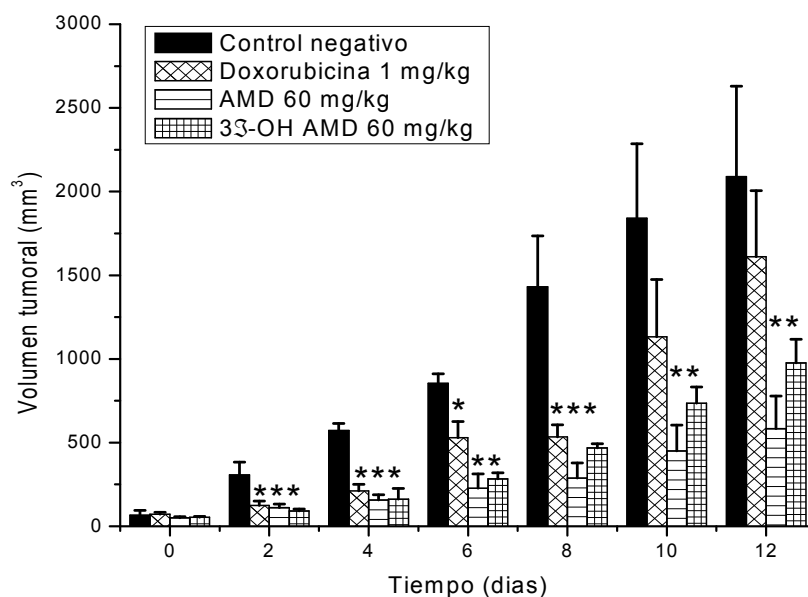


Figura 14. Efecto antitumoral de los ácidos AMD y 3-OH AMD sobre xenotrasplantes de células de carcinoma de mama triple negativo (MDA-MB-231). La actividad antitumoral de los compuestos AMD y 3-OH AMD fue evaluada en ratones nu/nu transplantados con células MDA-MB-231. Los ratones fueron inoculados con  $5 \times 10^6$  células MDA-MB-231 en el lado escapular derecho. Una vez que los tumores alcanzaron el tamaño promedio de  $50 \text{ mm}^3$ . Los datos se muestran como el promedio del volumen tumoral  $\pm$  EE para una  $n = 6$  por cada grupo experimental. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANADEVA) de dos vías seguido de una prueba de comparación múltiple (Tukey) con un nivel de significancia de  $*p < 0.05$ .

El peso corporal de los animales de experimentación se registró cada dos días paralelamente a la medición de los tumores. Como se puede observar en el Cuadro 12, los grupos que recibieron tratamiento con los triterpenos (AMD, 3 -OH AMD) y doxorubicina no presentaron cambios en el peso, si se compara con el control negativo donde se observa un incremento de 2 g aproximadamente, lo cual es compatible con el peso y tamaño de la masa tumoral.

Cuadro 12. Efecto de los ácidos AMD y 3 -OH AMD sobre el peso corporal de ratones xenotrasplantados con células MDA-MB-231. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  EE (error estándar de la media) para n = 6 por cada grupo experimental.

Tratamiento	Peso (g) Inicial	Peso (g) Final
Doxorubicina 1 mg/kg	20.65 $\pm$ 0.82	20.61 $\pm$ 0.63
AMD 60 mg/kg	20.25 $\pm$ 0.80	20.35 $\pm$ 0.49
3 -OH AMD 60 mg/kg	20.88 $\pm$ 0.26	20.98 $\pm$ 0.23
Control negativo	18.73 $\pm$ 0.79	20.8 $\pm$ 0.71

El Cuadro 13 muestra los valores de los parámetros bioquímicos medidos después del tratamiento con los ácidos AMD y 3 -OH AMD durante 12 días, los datos se muestran como el promedio  $\pm$  EE y n = 3 por cada grupo experimental. En general, la tendencia de los datos es similar a la observada en los animales que recibieron el mismo tratamiento y, presentaban xenotrasplantes de células PC-3 (Cuadro 11). Sin embargo, algunas diferencias observadas se precisan a continuación, la primera divergencia se encuentra en los datos hematológicos, donde la inducción de tumores con las células MDA-MB-231 correlaciona con una leucopenia (\*\*p<0.001). La cantidad de eritrocitos ( $5.53 \times 10^{12}/L$ ) muestra un decremento significativo (\*\*p<0.01) en el grupo que recibió tratamiento con doxorubicina 1 mg/kg.

Adicionalmente, se analizaron tres elementos de la química sanguínea, con el objetivo de evaluar efectos de toxicidad a nivel renal, específicamente sobre nitrógeno ureico y creatinina en sangre. Las diferencias se encontraron en la

creatinina, los tres grupos, doxorubicina (1 mg/kg), AMD a la dosis de 60 mg/kg y 3 -OH AMD (60 mg/kg) muestran incremento significativo (\*p<0.05) respecto a los controles sano y negativo, estos resultados indican un indicio de toxicidad a nivel renal tanto del fármaco de referencia como de los compuestos de prueba, lo que sugiere experimentar dosis menores de los compuestos para evitar dicho efecto.

Respecto al perfil hepático, se analizó la actividad de dos enzimas clave como indicadores de toxicidad a este nivel. No se observaron cambios en la ALT por la inducción del xenotransplante de células MDA-MB-231 y los tratamientos. En el análisis de AST se observaron diferencias estadísticas en el grupo que recibió doxorubicina (\*\*\*\*p<0.0001) respecto a los controles sano y negativo; este hallazgo apoya los datos informados en la literatura sobre la cardiotoxicidad de la doxorubicina, en este caso observada de forma indirecta (Chatterjee, 2010, Barrett, 2010). El grupo que recibió 3 -OH AMD mostró una diferencia significativa (\*p<0.05) en los niveles de dicha enzima, esta información sugiere disminuir la dosis del triterpeno para el tratamiento antitumoral.

Cuadro 13. Efectos tóxicos de los ácidos AMD y 3 -OH AMD a nivel sistémico en ratones xenotrasplantados con células MDA-MB-231. Los datos se muestran como los valores promedios ± EE para n = 3 por cada grupo.

Parámetro bioquímico	Control sano	Control negativo	Doxorubicina 1 mg/kg	AMD 60 mg/kg	3 -OH AMD 60 mg/kg
Leucocitos (x 10 <sup>9</sup> /L)	4.40 ± 0.11	2.46 ± 0.29****	***6.33 ± 0.17	4.13 ± 0.24	4.83 ± 0.17
Linfocitos (x 10 <sup>9</sup> /L)	2.16 ± 0.72	0.8 ± 0.11	***4.11 ± 0.11	1.66 ± 0.24	2.10 ± 0.20
Eritrocitos (x 10 <sup>12</sup> /L)	7.26 ± 0.41	7.53 ± 0.66	**5.53 ± 0.26	8.30 ± 0.23	8.93 ± 0.14
Hemoglobina (g/L)	143 ± 5.29	124 ± 1.15	116 ± 3.72	136 ± 8.38	146.33 ± 12.33
Glucosa (mmol/L)	9.37 ± 0.67	9.92 ± 1.45	5.77 ± 1.10	5.96 ± 0.98	6.65 ± 1.11
Urea (BUN) (mmol/L)	7.93 ± 0.68	6.8 ± 0.11	8.70 ± 0.11	8.59 ± 0.15	8.69 ± 1.02
Creatinina (mmol/L)	29.33 ± 1.66	17.33 ± 3.52	*66.3 ± 19.27	*60.0 ± 12.58	*68.33 ± 9.17
Alanina Transferasa ALT (U/L)	52.66 ± 5.81	54.06 ± 0.52	73.33 ± 8.98	46.66 ± 4.40	45.0 ± 1.52
Aspartato transferasa AST (U/L)	155.33 ± 2.40	131.33 ± 3.17	****263 ± 14.52	115.33 ± 2.90	*160.33 ± 2.60

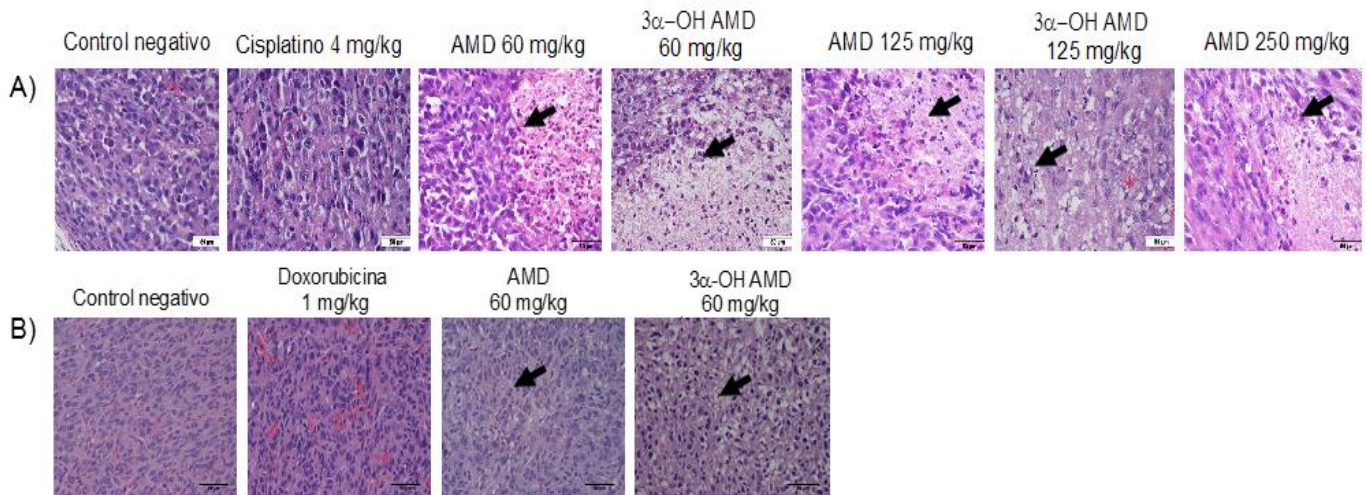
Diferencia estadística respecto al control sano. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

## 7.6 Análisis histológico de los tejidos tumorales

Después de demostrar el efecto de inhibición del crecimiento tumoral de ambos triterpenos, surgió la pregunta:

¿los tumores que recibieron tratamiento mostraron una tasa de crecimiento menor, porque las células no proliferaron o murieron?

Con el objetivo de observar la estructura tisular se realizó la tinción hematoxilina-eosina, misma que funcionó como base para la sugerencia de algunas tinciones inmunológicas. Los resultados se muestran en la siguiente serie de fotomicrografías representativas, en las cuales se observan zonas de muerte celular caracterizadas por la presencia de picnosis y algunos núcleos celulares fragmentados. Estas evidencias son compatibles con los cambios morfológicos a nivel celular observados en el proceso de muerte por apoptosis (Figura 15).



### 7.7 Efecto antiproliferativo de los ácidos AMD y 3-OH AMD

Para contestar la pregunta anterior, se evaluó el efecto antiproliferativo de los ácidos, en cortes histológicos de los xenotrasplantes. Se analizaron los cortes mediante la inmunotinción para el antígeno nuclear Ki67, se analizó este marcador para determinar si los triterpenos podrían funcionar como agentes antiproliferativos para inhibir el crecimiento tumoral. Los resultados se muestran en las siguientes fotomicrografías (Figura 16).

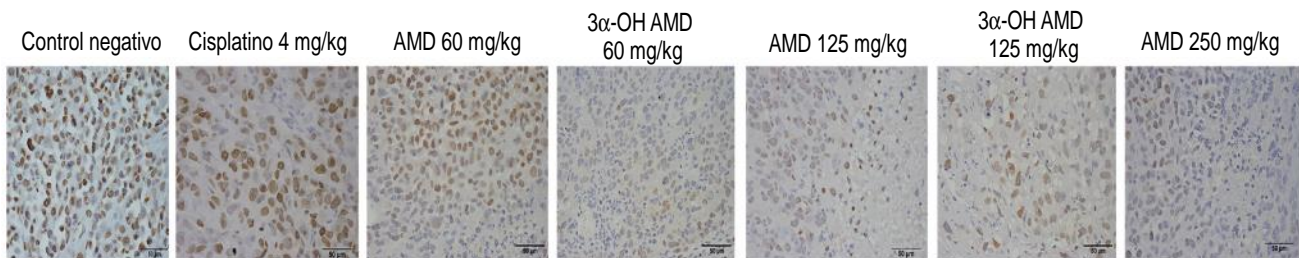


Figura 16. Fotomicrografías representativas de la inmunotinción específica para Ki67. La adquisición de las imágenes se hizo a 40X en la escala microscópica y 50  $\mu\text{m}$  en el software de adquisición antes citado. Las fotografías son representativas de tres xenotrasplantes analizados por cada grupo experimental. El texto a través de las imágenes indica el tratamiento para cada grupo experimental y la marca en color café muestra las células positivas a la proteína Ki67.

Para complementar los datos sobre el efecto antiproliferativo de los dos triterpenos por disminución en la expresión de Ki67, de la misma forma se analizó PCNA en los xenotrasplantes de células PC-3. Los resultados de la inmunotinción específica para PCNA indican que el ácido AMD disminuyó el número de células positivas a las dosis de 125 y 250 mg/kg, mientras que el 3-OH AMD presentó el mismo efecto a las dosis de 60 y 125 mg/kg (Figura 17). En el análisis cualitativo, el fármaco de referencia no mostró un efecto inhibitorio de la expresión de PCNA en los xenotrasplantes.



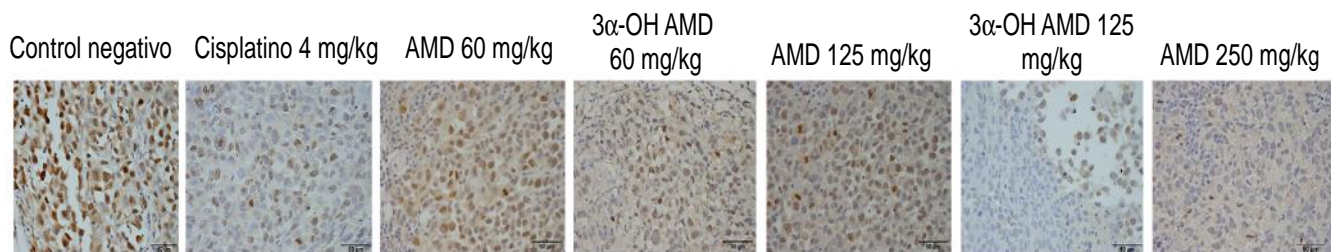


Figura 17. Fotomicrografías representativas de la inmunotinción específica para PCNA. La adquisición de las imágenes se hizo a 40X en la escala microscópica y 50  $\mu\text{m}$  en el software de captura Nis Elements-F. El texto a través de las imágenes indica el tratamiento para cada grupo experimental. La marca en color café muestra las células positivas a la proteína Ki67.

En el primer acercamiento, se hizo una primera observación microscópica de las inmunotinciones y obtuvieron imágenes de los cortes completos, para cada grupo experimental, la adquisición de las imágenes se hizo a 20 y 40x respecto a la lente microscópica y 100 y 50  $\mu\text{m}$  respectivamente, en la escala del software de adquisición de imagen (Nis Elements-F 3.0). Los resultados se interpretaron a través de las observaciones microscópicas como mayor o menor tinción comparando con el control negativo. Sin embargo, esta aproximación es subjetiva, ya que no se obtiene una relación cuantitativa de los datos.

Se hizo un análisis digital, usando como herramienta el software de análisis de imagen, Image Pro Plus 7.0. Como se describió en la sección “Materiales y Estrategia Experimental” para la cuantificación de los marcadores de proliferación celular se obtuvieron los núcleos celulares marcados positivamente a PCNA y Ki67. Mientras que, para aquellas fotografías correspondientes al ensayo de TUNEL, se obtuvo la suma de las áreas marcadas. La intensidad de la marca se interpretó a través del parámetro densidad óptica integrada (DOI), por cada campo microscópico analizado.

La cuantificación del PCNA, se determinó como el promedio del número de células positivas al antígeno en 10 campos microscópicos seleccionados al azar, después de analizar tres xenotrasplantes por cada grupo experimental. Los resultados muestran que el compuesto AMD inhibió la expresión de PCNA a las dosis de 125 y 250 mg/kg, observándose un comportamiento independiente de la dosis (65% y

38% respectivamente). En tanto que, el triterpeno 3-OH AMD, se encontró que inhibe 64% a la dosis de 60 mg/kg y 48% a 125 mg/kg. El grupo que recibió el fármaco de referencia inhibió sólo el 13%, este porcentaje no significó una diferencia (\* $p < 0.05$ ) respecto al control negativo (Figura 18a). Así mismo, se analizó Ki67, como el promedio de células positivas a Ki67 en 10 campos igualmente elegidos al azar y se realizó la comparación entre los grupos experimentales. Como se muestra en la Figura 18b todos los grupos que recibieron tratamiento mostraron diferencias significativas respecto al control negativo (\* $p < 0.05$ ). El triterpeno AMD inhibió significativamente el promedio de células positivas a Ki67 a las tres dosis indicadas (32%, 86%, 77%, respectivamente). Por su parte, el compuesto 3-OH AMD también inhibió la expresión de este marcador en 81% a 60 mg/kg mientras que a la dosis de 125 mg/kg el porcentaje de inhibición fue 55%, para ambos compuestos en la Figura 18b se observa un comportamiento independiente de la dosis. El fármaco de referencia (*cis*-diaminodicloroplatino (II) a la dosis de 4 mg/kg disminuyó el número promedio de células positivas a Ki67 (33%).

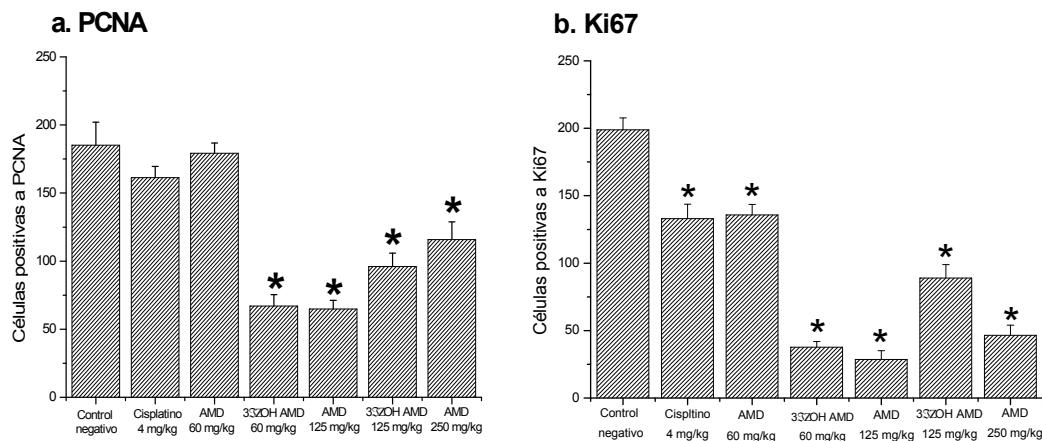


Figura 18. Efecto anti-proliferativo de los ácidos AMD y 3-OH AMD sobre los marcadores de proliferación celular PCNA (a) y Ki67 (b) en xenotrasplantes de células PC-3. Los resultados se muestran como el promedio de las células positivas  $\pm$  EE de tres xenotrasplantes analizados por cada grupo experimental. Los datos se analizaron mediante ANADEVIA de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparación múltiple (Dunn) indicando diferencias estadísticas respecto al control negativo (\* $p < 0.05$ ).

Otro parámetro analizado fue la DOI, para conocer si existe alguna diferencia en la intensidad de la marca de las inmunotinciones correspondientes a los marcadores de proliferación celular. Con este modelo de medición, los resultados muestran diferencias estadísticas de los grupos que recibieron tratamiento comparado con el control negativo, lo que sugiere una disminución en la proliferación celular.

En la Figura 19 se observan los datos encontrados para el antígeno PCNA (panel izquierdo). El grupo que recibió cisplatino (4 mg/kg) muestra un porcentaje de inhibición 47%, mientras el AMD a las tres dosis de prueba 60, 125 y 250 mg/kg los porcentajes de inhibición son 30%, 81% y 38%, respectivamente, este hallazgo indica que la dosis de 125 mg/kg es la que inhibe mayormente en términos de la intensidad de la marca observada para PCNA. Por otro lado, en el grupo que recibió el compuesto 3 $\beta$ -OH AMD, los porcentajes de inhibición son 67% y 54% respectivamente a las dosis de 60 y 125 mg/kg. Los datos aquí mostrados representan una diferencia estadísticamente significativa (\* $p < 0.05$ ).

En la Figura 19 (panel derecho) se pueden observar los resultados correspondientes a Ki67. El grupo que recibió cisplatino a la dosis de 4 mg/kg mostró 72% de disminución de la DOI. En el caso de AMD el índice de inhibición representa el 40%, 70% y 74% respectivamente a las dosis de 60, 125 y 250 mg/kg. Para el compuesto 3 $\beta$ -OH AMD (60 mg/kg y 125 mg/kg) los porcentajes de inhibición son 84% y 74% respectivamente. Estos resultados, muestran correlación respecto a los porcentajes obtenidos cuando se determinó el área marcada en las inmunotinciones, no obstante, en el fármaco de referencia se muestra un porcentaje de inhibición menor cuando se mide el área total (33%) que cuando se mide la DOI.

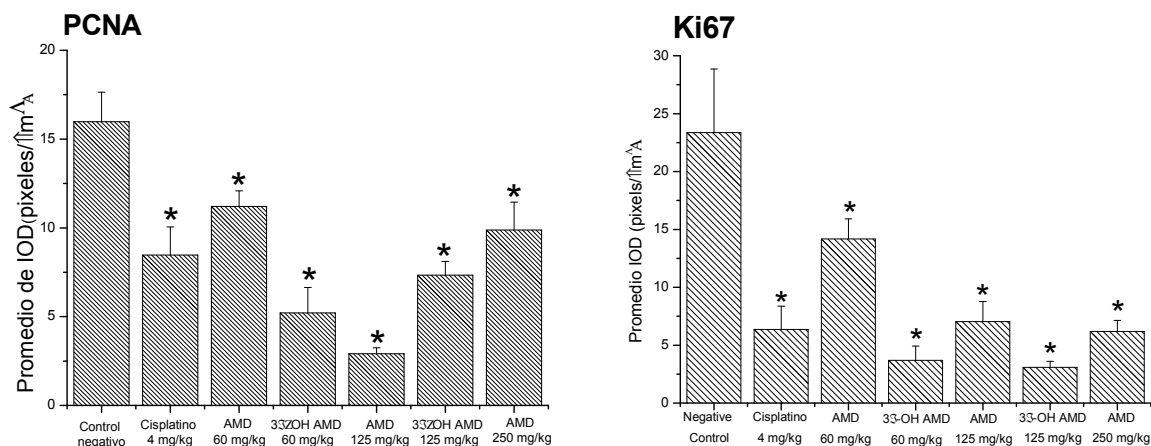


Figura 19. Disminución de la expresión de los marcadores de proliferación celular PCNA y Ki67 determinada en función de la intensidad de la marca, a los 21 días de tratamiento con los ácidos AMD y 3 -OH AMD en xenotrasplantes de células PC-3. Los resultados se muestran como el promedio de la DOI  $\pm$  EE de tres tumores analizados por cada grupo experimental. Los datos se analizaron mediante ANADEVIA de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparación múltiple (Dunn) indicando diferencias estadísticas respecto al control negativo (\* $p < 0.05$ ).

### 7.8 Los ácidos AMD y 3 -OH AMD inducen apoptosis *in vivo*

Para determinar si las evidencias de muerte celular observadas mediante la tinción de hematoxilina-eosina correspondían a un proceso de apoptosis, los cortes se analizaron mediante el ensayo de TUNEL. Las fotografías representativas se muestran en la Figura 20, donde se puede observar una tinción positiva para las dosis probadas de los dos triterpenos. En el análisis microscópico, se observan algunas diferencias en la intensidad de la marca, resultando el ácido 3 -OH AMD como el mejor agente proapoptótico. Dichas observaciones se comprobaron mediante el análisis cuantitativo.

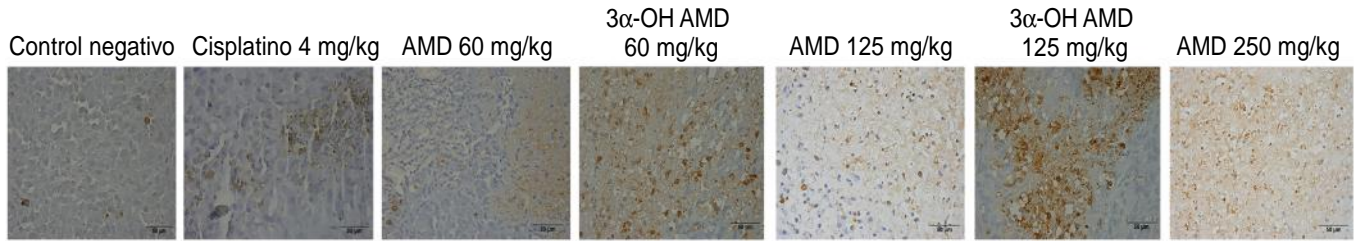


Figura 20. Fotomicrografías representativas de la fragmentación del ADN determinada mediante el ensayo de TUNEL. La adquisición de las imágenes se hizo a 40X en la escala microscópica y 50  $\mu\text{m}$  en el software de captura Nis Elements-F 3.0. El texto en la imagen indica el tratamiento por cada grupo experimental y la marca en café indica las zonas donde se observó fragmentación del ADN.

Se hizo el análisis morfométrico de las fotomicrografías tanto de los xenotrasplantes de células PC-3 como de aquellos que se indujeron con células de carcinoma de mama triple negativo (MDA-MB-231). Los resultados se muestran como el promedio del área total, marcada positivamente, para el ensayo de determinación de la fragmentación del ADN (TUNEL) y se compararon los grupos que recibieron tratamiento respecto al control. Para los xenotrasplantes derivados de células PC-3 el nivel basal de apoptosis representado en unidades de área es  $3891.89 \mu\text{m}^2$  en tanto que para los tumores derivados de las células MDA-MB-231 es  $594 \mu\text{m}^2$ , lo que sugiere una mayor tasa de muerte en los xenotrasplantes de carcinoma de próstata que en aquellos derivados de las células de carcinoma de mama.

El ácido AMD indujo la fragmentación del DNA, a la dosis de 60 mg/kg aumentó el área marcada positivamente 0.8 veces, 125 mg/kg (0.7 veces) y 250 mg/kg (0.6 veces) comportándose con el grupo control negativo. Para el ácido 3-OH AMD, se observó incremento en el área total correspondiente a la tinción de TUNEL, a la dosis de 60 mg/kg se calculó un incremento de 1.30 veces y a 125 mg/kg un incremento de 1.53 veces el área respecto al control sin tratamiento. El fármaco de referencia a 4 mg/kg aumentó el área 0.57 veces respecto al mismo control (Figura 21a).

Para complementar los datos sobre el efecto proapoptótico en los xenotrasplantes derivados de células PC-3, se analizó el mismo efecto en los xenotrasplantes de células MDA-MB-231. Los resultados se muestran en la Figura 21, se probaron los dos triterpenos a la dosis de 60 mg/kg y se usó doxorubicina 1 mg/kg como fármaco de referencia. Los datos se muestran como el promedio del área total en el grupo que recibió AMD a 60 mg/kg el incremento en el área fue 1.08 veces, mientras que el 3-OH AMD a la misma dosis mostró un incremento de 2.49 veces. El fármaco de referencia mostró un incremento de 0.1 veces. Estos resultados sugieren un efecto proapoptótico *in vivo* de los triterpenos en estudio.

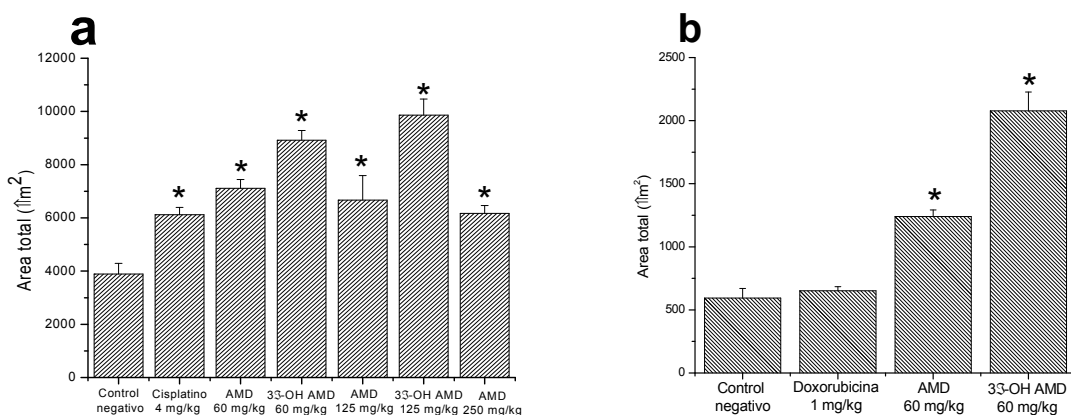


Figura 21. Los ácidos AMD y 3-OH AMD inducen apoptosis en xenotrasplantes de células PC-3 (a) y MDA-MB-231(b). Los datos se muestran como el promedio del área total  $\pm$  EE. Los datos se analizaron mediante ANADEVa de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparación múltiple (Dunn) indicando diferencias estadísticas respecto al control negativo (\* $p < 0.05$ ).

### 7.9 Efecto de los ácidos AMD y 3-OH AMD sobre la maduración de células dendríticas

La capacidad que tienen los triterpenos AMD y 3-OH AMD de madurar células dendríticas, y su posible aplicación como adyuvantes en la inmunoterapia antitumoral; se llevó a cabo en colaboración con el Laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos. Departamento de Biología Celular y Tisular. Facultad de Medicina, UNAM. La relevancia de estos hallazgos radica en que ambos triterpenos indujeron maduración de células dendríticas (CD). El grado de maduración de las CD se demostró a través de la determinación de moléculas

presentes en la superficie de éstas células. Los resultados mostraron que, tanto el tratamiento con AMD y 3-OH AMD no modificó significativamente el porcentaje de CD positivas a CD80. El incremento en la expresión de CD80 por el tratamiento con 3-OH AMD, se determinó al medir el promedio de la intensidad de fluorescencia (MIF) donde se encontró que el AMD aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) la expresión de CD80 a la dosis de 3  $\mu\text{M}$ , mientras que el 3-OH AMD indujo un aumento en la expresión de la misma molécula a las concentraciones 3, 30 y 300  $\mu\text{M}$  (Figura 22).

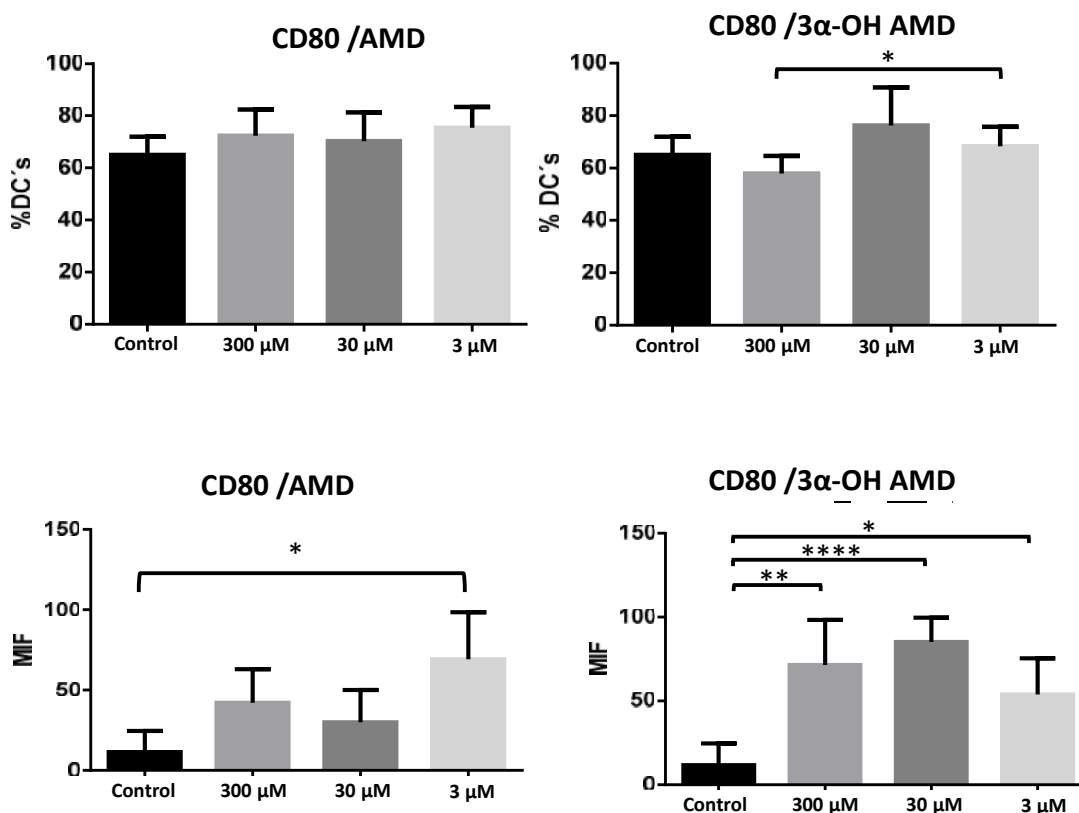


Figura 22. Los ácidos AMD y 3-OH AMD aumentan significativamente la expresión de la proteína CD80 en CD. Los resultados se muestran como el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  DE. Las diferencias estadísticas se consideraron con un nivel de significancia de  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  y  $***p < 0.001$  respecto al control.

Para continuar con la caracterización del fenotipo de las CD, se midió por citometría de flujo el grado de expresión de la molécula coestimuladora CD86 y se

encontró que sólo el 3-OH AMD incrementó significativamente (\* $p < 0.05$ ) el % CD positivas a CD86. La Figura 23 ilustra la expresión CD86 en las CD después del tratamiento con ambos triterpenos.

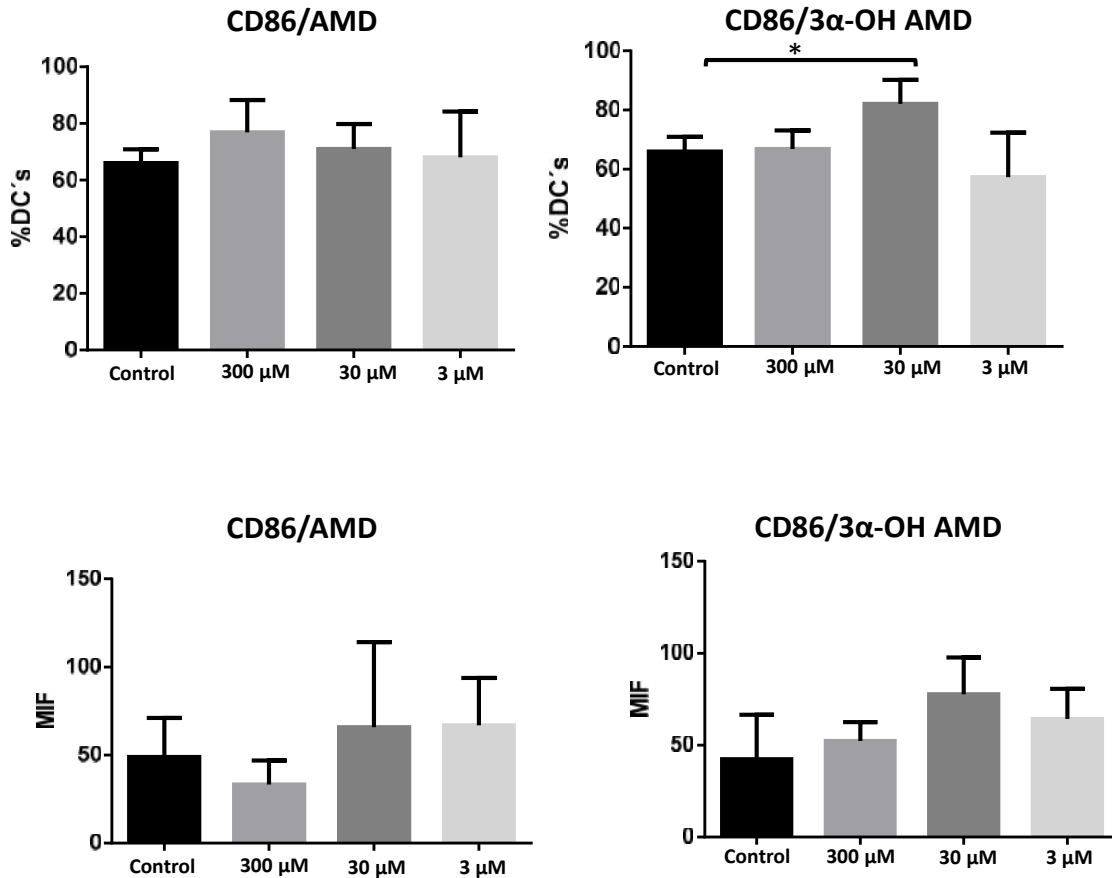


Figura 23. Efecto de los triterpenos AMD y 3-OH AMD sobre la expresión de CD86 en CD. Los resultados se muestran como el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  DE. Las diferencias estadísticas se consideraron con un nivel de significancia de \* $p < 0.05$  respecto al control.

Por otro lado, se determinó la expresión de CD40, una proteína coestimuladora expresada en la superficie de algunas células del sistema inmunológico, tales como células presentadoras de antígenos (macrófagos y CD). Al determinar la expresión de dicha molécula después del tratamiento con AMD o 3-OH AMD, se observó que tanto AMD como 3-OH AMD aumentaron significativamente el porcentaje de CD positivas a CD40. Sin embargo, al determinar la MIF no se encontró cambio en el nivel de expresión de CD40 (Figura 24).



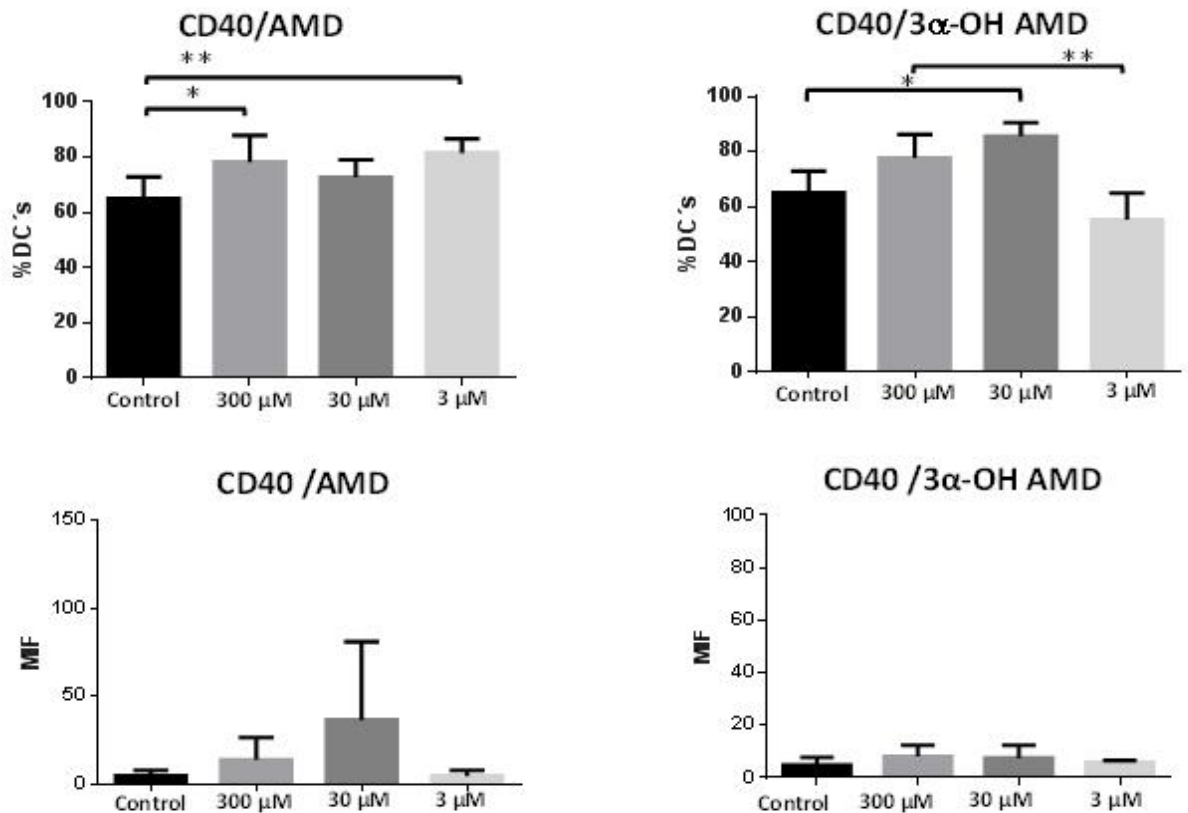


Figura 24. Los triterpenos AMD y 3 -OH AMD aumentan significativamente el porcentaje de CD positivas a CD40. Los resultados se muestran como el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  DE. Las diferencias estadísticas se consideraron con un nivel de significancia de \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.05$ .

Los resultados muestran que la mejor concentración de AMD para aumentar la expresión de moléculas coestimuladoras es la de 3  $\mu$ M, mientras que para el 3 -OH AMD la concentración donde se observan mejores resultados es 30  $\mu$ M.

Para complementar la información sobre el fenotipo de las CD tratadas con los ácidos, se analizaron los niveles de expresión de algunas moléculas coinhibitorias, tales como CD273 y CD274. Los resultados mostraron que el AMD no incrementa la expresión de ambas moléculas coinhibitorias. En tanto que el ácido 3 -OH AMD aumentó significativamente (\*\* $p < 0.001$ ) los niveles de expresión de CD273 a la concentración de 3  $\mu$ M, mientras que los niveles de CD274 se elevaron significativamente a las concentraciones de 30 y 300  $\mu$ M del mismo ácido.

---

---

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

---

---

En México el cáncer de mama y próstata, son dos de los cinco tipos de cáncer con mayor incidencia en mujeres y hombres mexicanos, correspondientemente. En ambos casos el diagnóstico en etapas tempranas de la enfermedad ha incrementado la supervivencia relativa de los pacientes. No obstante, se requiere mejorar los sistemas de diagnóstico y descentralizar las unidades enfocadas a este fin, para tener una cobertura mayor además de incrementar la eficacia de dichas estrategias.

Según la Guía de Práctica Clínica Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Mama en Segundo y Tercer nivel de Atención 2009, las opciones de tratamiento son cirugía seguida de quimioterapia adyuvante, radioterapia o quimioterapia neoadyuvante, posteriormente cirugía conservadora seguida de radioterapia. El tratamiento farmacológico consiste en varios esquemas. Una de las primeras líneas de tratamiento es la terapia de reemplazo hormonal para los tumores dependientes de hormonas, para dichos pacientes se usa tamoxifeno como primera línea de tratamiento y la continuación con inhibidores de aromatasas. Sin embargo, las pacientes cuyos fenotipos son negativos a receptores hormonales no responden a este tipo de tratamiento, por lo que se recurre a otras opciones tales como antraciclinas, taxanos, antimetabolitos y cisplatino. La poliquimioterapia es otra opción de tratamiento, en este grupo de pacientes, se hacen combinaciones de fármacos, tales como FEC (5-fluorouracilo, epirubicina y ciclofosfamida), EC (epirubicina y ciclofosfamida), GP (gemcitabina-paclitaxel) (Varonesi, 2009).

Por otro lado, el cáncer de próstata presenta un paradigma similar, la enfermedad en sus etapas iniciales es dependiente de andrógenos y la primera línea de tratamiento son los agentes antiandrogénicos esteroideos y no esteroideos (Mottet, 2011).

Sin embargo, tanto los pacientes que cursan con terapia anti androgénica como aquellos que son candidatos a experimentar la cirugía (prostatectomía) presentan riesgo alto de recaída, aproximadamente 20-40% de los pacientes en estadios tempranos de la enfermedad sufren recurrencia.

Actualmente, los pacientes con menos opciones terapéuticas son los grupos en estadio IV, con enfermedad recurrente y aquellos que desarrollan resistencia a las opciones quimioterapéuticas tanto de cáncer de mama como de próstata. Por lo tanto, existe la necesidad de realizar investigaciones que permitan encontrar otras opciones terapéuticas dirigidas hacia los pacientes con cáncer de mama y próstata en estadios avanzados (Saad, 2010). En los últimos años, numerosos estudios preclínicos han reportado las propiedades antitumorales de algunos triterpenos tanto pentacíclicos como tetracíclicos (Gao, 2012, Chintharlapalli, 2011, Cheng, 2015). Las dos razones principales que desencadenaron estas investigaciones son la relativa facilidad de aislamiento de dichos compuestos y las propiedades antitumorales en modelos *in vivo* de algunos triterpenos (Patlolla, 2012).

Otra situación importante en este campo de estudio es que algunos autores y revistas consideran como activos a aquellos compuestos aislados de plantas medicinales, que presenten un valor de  $DE_{50} < 4 \mu\text{g/ml}$  (Alonso, 2011). Este último antecedente excluye a muchos compuestos tales como los ácidos AMD y 3-OH AMD cuyo efecto antitumoral se encuentra a una dosis mayor *in vitro*, aunque *in vivo* muestren resultados prometedores como agentes antitumorales.

En este trabajo se usaron las líneas celulares tumorales MDA-MB-231 (mama) y PC-3 (próstata), mismas que se han usado ampliamente para realizar estudios *in vitro* e *in vivo* sobre la eficacia farmacológica y mecanismo de acción de diferentes metabolitos secundarios (Noolu, 2016, Alcántara, 2015). Dichas células expresan constitutivamente diferentes vías de señalización y características bioquímicas, las cuales son importantes para determinar el mecanismo molecular mediante el cual los triterpenos presentan su efecto antitumoral. Las células MDA-MB-231 se caracterizan por la falta de expresión de los receptores de estrógenos (ER),

progesterona (PR) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (Senkus, 2015). Por otro lado, las células PC-3 no expresan el receptor de andrógenos (RA) (Litewka, 2013).

Para complementar los datos sobre la citotoxicidad de los compuestos AMD y 3-OH AMD sobre diferentes líneas de cáncer humano, en el presente estudio se informa la  $CI_{50}$  sobre las líneas celulares MDA-MB-231 y PC-3. El rango obtenido para la  $CI_{50}$  es 50 a 60  $\mu$ M, estos valores son mayores a los descritos en la literatura (Oviedo, 2005, Dalla, 2012). Es importante destacar que, los triterpenos en estudio resultaron ser menos citotóxicos que los fármacos de referencia, cisplatino y doxorubicina en líneas tumorales. Asimismo, el AMD no mostró efectos citotóxicos sobre las líneas celulares MT2 y CLR-1790 que son células no tumorales humanas, mientras que en las líneas J774 y H9C2 murinas, se observó un rango de inhibición de la viabilidad celular de 25 a 30%. El ácido 3-OH AMD no afectó la viabilidad de las células CLR-1790, sin embargo, en las tres líneas no tumorales restantes, mostró una inhibición de la viabilidad celular de hasta 56% (Cuadro 7). Estos resultados indican la falta de especificidad de los triterpenos por las células tumorales.

Con base en los datos descritos anteriormente, se analizó el efecto antitumoral de los triterpenos AMD y 3-OH AMD en un modelo murino de xenotrasplantes de células MDA-MB-231 y PC-3. Los resultados muestran que tanto el AMD como el 3-OH AMD inhibieron significativamente ( $****p < 0.0001$ ), el crecimiento de xenotrasplantes derivados de células PC-3 a las dosis ministradas. Es importante mencionar que, ambos triterpenos presentaron un índice de inhibición del crecimiento tumoral comparable al fármaco de referencia (cisplatino), AMD de 88.76, 83.42 y 79.02% a 60, 125 y 250 mg / kg, respectivamente, y 3-OH AMD de 79.62% (60 mg / kg) y 81.19% (125 mg / kg). En el caso del ácido 3-OH AMD, la dosis de 250 mg/kg tuvo efectos tóxicos letales, dado que dicha dosis es mayor que su  $DL_{50}$  (188.94 mg/kg).

Por otro lado, se probaron las dosis menores (60 mg/kg) de ambos triterpenos como inhibidores del crecimiento de xenotrasplantes de células MDA-MB-231. Los resultados muestran una diferencia estadísticamente significativa ( $*p<0.05$ ) de los grupos que recibieron tratamiento respecto al control, con un índice de inhibición del crecimiento tumoral de 72.10% para el AMD y 53.26% para el ácido 3 -OH AMD. Es importante indicar que, el efecto en este modelo fue observable al segundo día de tratamiento, en un experimento de 12 días de duración. Estos hallazgos muestran que los dos triterpenos son más específicos para los xenotrasplantes derivados del carcinoma prostático, ya que se observa mayor inhibición del crecimiento tumoral.

Una primera aproximación para determinar los posibles efectos tóxicos de los compuestos AMD y 3 -OH AMD, fue a través de la medida del peso corporal; dicha variable se monitoreó en los grupos que recibieron los triterpenos de prueba y los fármacos de referencia. El análisis de los resultados muestra que el cisplatino induce una pérdida de peso significativa ( $*p<0.05$ ) comparado con los compuestos de prueba y la doxorubicina donde no se observaron diferencias significativas.

Respecto a la determinación de los efectos tóxicos del cisplatino a nivel sistémico, en los grupos de ratones machos xenotrasplantados con células PC-3, se observaron algunos cambios tales como leucopenia ( $*p<0.05$ ), linfopenia ( $*p<0.05$ ), incremento en los niveles de la AST ( $****p<0.0001$ ) y creatinina ( $****p<0.0001$ ), (Cuadro 11). Este último hallazgo es consistente con informes previos sobre la nefrotoxicidad del cisplatino (Guindon, 2014, Soni, 2016). Por otra parte, en los ratones machos con xenotrasplantes de células PC-3 y tratados con los ácidos AMD y 3 -OH AMD no se observaron efectos tóxicos importantes a nivel sistémico. Mientras que en las hembras con xenotrasplantes de células MDA-MB-231, se observó un incremento significativo ( $*p<0.05$ ) en los niveles de creatinina para los grupos que recibieron doxorubicina, AMD, 3 -OH AMD, lo cual indica que el proceso de filtración glomerular es deficiente debido a que los niveles de creatinina en sangre aumentaron. El efecto tóxico de la doxorubicina está relacionado con sus cardiotoxicidad, desde el punto de vista que la creatinina es

un producto del metabolismo de las células musculares (De Angelis, 2016). Los compuestos de prueba mostraron un incremento significativo en los niveles de creatinina ( $*p<0.05$ ), interesantemente este efecto sólo se observa en las hembras y no en los animales machos.

Al analizar los parámetros indicativos de toxicidad hepática, el grupo que recibió doxorubicina (1 mg/kg) presentó incremento en los niveles de AST ( $****p<0.0001$ ). De la misma forma, para los compuestos de prueba sólo el grupo tratado con 3 -OH AMD a la dosis de 60 mg/kg presentó incremento significativo ( $*p<0.05$ ) en dicha enzima. Posiblemente, porque como se describe en la guía 423 de la Organización para el Desarrollo y Cooperación Económicos (OCDE) los individuos hembras son más sensibles a los efectos de agentes químicos externos.

En relación al posible mecanismo antitumoral de los triterpenos AMD y 3 -OH AMD, primeramente, se decidió indagar sobre la proliferación y muerte celular. Los resultados indicaron que estos triterpenos disminuyeron el número de células positivas a PCNA y Ki-67 en xenotrasplantes derivados de células PC-3. La PCNA es una proteína nuclear, no histona, está conservada evolutivamente en todas las especies eucariontes, desde las levaduras hasta los humanos. Las funciones de PCNA se asocian no sólo a la replicación del ADN, sino también en procesos celulares vitales, tales como la remodelación de la cromatina, reparación del ADN y control del ciclo celular (Müller, 2013). Esencialmente, PCNA se expresa en la fase de síntesis del ADN (S) y se conoce que interacciona con 400 proteínas aproximadamente (Stoimenov, 2009). Mientras que Ki-67 es un marcador clásico de la proliferación celular (Bologna, 2013). Los ácidos AMD y 3 -OH AMD mostraron un efecto anti-proliferativo, como se ha observado para los triterpenos ácido acetil-11-ceto- -boswellico (AKBA) y el nimbólido (Yadav, 2012, Gupta, 2013).

Las evidencias experimentales sobre la muerte celular inducida por AMD y 3 -OH AMD, tanto en los xenotrasplantes de células PC-3 como de MDA-MB-231 sugieren un proceso apoptótico. Recordando que, la apoptosis es un mecanismo

de muerte celular, que se lleva a cabo a través de múltiples etapas y se caracteriza por el encogimiento celular, condensación de cromatina (picnosis) y fragmentación nuclear, el resultado es la formación de cuerpos apoptóticos que son fagocitados para la eliminación de los restos celulares (Cotter, 2009, Su, 2015). Tal como se demostró en las observaciones histopatológicas de los xenotrasplantes de los ratones tratados con los ácidos AMD y 3-OH AMD donde se observaron abundantes células en proceso apoptótico.

Los datos sobre la fragmentación del ADN, están de acuerdo con el análisis histológico y el hallazgo donde recientemente se reportó que a bajas concentraciones, el 3-OH AMD actúa como un agente pro-apoptótico intrínseco; promoviendo el proceso transición de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (MPT) y la consecuente liberación de factores pro-apoptóticos. Por el contrario, en una concentración más alta, 3-OH AMD protege las mitocondrias del hígado de rata contra MPT bloqueando la entrada de  $Ca^{2+}$  (Dalla, 2012). Aunque no siempre es posible relacionar los resultados *in vitro* con los obtenidos *in vivo*, en el presente estudio se demostró la actividad pro-apoptótica *in vivo* de los ácidos AMD y 3-OH AMD, en xenotrasplantes de células PC-3 y MDA-MB-231. Estos resultados sugieren que el mecanismo de inducción de muerte celular de los triterpenos AMD y 3-OH AMD converge con el reportado en estudios anteriores para otros triterpenos, tales como el ácido ursólico y celastrol, los cuales indujeron apoptosis en xenotrasplantes de carcinoma prostático y osteosarcoma, respectivamente (Shanmugam, 2011. Li, 2015).

Por otra parte, se propone la interacción de los ácidos AMD y 3-OH AMD con las CD, favoreciendo su maduración y con esto, su capacidad de presentar antígenos tumorales. Lo anterior, en consonancia con los resultados obtenidos sobre CD tratadas con los ácidos AMD y 3-OH AMD, los cuales incrementaron la expresión de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 y CD86). Lo anterior sugiere que, los compuestos indujeron la maduración de las CD, como se ha descrito para otros triterpenos como la cucurbitacina I y el ácido uncarínico C (Hira, 2015, Kim, 2011). El incremento en las moléculas coestimuladoras después del tratamiento con los

ácidos, probablemente sea una consecuencia de la activación de algún receptor tipo Toll (TLR), como se ha descrito para el ácido ursólico, dicho triterpeno es reconocido por el TLR4, en un modelo de macrófagos al inhibir la unión del TLR4 al lipopolisacárido (Jang, 2014). Aunque el modelo de estudio en el que se probaron los ácidos como agentes antitumorales, tiene como limitante que, los ratones nu/nu presentan aplasia del timo, por lo que la respuesta celular dependiente de linfocitos T es mínima o nula. No obstante, en este contexto se pueden encontrar células NK, NKT las cuales se sabe que pueden ser activadas por las células dendríticas a través de una interacción célula-célula o por la secreción de citocinas (Borg, 2004, Barreira, 2011). Este mecanismo se apoya de los siguientes hallazgos, donde las CD cargadas con antígenos asociados a melanoma (MAGEAX) y tratadas con los ácidos AMD y 3 -OH AMD, se inocularon en un modelo de melanoma murino en individuos inmunocompetentes de la cepa C57BL/6, observando disminución en la tasa de crecimiento tumoral (Reyes, 2018). Interesantemente, al analizar las moléculas coinhibitorias CD273 y CD274 en las CD tratadas con los ácidos AMD y 3 -OH AMD, se observó que sólo el 3 -OH AMD indujo cambios significativos en la expresión de CD274.

Es de notar que, el ácido ursólico de forma similar al ácido 3 -OH AMD muestra un efecto dual sobre las CD, es decir tiene un efecto tanto en moléculas coestimuladoras como inhibitorias (Checker, 2012). Estos resultados en conjunto permiten retomar un adagio antiguo de la toxicología, la selección de la dosis correcta de una sustancia con potencial terapéutico. La dosis correcta de los triterpenos investigados en este trabajo, se debe seleccionar cuidadosamente; para su uso como agentes antitumorales o como adyuvantes en la investigación de nuevas estrategias de inmunoterapia antitumoral.



---

---

## 9. CONCLUSIONES

---

---

En esta investigación se demostró que los ácidos masticadienónico y 3 -OH masticadienoico inhibieron la proliferación celular *in vitro* e *in vivo*. El decremento en los niveles de los marcadores de proliferación celular (Ki67, PCNA), así como la inducción de muerte celular por apoptosis; están relacionados con la inhibición del crecimiento tumoral inducida por los ácidos AMD y 3 -OH AMD en un modelo murino. En otras palabras, los triterpenos AMD y 3 -OH AMD mostraron un efecto antitumoral dependiente de más de un blanco molecular.

Estos hallazgos, fragmentan el paradigma de estudio de los metabolitos secundarios como agentes antitumorales, ya que dichas moléculas se excluyen de los estudios *in vivo*, por presentar baja citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano. Además, los resultados se proponen como la base de investigaciones futuras, ya que los triterpenos AMD y 3 -OH AMD muestran resultados prometedores como agentes antitumorales y adyuvantes en la investigación de nuevas estrategias de inmunización antitumoral.

---

---

## 10. LITERATURA CONSULTADA

---

---

Akiba, H., Kehren, J., Ducluzeau, M.T., Krasteva, M., Horand, F., Kaiserlian, D. (2002). Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8+T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis. *J Immunol.* 168, 3079–3087.

Alcántara, F. E., Brechú, F.A.E., García, L.P., Rocha, Z. L., López, Marure, R., Martínez, V. M. (2015). Argentatin B Inhibits Proliferation of Prostate and Colon Cancer Cells by Inducing Cell Senescence. *Molecules*, 20, 21125-21137.

Alexandroff, A.B., Jackson, A.M., Paterson, T., Haley, J.L., Ross, J.A., Longo, D.L., Murphy, W.J., James K., Taub, D.D. (2000). Role for CD40-CD40 ligand interactions in the immune response to solid tumours. *Mol. Immunol.* 37, 515-526.

Alewine, C., Hassan, R., & Pastan, I. (2015). Advances in Anticancer Immunotoxin Therapy. *Oncologist.*, 20, 176–185.

Alonso, C.A.J., Juárez, V., M. C., & Campos, X., N. (2016). Medicinal Plants from Mexico, Central America, and the Caribbean Used as Immunostimulants. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2016, 1-15.

Alonso, C.A.J.; Villareal, M.L., Salazar, O.L.A., Gómez, S.M., Domínguez, F., García, C. A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J. Ethnopharmacol.*, 133, 945-972.

Barreira da Silva, R., Münz C. (2011). Natural killer cell activation by dendritic cells: balancing inhibitory and activating signals. *Cell Mol Life Sci.* 68, 3505-3518.

Barrett, L. P.J., Dixon, J. M. C., Jones, F. A., Leonard, R. N. Murray, C., Palmieri, C. J. Plummer, A., Stanley, M. W. Verrill. (2009). Expert opinion on the use of anthracyclines in patients with advanced breast cancer at cardiac risk. *Ann. Oncol.*, 20, 816-827.

Bologna, M.R., Mosqueda, T.A., Molina, F.N., Mori, E.D., Sánchez, A.G. (2013). Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med. Oral Patol.*, 18, e174–e179.

Borg, C., Jalil, A., Laderach, D., Maruyama, K., Wakasugi, H., Charrier, S., Ryffel B., Cambi, A., Figdor, C., Vainchenker, W., Galy, A., Caignard, A., Zitvogel, L. (2004). NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood.* 104, 3267-3275.

Brunner, R., Jensen, J. E., Pali, S. I. (2010). The ABC of clinical and experimental adjuvants—A brief overview. *Immunol. Lett.*, 128, 29-35.

- Bussard, K. M., Mutkus, L., Stumpf, K., Gomez, M., C., & Marini, F. C. (2016). Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res.* 18, 84.
- Cara, C. J., Salvador, A.P., Sans, M., Rodrigo, L., Guerrero, E. M., Hinojosa, J., García, P, J., Guijarro, L. G. (2004). Reviewing the mechanism of action of thiopurine drugs: Towards a new paradigm in clinical practice. *Med. Sci. Monit.*, 10, 247-254.
- Chabner, B. A. and Roberts, T.G. (2005). Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Can.*, 5, 65-72.
- Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N., & Karliner, J. S. (2010). Doxorubicin Cardiomyopathy. *Cardiol.*, 115, 155–162.
- Checker, R., Sandur, S. K., Sharma, D., Patwardhan, R. S., Jayakumar, S., Kohli, V., Sainis, K. B. (2012). Potent Anti-Inflammatory Activity of Ursolic Acid, a Triterpenoid Antioxidant, Is Mediated through Suppression of NF- B, AP-1 and NF-AT. *PLoS ONE*, 7, e31318.
- Cheng, S.; Swanson, K.; Eliaz, I., McClintick, J.N., Sandusky, G.E., Sliva, D. (2015). Pachymic Acid Inhibits Growth and Induces Apoptosis of Pancreatic Cancer In Vitro and In Vivo by Targeting ER Stress. *PLoS ONE*, 10, e0122270.
- Chintharlapalli, S., Papineni, S., Lei, P., Pathi, S. Safe, S. (2011). Betulinic acid inhibits colon cancer cell and tumor growth and induces proteasome-dependent and -independent downregulation of specificity proteins (Sp) transcription factors. *BMC Cancer*, 11, 1-12.
- Cotter, T.G. (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat. Rev. Can.*, 9, 501-507.
- Cuzick, J., Thorat, M. A., Andriole, G., Brawley, O. W., Brown, P. H., Culig, Z., Wolk, A. (2014). Prevention and Early Detection of Prostate Cancer. *Lancet Oncol.*, 15, e484–e492.
- Dalla, V. A., Braga, A., García, A. A.N., Martínez, V.M., Toninello, A. (2012). 3 -Hydroxymasticadienonic Acid As an Antiproliferative Agent That Impairs Mitochondrial Functions. *J. Nat. Prod., Prod.*, 75, 557-562.
- De Angelis, A., Urbanek, K., Cappetta, D., Piegari, E., Ciuffreda, L.P., Rivellino, A., Ross, F., Berrino, L. (2016). Doxorubicin cardiotoxicity and target cells: a broader perspective. *Cardio Oncol.*, 2, 1-8.
- DeVita, V.T., Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 68, 8643-8653.
- Dong, Y., Lu, B., Zhang, X., Zhang, J., Lai, L., Li, D., Wu, Y., Song, Y., Luo, J., Pang, X., Yi, Z., Liu, M.. (2010). Cucurbitacin E, a tetracyclic triterpenes compound

from Chinese medicine, inhibits tumor angiogenesis through VEGFR2-mediated Jak2-STAT3 signaling pathway. *Carcinogenesis*, 12, 2097-20104.

Ehrhardt, H., Pannert, L., Pfeiffer, S., Wachter, F., Amtmann, E., & Jeremias, I. (2013). Enhanced anti-tumour effects of Vinca alkaloids given separately from cytostatic therapies. *Br.J. Pharmacol.*, 168, 1558–1569.

Estrada, A.C., Syrovets, T., Pitterle, K., Lunov, O., Büchele, B., Schimana, P. J., Schmidt, T., Morad, S.A., Simmet, T. (2010). Tirucallic acids are novel pleckstrin homology domain-dependent Akt inhibitors inducing apoptosis in prostate cancer cells. *Mol. Pharmacol.*, 73, 378–387.

Faivre, S., Djelloul, S., Raymond, E. (2006). New paradigms in anticancer therapy: targeting multiple signaling pathways with kinase inhibitors. *Semin. Oncol.*, 33, 407-420

Feitelson, M. A., et al. (2015). Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin. Cancer Biol.*, 35, S25-S54.

Feldman A.T., Wolfe D. (2014). Chapter 3. Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining. In: Histopathology. Methods in Molecular Biology “Methods and Protocols” (31-43). USA: Humana Press.

Feoktistova, M., Geserick, P., Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* 4, 343-346.

Figuroa, G. G., & Pérez, P. C. (2017). Strategies for the evaluation of DNA damage and repair mechanisms in cancer (Review). *Oncol. Lett.*, 13, 3982-3988.

Fitzmaurice, C. (2017). Global Burden of Disease Cancer Collaboration. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 3, 524-548.

Fogh, J., Giovanella, B. C. (1982). The nude mice in experimental and clinical research. 16-22. USA: Academic Press.

Fonsatti, E., Maio, M., Altomonte, M., Hersey, P. (2010). Biology and clinical applications of CD40 in cancer treatment. *Semin. Oncol.* 37, 517-523.

Fortoul, T. (2010). Histología y biología celular. Técnica histológica y sus aplicaciones. 15-23. China: Mc Graw Hill.

Gao, N., Cheng, S., Budhreja, A., Gao, Z., Chen, J., Liu, E.H., Huang, C., Chen, D., Yang, Z., Liu, Q., Li, P., Shi, X., Zhang, Z. (2012). Ursolic acid induces apoptosis in human leukaemia cells and exhibits anti-leukaemic activity in nude mice through the PKB pathway. *Br. J. Pharmacol.*, 165, 1813-1826.

- Garg, D. A., Pierre G. Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., Agostinis P. (2017). Integrating Next-Generation Dendritic Cell Vaccines into the Current Cancer Immunotherapy Landscape. *Trends Immunol.* 38, 577-593.
- Gómez, D. H., Lamadrid, F.H., Cahuan, H.L., Silverman, R.O.; Montero, P., González, R. M. C., Fitzmaurice, C. P. A., Allen, C., Dicker, D.J., Hamavid, H., López, A., Murray, C., Naghavi, M., Lozano, R. (2015). The burden of cancer in Mexico, 1990-2013. *Salud Pública de Mex.*, 58, 118-131.
- Greene, J.L., Leytze, G.M., Emswiler, J., Peach, R., Bajorath, J., Cosand, W., Linsley, P.S. (1996). Covalent dimerization of CD28/CTLA-4 and oligomerization of CD80/CD86 regulate T cell costimulatory interactions. *J. Biol. Chem.*, 271 (43), 26762-26771.
- Guía de Práctica Clínica Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Mama en Segundo y Tercer nivel de Atención. México. (2009). Secretaria de Salud. 1-102. Disponible en: <http://www.cenetec.salud.gob.mx>. Consultado: 02/Marzo/2018.
- Guindon, J., Deng, L., Fan, B., Wager, M.J., Hohmann, A.G. (2014). Optimization of a cisplatin model of chemotherapy induced peripheral neuropathy in mice: Use of vitamin C and sodium bicarbonate pretreatments to reduce nephrotoxicity and improve animal health status. *Mol. Pain.* 10, 1–14.
- Gupta, S.C., Prasad, S., Sethumadhavan, D.R., Nair, M.S., Mo, Y.Y., Aggarwal, B.B. (2013). Nimbolide, a Limonoid Triterpene, Inhibits Growth of Human Colorectal Cancer Xenografts by Suppressing the Proinflammatory Microenvironment. *Clin. Cancer Res.*, 19, 4465-4476.
- Guzmán A., Cruz E. (2014). Physical Characteristics of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl.) fruits from three provenances. *Rev. Fitotec. Mex.*, 37, 250-260.
- Haenssle, H., Buhl, T., Knudsen, S., Krueger, U. Rosenberger, A. Reich, K., Neumann, C. (2008). CD40 ligation during dendritic cell maturation reduces cell death and prevents interleukin-10-induced regression to macrophage-like monocytes. *Exp. Dermatol.* 17, 177-187.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-674.
- Heidenreich, S. K., Rawal, K., Szkarlat, Bogdanova, N., Dirix, A., Stenzl, M., Welslau, G., Wang, F., Dawkins, de Boer, C.J., Schrijvers, D. (2013). A randomized, double-blind, multicenter, phase 2 study of a human monoclonal antibody to human  $\beta$ 3 integrins (intetumumab) in combination with docetaxel and prednisone for the first-line treatment of patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Ann. Oncol.*, 24, 329-336.

- Hira S.K., Mondal I., Manna, P. (2015). Combined immunotherapy with whole tumor lysate-pulsed interleukin-15-activated dendritic cells and cucurbitacin I promotes strong CD8+ T-cell responses and cures highly aggressive lymphoma. *Cytother.*, 17(5), 647-664.
- Hubo, M., Trinschek, B., Kryczanowsky, F., Tuettenberg, A., Steinbrink, K., Jonuleit, H. (2013). Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Fron. Immunol.* 4, 1-14.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2015). Anuario estadístico y geográfico de Morelos. 1-475. Disponible en. Consultado: 19/Diciembre/2016.
- Iwanski, G.B., Lee, D.H., En, G.I. S., Doan, N.B., Castor, B. Vogt, M., Toh, M., Bokemeyer, C., Said, J.W., Thoennissen, N.H., Koeffler, H.P. (2010). Cucurbitacin B, a novel in vivo potentiator of gemcitabine with low toxicity in the treatment of pancreatic cancer. *Br. J. Pharmacol.*, 160, 998-1007.
- Jang, S.E., Jeong, J.J., Hyam, S.R., Han, M.J., Kim, D.H. (2014). Ursolic acid isolated from the seed of *Cornus officinalis* ameliorates colitis in mice by inhibiting the binding of lipopolysaccharide to Toll-like receptor 4 on macrophages. *J. Agric. Food Chem.*, 72, 9711-9721.
- Juríková, M., Danihel, L., Polák Š., Varga, I. (2016). Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem.*, 118, 544-552.
- Kantoff, P. W., Higano, C.S., Shore, N.D., Berger, E.R., Small, E.J., Penson, D.F., Redfern, C.H., Ferrari, A.C., Dreicer, R., Sims. R.B, Xu, Y., Frohlich, M.W., Schellhammer, P.F. (2010). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.*, 363, 411-422.
- Kim, K.S., Pham, T.N., Jin, C.J., Umeyama, A., Shoji, N., Hashimoto, T., Lee, J.J., Takei, M. (2011). Uncarinic Acid C Isolated from *Uncaria rhynchophylla* Induces Differentiation of Th1-Promoting Dendritic Cells Through TLR4 Signaling. *Biomark Insights*, 28, 27-38.
- Kumar, D., Arya, V., Kaur, R., Bhat, Z.A., Gupta, V.K., Kumar, V. (2012). A review of immunomodulators in the Indian traditional health care system. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 45,165-184.
- Lennard, L., Lilleyman, J. S. (1989). Variable mercaptopurine metabolism and treatment outcome in childhood lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 7, 1816-1823.
- Levitzki, A., Klein, S. (2010). Signal transduction therapy of cancer. *Mol. Aspects Med.*, 31, 287-329.
- Li, H.Y., Zhang, J., Sun, L.L., Li, B.H., Gao, H.L., Xie, T., Zhang, N., Ye, Z.M. (2015). Celastrol induces apoptosis and autophagy via the ROS/JNK signaling

pathway in human osteosarcoma cells: an in vitro and in vivo study. *Cell Death and Dis.* 6, e1604.

Li, J., Li, J., Zhang, F. (2015). The immunoregulatory effects of Chinese herbal medicine on the maturation and function of dendritic cells. *J. Ethnopharmacol.*, 171, 185-195.

Lu, J., Jiang, F., Lu, A., Zhang, G. (2016). Linkers Having a Crucial Role in Antibody–Drug Conjugates. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 561.

LI, T. L., Jiang, G., Chen, Q., Sheng, N. J. (2015). Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Mol. Med. Rep.* 11, 1566-1572.

Lim, Y. T. (2015). Vaccine adjuvant materials for cancer immunotherapy and control of infectious disease. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 4, 54–58.

Litewka, J. D., McCubrey, J. A.; Laidler, P. (2013). Increased Akt Signaling Resulting from the Loss of Androgen Responsiveness in Prostate Cancer. *Curr. Med. Chem.* 20, 144-157.

Liu, F., He, Y., Liang, Y., Wen, L., Zhu, Y., Wu, Y., Zhao, L., Li, Y., Mao, X., Liu, H. (2013). PI3-kinase inhibition synergistically promoted the anti-tumor effect of lupeol in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int.*, 13, 1-7.

Lorke, D. (1983). A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. *Arch. Toxicol.*, 54, 275-287.

Louis, S. K. & Siegel, A. C. (2011). Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. En *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols* (7-12). USA: Humana Press.

Lui, V.W., Yau, D.M., Wong, E.Y., Ng, Y.K., Lau, C.P., Ho, Y., Chan, J.P., Hong, B., Ho, K., Cheung, C.S., Tsang, C.M., Tsao, S.W., Chan, A.T. (2009). Cucurbitacin I elicits anoikis sensitization, inhibits cellular invasion and in vivo tumor formation ability of nasopharyngeal carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 30, 2085-2094.

Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L., Rössner, S., Koch, F., Romani, N., & Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods*, 223, 77-92.

Mac, K.S., Ruiz, M.S., Gazzaniga, S., & Wainstok, R. (2015). Dendritic Cell-Based Vaccination in Cancer: Therapeutic Implications Emerging from Murine Models. *Front. Immunol.* 6, 243.

- McArthur, H.L, Page, D.B. (2016). Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer: Checkpoint Blockade, Cancer Vaccines, and Future Directions in Combination Immunotherapy. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 14, 922-933.
- Medina, L.A., Herrera, P.B.I., Morales, C.M.A., García, L.P., Pérez, C.E., Chanona, V.J. & Brandan, M.E. (2008). Use of an orthovoltage X-ray treatment unit as a radiation research system in a small-animal cancer model. *J. of Experim. Clin. Can. Res.*, 27, 1-11.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L. (2004). Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.*, 56,185-229.
- Mottet, N.J., Bellmunt, M., Bolla, S., Joniau, M., Mason, V., Matveev, H.P., Schmid, T., van der Kwast, T., Wiegel, F., Zattoni, A., Heidenreich. (2011). EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *Actas Urol. Esp.* 35, 565-579.
- Moudi, M., Go, R., Yien, C. Y. S., & Nazre, M. (2013). Vinca Alkaloids. *Int. I. J. Prev. Med.*, 4, 1231–1235.
- Mu, X., Shi, W., Sun, L., Li, H., Jiang, Z., Zhang, L. (2012). Pristimerin, a triterpenoid, inhibits tumor angiogenesis by targeting VEGFR2 activation. *Molecules*, 17, 6854-6868.
- Müller, R., Misund, K., Holien, T., Bachke, S., Gilljam, K. M., Vatsveen, T. K., Torstein, B. R., Bellacchio, E., Sundan, A., Otterlei, M. (2013). Targeting Proliferating Cell Nuclear Antigen and Its Protein Interactions Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells. *PLoS ONE* 8, e70430
- Neefjes, J, Jongsma, M.L., Paul, P., Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 823-836.
- Neidle, S., Thurston, D. E. (2005). Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies. *Nat. Rev.*, 5, 285-296.
- Newman, D.J, Cragg, G.M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.*, 79, 629-661.
- Noolu, B., Gogulothu, R., Bhat, M., Qadri, S.S., Reddy V.S., Reddy G.B., Ismail, A. (2016). In Vivo Inhibition of Proteasome Activity and Tumour Growth by *Murraya koenigii* Leaf Extract in Breast Cancer Xenografts and by Its Active Flavonoids in Breast Cancer Cells. *Anticancer Agents Med. Chem.* 16, 1605-1614.



- Olivera, O.A.G., Soto, H. M., Martínez, V. M., Terrazas, S. T., Solares, A. F. (1999). Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *J. Ethnopharmacol.* , 68, 109-113.
- Oviedo, C.I., Apan, R.T., Soto, H.M. & Martínez V.M. (2004). Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory. *Phytomed.*,11, 436-445.
- Oviedo, C.I., Apan, R.T., Martínez, V.M. (2005). Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes. *J. Pharm. Pharmacol.* 57, 1087-1091.
- Oviedo, I. (2007). Obtención de agentes antiinflamatorios y citotóxicos a partir de modificaciones químicas a los ácidos masticadienoico y 3-epimasticadienólico (Tesis para optar por el grado de Doctora en Ciencias). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. México.
- Palucka, K., Banchereau, J. (2013). Dendritic-Cell-Based Therapeutic Cancer Vaccines. *Cell*, 39, 38-48.
- Palucka, K, Banchereau, J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat. Rev. Cancer*, 12, 265-277.
- Parikh, N.R., Mandal, A., Bhatia, D., Siveen, K.S., Sethi, G., Bishayee, A. Oleanane triterpenoids in the prevention and therapy of breast cancer: current evidence and future perspectives. *Phytochem. Rev.*, 13, 793-810.
- Patel, A.R., Klein, E.A. (2009). Risk factors for prostate cancer. *Nat. Clin. Pract. Urol.*, 6, 87-95.
- Patlolla, J.M.R., Rao, C. V. (2012). Triterpenoids for Cancer Prevention and Treatment: Current Status and Future Prospects. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 13, 147–155.
- Petrelli, A, Valabrega, G. (2009). Multitarget drugs: the present and the future of cancer therapy. *Exper Opin. Pharmacother.* 10, 589-600
- Polakis, P. (2016). Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Pharmacol. Rev.*, 68, 3-19.
- Prudnikova, T. Y., Villamar-Cruz, O., Rawat, S. J., Cai, K. Q., Chernoff, J. (2016). Effects of p21-activated kinase 1 inhibition on 11q13-amplified ovarian cancer cells. *Oncogene*, 35, 2178-2185.
- Ramachandran, C., Nair, P.K., Alamo, A., Cochrane, C.B., Escalon, E., Melnick, S.J. (2006). Anticancer effects of amooranin in human colon carcinoma cell line in vitro and in nude mice xenografts. *Int. J. Cancer*, 119, 2443-2454.
- Ramírez, L.A., Barajas, M.H., Flores, T. E., Orozco, B. A. (2013). Immunostimulating Effect of Aqueous Extract of *Amphipterygium Adstringens* on

Immune Cellular Response in Immunosuppressed Mice. *Afr. J. Tradit., Complement. Altern. Med.*, 10, 35–39.

Reis e Sousa C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 476-83.

Revelo, J.C. (2010). Obtención de derivados, por métodos químicos, de triterpenos aislados de *Amphipterygium adstringens* y su evaluación como agentes antiinflamatorios (Tesis para obtener el grado de Químico Farmacéutico Biólogo). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. México.

Reyes, R. M. F. (2018). Efecto del ácido ursólico, masticadienónico y 3 -OH masticadienoico en la inmunoterapia antitumoral basada en células dendríticas derivadas de médula ósea cargadas con MAGEAX en un modelo de melanoma murino (Tesis para obtener el grado de Bióloga). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. México.

Rodríguez, C. M., Jiménez, R. R., Canales, M. M. M., García, L. J., Rivera, Y. N., Nieto, O. Y., Ledesma, S. Y., Sánchez, T. L. E., Rodríguez, S. M., Ignacio, T. L., Rodríguez, M. M. A. (2016). Protective Effect of *Amphipterygium adstringens* Extract on Dextran Sulphate Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice. *Mediators Inflamm.* 4, 1-12.

Saad, F., Hotte, S. J. (2010). Guidelines for the management of castrate-resistant prostate cancer. *Can. Urol. Assoc. J.* 4, 380–384.

Sansom, D.M., Manzotti, C.N., Zheng, Y. (2003). What 's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol.* 14, 313-317.

Schneider, P., Hosseiny, S.S., Szczotk, M., Jordan, V. & Schlitter, K. (2009). Rapid solubility determination of the triterpenes oleanolic acid and ursolic acid by UV-spectroscopy in different solvents. *Phytochem. Letters*, 2, 85-87.

Sciacovelli, M., Gaude, E., Hilvo, M., Frezza, C. (2014). Chapter One. The Metabolic Alterations of Cancer Cells. En *Methods in Enzymology* (1-23). UK: Elsevier.

Scott, A. M., Allison, J. P., Wolchok, J. D. (2012). Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immun.*, 12, 1-8.

Senkus, E., Kyriakides, S., Ohno, S., Penault-Llorca, F., Poortmans, P., E. Rutgers, E., Zackrisson, S., Cardoso, F. (2015). Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 26, 8–30.

Shanmugam, M. K., Rajendran, P., Li, F., Nema, T., Vali, S., Abbasi, T., Kapoor, S., Sharma, A., Kumar, A.P., Ho, P.C., Hui, K.M., Sethi, G. (2011). Ursolic acid inhibits multiple cell survival pathways leading to suppression of growth of prostate cancer xenograft in nude mice. *J. Mol. Med.* 89, 713-727.

Siegel, R. L., Miller, D. K., Jemal, A. (2016). Cancer Statistics, 2016. *CA Cancer J. Clin.*, 66 , 7-30.

Sim nek, T., Stérba, M., Popelová, O., Adamcová, M., Hrdina, R., Gersl, V. (2009). Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol. Rep.*, 61, 154-171.

Soni, K. K., Kim, H.K., Choi, B.R., Karna K. K., You, J. H., Cha J.S., Shin, Y.S., Lee, S.W., Kim, C.Y., Park J.K. (2016). Dose-dependent effects of cisplatin on the severity of testicular injury in Sprague Dawley rats: reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress. *Drug Des. Devel. Ther.*, 10 3959–3968.

Stanton, R. A., Gernert, K. M., Nettles, J.H., Aneja, R. (2011). Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med. Res. Rev.*, 31, 443-481.

Stoimenov, I., Helleday, T. (2009). PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 605-613.

Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., Yu, Q. (2015). Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol. Cancer*, 14:48.

Taylor, C. R., Shan, R. S. (2014). Chapter 1. Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls, and Standardization. In: Diagnostic Immunohistochemistry “Theranostic and Genomic Applications” (1-38). USA. Elsevier Saunders.

Temizoz, B., Kuroda, E., Ishii, K. J. (2016). Vaccine adjuvants as potential cancer immunotherapeutics. *Int. Immunol.*, 28, 329–338.

Tiwari, M. (2012). Antimetabolites: established cancer therapy. *J. Can. Res. Ther.*, 8, 510-519

Veronesi, U., Zurrada, S., Viale, G., Galimberti, V., Arnone, P., Nolè, F. (2009). A Breast Cancer Classification to Guide to Treatment and Facilitate Research. *Breast J.* 15, 291-295.

Walsh, M. F., Nathanson, K. L., Couch, F. J., & Offit, K. (2016). Genomic Biomarkers for Breast Cancer Risk. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 882, 1–32.

Wang, B. (2012). Targeting dendritic cells in situ for breast cancer immunotherapy. *Oncoimmunol.* 1, 1398–1400.

Wang, S. C. (2014). PCNA: a silent housekeeper or a potential therapeutic target? *Trend. Pharmacol. Sci.* 35, 78-186.

Wang, Z., Fu, M., Wang, L., Liu, J., Li, Y., Brakebusch, C., & Mei, Q. (2013). p21-Activated Kinase 1 (PAK1) Can Promote ERK Activation in a Kinase-independent Manner. *J. Biol. Chem.*, 288, 20093–20099.

Wei, E. K., Wolin, K. Y., & Colditz, G. A. (2010). Time Course of Risk Factors in Cancer Etiology and Progression. *J. Clin. Oncol.*, 28, 4052–4057.

Welsch, U., Deller, T. (2013). Histología. En Terminología, microscopía y técnica histológica 1-11. China: Médica Panamericana.

Wieczorek, M., Abualrous, E.T., Sticht, J. Álvaro, B. M., Stolzenberg, S. N. F., Freund, C. (2017). Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front. Immunol.* 8, 292.

Yadav, V.R., Prasad, S., Sung, B., Gelovani, J.G., Guha, S., Krishnan, S., Aggarwal, B.B. (2012). Boswellic acid inhibits growth and metastasis of human colorectal cancer in orthotopic mouse model by downregulating inflammatory, proliferative, invasive and angiogenic biomarkers. *Int. J. Can.*130, 2176-2184.

Yang, H., Chen, D., Cui, Q.C., Yuan, X., Dou, Q.P. (2006). Celastrol, a Triterpene Extracted from the Chinese “Thunder of God Vine,” Is a Potent Proteasome Inhibitor and Suppresses Human Prostate Cancer Growth in Nude Mice. *Cancer Res.*, 66, 4758-4765.

Zerjatke, T., Igor, A. G., Kirova, D., Markus, F., Daniel, K., Gonciarz, M., Muller, D., Glauche, I., Mansfeld, Jörg. (2017). Quantitative Cell Cycle Analysis Based on an Endogenous All-in-One Reporter for Cell Tracking and Classification. *Cell Rep.* 19, 1953-1966.

# **11. APÉNDICE ARTÍCULO**

Article

# Masticadienonic and 3 $\alpha$ -OH Masticadienoic Acids Induce Apoptosis and Inhibit Cell Proliferation and Tumor Growth in Prostate Cancer Xenografts In Vivo

Ma. Beatriz Sánchez-Monroy<sup>1</sup>, Nadia J. Jacobo-Herrera<sup>2</sup>, Alejandro Zentella-Dehesa<sup>2,4</sup>, Beatriz Hernández-Téllez<sup>3</sup> and Mariano Martínez-Vázquez<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán C.P., CDMX 04510, Mexico; beatriz.sanchez@ciencias.unam.mx

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Sección XVI, Delegación Tlalpan C.P., CDMX 14000, Mexico; nadia.jacobo@gmail.com (N.J.J.-H.); azentell@iibiomedicas.unam.mx (A.Z.-D.)

<sup>3</sup> Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán C.P., CDMX 04510, Mexico; bhernandezt@hotmail.com

<sup>4</sup> Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental & Programa Institucional de Cáncer de Mama, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Deportivo, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán C.P., CDMX 04510, Mexico

\* Correspondence: marvaz@unam.mx; Tel.: +52-555-6224-403

Received: 5 July 2017; Accepted: 30 August 2017; Published: 6 September 2017

**Abstract:** The triterpenes have been constituted as a group of interesting molecules as possible antitumor agents. Despite several of them not presenting a potent cytotoxic activity in vitro against cancer cells, in vivo in xenotransplant tumors studies, they show promising results. Based on the above considerations, we investigated the antitumor activity of both masticadienonic (MDA) and 3 $\alpha$ -OH masticadienoic (3 $\alpha$ -OH MDA) acids in a mouse prostate cancer xenograft model. Immunohistochemical assays were used to evaluate the decrease in the expression of the Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and the Ki-67 induced by MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay was performed to demonstrate the fragmentation of DNA. Our results showed that the two triterpenes inhibited tumor growth, had anti-proliferative effect in vivo and induced cell death by apoptosis. Collectively, our data suggested that the antitumor mechanism of MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA involves several molecular targets related to cell proliferation and apoptosis.

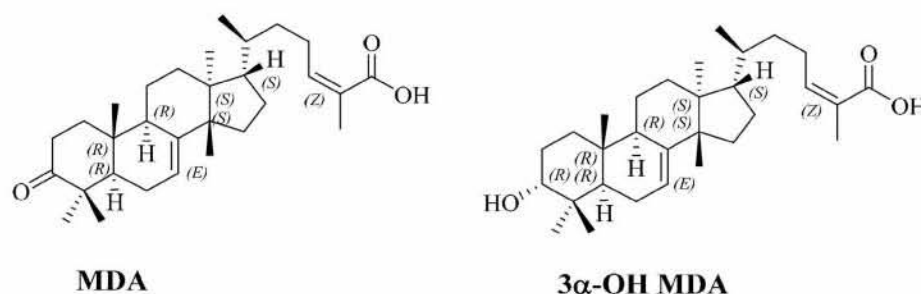
**Keywords:** masticadienonic acid; 3 $\alpha$ -OH masticadienonic acid; prostate cancer; xenografts; PCNA; Ki-67; apoptosis

## 1. Introduction

Prostate cancer (PC) is the second leading cause of cancer death in men, accounting for approximately 27,540 deaths worldwide in 2015 [1]. PC begins as an androgen-dependent disease; the standard treatment options usually include surgery, radiation, active surveillance and androgen-deprivation therapy. Although these approaches are initially positive, 25 to 40 percent of the patients progress to an advanced stage [2,3]. In this stage, 50 to 70% of the patients receive chemotherapy resulting in progression-free survival but without curative results [4,5]. Further efforts are needed to investigate novel treatments for incurable PC.

Plants are a rich source of antitumor compounds; from the 1940s until now, 48.6% of the drugs approved by the Food and Drug Administration (FDA) are natural or naturally derived products [6]. In recent studies, the antitumor activities of some triterpenes, such as ursolic acid, acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA) and 3- $\beta$ -acetoxy-tirucallic acid ( $\beta$ ATA) [7–9] have been reported.

*Amphipterygium adstringens* Schiede Schlecht (common name: Cuachalalate) is a medicinal plant with a long tradition of ethnobotanical use in treating several ailments, including gastric cancer and anti-inflammatory conditions [10,11]. Previous work has shown that the major components of the bark of *A. adstringens* comprise some tirucallane-type triterpenes, such as masticadienonic acid (MDA) and 3- $\alpha$ -hydroxy masticadienonic acid (3 $\alpha$ -OH MDA) (Figure 1) [12]. Previously, we demonstrated anti-proliferative and anti-inflammatory activities of MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA [13], and also that 3 $\alpha$ -OH MDA impairs mitochondrial functions [14].



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

Based on the above findings, we decided to evaluate the antitumor activities of MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA acids in a mouse xenograft model.

## 2. Results

### 2.1. Acute Toxicity Test

The results indicated that only the 1000 mg/kg dose of MDA or 3 $\alpha$ -OH MDA induced death in the animals. To determine the median lethal dose (LD<sub>50</sub>) of each triterpene, 250, 500 and 750 mg/kg of MDA and 170, 210, 250 and 500 mg/kg of 3 $\alpha$ -OH MDA were used. The lethal dose 50 (LD<sub>50</sub>) was calculated from the square root of the product of the lowest lethal dose and the highest non-lethal dose. The LD<sub>50</sub> of MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA were calculated from the equations  $\sqrt{(500 \times 250)}$  and  $\sqrt{(170 \times 210)}$ , respectively [15]. The LD<sub>50</sub> values were determined as 353.55 mg/kg and 188.94 mg/kg for MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA, respectively.

### 2.2. Cytotoxicity In Vitro of MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA on PC-3 Cells

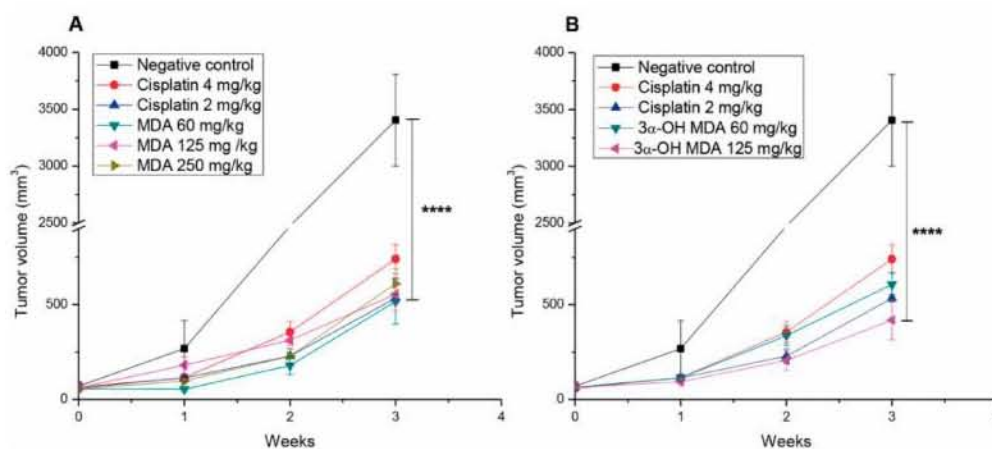
The cytotoxic effect of masticadienonic and 3 $\alpha$ -OH masticadienonic acids in the PC-3 cells was tested by the crystal violet colorimetric method. Cisplatin was used as the positive control. The PC-3 cells were exposed to concentration ranges of 12.5 to 100  $\mu$ M of the triterpenes for 48 h. Bioactivities of MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA were determined from the concentration that induced 50% growth inhibition in the treated cells compared to the controls. The results are shown in Table 1.

**Table 1.** Cytotoxic effect of MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA in prostate cancer cells (PC-3) at 48 h. The inhibitory concentration 50% (IC<sub>50</sub>) values represent the average of three independent assays. The data are shown as the means  $\pm$  standard deviation (SD).

Treatment	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
MDA	56.51 $\pm$ 2.31
3 $\alpha$ -OH MDA	54.52 $\pm$ 4.95
Cisplatin	15.56 $\pm$ 1.14

### 2.3. Masticadienonic and 3 $\alpha$ -Hydroxy Masticadienoic Acids Inhibited the Growth of Prostate Cancer Xenografts

The tumor growth inhibition of MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA was evaluated in nude mice transplanted with PC-3 cells. The tumor growth kinetics after three weeks of the treatment with either cisplatin or the two triterpenes is depicted in Figure 2. Tumors from the negative control group grew to an average volume of 3500 mm<sup>3</sup>, while those treated with MDA, 3 $\alpha$ OH-MDA or cisplatin grew to an average volume of 500 mm<sup>3</sup> (Figure 2A,B).



**Figure 2.** In vivo antitumor effect of masticadienonic and 3 $\alpha$ -hydroxymasticadienoic acids. The antitumor activities of MDA (A) and 3 $\alpha$ -OH MDA (B) were evaluated in nu/nu mice transplanted with human prostate cancer cells. The mice were subcutaneously inoculated with  $3 \times 10^6$  cells on the right flank. Once the tumors reached 50 mm<sup>3</sup>, the mice received the indicated doses of MDA, 3 $\alpha$ -OH MDA, cisplatin or vehicle (sesame oil and 5% dimethyl sulfoxide) at days 0, 7, 14 and 21. Each point represents the average  $\pm$  SEM of six mice for each experimental group. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , significant differences compared with the negative control. Data were analyzed by two-way ANOVA following a multiple comparisons test (Tukey test). All the treated groups were statistically different from negative groups.

The differences in the growth of the tumors between the negative control group and those treated with the drugs were statistically significant. These data support the proposal of MDA and 3 $\alpha$ -OH-MDA as antitumor compounds in vivo.

The body weights of mice from all the groups were monitored. The results showed that the average body weight of the animals treated with MDA or 3 $\alpha$ -OH MDA and the untreated mice did not change significantly. However, the mice that received cisplatin lost up to 29% of body weight (Table 2).



**Table 2.** Effect of MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA on body weight of mice. The data are shown as the means  $\pm$  SEM (standard error of mean) with  $n = 6$  animals for each experimental group. \*\*  $p < 0.01$  represent the statistical difference in body weight change between the beginning and end of treatment. Data were analyzed by one-way ANOVA-repeated measures.

Treatment	Weight (g) Initial	Weight (g) Final
Cisplatin 4 mg/kg	19.61 $\pm$ 0.61	13.80 $\pm$ 0.82 **
Cisplatin 2 mg/kg	25.13 $\pm$ 0.68	21.73 $\pm$ 0.93
MDA 60 mg/kg	22.06 $\pm$ 0.98	20.96 $\pm$ 0.67
MDA 125 mg/kg	23.33 $\pm$ 1.01	22.25 $\pm$ 1.18
MDA 250 mg/kg	24.23 $\pm$ 0.88	24.31 $\pm$ 1.09
3 $\alpha$ -OH MDA 60 mg/kg	23.90 $\pm$ 1.16	21.96 $\pm$ 1.05
3 $\alpha$ -OH MDA 125 mg/kg	24.76 $\pm$ 1.76	22.46 $\pm$ 1.82
Control without treatment	22.02 $\pm$ 1.45	19.72 $\pm$ 1.48

Evaluation of the preclinical data for systemic toxicity (Table 3) indicated that both MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA at the administered doses did not produce any significant change in the levels of serum hepatic enzymes and renal parameters such as blood urea nitrogen and creatinine. However, an increase in the liver enzyme, aspartate transaminase (AST) and some renal parameters like creatinine was observed in the cisplatin-treated group. Furthermore, hematological parameters including leukocyte, red blood cell, and lymphocyte counts did not change in the groups treated with the triterpenes. These data suggest that MDA and 3 $\alpha$ -OH-MDA were less toxic to the animals than cisplatin.

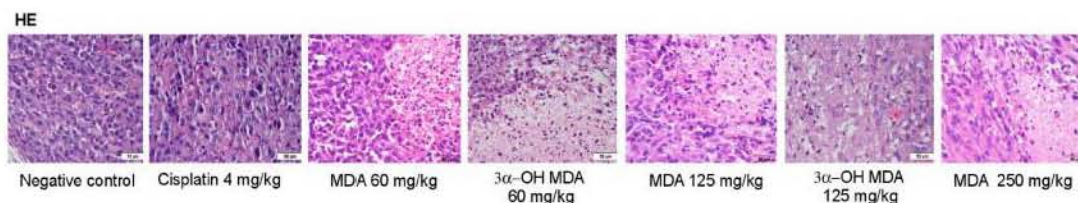
**Table 3.** Evaluation of preclinical systemic toxicities of MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA in the blood after treatment. The values of biochemical parameters are reported as the means  $\pm$  SEM.

	Healthy	Negative Control	Cisplatin 2 mg/kg	MDA 60 mg/kg	3 $\alpha$ -OH MDA 60 mg/kg
Leucocytes ( $\times 10^9$ /L)	4.46 $\pm$ 0.13	3.73 $\pm$ 1.73	1.93 $\pm$ 0.12 *	4.56 $\pm$ 0.92	3.80 $\pm$ 0.35
Lymphocytes ( $\times 10^9$ /L)	2.83 $\pm$ 0.76	2.2 $\pm$ 1.17	0.75 $\pm$ 0.27 *	2.06 $\pm$ 1.28	1.46 $\pm$ 0.33
Erythrocytes ( $\times 10^{12}$ /L)	7.66 $\pm$ 0.43	4.13 $\pm$ 1.27	7.16 $\pm$ 0.37	7.16 $\pm$ 1.0	8.53 $\pm$ 0.68
Hemoglobin (g/L)	149.0 $\pm$ 2.0	134 $\pm$ 6.08	120.66 $\pm$ 9.93	135.33 $\pm$ 13.24	153.66 $\pm$ 5.60
Glucose (mmol/L)	9.37 $\pm$ 0.64	11.25 $\pm$ 0.66	7.80 $\pm$ 0.86	6.94 $\pm$ 1.97	8.39 $\pm$ 1.92
Urea (BUN) (mmol/L)	7.93 $\pm$ 0.68	7.86 $\pm$ 0.78	9.03 $\pm$ 0.94	8.46 $\pm$ 0.03	8.56 $\pm$ 1.04
Creatinine (mmol/L)	37.33 $\pm$ 8.95	29.33 $\pm$ 1.33	84.0 $\pm$ 3.21 ****	24.0 $\pm$ 6.02	26.66 $\pm$ 0.88
Alanine transaminase ALT (U/L)	52.66 $\pm$ 5.81	53 $\pm$ 5.50	56.66 $\pm$ 6.69	53.33 $\pm$ 17.48	51.33 $\pm$ 7.42
Aspartate transaminase AST (U/L)	155.33 $\pm$ 2.40	143.66 $\pm$ 9.35	285.66 $\pm$ 13.37 ****	145.33 $\pm$ 18.66	164.66 $\pm$ 6.76

Values for mice show statistical difference in comparison to the negative control, healthy, MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA groups (\*  $p < 0.05$ ), (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

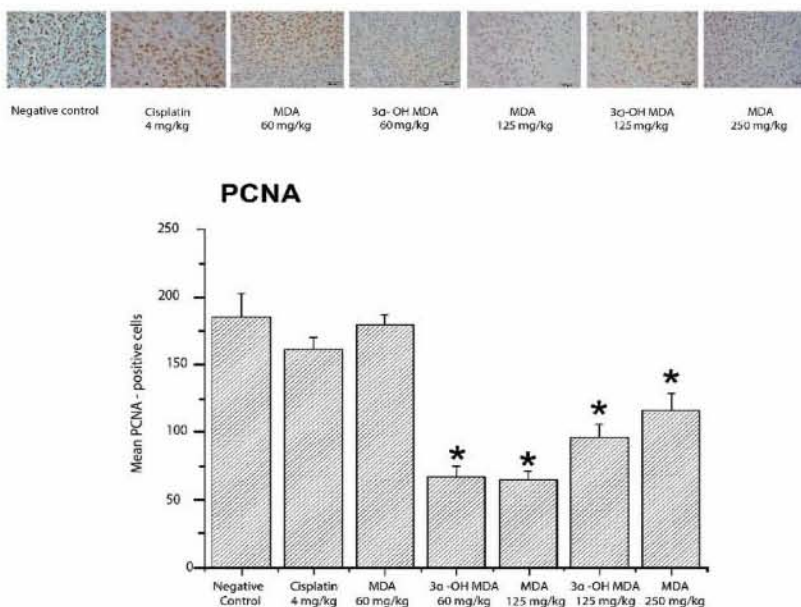
#### 2.4. Histological and Immunohistochemical Analysis of Tumor Tissues

To evaluate whether the administration of MDA or 3 $\alpha$ -OH MDA in the tumor tissues induced changes in cellular morphology, hematoxylin and eosin staining was performed. Sections of PC-3 xenografts from mice treated with MDA or 3 $\alpha$ -OH MDA showed that the hematoxylin staining in the cells was markedly diminished in comparison with the negative control (Figure 3). The apoptotic regions were identified by their amorphous shapes and condensed nuclei. Characteristic features of apoptosis were also observed with the TUNEL assay.

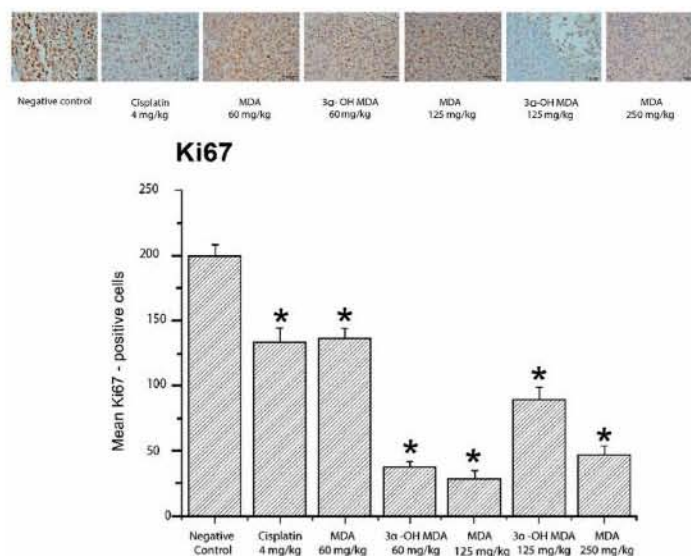


**Figure 3.** Representative photomicrographs of hematoxylin-eosin staining of tumor tissues.

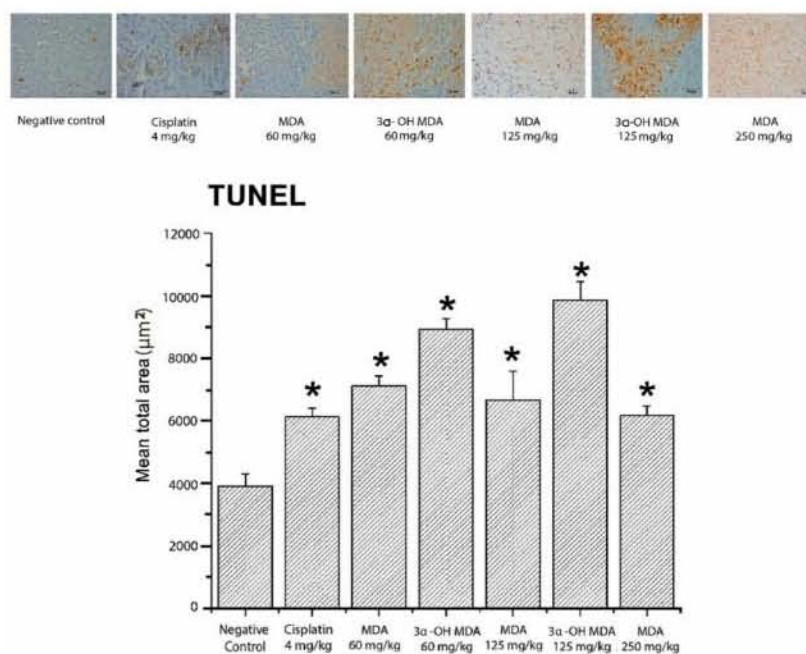
The inhibition of cell proliferation induced by MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA was evaluated by the expression of two markers of cell proliferation, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki67. MDA at doses of 125 and 250 mg/kg decreased the average number of cells positive for PCNA and downregulated the expression of Ki67 at the three tested doses. Significant differences were observed in both Ki67-positive cells ( $p < 0.05$ ) and PCNA-positive cells. Furthermore, the integrative optical density (IOD) values for Ki67 were  $14.18 \pm 1.58$ ,  $7.03 \pm 1.72$  and  $6.18 \pm 0.96$  pixels/ $\mu\text{m}^2$  (MDA at 60, 125 and 250 mg/kg, respectively) and  $3.69 \pm 1.23$  and  $3.08 \pm 0.52$  (3 $\alpha$ -OH MDA at 60 and 125 mg/kg, respectively), which were significantly lower than that for the control group (IOD =  $23.37 \pm 1.58$  pixels/ $\mu\text{m}^2$ ). For PCNA, the IOD values were  $11.91 \pm 0.33$ ,  $2.90 \pm 0.09$  and  $9.88 \pm 0.52$  (MDA at 60, 125 and 250 mg/kg, respectively) and  $5.21 \pm 0.43$  and  $7.33 \pm 0.29$  (3 $\alpha$ -OH MDA at 60 and 125 mg/kg, respectively) compared to the IOD of  $15.98 \pm 0.67$  pixels/ $\mu\text{m}^2$  for the control group on day 21 after treatment. These results indicated that the tumor tissues expressed both PCNA and Ki67 and the expression of these proteins diminished in the tumors treated with MDA or 3 $\alpha$ -OH MDA (Figures 4 and 5). Consistent with the microscopic observations in the photomicrographs, we found a quantitative decrease in the number of PCNA-positive and Ki67-positive cells.



**Figure 4.** IHC analysis for the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in tumor tissues from mice treated with MDA or 3 $\alpha$ -OH MDA for 21 days. The images in Figures 3–6 were acquired at 40 $\times$  using an acquisition software of images (Nis Elements-F). The values across the histogram represent the result of quantitative analysis of PCNA-positive cells. The data are shown as the means  $\pm$  SEM of three xenografts analyzed for each group. \*  $p < 0.05$ , significant differences compared with the control.



**Figure 5.** MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA inhibit the expression of proliferation marker Ki67. Quantitative analysis of Ki67-positive cells was performed by using Image-Pro Plus 7.0 software (Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA). The data are shown as the means  $\pm$  SEM of three xenografts analyzed for each group. \*  $p < 0.05$ , significant differences compared with the control.



**Figure 6.** Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) analysis for the detection of apoptosis in the tumor samples. The values across the histogram represent the result of quantitative analysis of marked areas using Image-Pro Plus 7.0 software (Media Cybernetics). The data are shown as the means  $\pm$  SEM of three xenografts analyzed for each group. \*  $p < 0.05$ , significant differences compared with the control.

DNA fragmentation by TUNEL assay was investigated as the evidence of apoptotic cell death. The sections of tumors from the MDA- or 3 $\alpha$ -OH MDA-treated mice showed numerous apoptotic cells (stained in brown, Figure 6) in comparison with the control group. In all treatments, apoptotic bodies were quantified as a sum of the brown areas. In the case of MDA, the values were  $7112.96 \pm 326.35$ ,  $6668.73 \pm 920.09$ , and  $6171.04 \pm 296.37 \mu\text{m}^2$  for the doses of 60, 125, and 250 mg/kg, respectively; for 3 $\alpha$ -OH MDA, the values were  $8919.03 \pm 362.49$  and  $9862.86 \pm 601.45 \mu\text{m}^2$  for 60 and 125 mg/kg, respectively; and for the negative control the value was  $3891.89 \pm 398.20 \mu\text{m}^2$ , which resulted in significant differences ( $p < 0.05$ ) (Figure 6).

### 3. Discussion

The number of in vivo preclinical studies on antitumor properties of triterpenes, secondary metabolites with hydrocarbon skeletons of 30 carbon atoms, have increased [16–18]. Although there are several reasons for this rise, two of the most prominent reasons include the ease of isolation of some of these compounds and the excellent in vivo antitumor properties of several anti-inflammatory triterpenes despite modest in vitro cytotoxic properties [19].

In our previous work, we reported the anti-inflammatory and cytotoxic properties of MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA, and the capacity of the 3 $\alpha$ -OH MDA to impair mitochondrial functions. However, their cytotoxic effect was depicted with an inhibitory concentration 50% (IC<sub>50</sub>) range between 40 and 70  $\mu\text{M}$ . To supplement the data from the literature, we evaluated the cytotoxic effects of these triterpenes in PC3 cells. As expected, MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA showed a moderate activity against this cancer cell line (see experimental). Although it is not a formal rule, several authors, journals and the National Cancer Institute (NCI) consider compounds isolated from medicinal plants as active compounds only when they have ED<sub>50</sub> (effective dose 50) values of  $\leq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$  [20].

Considering the above findings, MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA would be considered as inactive compounds. Nevertheless, in this work, we investigated the in vivo effect of the two triterpenes in a xenograft model using PC3 cancer cells. Our results showed that MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA significantly suppressed tumor growth (Figure 2). Tumor suppression was measurable from the fourteenth day of treatment in a 21-day experiment.

The toxicity of cisplatin was evident due to the loss of body weight in mice at dose of 4 mg/kg (Table 2). Moreover, the mice treated with cisplatin presented with leukopenia, lymphopenia and increased levels aspartate transaminase (AST) at the dose of 2 mg/kg (Table 3). Also in the cisplatin-treated groups, a significant increase in creatinine levels was observed, consistent with previous reports [21]. It is noteworthy that although MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA decreased tumor growth, both triterpenes did not induce statistical body weight loss (Table 2).

According to the LD<sub>50</sub> values, 3 $\alpha$ -OH MDA appeared to be more toxic than MDA. This difference in the pharmacological behavior of the two compounds was not expected, since the only structural difference between them is the presence of a carbonyl group at C-3 in MDA (Figure 1).

Regarding the mechanism of action of MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA, our findings indicate that the intraperitoneal administration of these triterpenes decreased the levels of the proliferation markers PCNA and Ki-67 in the tumor tissues. PCNA is a nuclear non-histone protein that is necessary for DNA synthesis. The critical involvement of PCNA in cellular proliferation and its tight association with transformation in cancer have resulted in its significant importance and application in the clinic [22]. Ki-67 is a classical marker of cellular proliferation. This antigen is preferentially expressed during the late G1, S, G2, and M phases of the cell cycle, whereas resting, non-cycling cells (G0 phase) lack Ki-67 expression [23].

MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA depleted the expression of PCNA (Figure 4) and Ki67 (Figure 5), which indicated their anti-proliferative effect. These results agree with previous studies where anti-proliferative effects of the triterpenes acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA) and nimbolide [8,24] were investigated.

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay was used to detect the induction of apoptotic cell death by MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA. The results showed that both triterpenes are pro-apoptotic (Figure 6). Our findings indicate the likelihood of the following occurrence: membrane permeability transition (MPT) causes a dissipation of the electrical transmembrane potential by matrix swelling and outer membrane disruption, leading to the release of caspase activators, such cytochrome *c* (cyt *c*) and apoptosis-inducing factor (AIF). We recently published that at low concentrations, 3 $\alpha$ -OH MDA acts as an intrinsic pro-apoptotic agent, promoting the MPT process and the consequent release of pro-apoptotic factors. In contrast, at a higher concentration, 3 $\alpha$ -OH MDA protects rat liver mitochondria against MPT by blocking Ca<sup>2+</sup> entry [13]. Although it is not always possible to relate the in vitro results with those obtained in vivo, in this study, 3 $\alpha$ -OH MDA demonstrated pro-apoptotic activity.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Drugs and Reagents

###### 4.1.1. Media

Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640, BIO-L500-500) and FBS (fetal bovine serum, BIO-S1650-500) and Trypsin (BIO-L0931-100) were obtained from Biowest company (Riverside, MO, USA). Dimethyl sulfoxide (D4540-100), Poly-L-lisyl (P8920-100) and Cisplatin (*cis*-Diammineplatinum (II) dichloride, 479306-1G) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). TUNEL staining kit was acquired from Promega Corporation (Madison, WI, USA). Proteinase K (IB05406) was obtained from IBI Scientific (Kapp Ct, IA, USA). The antibodies anti-PCNA (sc-9857) and Ki67 (sc-15402) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Crystal Violet reagent was acquired from Roche (Mannheim, Germany).

###### 4.1.2. Dissolutions

High-quality water employed to prepare solutions was obtained through a Milli-Q Reagent Water System (Billerica, MA, USA). Stock dissolutions of cisplatin were prepared in saline solution (1 mg/mL) for in vivo studies, and 3 mM for in vitro assays. MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA (25 mg/mL) were dissolved in extra virgin sesame oil plus 5% of DMSO. Stock solutions of MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA (22 mM) were prepared in DMSO for in vitro assays, and stored at 4 °C.

###### 4.1.3. Isolation of Masticadienonic (MDA) and 3 $\alpha$ -OH Masticadienoic (3 $\alpha$ -OH MDA) Acids

Masticadienonic and 3 $\alpha$ -OH masticadienoic acids were isolated from *Amphipterygium adstringens*, as previously reported [11].

##### 4.2. Acute Toxicity Test

The toxicity assay was performed in 6- to 8-week-old CD-1 female mice. Initially, 3 mice groups were treated with 10, 100 and 1000 mg/kg doses of each triterpene. The treatments were administered intraperitoneally with single injections. Food and water were given up to 4 h after the treatment. Mortality was observed during the first 4 h. Changes in body weight were monitored in the surviving mice for 14 days. At the end of the experiment, the mice were euthanized.

##### 4.3. Cell Culture

The human prostate cancer cell line PC-3 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The cells were routinely maintained as a monolayer in RPMI-1640 medium supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS), 250  $\mu$ g/mL streptomycin sulfate, 250 U/mL penicillin, 0.625  $\mu$ g/mL amphotericin B and 2 mmol L-glutamine and incubated at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere until 80% confluent. The cells were harvested with 0.025% Trypsin and

1 mmol ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and washed in phosphate buffered saline (PBS) by centrifugation. After centrifugation, the supernatant was eliminated and the cell pellet was suspended in RPMI-1640 without phenol red and fetal bovine serum.

#### 4.4. Determination of Cell Proliferation by Crystal Violet Staining

Cytotoxicity assays were performed by seeding cells in 48-well plates at a density of  $4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in RPMI-1640 phenol red supplemented with 10% FBS at the same culture conditions indicated in 2.3. One day later, MDA or 3 $\alpha$ -OH MDA were added at concentrations of 0, 12.5, 25, 50 and 100  $\mu$ M. Cell viability was evaluated 48 h after the treatment with crystal violet staining. The compounds were dissolved in DMSO to make a stock solution and diluted in RPMI-1640 phenol red supplemented with 10% FBS. Cisplatin was used as the drug reference. After the incubation with MDA or 3 $\alpha$ -OH MDA, the adherent cell cultures were fixed by adding 200  $\mu$ L of glutaraldehyde 1.1% (*w/v*) in RPMI-1640 phenol red supplemented with 2% of FBS and incubated at room temperature for 15 min. The supernatant was transferred, and the plates were washed with water and left to air dry. The fixed cells were stained with 200  $\mu$ L of crystal violet for 15 min, and the protein-bound dye was solubilized with 200  $\mu$ L of 10% acetic acid (*w/v*). The optical density was measured with a microplate reader (Elx808; BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) at 595 nm. A dose-response curve was plotted for each compound, and then IC<sub>50</sub> was estimated.

#### 4.5. Human Prostate Tumor Xenografts

Male nude mice (*nu/nu*) aged 6–8 weeks were obtained from the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Mexico City, Mexico. The animals were housed under pathogen-free conditions in accordance with Institutional Animal Care Guidelines. All experimental procedures involving animals were approved by the Committee of Animals Research (protocol number 1488) and carried out in accordance to the Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals of the INCMNSZ, Mexico City, Mexico. The mice were fed a regular chow diet and had free access to sterile-water.

Groups of six animals were implanted with  $3 \times 10^6$  PC-3 cells. The cells were subcutaneously inoculated in a 0.1 mL volume of medium (RPMI-1640 without phenol red and fetal bovine serum) into the right flank of the mice. Three weeks after the cell inoculation, the animals were pair-matched into treatment and control groups. The treatments were performed by single weekly intraperitoneal injections of the triterpenes and drug reference. The mice received either MDA (60, 125 or 250 mg/kg) or 3 $\alpha$ -OH MDA (60 or 125 mg/kg) dissolved in sesame oil plus 5% DMSO at 0, 7, 14 and 21 days. The positive control group received cisplatin at doses of 2 or 4 mg/kg and the negative control received the vehicle (sesame oil and 5% DMSO). The mice were weighed every week. Tumor size was measured by using a digital Vernier caliper once a week. Tumor volume was determined with the following formula:  $V = \pi/6 \times (\text{large diameter} \times [\text{small diameter}]^2)$  [25]. After each drug administration, the mice were weighed, and the tumor volume was calculated. After 21 days of treatment, the animals were weighed and anesthetized (sodium pentobarbital), and blood samples were collected by cardiac puncture. Serum was separated by centrifugation (1500 rpm) for further analysis. Determination of biochemical parameters was carried out by the Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

#### 4.6. Immunohistochemical Analysis of PCNA and Ki-67

Once the treatment was over, the mice were humanely sacrificed. The tumor tissues were dissected, fixed in 10% formaldehyde, paraffin-embedded and serially sectioned into 4  $\mu$ m-thick sections. The sections were placed on glass slides coated with 0.1% poly-L-lysine for immunohistochemical analyses (IHC). The tissue sections were first stained with hematoxylin and eosin to determine their histological characteristics. Then, the slides were dewaxed with xylene, gradually hydrated with gradient alcohol (100 to 70%), and washed with PBS. Subsequently, the tissue sections were subjected to

heat-induced epitope retrieval by treatment with sodium citrate buffer (pH 6.0). The slides were treated with 30% solution  $H_2O_2$  for 10 min at room temperature to block endogenous peroxidase. After rinsing with phosphate-buffered saline (PBS), the slides were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 10 min at room temperature; afterwards, they were incubated at 4 °C overnight with the primary antibodies against PCNA (1:200) and Ki-67 (1:100). After washing with PBS, each slide was incubated with the specific biotinylated secondary antibody for 60 min at 37 °C. Then, the slides were incubated with streptavidin-peroxidase complex for 30 min at 37 °C. The immunoreactive products were visualized by reaction with 3,3-diaminebenzidine (DAB) and hematoxylin counterstain. The negative controls were incubated with albumin solution instead of primary antibodies.

#### 4.7. TUNEL Assay

The apoptotic cells in the tissue samples were detected using a Promega kit (G7131) for *in situ* detection according to the manufacturer's instructions. The tissues samples were dewaxed and hydrated as described in the previous section. Then, the slides were incubated with proteinase K (1:500) for 15 min at room temperature. The samples were then incubated with the TUNEL reaction mixture, terminal nucleotidyltransferase (rTdT) and biotinylated-dUTP for 60 min at 37 °C. After being washed three times with PBS, the slides were incubated with streptavidin-peroxidase complex for 30 min at 37 °C. The apoptosis signals were visualized with diaminobenzidine. The sections were counterstained with hematoxylin, mounted with mounting medium and analyzed by light microscopy (Nikon Eclipse 80i, Nikon Co., Tokyo, Japan). The negative control was prepared with equilibrium buffer, nucleotide mix, and deionized water without rTdT.

#### 4.8. Analysis of Photomicrographs

Photomicrographs of the slides were captured using a Nikon Eclipse 80i microscope equipped with a Nikon DS-U2 camera and by using Nis Elements-F acquisition software (Nikon Co, Tokyo, Japan, version 3.0). Images were digitized at  $2560 \times 1920$  pixels. The images were acquired at  $40\times$  magnification and processed in TIF format.

The brown color corresponding to the immunostaining on the slides was quantified as the sum area or nuclei number and Integrative Optical Density (IOD) with Image-Pro Plus 7.0 software (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). First, a spatial calibration of 50  $\mu\text{m}$  was done for each image and the ranges of area and OD were defined in Image-Pro Plus 7.0. Second, the color corresponding to the immunohistochemical signal was segmented according to the Hue, Saturation, Intensity (HSI) model. For a better representation of the assessment of expression levels, a total of 10 random images were acquired for each slide and analyzed using Image-Pro Plus 7.0 software as described in the technical manual with some modifications [26].

#### 4.9. Statistical Analysis

Tumor volumes, body weights, number of positive cells (for Ki67 or PCNA) and values of biochemical parameters are reported as the means  $\pm$  SEM (standard error of mean). Statistical comparisons between drug treatment and the untreated group were done with the Kolmogorov–Smirnov test when the distribution of the data was determined. The data with Gaussian distribution were analyzed by two-way ANOVA following a multiple comparisons test (Tukey test). The data without Gaussian distribution were analyzed with a nonparametric test (ANOVA of Kruskal–Wallis) followed by a multiple comparisons test (Dunn's test). The significant differences were reported with *p*-values.

## 5. Conclusions

Our results showed that the decrease in the levels of the proliferation markers PCNA and Ki-67 as well as the increase in cell death by apoptosis are related to the tumor growth inhibition induced by MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA in a mouse xenograft model.

The present results demonstrate the activity of the compounds under study in one particular prostate cancer model. More detailed investigations with breast cancer cell lines will be performed. In addition, the possible use of MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA as adjuvants in antitumor immunization strategies will be investigated.

**Acknowledgments:** Ma. Beatriz Sánchez-Monroy is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 264325 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). The financial support from CONACYT Grant 152650 is acknowledged by the authors of this research. We thank M. en C. Antonio Nieto Camacho and M. en C. Ed. Hortensia Segura Silva (Instituto de Química, UNAM) for technical assistance.

**Author Contributions:** M.B.S.-M. performed all the experimental work and contributed to the writing of the manuscript. M.M.-V. both contributed to the discussion of the results and to the writing of the manuscript. N.J.J.-H. participated in the development of toxicity in CD-1 mice, the tumor xenograft mouse model and contributed to the writing of the manuscript. A.Z.-D. participated in experimental work. B.H.-T. participated in the evaluation of the anti-proliferative effect of MDA and 3 $\alpha$ -OH MDA by immunohistochemical analysis and the detection of apoptotic cells by TUNEL assay. All authors read and approved the final manuscript.

**Conflicts of Interest:** We declare that we do not have any conflict of interest related to this work.

## References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J. Clin.* **2015**, *65*, 5–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Zhou, H.; Zhang, Y.; Hambuerger, A.W. EBP1 Inhibits Translation of Androgen Receptor mRNA in Castration Resistant Prostate Cancer Cells. *Anticancer Res.* **2011**, *31*, 3129–3135.
3. Masters, G.A.; Krilov, L.; Bailey, H.H.; Brose, M.S.; Burstein, H.; Diller, L.R.; Dizon, D.S.; Fine, H.A.; Kalemkerian, G.P.; Moasser, M.; et al. Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 1–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Heidenreich, A.; Aus, G.; Bolla, M.; Joniau, S.; Matveev, V.B.; Schmid, H.P.; Zattoni, F. EAU Guidelines on Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **2008**, *53*, 68–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Patel, J.D.; Krilov, L.; Adams, S.; Aghajanian, C.; Basch, E.; Brose, M.S.; Carrol, W.L.; de Lima, M.; Gilbert, M.R.; Kris, M.G.; et al. Clinical Cancer Advances 2013: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 1–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Shanmugam, M.K.; Rajendran, P.; Li, F.; Nema, T.; Vali, S.; Abbasi, T.; Kapoor, S.; Sharma, A.; Kumar, A.P.; Ho, P.C.; et al. Ursolic acid inhibits multiple cell survival pathways leading to suppression of growth of prostate cancer xenograft in nude mice. *Mol. Med.* **2011**, *89*, 713–727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Yadav, V.R.; Prasad, S.; Sung, B.; Gelovani, J.G.; Guha, S.; Krishnan, S.; Aggarwal, B.B. Boswellic acid inhibits growth and metastasis of human colorectal cancer in orthotopic mouse model by downregulating inflammatory, proliferative, invasive and angiogenic biomarkers. *Int. J. Can.* **2012**, *130*, 2176–2184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Estrada, A.C.; Syrovets, T.; Pitterle, K.; Lunov, O.; Büchele, B.; Schimana-Pfeifer, J.; Schmidt, T.; Morad, S.A.F.; Simmet, T. Tirucallic Acids Are Novel Pleckstrin Homology Domain-Dependent Akt Inhibitors Inducing Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Mol. Pharmacol.* **2010**, *77*, 378–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Ortega, O.A.G.; Hernández, M.; Martínez, V.M.; Salgado, T.T.; Arenas, S.F. Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *68*, 109–113. [[CrossRef](#)]
11. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Atlas de la Medicina Tradicional Mexicana (2009). Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Available online: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php> (accessed on 10 August 2017).
12. Oviedo, C.I.; Apan, R.T.; Soto, H.M.; Martínez, V.M. Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory. *Phytomedicine* **2004**, *11*, 436–445.
13. Oviedo, C.I.; Apan, R.T.; Martínez, V.M. Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes. *J. Pharm. Pharmacol.* **2005**, *57*, 1087–1091.

gradient alcohol (100 to 70%), and washed with PBS. Subsequently, the tissue sections were subjected to



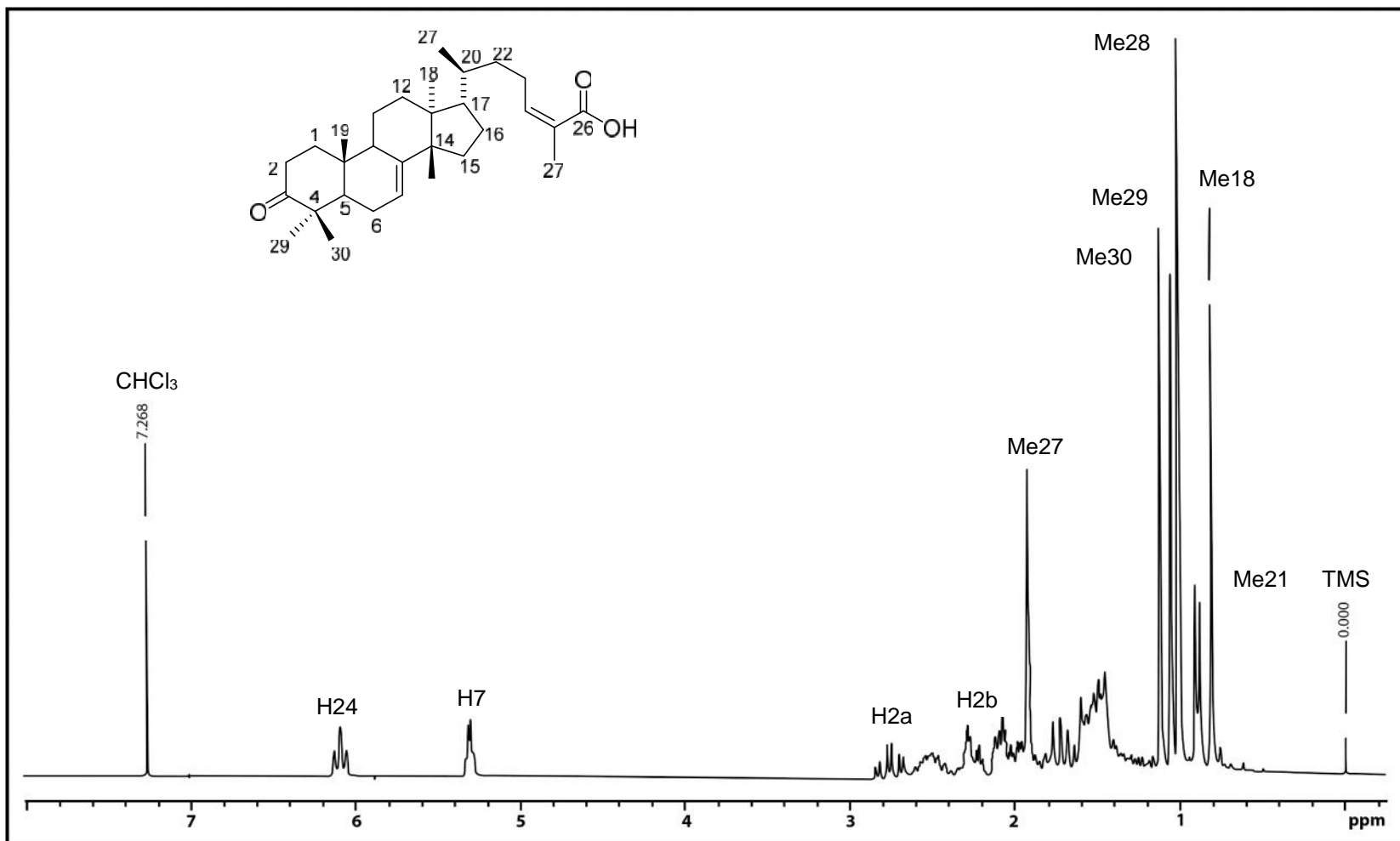
14. Dalla, V.A.; Braga, A.; García, A.A.N.; Martínez, V.M.; Toninello, A. 3 $\alpha$ -Hydroxymasticadienonic Acid As an Antiproliferative Agent That Impairs Mitochondrial Functions. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 557–562. [CrossRef] [PubMed]
15. Lorke, D.A. New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. *Arch. Toxicol.* **1983**, *54*, 275–287. [CrossRef] [PubMed]
16. Gao, N.; Cheng, S.; Budhraj, A.; Gao, Z.; Chen, J.; Liu, E.H.; Huang, C.; Che, D.; Yang, Z.; Liu, O.; et al. Ursolic acid induces apoptosis in human leukaemia cells and exhibits anti-leukaemic activity in nude mice through the PKB pathway. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *165*, 1813–1826. [CrossRef] [PubMed]
17. Chintharlapalli, S.; Papineni, S.; Lei, P.; Pathi, S.; Safe, S. Betulinic acid inhibits colon cancer cell and tumor growth and induces proteasome dependent and -independent downregulation of specificity proteins (Sp) transcription factors. *BMC Cancer* **2011**, *11*, 371. [CrossRef] [PubMed]
18. Cheng, S.; Swanson, K.; Eliaz, I.; McClintick, J.N.; Sandusky, G.E.; Sliva, D. Pachymic Acid Inhibits Growth and Induces Apoptosis of Pancreatic Cancer In Vitro and In Vivo by Targeting ER Stress. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0122270. [CrossRef] [PubMed]
19. Patlolla, J.M.R.; Rao, C.V. Triterpenoids for Cancer Prevention and Treatment: Current Status and Future Prospects. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2012**, *13*, 147–155. [CrossRef] [PubMed]
20. Alonso, C.A.J.; Villareal, M.L.; Salazar, O.L.A.; Gómez, S.M.; Domínguez, F.; García, C.A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *133*, 945–972. [CrossRef] [PubMed]
21. Guindon, J.; Deng, L.; Fan, B.; Wager, M.J.; Hohmann, A.G. Optimization of a cisplatin model of chemotherapy induced peripheral neuropathy in mice: Use of vitamin C and sodium bicarbonate pretreatments to reduce nephrotoxicity and improve animal health status. *Mol. Pain* **2014**, *10*, 1–14. [CrossRef] [PubMed]
22. Stoimenov, I.; Helleday, T. PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem. Soc. Trans.* **2009**, *37*, 605–613. [CrossRef] [PubMed]
23. Bologna, M.R.; Mosqueda, T.A.; Molina, F.N.; Mori, E.D.; Sánchez, A.G. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **2013**, *18*, e174–e179. [CrossRef]
24. Gupta, S.C.; Prasad, S.; Sethumadhavan, D.R.; Nair, M.S.; Mo, Y.Y.; Aggarwal, B.B. Nimbolide, a Limonoid Triterpene, Inhibits Growth of Human Colorectal Cancer Xenografts by Suppressing the Proinflammatory Microenvironment. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 4465–4476. [CrossRef] [PubMed]
25. Medina, L.A.; Herrera, P.B.I.; Morales, C.M.A.; García, L.P.; Pérez, C.E.; Chanona, V.J.; Brandan, M.E. Use of an orthovoltage X-ray treatment unit as a radiation research system in a small-animal cancer model. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2008**, *27*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
26. Stîngă, A.C.; Mărgăritescou, O.; Stîngă, S.A.; Pirici, D.; Ciurea, R.; Bunget, A.; Cruce, M. VEGFR1 and VEGFR2 immunohistochemical expression in oral squamous cell carcinoma: A morphometric study. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **2011**, *52*, 1–11.

**Sample Availability:** Samples of the compounds are available from the authors.

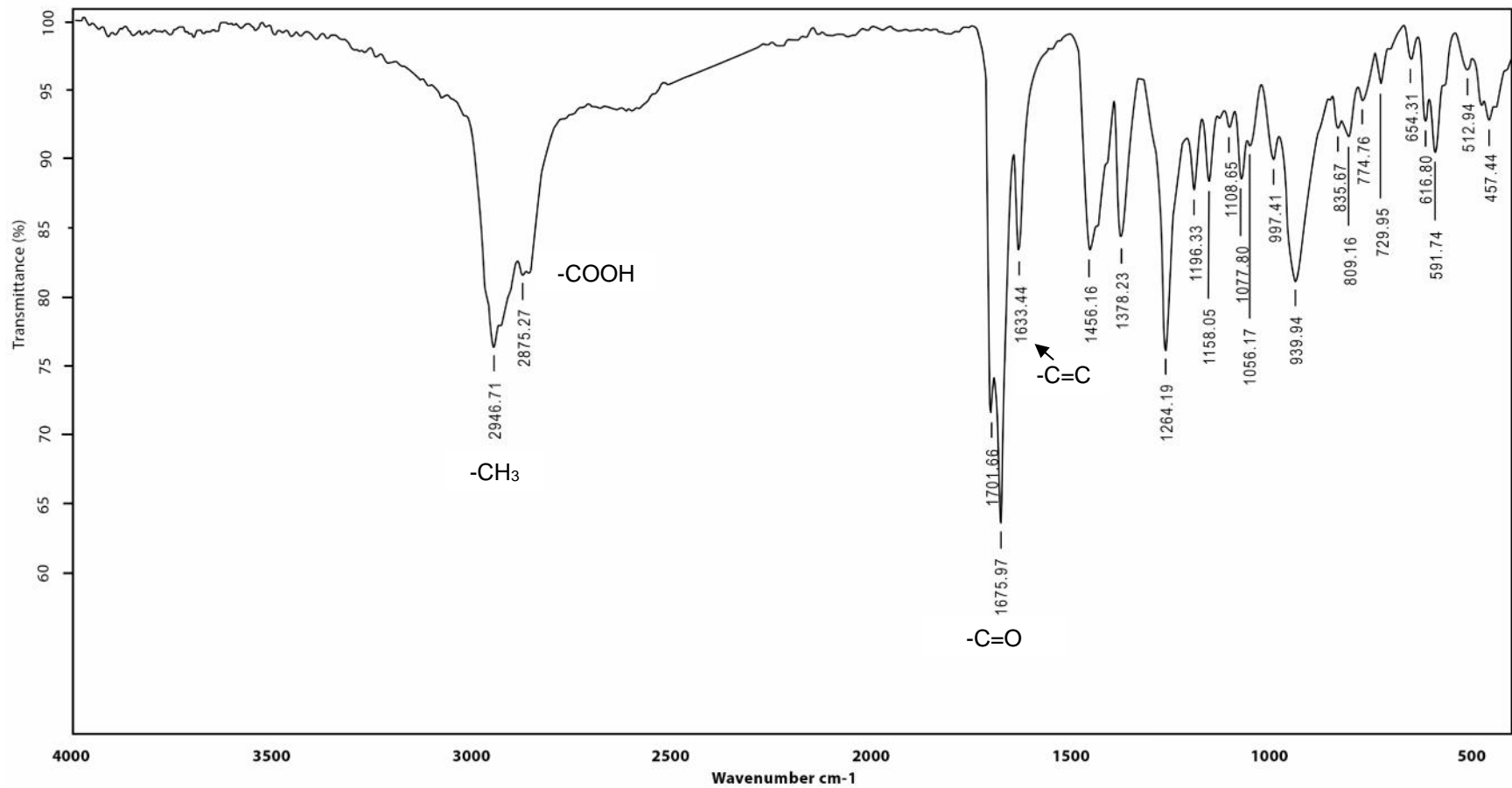


© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

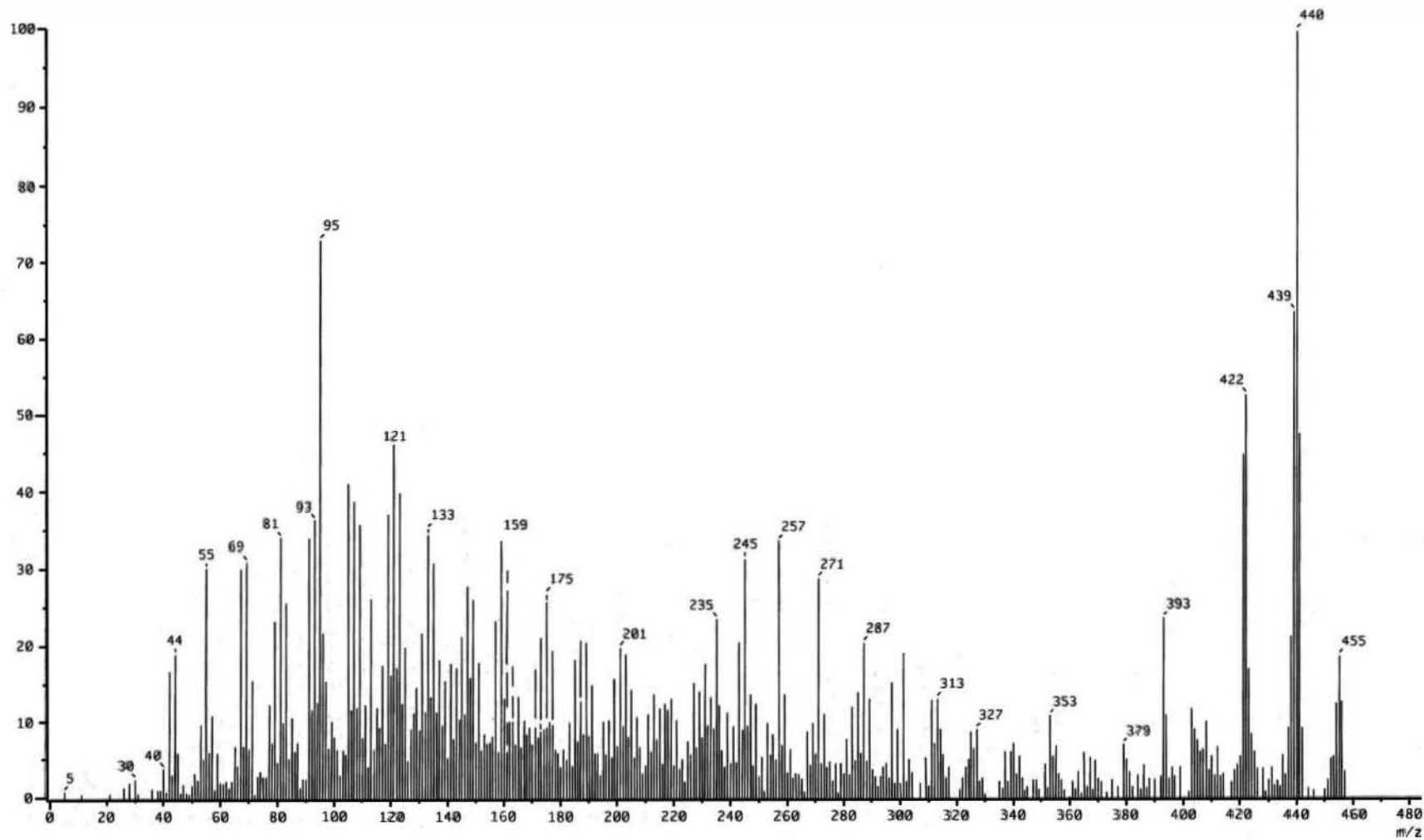
## **12. APÉNDICE ESPECTROSCOPIA**



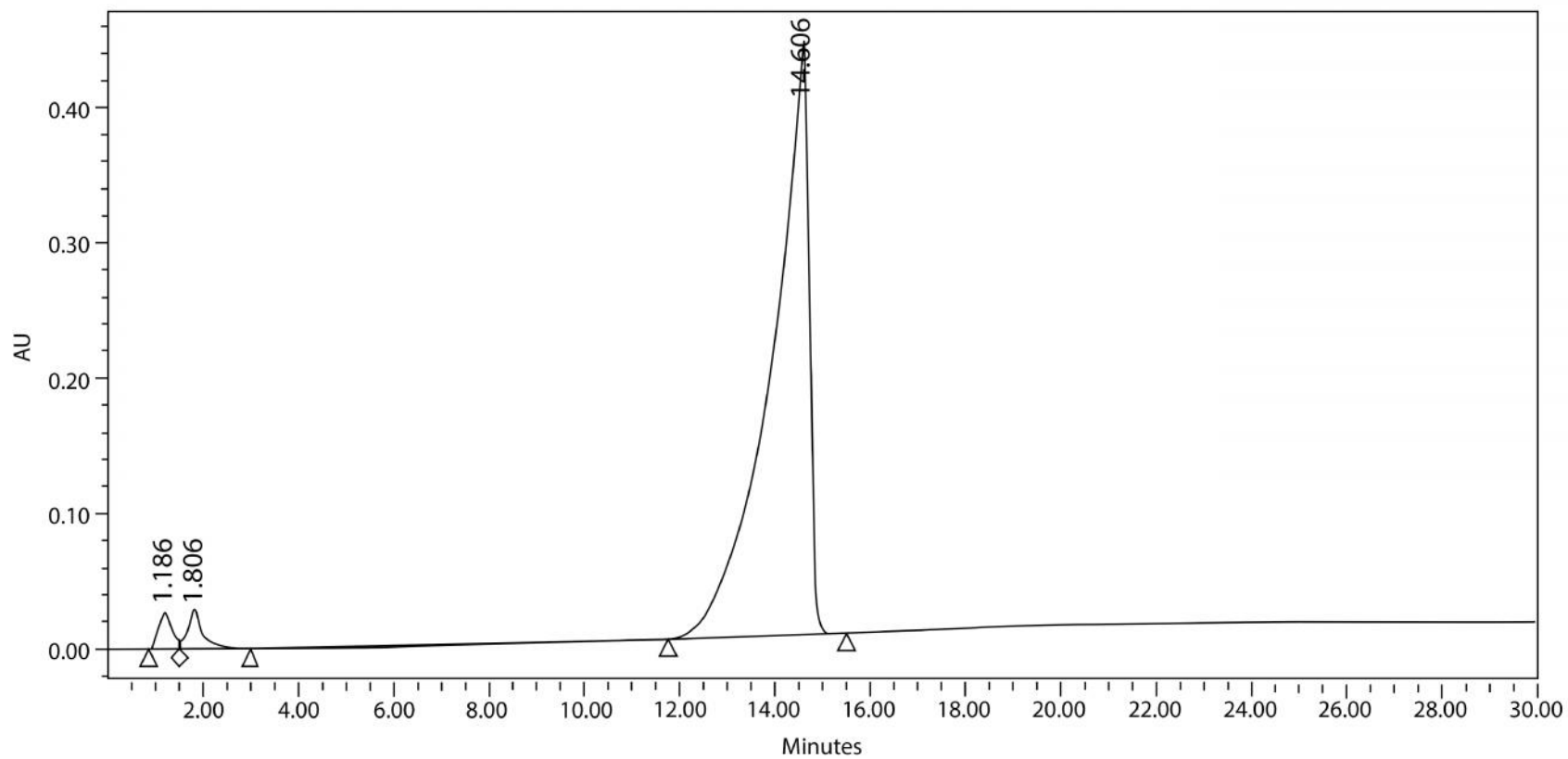
Apéndice 1. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) del ácido masticadienónico aislado de *A. adstringens*.



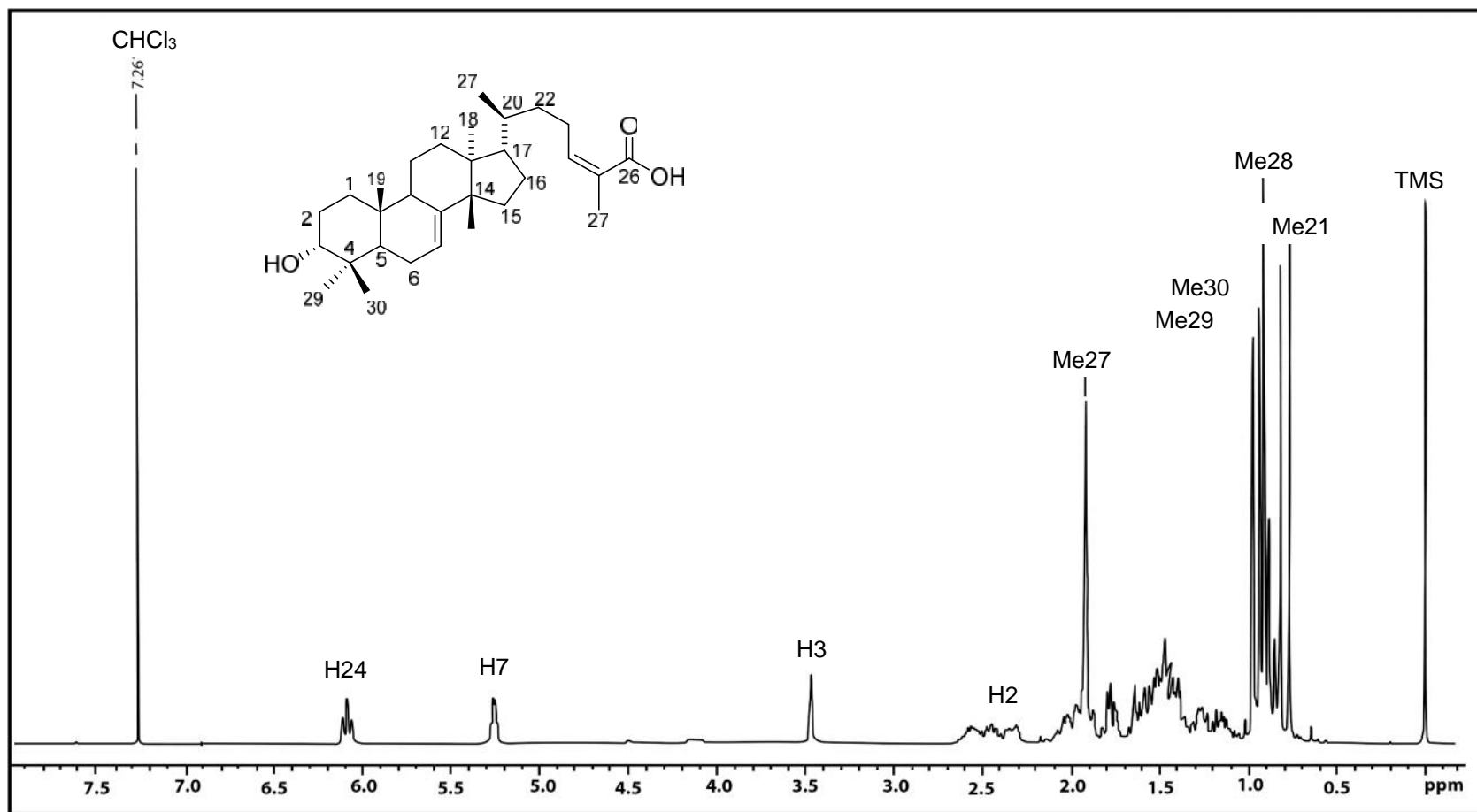
Apéndice 2. Señales características del ácido masticadienónico en el espectro de infrarrojo (pastilla de KBr).



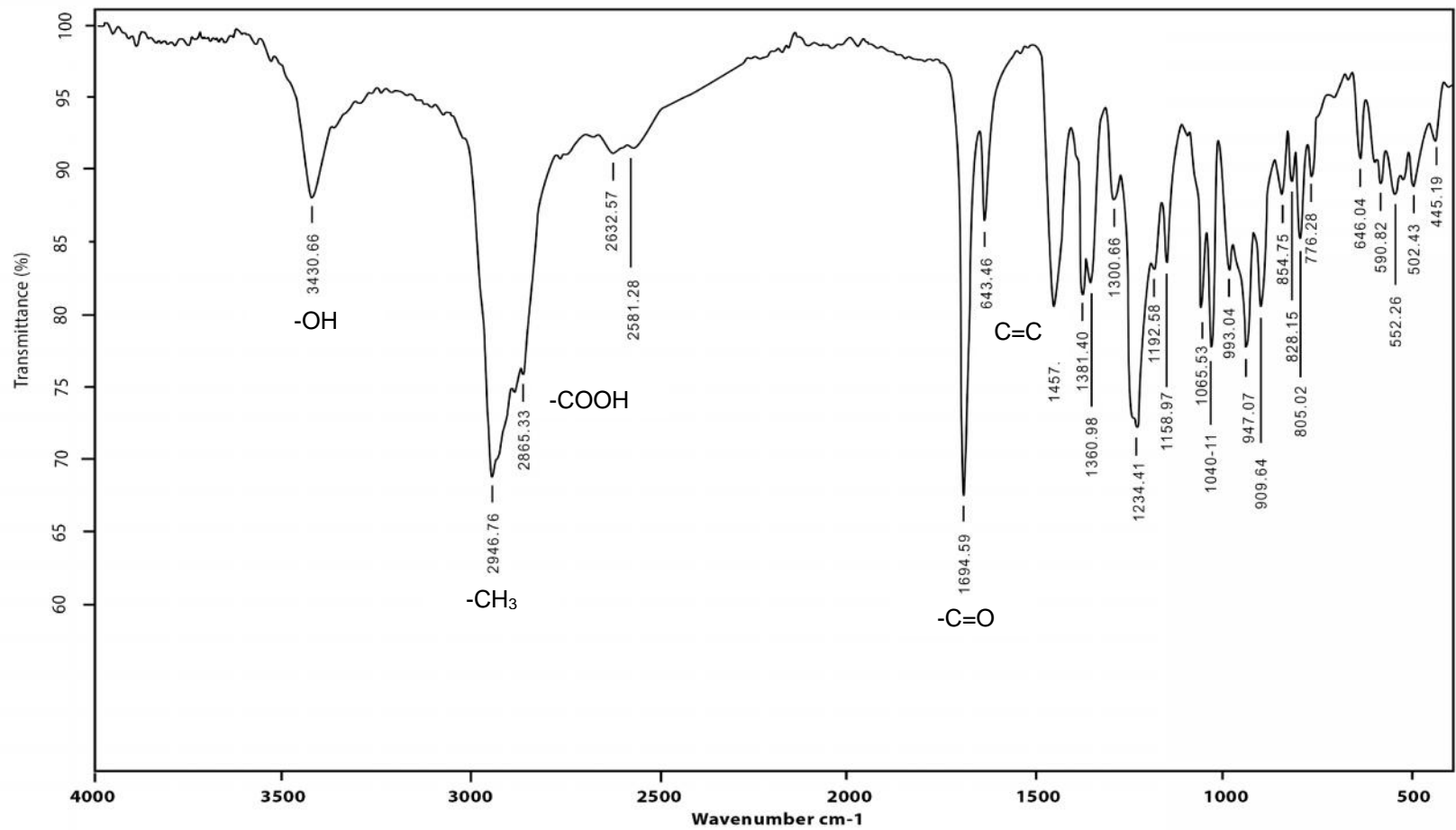
Apéndice 3. La espectrometría de masas del ácido masticadienónico presentó un ion molecular de 455 m/z para una fórmula mínima  $C_{30}H_{46}O_3$ .



Apéndice 4. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) del ácido masticadienónico. Los resultados muestran una pureza de 98.15% y un tiempo de retención de 14.60 minutos (en el eje Y).

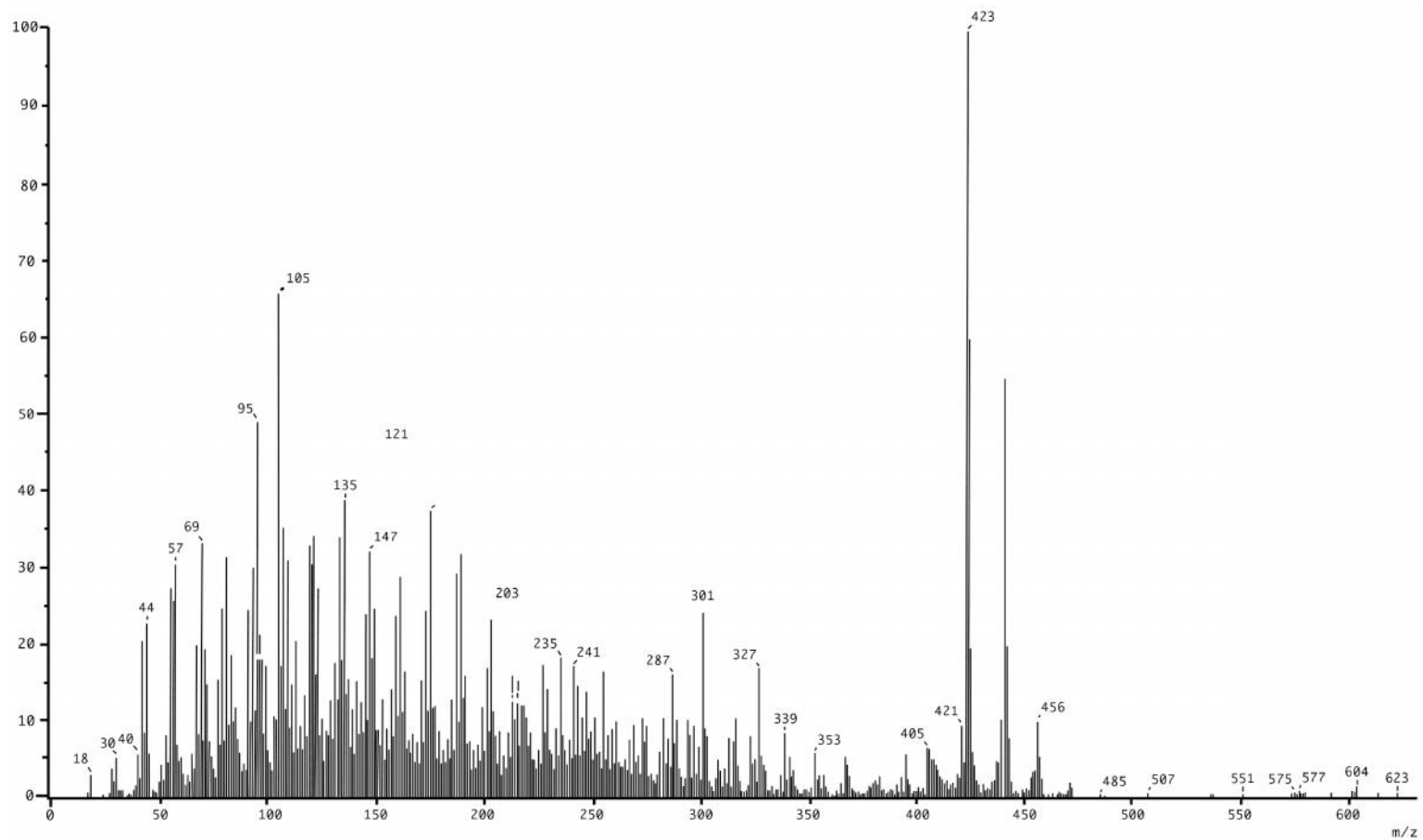


Apéndice 5. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) del ácido M-OH masticadienónico aislado de *A. adstringens*.

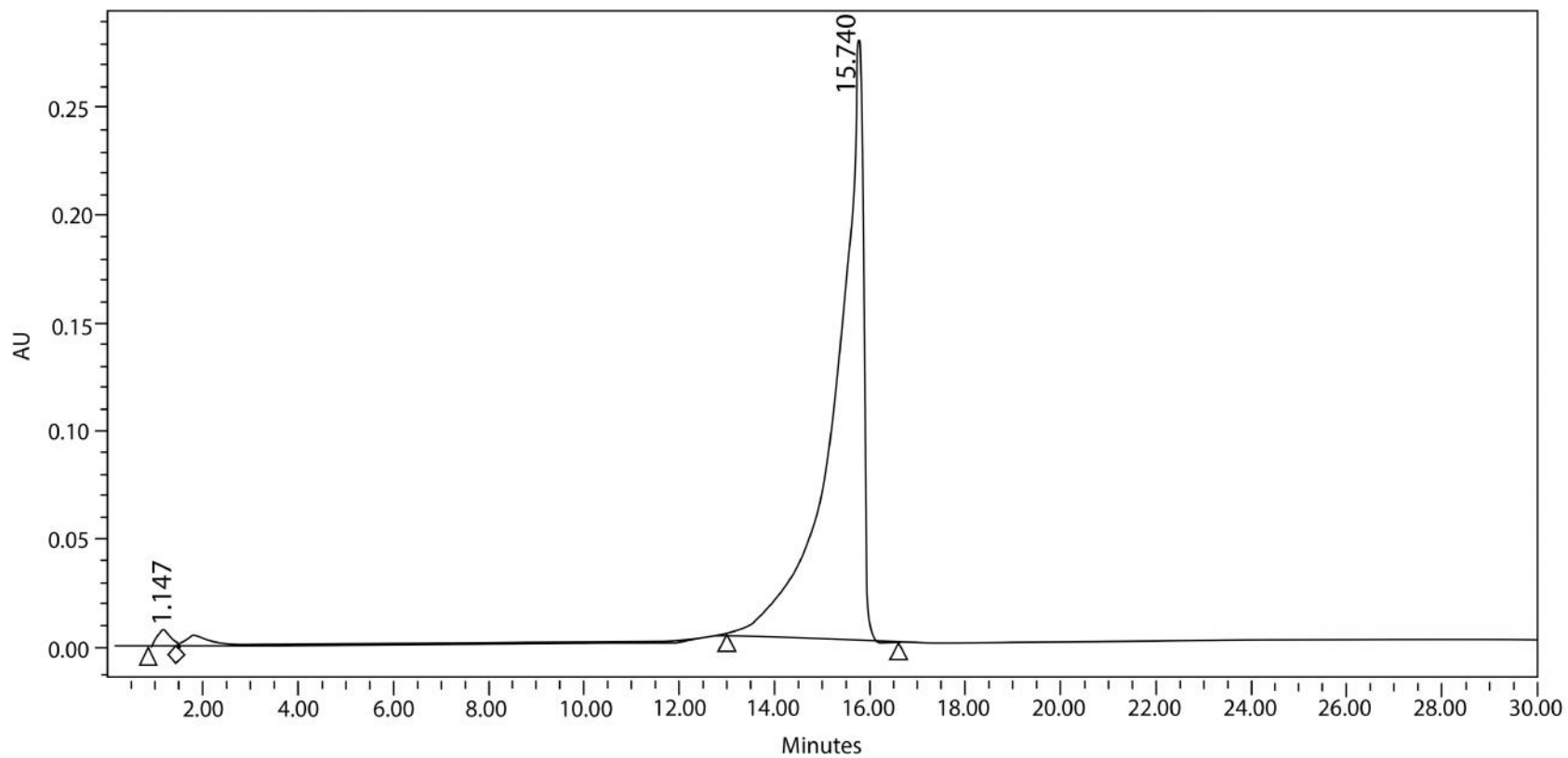


Apéndice 6. Señales características del ácido 3 -OH masticadienónico en el espectro de infrarrojo (pastilla de KBr).





Apéndice 7. La espectrometría de masas del ácido masticadienónico presentó un ion molecular de 456 m/z para una fórmula mínima  $C_{30}H_{48}O_3$ .



Apéndice 8. CLAR del ácido 3 -OH masticadienoico. Los resultados muestran una pureza de 98.88% y un tiempo de retención de 15.74 minutos (en el eje Y).