



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

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL *IN VITRO* E *IN VIVO* DEL
PENIOCEROL AISLADO DE *MYRTILLOCACTUS GEOMETRIZANS***

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA
M. EN C. BEATRIZ DEL CARMEN COUDER GARCÍA**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
INSTITUTO DE QUÍMICA
COMITÉ TUTOR
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
INSTITUTO DE CANCEROLOGÍA**

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A Dios

Por la vida tan bonita que me concedió.

A Lucía García Núñez y a Ricardo Couder García, mis padres

Por darme la vida, orientarme, educarme, tenerme paciencia, por su amor incondicional, alentarme en los momentos difíciles, por ser tan buenos, mis mejores amigos, mis grandes amores. A la memoria de mi Padre, que en paz descanse.

A Beatriz Núñez Benítez, mi abuelita

Por su gran amor, enorme cariño, por ser bondadosa, por los sabios y certeros consejos. por ser mi otra mejor amiga, una tierna abuelita, mi otro gran amor.

A mis hermanos

Yunis, Dennis y Moisés. Por su gran apoyo, cariño, por siempre estar pendientes de mí y ser parte fundamental de mi vida.

A mi demás familia

A mis sobrinos, mis pequeños amores bonitos. A mis cuñadas, quienes son las hermanas que me dio la vida. A mis tías; Sara, Beatriz, Martha, Ranulfa, Manuela, Gladis. A mis tíos, mis primas, primos y amigos. A la memoria de los que se adelantaron en el camino.

A los estados de Oaxaca y Chiapas

Por el enorme cariño que les tengo. El primero, en el que nací y poder pertenecer a la cultura zapoteca del Istmo. El segundo en el cual crecí y tuve la oportunidad de realizar mis estudios, hasta la maestría.

A los ratones que dieron su vida en esta investigación

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado a través del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas con sede en el Instituto de Química.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Por la beca (número de registro 442677) otorgada para la realización de mis estudios de doctorado.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez

Por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación en el laboratorio 1-4 del Instituto de Química y todo el apoyo a lo largo del desarrollo de la investigación, tanto profesional como personal.

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación en el departamento Unidad de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y realizar una gran parte del proyecto, así como todas sus críticas constructivas en cada examen semestral, el gran apoyo brindado en la preparación del examen de candidatura y personalmente por todos los consejos.

Al Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo

Por brindarme su apoyo como comité tutorial.

A la Dra. Nadia J. Jacobo Herrera

Por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación en el departamento Unidad de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, brindarme incondicionalmente su apoyo, sus valiosas aportaciones, siempre pendiente en cada examen semestral, en la redacción del artículo y personalmente por ser tan bondadosa.

A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta

Por darme la oportunidad realizar una estancia, de formar parte de su grupo de investigación en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, poder concluir el proyecto, sus valiosas aportaciones en la redacción del artículo, así como personalmente por ser tan bondadosa.

A mis grandes amigos y compañeros

Zaira Tavarez Santamaria, mi gran amiga, con quien compartí el mayor tiempo, gracias por todo el apoyo y la paciencia. **José Anselmo López Méndez**, gracias, amigo por todo el apoyo. **Ma. Beatriz Sánchez Monroy**, por enseñarnos las técnicas *in vivo*. **Víctor Alberto Castro Torres**, **Lidia Diaz Sánchez**, **Sonia Hernández** compañeros del laboratorio 1-4 del Instituto de Química de la UNAM. **Alberto Cabrera**, **Irma Mitre**, **Beatriz Mora**, compañeros y amigos que me apoyaron en el departamento Unidad de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. **Liliana Guadalupe Cortés Ballinas**, **José Andrés López Mejía**, **Mariana López Filloy**, **Flor Cortez**, muy buenos amigos que me brindaron su apoyo en el laboratorio de investigación en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

A los técnicos

M. en C. Antonio Nieto Camacho del Instituto de Química de la UNAM, **M. en C. José Luis Ventura Gallegos** del departamento Unidad de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y a la **M. en C. Cecilia Aguilar Zacarias**, del laboratorio de investigación en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Agradezco inmensamente a todas las personas anteriormente mencionadas y a los institutos que hicieron posible la realización de este proyecto de investigación, de lo contrario no hubiera podido concluir satisfactoriamente mis estudios de doctorado.

Muchas gracias.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABLAS.....	11
RESUMEN	12
ABSTRACT.....	13
I. INTRODUCCIÓN.....	14
II. MARCO TEORÍCO	15
2.1 El Cáncer	15
2.2 Epidemiología	16
2.3 Factores de riesgo	17
2.4 Inflamación en el cáncer	18
2.4.1 Inductores inflamatorios relacionados con el cáncer	18
2.4.2 Vías que relacionan la inflamación con el cáncer	19
2.4.3 Inflamación en la progresión de los tumores	19
2.5 Resistencia a la muerte celular	21
2.5.1 Apoptosis	22
2.5.2 Vías apoptóticas relacionadas con el cáncer	22
2.6 Terapia contra el cáncer.....	24
2.6.1 Cirugía	25
2.6.2 Radioterapia	26
2.6.3 Quimioterapia.....	26
2.7 Productos naturales de origen vegetal.....	28
2.7.1 Fitoesteroles	30

2.7.2 Triterpenos.....	34
2.9 Peniocerol aislado de <i>Myrtillocactus geometrizans</i>	36
2.9.1 <i>Myrtillocactus geometrizans</i> (Mart. ex Pfeiff.) Console	37
2.9.2 Antecedentes de la actividad biológica del peniocerol.....	38
2.10 Metodologías en el descubrimiento de nuevos fármacos contra el cáncer	42
2.10.1 Evaluación antiproliferativa	42
2.10.2 Estudio de xenotrasplante <i>in vivo</i> en ratones de la cepa <i>nu/nu</i>	43
2.10.3 Marcadores moleculares.....	44
III. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	46
IV. HIPÓTESIS.....	47
V. OBJETIVOS	48
5.1 General:	48
5.2 Específicos:.....	48
VI. METODOLOGÍA.....	49
6.1. Aislamiento de peniocerol	49
6.2. Líneas y cultivos celulares	49
6.3 Animales	50
6.4. Soluciones.....	51
6.5. Evaluación de la actividad citotóxica.....	51
6.6. Evaluación de la inducción de apoptosis	52
6.7 Evaluación de la actividad citotóxica en presencia de antioxidantes	52
6.8 Evaluación de la toxicidad en ratones <i>nu/nu</i>	53
6.9 Evaluación de la actividad antitumoral en ratones xenotrasplantados	54
6.10. Análisis de los tumores tratados con peniocerol	55

6.10. Análisis de los tumores tratados con peniocerol	56
6.10.1 Tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E)	56
6.10.2 Evaluación de núcleos apoptóticos por tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)	56
6.10.3 Determinación del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA)	57
6.10.4 Determinación de la poli [ADP-ribosa] polimerasa 1 (PARP-1).....	58
6.11 Análisis estadístico.....	59
VII. RESULTADOS	60
7.1 Obtención del peniocerol.....	60
7.2 Evaluación de la actividad citotóxica del peniocerol.....	60
7.3 Evaluación de la inducción de apoptosis por el peniocerol	61
7.4 Evaluación de la actividad citotóxica del peniocerol en presencia de un antioxidante.....	64
7.5 Evaluación de la toxicidad del peniocerol en ratones de la cepa <i>nu/nu</i>	64
7.6 Evaluación de la actividad antitumoral del peniocerol.....	67
7.6.1 Tratamiento una vez a la semana por tres semanas	67
7.6.2 Tratamiento tres veces a la semana por tres semanas	68
7.7 Análisis inmunohistológico de los tumores.....	71
VIII. DISCUSIÓN	74
IX. CONCLUSIÓN.....	78
X. PERSPECTIVAS	79
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
XII. ANEXOS.....	94

11.1 Otros experimentos.....	94
11.1.1 Objetivos específicos:	94
11.1.2 Modificación estructural del peniocerol a peniocerol diacetilado.....	94
11.1.3 Obtención del peniocerol diacetilado	95
11.1.4 Evaluación de la actividad citotóxica del peniocerol diacetilado	96
11.1.5 Resultados de la actividad citotóxica del peniocerol diacetilado	97
11.1.6 Evaluación de la inducción de senescencia.....	97
11.1.7 Resultados de inducción de senescencia	98
11.1.8 Determinación de la DL ₅₀ en ratones de la cepa CD1	99
11.1.9 Resultado de la determinación de la DL ₅₀ en ratones de la cepa CD1	100
11.2 Artículo publicado.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Características distintivas de las células tumorales.....	15
Figura 2 Porcentajes de nuevos casos de cáncer y muertes por cáncer en el mundo en 2018.	16
Figura 3 Representación ilustrativa de la inflamación relacionada con el cáncer.....	21
Figura 4 Representación ilustrativa de las vías que desencadenan la apoptosis: vía extrínseca (A), vía intrínseca (B) o vía granzima B/perforina (C).	24
Figura 5 Blancos moleculares de las características distintivas de la célula cancerosas.	25
Figura 6 Línea del tiempo de los diversos agentes quimioterapéuticos descubiertos a lo largo de la historia.....	28
Figura 7 Representación esquemática de las vías de biosíntesis de metabolitos secundarios.	29
Figura 8 Representación esquemática de la biosíntesis de fitoesteroles.....	30
Figura 9 Nomenclatura de la estructura química de los fitoesteroles.....	31
Figura 10 Los fitoesteroles más comunes presentes en la dieta.	31
Figura 11 Esquema representativo de los mecanismos de triterpenos para la regulación a la baja de Sp.....	36
Figura 12 Estructura química del peniocerol (3 β , 6 α -diol-8-eno-colesterol).....	36
Figura 13 Imagen de <i>Myrtillocactus geometrizans</i> , comúnmente conocido como “Garambullo” en el municipio de San Juan del río, Querétaro.....	38
Figura 14 Inducción de apoptosis por el peniocerol en las líneas celulares de A) HCT-15 y B) MCF-7.	41
Figura 15 Inducción de apoptosis por peniocerol mediada por la escisión de PARP en las líneas celulares HCT-15 y MCF-7.	41
Figura 16. Esquema representativo del aislamiento del peniocerol.....	50
Figura 17 Esquemas de tratamientos para la determinación de la toxicidad en ratones de la cepa <i>nu/nu</i>	54
Figura 18 Esquemas de tratamientos para la evaluación antitumoral en ratones de la cepa <i>nu/nu</i>	55
Figura 19 Actividad citotóxica del peniocerol en las líneas celulares de cáncer de colon HCT-15, HCT-116, SW-620, de mama MDA-MB-231 y no cancerosa MCF-10A.	61
Figura 20 Inducción de apoptosis por peniocerol en la línea celular HCT-116 a 0, 48 y 72 horas.	62
Figura 21 Inducción de apoptosis por peniocerol en la línea celular MDA-MB-321 a 0, 48 y 72 horas. Los ensayos se realizaron mediante citometría de flujo con los marcadores Anexina V/Yoduro de propidio (AV/IP).	63

Figura 22 Actividad citotóxica mejorada del peniocerol en adición de un antioxidante (DTT o ANDG) en líneas celulares de cáncer.....	65
Figura 23 Toxicidad del peniocerol evaluada en ratones de la cepa <i>nu/nu</i>	67
Figura 24 Actividad antitumoral de peniocerol evaluada en ratones de la cepa <i>nu/nu</i> . Esquema de tratamiento: una vez por semana durante tres semanas.	69
Figura 25 Evaluación de la actividad antitumoral del peniocerol en ratones de la cepa <i>nu/nu</i> . Esquema de tratamiento: tres veces por semana durante tres semanas.	70
Figura 26 Efecto antiproliferativo y apoptótico del peniocerol determinado mediante fotomicrografías de tejidos obtenidas de tumores xentrasplantados con células HCT-116..	72
Figura 27 Efecto antiproliferativo y apoptótico del peniocerol determinado mediante la cuantificación de marcadores moleculares.	73
Figura 28 Esquema representativo de los efectos antiinflamatorio <i>in vivo</i> , antiproliferativo <i>in vitro</i> , inducción de apoptosis, arresto del ciclo celular del peniocerol relacionados con su actividad antitumoral <i>in vivo</i>	77
Figura 29 Esquema de la metodología para la obtención del peniocerol diacetilado.	95
Figura 30 Reacción de acetilación del peniocerol.....	95
Figura 31 Comparación para la determinación del peniocerol diacetilado mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (¹ H).....	96
Figura 32 Citotoxicidad nula del peniocerol diacetilado en diferentes líneas celulares de cáncer humano.	97
Figura 33 Inducción de senescencia nula del peniocerol..	99

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Factores del estilo de vida relacionados con el impacto de riesgo de cáncer.	17
Tabla 2 Inductores inflamatorios y su relación con el cáncer.	18
Tabla 3 Estudios epidemiológicos de fitoesteroles en la prevención del cáncer.	32
Tabla 4 Estudios experimentales <i>in vitro</i> de fitoesteroles en líneas celulares de cáncer humano.	32
Tabla 5 Estudios experimentales <i>in vivo</i> de fitoesteroles en diversos modelos murinos.	33
Tabla 6 Estudios clínicos de la ingesta de fitoesteroles en cáncer.	33
Tabla 7 Estudios del efecto antiinflamatorio de los fitoesteroles.	34
Tabla 8 Clasificación taxonómica de <i>Myrtillocactus geometrizans</i> (Mart. ex Pfeiff.) Console.	37
Tabla 9 Actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> del peniocerol en dos modelos.	39
Tabla 10 Citotoxicidad del peniocerol en ensayo de sulforrodamina B en varias líneas celulares.	40
Tabla 11 Citotoxicidad inducida por el peniocerol a las 24 y 48 horas en las líneas HCT-15 y MCF-7 en ensayo de cristal violeta.	40
Tabla 12 Fase de arresto celular inducido por peniocerol determinación realizada por citometría de flujo con el marcador yoduro de propidio (IP).	42
Tabla 13 Síntomas de toxicidad del peniocerol en ratones de la cepa <i>nu/nu</i> con una dosis. 65	
Tabla 14 Síntomas de toxicidad del peniocerol en ratones de la cepa CD1 a una dosis.	100

RESUMEN

Objetivo. Evaluar la actividad anticancerosa del peniocerol, un esteroil aislado de las raíces del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) una cactácea con tradición medicinal y que crece de manera abundante en la región central de México. La actividad anticancerosa de este esteroil se determinó mediante la actividad citotóxica del peniocerol contra líneas celulares de cáncer humano, así como su efecto antitumoral *in vivo* en un modelo de xenotrasplante utilizando ratones *nu/nu*.

Materiales y métodos. La actividad citotóxica se evaluó utilizando las líneas celulares de cáncer de colon (SW-620, HCT-15 y HCT-116), cáncer de mama (MDA-MB-231) y una no tumorigénica de mama (MCF-10A) las cuales se trataron con peniocerol (10 a 80 μ M) durante 24, 48 o 72 horas. La actividad citotóxica fue determinada mediante la técnica de cristal violeta. La inducción de apoptosis celular se detectó mediante citometría de flujo con el kit Annexin-V FLUOS/PI en las líneas celulares HCT-116 y MDA-MB-231. También se evaluó la actividad citotóxica del peniocerol en las combinaciones por separado con el ácido nordihidroguayarático (NDGA) y con el ditiotreitól (DTT) compuestos con reconocida actividad antioxidante. La actividad antitumoral de peniocerol se evaluó en un modelo de xenotrasplante de HCT-116 en ratones *nu/nu*. Después del tratamiento, se analizó el efecto del peniocerol en secciones histológicas de tumores mediante inmunohistoquímica usando anticuerpos DAPI, anti-PCNA y PARP-1.

Resultados. El peniocerol inhibió el crecimiento celular e indujo apoptosis *in vitro* de una manera dependiente del tiempo y la dosis. Por otro lado, la combinación con los antioxidantes aumentó la actividad citotóxica del peniocerol. Las dosis 30 mg/kg y 15 mg/kg no ocasionaron toxicidad en los ratones. Adicionalmente, las administraciones de peniocerol; 30 mg/kg, 15 mg/kg una vez por semana o 15 mg/kg tres veces por semana durante tres semanas, tuvieron efecto antiproliferativo y provocaron muerte celular por apoptosis en los tumores xenotrasplantados de los ratones.

Conclusiones. Nuestros resultados demostraron que el peniocerol induce apoptosis en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

ABSTRACT

Objective. To evaluate the anticancer activity of peniocerol, a sterol isolated from the roots of garambullo (*Mytillocactus geometrizans*), a cactus with a medicinal tradition that grows abundantly in the central region of Mexico. The anticancer activity of this sterol was determined by the cytotoxic activity of peniocerol against human cancer cell lines, as well as its antitumor effect *in vivo* in a xenograft model using *nu/nu* mice.

Materials and methods. Cytotoxic activity was evaluated using the colon (SW-620, HCT-15 and HCT-116), breast (MDA-MB-231) cancer and non-tumorigenic (MCF-10A) cell lines which were treated with peniocerol (10 to 80 μ M) for 24 , 48 or 72 hours. Cytotoxic activity was determined by the crystal violet technique. Induction of cell apoptosis was detected by flow cytometry with the Annexin-V FLUOS/PI kit on the HCT-116 and MDA-MB-231 cell lines. The cytotoxic activity of peniocerol was also evaluated in combinations separately with nordihydroguarectic acid (NDGA) and with dithiothreitol (DTT) compounds with recognized antioxidant activity. The antitumor activity of peniocerol was evaluated in a model of xenograft of HCT-116 in *nu/nu* mice. After treatment, the effect of peniocerol on histological sections of tumors was analyzed by immunohistochemistry using DAPI, anti-PCNA and PARP-1 antibodies.

Results. Peniocerol inhibited cell growth and induced apoptosis *in vitro* in a time and dose dependent manner. On the other hand, the combination with antioxidants increased the cytotoxic activity of peniocerol. The doses 30 mg/kg and 15 mg/kg did not cause toxicity in the mice. Additionally, peniocerol administrations; 30 mg/kg, 15 mg/kg once a week or 15 mg/kg three times a week for three weeks, had an antiproliferative effect and caused cell death by apoptosis in the xenografted tumors of the mice.

Conclusions. Our results showed that peniocerol induces apoptosis *in vitro* and *in vivo* assays.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial [1], se estima que es responsable de más de 9.6 millones de muertes y de más de 18.1 millones de nuevos casos, en 2018 [2]. Por lo tanto, la búsqueda de mejores medicamentos antitumorales no está concluida. En este sentido, los llamados productos naturales son una rica fuente de compuestos bioactivos que podrían considerarse prototipos contra el cáncer.

Los fitoesteroles son esteroides vegetales, componentes estructurales de la membrana celular que participan en la regulación de la fluidez, la permeabilidad y el metabolismo asociados con la membrana [3]. Son productos de la biosíntesis que utiliza al escualeno como producto intermediario [4]. Los fitoesteroles pertenecen a una familia de más de 200 compuestos diferentes, los más comunes son β -sitosterol, campesterol y estigmasterol [3]. Estos metabolitos secundarios han demostrado protección contra diversas enfermedades crónicas como cardiovasculares, hepáticas, diabetes y diferentes tipos de cáncer [5, 6, 7, 8, 9]. Los estudios de prevención del cáncer muestran que una dieta rica en fitoesteroles puede reducir el riesgo de diferentes tipos de cáncer [10]. Por ejemplo, la ingesta de β -sitosterol, un potente agente antiinflamatorio [11] puede prevenir el cáncer de colon [12, 13].

En este contexto, hemos publicado previamente la actividad antiinflamatoria *in vivo* y la actividad citotóxica *in vitro* contra las células humanas de cáncer de mama y colon del peniocerol, un esteroide aislado del cactus *Myrtillocactus geometrizans* (Mart Ex Pfeiff) Console [15, 16].

En este trabajo, demostramos la actividad apoptótica del peniocerol *in vitro* en líneas celulares de cáncer, así como el efecto antitumoral *in vivo* en ratones xenotrasplantados con células de cáncer de colon humano.

II. MARCO TEORÍCO

2.1 El Cáncer

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación descontrolado de células que puede aparecer en cualquier lugar del cuerpo [15]. En el proceso canceroso, las células normales evolucionan progresivamente en un curso de múltiples etapas que les permite convertirse en tumorigénicas y finalmente malignas. Los tumores son tejidos complejos compuestos de diversos tipos de células que participan en interacciones heterotípicas entre sí, por lo que se han propuesto características distintivas para comprender la diversidad de las neoplasias [16].

Inicialmente, las células cancerosas dentro de los tumores son poblaciones celulares homogéneas hasta que se da la hiperproliferación combinada, la cual genera distintas subpoblaciones clonales en el curso de la progresión del tumor [17].

Las características distintivas incluyen el mantenimiento de la señalización proliferativa, la evasión de supresores de crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la permanencia de la inmortalidad replicativa, la inducción de angiogénesis, la activación de la invasión y la metástasis, así como también evitando la activación inmune, la desregulación del metabolismo energético, la inestabilidad y mutación genómica y la inflamación promotora del tumor (Figura 1) [17].



Figura 1 Características distintivas de las células tumorales. En los recuadros se muestra cada una de las características distintivas adquiridas, necesarias para el crecimiento y la progresión del tumor. Modificado de [18].

2.2 Epidemiología

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer se encuentra entre las 10 principales causas de muertes en todo el mundo [1]. La incidencia y mortalidad mundial relacionadas al cáncer están creciendo rápidamente. Aunque la razón es compleja y los factores de riesgo son diversos, no obstante, estos aspectos de incidencia y mortalidad se pueden relacionar con el envejecimiento, el crecimiento de la población y el desarrollo socioeconómico. Los datos del GLOBOCAN en 2018 revelan que existen más de 18.1 millones de nuevos casos y 9.6 millones de muertes por cáncer a nivel mundial. El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer, seguido por el colorrectal, estómago, hígado y mama, en cuanto a datos de incidencia, el cáncer más comúnmente diagnosticado es también el cáncer de pulmón, seguido por el de mama, colorrectal, próstata y estómago en ambos sexos alrededor del mundo (Figura 2) [2].

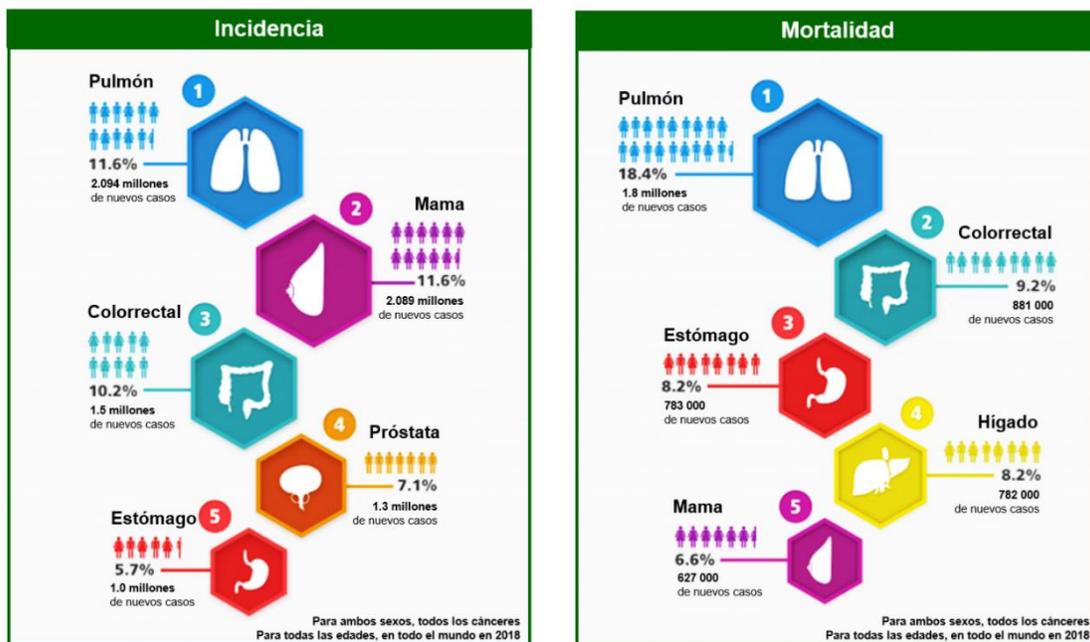


Figura 2 Porcentajes de nuevos casos de cáncer y muertes por cáncer en el mundo en 2018. Modificado de GLOBOCAN, <https://www.uicc.org/news/new-global-cancer-data-globocan-2018>, fecha de consulta: septiembre del 2019.

2.3 Factores de riesgo

La actual evidencia epidemiológica vincula los factores del estilo de vida con el impacto de riesgo de cáncer, que se puede prevenir logrando cambios generalizados en el estilo de vida. [19]. Estos factores de riesgo incluyen tabaquismo, consumo excesivo de alcohol, exceso de peso corporal, dieta, la inactividad física, exposición a la radiación ultravioleta (UV), infección por bacterias como *Helicobacter pylori* e infección por virus como el virus de hepatitis B (VHB), virus de hepatitis C (VHC), virus de papiloma humano (VPH), virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o virus del herpes humano tipo 8 (HHV8), virus de Epstein-Barr (EBV), virus de leucemia de células T tipo 1 (HTLV-I) [20, 21, 22, 23, 24]. En la Tabla 1 se muestran los factores de riesgos y el tipo de cáncer al que están asociados.

Factor de riesgo	Tipo de cáncer
Humo de tabaco	Pulmón, boca, laringe, esófago, páncreas, estómago, colon, cuello uterino, riñón, vejiga, hígado, próstata y leucemias
Consumo excesivo de alcohol	Hígado, esófago, oral, mama y colorrectal
Exceso de peso corporal	Colorrectal, mama, renal, esofágico, próstata, hígado, vesícula biliar, páncreas, estómago, ovario, cuello uterino, linfoma no Hodgkin y mieloma múltiple
Dieta	Cavidad oral/faringe, laringe, pulmón y colorrectal
Inactividad física	Colon, mama, pulmón, próstata
UV	Melanoma de la piel
Infecciones	
<i>Helicobacter pylori</i>	Gástrico
VHB y VHC	Hígado
HHV8	Sarcoma de Kaposi
VIH	Linfoma no Hodgkin, cervical
VPH	Cervical, vagina, pene, orofaringe
EBV	Carcinoma nasofaríngeo, carcinoma linfoepiteliales
HTLV-I	Linfoma de células T

Tabla 1 Factores del estilo de vida relacionados con el impacto de riesgo de cáncer. [20, 21, 22, 23, 24].

2.4 Inflamación en el cáncer

La inflamación se produce como una respuesta defensiva del sistema inmune por exposición a patógenos invasores, así como a riesgos físicos y químicos [25]. Sin embargo, la inflamación es una característica que también contribuye al mantenimiento del cáncer.

La especulación sobre la asociación entre inflamación y el cáncer se remonta a 1863, cuando Rudolf Virchow, fundador de la patología celular, demostró la presencia de leucocitos en lesiones cancerosas [26].

Actualmente estudios epidemiológicos indican que, hasta el 25% de los tumores malignos humanos están relacionados con una inflamación crónica, mientras que otros estudios proporcionan evidencia de que la inflamación crónica aumenta el riesgo de cáncer, promueve la progresión tumoral y la propagación metastática [27, 28].

2.4.1 Inductores inflamatorios relacionados con el cáncer

Las infecciones persistentes inducidas por parásitos, bacterias y virus, así como los estímulos físicos y/o químicos pueden causar inflamación [29]. La inflamación crónica puede promover la carcinogénesis, su desarrollo y su crecimiento metastático en ratones y humanos [27]. En la Tabla 2 se proporciona una visión general sobre condiciones inflamatorias y patógenas que se consideran asociadas con diversos tipos de cáncer [27].

Inductor	Inflamación	Cáncer
Patógeno intestinal	Enfermedad inflamatoria intestinal	Cáncer colorrectal
Humo de tabaco	Bronquitis	Cáncer de pulmón bronquial
<i>Helicobacter pylori</i>	Gastritis	Cáncer gástrico
Virus del papiloma humano	Cervicitis	Cáncer cervical
Virus de hepatitis B/C	Hepatitis	Carcinoma hepatocelular
Bacteria, cálculos en la vesícula biliar	Colecistitis	Cáncer de vesícula biliar
Tabaco, genéticos, alcohol	Pancreatitis	Cáncer de páncreas
Virus de Epstein-Barr	Mononucleosis	Linfoma de Burkitt
Luz ultravioleta	Bronceado	Melanoma
Fibras de asbestos	Asbestosis	Mesotelioma
Gram-uropatógenos	Esquistosomiasis (Bilharzia)	Cáncer de vejiga
Ácido gástrico, alcohol, tabaco	Esofagitis	Adenocarcinoma esofágico

Tabla 2 Inductores inflamatorios y su relación con el cáncer. Modificado de [27].

2.4.2 Vías que relacionan la inflamación con el cáncer

La relación entre la tumorigénesis y la inflamación está mediada por dos vías; intrínseca y extrínseca. La vía intrínseca se activa por alteraciones genéticas, activación por oncogenes o impulsada por la mutación y/o inactivación de los supresores tumorales. Las células transformadas secretan mediadores inflamatorios y generan así un microambiente inflamatorio. La vía extrínseca, llevada a cabo principalmente por leucocitos que producen mediadores inflamatorios [28].

La carcinogénesis inducida por inflamación generalmente inicia por la vía extrínseca. Cuando ocurre una mutación que origina una célula cancerosa, éstas activarán la vía intrínseca, dándose la convergencia de ambas vías en las células tumorales e inducen la activación de factores de transcripción, el factor nuclear κ B (NF- κ B), transductor de señal, el activador de la transcripción 3 (STAT-3) y el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) en células tumorales. Estos factores de transcripción coordinan la producción de mediadores inflamatorios, incluidas las citocinas, las quimiocinas y prostaglandinas. Estos factores reclutan y activan varios leucocitos, más notablemente células del linaje mielomonocítico, además de macrófagos, mastocitos, eosinófilos y neutrófilos. Las citocinas, quimiocinas y prostaglandinas activan los mismos factores clave de transcripción en las células inflamatorias, las células del estroma y las células tumorales, lo que favorece la producción de más mediadores inflamatorios y la generación de un microambiente inflamatorio relacionado con el cáncer (Figura 3A) [25, 28].

2.4.3 Inflamación en la progresión de los tumores

La proliferación de células epiteliales y la homeostasis de leucocitos en el epitelio está regulado por la señalización mediada por mediadores inflamatorios (quimiocinas, citocinas y prostaglandinas), autócrinos y parácrinos, en el epitelio normal [27, 28].

En la carcinogénesis *in situ*, los mediadores inflamatorios atraen un infiltrado que promueve el tumor, por ejemplo, macrófagos asociados a tumores (TAM) y células T reguladoras. La expresión de receptores de quimiocinas puede inducirse en células tumorales tempranas [28].

Las quimiocinas, citocinas y prostaglandinas continúan atrayendo y modulando un infiltrado que promueve el tumor, también promueven la angiogénesis y controlan la remodelación del tejido. Están involucradas en la intravasación de las células tumorales en los vasos sanguíneos y en la diseminación linfática, en la invasión local [28].

En la metástasis, la señalización de estos mediadores inflamatorios promueve la supervivencia de células malignas en órganos distantes, atrayendo nuevamente un infiltrado que contribuye a la capacidad de las células tumorales para colonizar el nicho metastásico. Modelo presentado por Mantovani *et al*, 2008 (Figura 3B) [28].

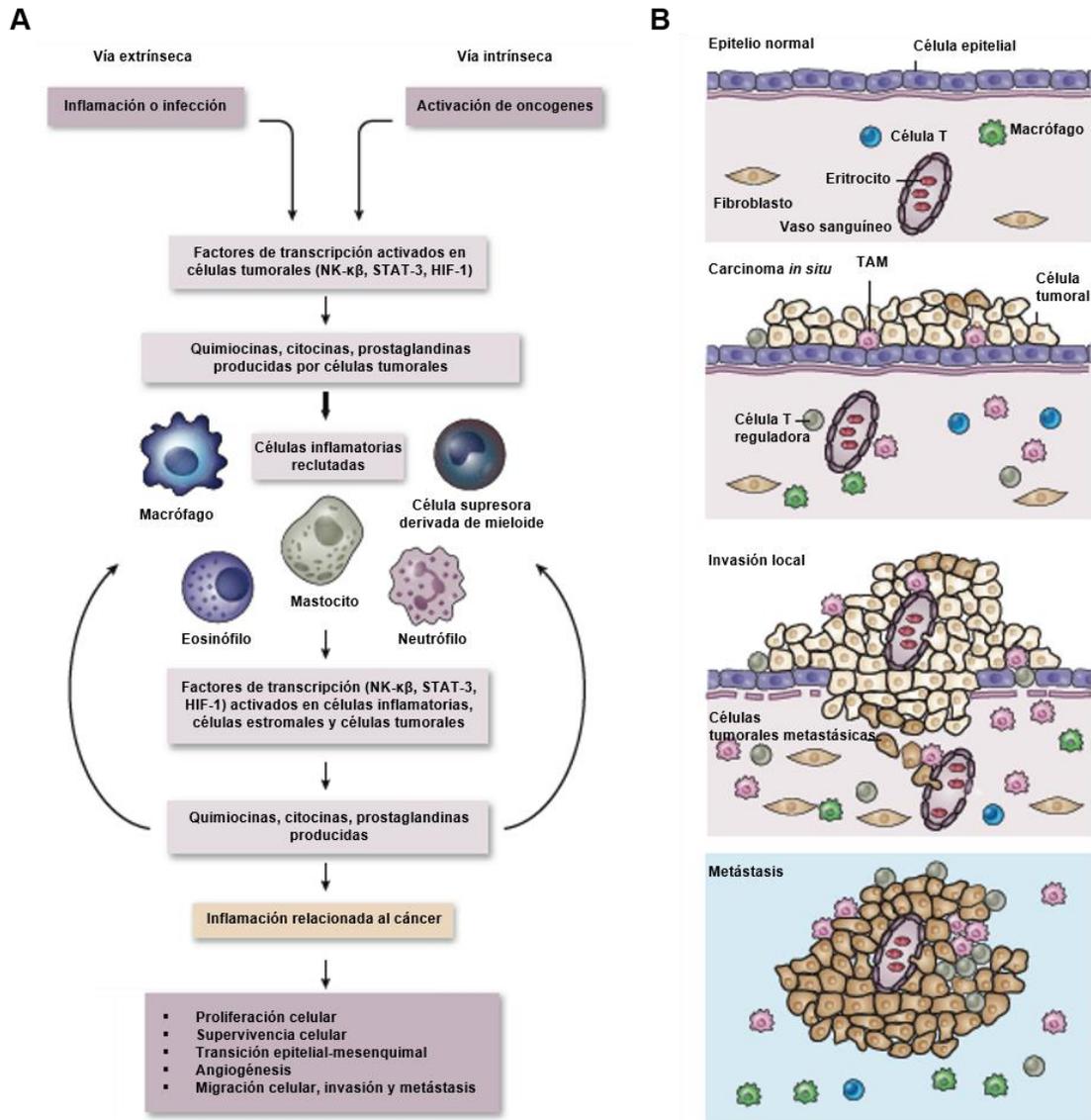


Figura 3 Representación ilustrativa de la inflamación relacionada con el cáncer. A) Esquema de las vías que relacionan a la inflamación con el cáncer. B) Modelo de la inflamación en progresión maligna de tumores. Modificado de [25].

2.5 Resistencia a la muerte celular

La resistencia a la muerte celular o evasión de la apoptosis se ha propuesto como una característica distintiva del cáncer [18].

2.5.1 Apoptosis

La apoptosis es un proceso fisiológico de eliminación celular estrechamente regulado y caracterizado por una secuencia de cambios morfológicos estereotipados: contracción celular, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear y celular, con formación de cuerpos apoptóticos que son engullidos por las células fagocíticas próximas antes de que se pierda la integridad de la membrana [30].

La muerte celular programada involucra una serie de eventos celulares que finalmente conducen a la activación de las caspasas. En respuesta a varios estímulos apoptóticos, se activan las caspasas "iniciadoras" (caspasa-2, caspasa-8, caspasa-9 o caspasa-10). Las caspasas iniciadoras, a su vez, cortan y activan a las caspasas "ejecutoras" (caspasa-3 o -7), lo que resulta en la escisión proteolítica de sustratos celulares específicos y, en consecuencia, la muerte celular [31].

2.5.2 Vías apoptóticas relacionadas con el cáncer

Existen distintas vías apoptóticas; la extrínseca, la intrínseca y la mediada por granzima B/perforina, sin embargo, sus mecanismos convergen en algún punto hacia este tipo de muerte celular. En la vía extrínseca o también llamada de receptor de muerte, el iniciador caspasa-8 o caspasa-10 se activan mediante la formación de un complejo de señal inductora de muerte en respuesta al acoplamiento de ligandos extracelulares (Fas o TNF [factor de necrosis tumoral]) por los receptores de la superficie celular (Figura 4A) [33]. En la vía intrínseca, está implicada la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP); MOMP desencadena la liberación de un grupo de proteínas proapoptóticas, incluido el citocromo c y el segundo activador de caspasas derivado de mitocondrias (SMAC), desde el espacio intermembrana mitocondrial al citoplasma. En el citoplasma, el citocromo c se une a la proteína adaptadora APAF-1 (factor de activación de la proteasa apoptótica 1) para formar un complejo activador de caspasa-9, llamado apoptosoma. SMAC aumenta la activación de caspasa inducida por el citocromo c mediante la unión y neutralización de XIAP (inhibidor de la proteína de apoptosis

ligado al cromosoma X), un inhibidor de caspasa-3, caspasa-7 y caspasa-9 (Figura 4) (Figura 4B) [31, 32]. La vía de granzima B/perforina para la inducción de apoptosis es específica de células del sistema inmune; las células T citolíticas (CTL) y las natural killer (NK), llamadas así en inglés, sobre las células objetivo. El suministro de granzima B al citoplasma de una célula a otra, se lleva a cabo mediante gránulos en la que se empaquetan granzima B y la perforina, esta última facilita el movimiento de granzima B al citoplasma de la célula diana a través de la formación de poros. Una vez en el citoplasma granzima B escinde residuos de aspartato, es decir, activa diferentes caspasas y sustratos de caspasas que a su vez activan mecanismos para la fragmentación del ADN y así provocar la muerte celular por apoptosis (Figura 4C) [33, 34].

A diferencia de las células normales, las células cancerosas están sometidas a un estrés constante, como el estrés oncogénico, la inestabilidad genómica y la hipoxia celular. En respuesta a tales estímulos apoptóticos internos, las células cancerosas pueden modular las vías apoptóticas de manera transcripcional, traduccional y postraduccional. En algunos casos, las células cancerosas pueden escapar de la apoptosis al aumentar o disminuir la expresión de los genes antiapoptóticos o proapoptóticos, respectivamente. Alternativamente, pueden inhibir la apoptosis estabilizando o desestabilizando las proteínas proapoptóticas o antiapoptóticas, respectivamente. Además, las células cancerosas también pueden prevenir la apoptosis al cambiar las funciones de las proteínas involucradas en la apoptosis a través de modificaciones postraduccionales, como la fosforilación. Es importante destacar que estos mecanismos no son mutuamente excluyentes y las células cancerosas pueden emplear uno o múltiples mecanismos para evadir la apoptosis [31, 32].

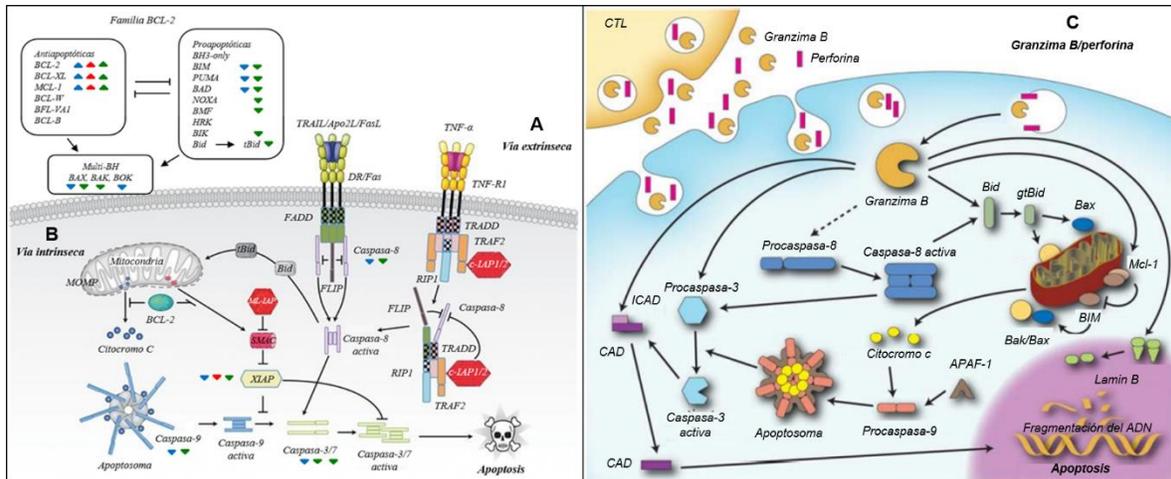


Figura 4 Representación ilustrativa de las vías que desencadenan la apoptosis: vía extrínseca (A), vía intrínseca (B) o vía granzima B/perforina (C). La vía extrínseca se activa por los ligandos de la familia TNF que se unen a los receptores que contienen dominio de muerte, lo que resulta en la activación de las caspasas que contienen dominios efectores de muerte, desencadenando la activación de mecanismos que convergen con la vía intrínseca, llevando a la muerte celular por apoptosis. La vía intrínseca se inicia mediante la activación de la proteína BH3-only. Entre las proteínas BH3-only, cuya expresión a menudo se induce transcripcionalmente después de un estímulo apoptótico, BID es único en el sentido de que se activa por escisión de caspasas (2 y 8/10); BID escindido, denominado tBID. Las proteínas BH3 desencadenan la activación de proteínas de dominio multi-BH por unión directa o por inhibición de las proteínas de la familia antiapoptótica BCL-2. Una vez activadas, las proteínas del dominio multi-BH forman oligómeros que inducen MOMP (permeabilidad de la membrana mitocondrial externa). Esto permite que las proteínas proapoptóticas SMAC y el citocromo c se liberen al citoplasma, donde el citocromo c induce la formación del apoptosoma. El iniciador caspasa-9 activado dentro del Apoptosoma inicia la activación del ejecutor caspasa-3 y caspasa-7, lo que resulta en apoptosis. Los triángulos coloreados indican que el gen o producto genético indicado puede estar transcripcionalmente (azul), traduccionalmente (rojo) y/o postraduccionalmente (verde) regulado hacia arriba o hacia abajo en las células cancerosas. En la vía de apoptosis mediada por granzima B/perforina, la internalización de granzima B es facilitada por la perforina. Tras la internalización, granzima B escinde Bid a gtBid que desencadena la liberación de citocromo c mitocondrial y la formación del apoptosoma, el cual activa a la caspasa-8 lo que desencadena finalmente la fragmentación del ADN. Granzima B también puede evitar la vía mitocondrial e iniciar la activación de caspasa-3 directamente y/o escindir sustratos de caspasa-3 como el inhibidor de la desoxirribonucleasa activada por caspasa (ICAD), permitiendo así que CAD se transloque al núcleo para fragmentar el ADN. Granzima B también escinde la proteína de membrana nuclear lamina B (Lamin B), lo que resulta en una pérdida de integridad de la membrana nuclear. [31, 32, 34, 35].

2.6 Terapia contra el cáncer

La terapia contra el cáncer describe el tratamiento en un paciente con el objetivo de curar o prolongar la supervivencia. Así como preservar una mejor calidad de vida en los pacientes con enfermedad avanzada [35]. Para determinar el mejor tratamiento anticanceroso de un paciente se deben tomar en cuenta varios parámetros. El primero es la confirmación clínica del diagnóstico previo. Posteriormente se debe evaluar el tipo, la localización y el estadio del cáncer, tomando en cuenta también el estado de salud del paciente [36]. Las terapias contra

el cáncer están dirigidas hacia los blancos moleculares de las características distintivas de las células cancerosas (Figura 5) [18].

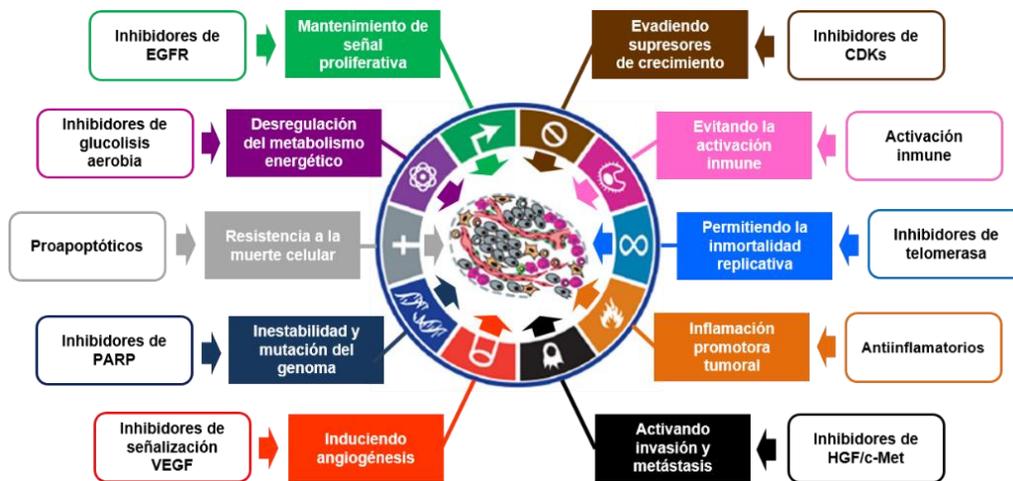


Figura 5 Blancos moleculares de las características distintivas de la célula cancerosas. En los recuadros de fondo blanco se muestran los inhibidores para cada una de las características. Modificado de [18].

Existen diferentes modalidades de terapias contra el cáncer son; la terapia neoadyuvante, que consiste en reducir el tamaño del tumor antes del tratamiento principal [35]. La terapia adyuvante, regímenes administrados después del tratamiento primario [35]. Y la terapia paliativa que son los tratamientos en los que el paciente no responde a los tratamientos anteriores, se centra en la calidad de vida de los pacientes, teniendo como objetivo controlar los síntomas y dar una calidad de vida a los pacientes. Debe estar presente desde el diagnóstico a través de las diferentes etapas evolutivas de los pacientes con cáncer [36]. Los tratamientos más comunes disponibles para las modalidades anteriormente mencionadas son la cirugía, radioterapia y/o la quimioterapia [37].

2.6.1 Cirugía

La cirugía como tratamiento para el cáncer consiste en extirpar el tumor y tejido que lo rodea durante una operación, es el tratamiento más antiguo contra el cáncer, hoy en día continúa siendo utilizada para muchos tipos de cáncer. En una etapa localizada, podría ser el único tratamiento o se podría combinar con otros tratamientos, como quimioterapia o radioterapia [38].

2.6.2 Radioterapia

La radioterapia o terapia de radiación es un tratamiento curativo para los tumores localizados en regiones no comprometidas con otros órganos y que a las dosis precisas de radiación destruye células cancerosas o hacer lento el crecimiento tumoral. La radiación suministrada causa daño al ADN de las células cancerosas que dejan de dividirse y mueren, lo que ocasiona la reducción tumoral. La radioterapia se puede implementar en combinación con otras terapias como la cirugía, inmunoterapia o quimioterapia [39].

La quimioterapia a diferencia de cirugía y la radioterapia que eliminan o dañan células cancerosas en un área determinada, puede funcionar en todo el cuerpo, causando la muerte a las células que se han diseminado a partes del cuerpo lejos del tumor primario, debido a que el tratamiento es a nivel sistémico [40].

2.6.3 Quimioterapia

La quimioterapia tiene efectos terapéuticos en algunos tipos de cáncer avanzado, aunque el tratamiento no siempre es curativo, sin embargo, ha habido una mejora en general significativa en la supervivencia libre de progresión. La quimioterapia neoadyuvante, cuyo objetivo es reducir el tamaño del tumor primario y prevenir las micrometástasis. Este tipo de tratamiento mejora las técnicas quirúrgicas más conservadoras para preservar la funcionalidad de los órganos importantes. La quimioterapia neoadyuvante con efecto curativo está indicada para muchos tipos de cáncer y con nuevos medicamentos y combinaciones efectivas [40].

La quimioterapia moderna comenzó con el descubrimiento de Goodman y Gilman de la mostaza nitrogenada en 1942, gas letal utilizado en la Primera Guerra Mundial, como un agente alquilante eficaz para el cáncer. En esa misma década se llevó a cabo el descubrimiento de la síntesis de análogos de folato; aminopterina y ametoterina (metotrexato), que podían suprimir proliferación de células malignas en leucemias [41]. Posteriormente, a principios de la década de los 50s, se descubrieron los antimetabolitos, análogos de purinas como la 6-mercaptopurina (6-

PM). Se demostró que este tipo de fármacos podrían inhabilitar el crecimiento de las células tumorales a través de la inhibición de la síntesis del ADN. En esa misma década se descubrieron los alcaloides de la vinca [41, 42].

La quimioterapia combinada se comenzó a utilizar a finales de los 60s, con la combinación de metotrexato, vincristina, 6-MP y prednisona, el régimen POMP, podía curar a corto plazo el cáncer en niños con leucemia. En 1964 fue descubierto otro producto natural, el taxol, obtenido de la corteza de *Taxus brevifolia* árbol de tejo del Pacífico, sin embargo, fue hasta 1992 que se aprobó el paclitaxel como un nuevo agente antimitótico que inhibía el ensamblaje de microtúbulos, eficaz en el tratamiento de pacientes con cáncer de ovario. En 1966 se descubrió la camptotecina, inhibidor de la topoisomerasa I, obtenida de *Camptotheca acuminata*. Fue hasta 1996 que un análogo de la camptotecina, irinotecán, fue aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer de colon [41, 42].

Durante las décadas de 1970 y 1980 se llevaron a cabo descubrimientos de fármacos importantes, aunque los agentes quimioterapéuticos habían ganado la reputación de tener un alto riesgo y pocas posibilidades de eficacia. Fue descubierto el cisplatino para curar el cáncer testicular, posteriormente se desarrolló el carboplatino, un derivado del cisplatino, con amplia actividad antitumoral y menos nefrotoxicidad. En los años 90s el descubrimiento de nuevos medicamentos transformó el desarrollo de estos, se comenzó la era de la "terapia dirigida" contra el cáncer, la cual incluía nuevos objetivos; factores de crecimiento, moléculas de señalización, proteínas del ciclo celular, moduladores de la apoptosis y moléculas que promueven la angiogénesis [58]. En el periodo a partir del año 2000 se llevaron a cabo la aprobación por la FDA de estos nuevos fármacos (Figura 6) [41, 42].

Línea del tiempo de la quimioterapia

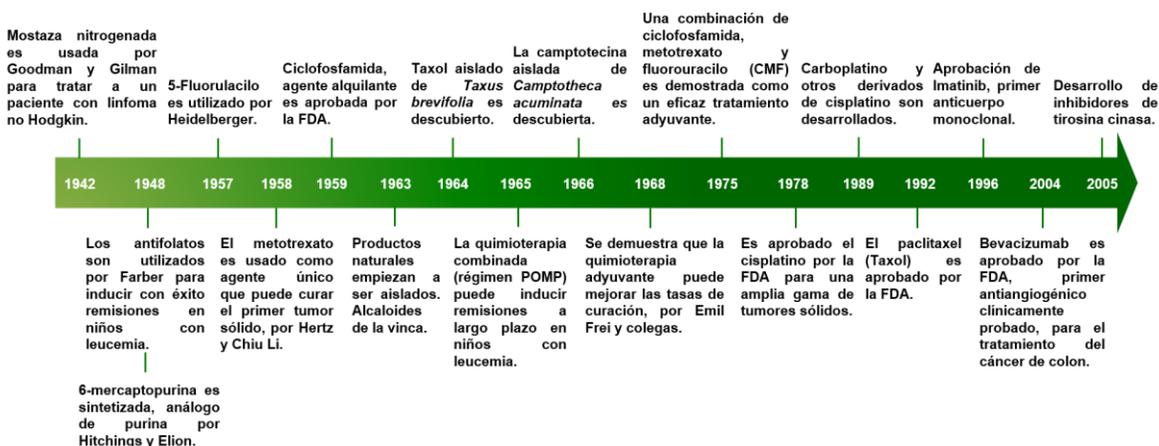


Figura 6 Línea del tiempo de los diversos agentes quimioterapéuticos descubiertos a lo largo de la historia. Modificado de [41].

2.7 Productos naturales de origen vegetal

Las plantas sintetizan productos conocidos como metabolitos secundarios, los cuales surgen como resultado de la adaptación a su entorno o para actuar como posible mecanismo de defensa contra los depredadores. La presencia de estos metabolitos induce y participa en la supervivencia de la planta, lo que ha permitido su evolución a lo largo de millones de años [43]. La biosíntesis de productos naturales se deriva de los intermediarios biosintéticos de los procesos de la fotosíntesis, la glucólisis y el ciclo de Krebs. [43]. Los componentes básicos más importantes empleados en la biosíntesis de productos naturales son los intermediarios como, acetil coenzima A (acetil-CoA), ácido shikimico, ácido mevalónico. Estos compuestos están involucrados en innumerables vías biosintéticas, que implican numerosos mecanismos y reacciones diferentes, para obtener una enorme variedad de compuestos alcaloides, polifenoles, triterpenos, esteroides (Figura 7) [43, 44].

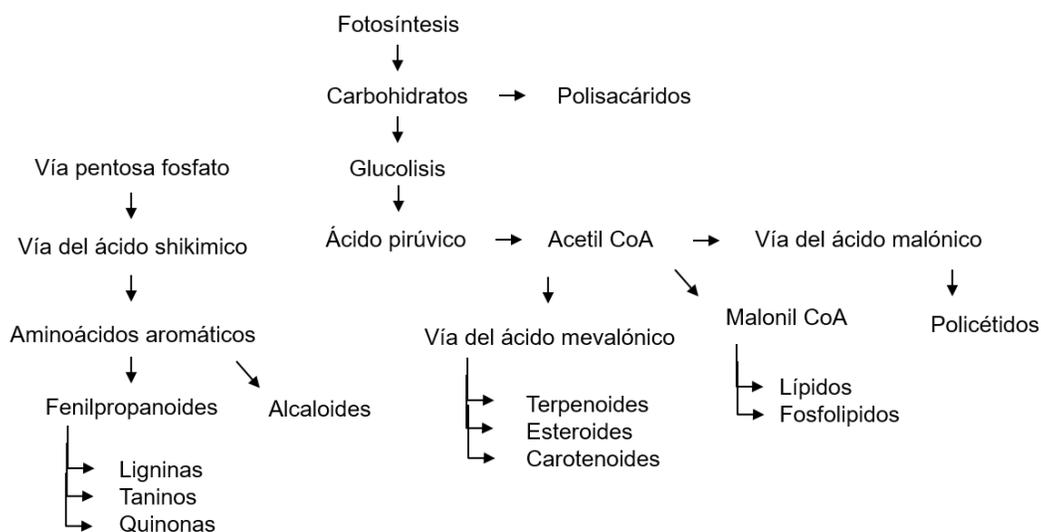


Figura 7 Representación esquemática de las vías de biosíntesis de metabolitos secundarios. Modificado de [45].

El uso de productos naturales a partir de plantas medicinales es el resultado de que el hombre buscó durante cientos de siglos, mediante ensayo y error, remedios para el tratamiento de enfermedades. Estos principios o productos naturales se pueden utilizar en forma de medicamentos tradicionales, remedios, pociones y aceites. Sus propiedades etno-farmacológicas se utilizaron como fuente primaria para el descubrimiento de fármacos [43].

De acuerdo con la OMS, el 80% de las personas todavía dependen de los medicamentos tradicionales a base de plantas para la atención primaria de salud, el 80% de los 122 medicamentos derivados de plantas estaban relacionados con su objetivo etno-farmacológico original. El conocimiento asociado con la medicina tradicional promovió nuevas investigaciones de plantas medicinales como medicamentos potenciales y condujo al aislamiento de varios productos naturales que se convirtieron en productos farmacéuticos bien conocidos [44].

Para el tratamiento del cáncer en el período comprendido entre 1981 y 2014, fue aprobada la comercialización de un total de 174 nuevos compuestos. De los cuales, 56 que representa el 32%, eran productos naturales no modificados, es decir, derivados directos, 37 (21%) inspirados en estructuras químicas de productos naturales, 43 (25%) eran entidades químicas sintéticas, 33 (19%) de origen no

biológico y 5 (3%), vacunas. Así, un total de 93 (53%) son productos naturales, derivados directamente o basados en ellos [44].

Por lo que los productos naturales y sus derivados obtenidos de las plantas medicinales han representado una importante fuente de agentes quimioterapéuticos a lo largo de la historia, siendo una fuente exitosa en el descubrimiento de fármacos potenciales.

2.7.1 Fitoesteroles

Los fitoesteroles son productos naturales esteroideos que han llamado la atención, debido a que en diversos estudios han demostrado efecto antiinflamatorio [46, 47], contra enfermedades crónicas cardiovasculares [48], diabetes [49] y efecto antitumoral [50].

Los fitoesteroles son los esteroides de las plantas, componentes estructurales de la membrana celular, participan en la regulación de la fluidez, permeabilidad y metabolismo asociado a la membrana [51]. Los fitoesteroles son subproductos de la compleja ruta biosintética de isoprenoides, proveniente del mevalonato, en la cual intervienen más de 30 enzimas y se lleva a cabo exclusivamente en el citoplasma [50]. La ruta biosintética, consiste en la conversión de isoprenil pirofosfato en diversos intermediarios hasta farnesil pirofosfato que es convertido a escualeno y finalmente en la gran diversidad de fitoesteroles (Figura 8) [52].

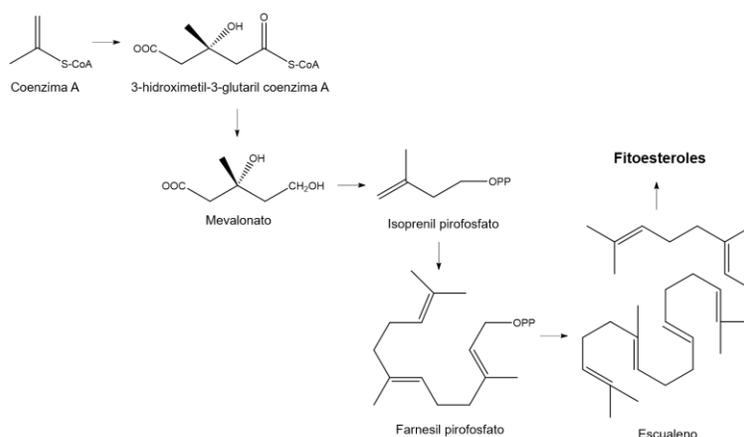


Figura 8 Representación esquemática de la biosíntesis de fitoesteroles. Modificado de [52].

Estructuralmente los fitoesteres están formados por un anillo de ciclopenta[a]fenantreno tetracíclico, una cadena lateral larga y flexible en el átomo de carbono C-17, los cuatro anillos (A, B, C, D) tienen uniones de anillo trans, formando un sistema α . La cadena lateral y los dos grupos metilo (C-18, C-19) son angulares a la estructura del anillo y por encima del plano, por lo que tienen una estereoquímica β (Figura 9) [52].

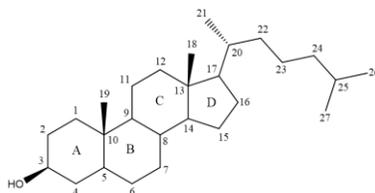


Figura 9 Nomenclatura de la estructura química de los fitoesteres. Modificado de [52].

Estos productos naturales comprenden más de 200 compuestos diferentes que se originan en una variedad de vegetación. La fuente más rica en fitoesteres son los alimentos como las nueces, semillas, aceites vegetales, cereales y legumbres. Los fitoesteres que se encuentran con mayor frecuencia son el β -sitosterol, el campesterol y el estigmasterol (Figura 10) [53].

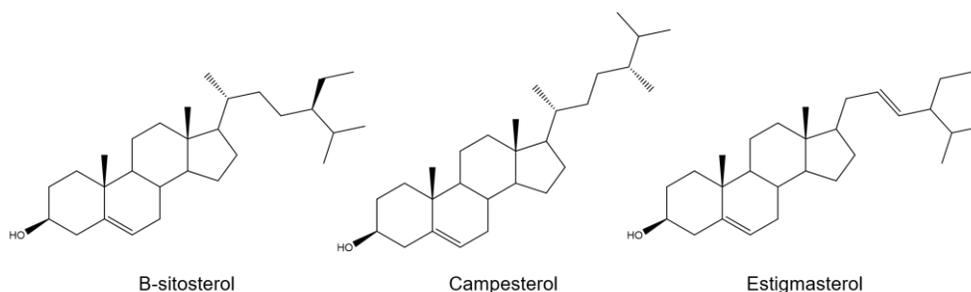


Figura 10 Los fitoesteres más comunes presentes en la dieta.

Existen diversas investigaciones de la evaluación de los efectos protectores contra el cáncer, así como actividad antitumoral y antiinflamatorios de fitoesteres. Una serie de estudios de casos y controles realizados en los principales hospitales de Uruguay han demostrado el papel protector de los fitoesteres en la dieta para aliviar el riesgo de cáncer gástrico [54]. En un estudio poblacional existió disminución del riesgo de cáncer de ovario en pacientes relacionado con la ingesta

fitoquímica en la dieta [55]. Las poblaciones femeninas con bajo riesgo de cáncer de seno consumen más fitoesteroles en la dieta que aquellas con alto riesgo. Por ejemplo, los japoneses consumen alimentos basados en plantas y una dieta baja en grasas animales que es rica en fitoesteroles. Las mujeres japonesas también tienen una baja incidencia de cáncer de mama [57]. En la siguiente tabla se resumen los estudios epidemiológicos de fitoesteroles en la prevención del cáncer.

Fitoesterol	Estudio	Referencia
β-sitosterol, campesterol, estigmasterol y otros fitoesteroles.	Dieta a 360 pacientes con alto consumo, previene cáncer gástrico, en hospitales de Uruguay.	[54]
Mezcla de fitoesteroles	Dieta a 696 pacientes basados en la población, con la frecuencia correspondiente a los casos de edad y condado de residencia. Reducción de cáncer de ovario. NY, EU.	[55]
Mezcla de fitoesteroles	463 casos con cáncer de pulmón y 465 controles hospitalizados. La ingesta total de esteroides vegetales se asoció con una reducción en el riesgo del 50%.	[56]
Mezcla de fitoesteroles	Baja incidencia de cáncer de mama. Japonesas que consumen alto contenido en fitoesteroles.	[57]

Tabla 3 Estudios epidemiológicos de fitoesteroles en la prevención del cáncer.

Existen estudios en diversas líneas celulares de cáncer humano de los fitoesteroles, en algunos la evaluación ha revelado un efecto inhibitor, citotóxico y apoptótico sobre la proliferación de las células como; HT-29, PC-3, DU145, LNCaP, MDA-MB-231, HEL, K562 (Tabla 4).

Fitoesterol	Estudio	Efecto	Referencia
Fitoesteroides	Líneas celulares de cáncer PC-3 y DU145	Inhibición del crecimiento celular	[58]
Campesterol	Monocito humano, células U937	Apoptosis	[59]
β-sitosterol	Línea celular de cáncer de colon humano, HT-29	Inhibe la hiperproliferación de monocitos, cuando se tratan con suplementos de 16 mmol/L de β -sitosterol durante 5 días	[60]
β-sitosterol	Línea celular de cáncer próstata LNCaP	Inhibición del crecimiento celular, produciendo antígeno prostático específico (PSA) y fosfatasa ácida en cultivo	[61]
β-sitosterol	Línea celular de cáncer de mama humano, MDA-MB-231	Inhibición de la proliferación celular inducida por ácido cólico inhibida	[62]
Fitoesterol (Diosgenina Solamargina)	Eritroleucemia humana líneas celulares HEL y K562	Apoptosis	[63, 64]

Tabla 4 Estudios experimentales *in vitro* de fitoesteroles en líneas celulares de cáncer humano.

En experimentos *in vivo* de la evaluación antitumoral de los fitoesteroles, presentan efecto inhibitor en la proliferación celular, que se refleja en la disminución del crecimiento tumoral y en la metástasis en distintos modelos murinos, como se puede observar en la Tabla 5.

Fitoesterol	Estudio	Efecto	Referencia
Fitoesteroles	Cáncer de mama hereditario (ratones MMTV-PyMT Tg)	Prevención de la oxidación de lipoproteínas	[65]
β-sitosterol	Tumor inducido por metil nitrosourea en ratas, que se alimentaron con 0.2% de β-sitosterol por 28 semanas	Reducción del 39% en el número de ratas que desarrollaron tumor, así como una reducción del 60% en los tumores por rata	[62, 66, 67]
Fitoesteroles	Ratones SCID xenotrasplantados con MDA-MB-231, alimentados con 2% de una mezcla de fitoesteroles o colesterol y ácido cólico al 0.2% para estimular la absorción de esteroles	Después de 8 semanas, los ratones alimentados con fitoesteroles tenían tumores 33% más pequeños y mostraron un 20% menos de metástasis en comparación con los ratones alimentados con colesterol	[68]
Dieta rica en β-sitosterol	Ratones atímicos ovariectomizados que fueron inyectados con las células de cáncer de mama humano positivas para receptores de estrógeno MCF-7	Reducción del 32-42% en el tamaño del tumor	[69]
Mezcla de fitoesteroles	Proliferación celular inducida por ácido cólico en el colon proximal de ratas Sprague-Dawley, alimentadas con 2% de fitoesteroles	Inhibición del crecimiento tumoral	[65]

Tabla 5 Estudios experimentales *in vivo* de fitoesteroles en diversos modelos murinos.

Estudios clínicos de fitoesteroles en pacientes con hiperplasia de próstata, mostraron mejoras en los síntomas clínicos a ciertas dosis, que puede estar relacionado con un metabolismo alterado de la testosterona (Tabla 6).

Fitoesterol	Estudio	Efecto	Referencia
β-sitosterol	Consumo de 130 mg/día, de pacientes con síntomas de obstrucción de la salida causada por hiperplasia prostática benigna (HPB).	Mejoras significativas en los síntomas clínicos en comparación con el placebo	[70]
β-sitosterol (Mezcla de fitoesteroles)	Consumo de 20 mg, tres veces al día, en pacientes con hiperplasia prostática por 4 a 26 semanas.	Síntomas clínicos mejorados de HPB.	[71]
Fitoesteroles β-sitosterol	Consumo de 60 mg/día, por pacientes con hiperplasia de próstata durante 18 meses.	Efectos beneficiosos en la mejora de síntomas	[77]

Tabla 6 Estudios clínicos de la ingesta de fitoesteroles en cáncer.

En otros estudios sobre el efecto antiinflamatorio de los fitoesteroles (Tabla 7), se encuentran diversos estudios *in vitro* que mostraron una inhibición de la secreción

de marcadores inflamatorios, así como estudios *in vivo*, que demuestran la reducción de la inflamación en modelos murinos.

Fitoesterol	Estudio	Efecto	Referencia
Mezcla de fitoesteroles	Evaluación del efecto antiinflamatorio en edema en modelos murinos	Disminuyó el edema de pata en ratones por carragenina e inhibió el edema de la oreja de ratón inducido por el acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) después de la aplicación tópica	[73]
β-sitosterol	Evaluación del efecto antiinflamatorio en la prevención/ inducción/remisión en un modelo experimental de colitis murino.	La alimentación con fitoesteroles muestra un efecto antiinflamatorio en la reducción significativa de la gravedad de la enfermedad y mejoró la remisión clínica e histológica.	[74]
β-sitosterol	Evaluación de la capacidad antiinflamatoria mediante la prueba de edema de pata de rata y el ensayo de pleuresía de rata.	Potencial antiinflamatorio significativo. En la prueba de edema de pata de rata inhibió del 50-70% en el ensayo de pleuresía de rata, los hallazgos mostraron una reducción del 46%,	[75]
β-sitosterol	Se investigó el efecto sobre la proliferación celular inflamatoria, el estrés oxidativo, la histopatología pulmonar y la remodelación, en un modelo de asma inducida por ovoalbúmina en cobayas.	Modulación de la inflamación alérgica de las vías respiratorias.	[76]
β-sitosterol	Se investigó la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> en dos líneas celulares	Capacidad de la formulación para inhibir las vías de transducción de señales de inflamación en los macrófagos	[77]
Estigmasterol	Se investigaron los efectos hepatoprotectores contra la lesión hepática aguda inducida	Reprime el daño hepático agudo inducido por lipopolisacárido/d-galactosamina al inhibir la oxidación y la inflamación en ratones	[78]

Tabla 7 Estudios del efecto antiinflamatorio de los fitoesteroles

2.7.2 Triterpenos

Los triterpenos son otro grupo de productos naturales también provenientes de la ruta biosintética de isoprenoides, proveniente del mevalonato [79]. Este grupo de metabolitos secundarios que poseen notables actividades, entre las que se encuentran; actividades antineoplásicas, antivirales, antiinflamatorias, antimicrobianas, también efectos hepato y cardioprotectores [80].

Existen estudios en los que se han explorado el papel anticancerígeno de los triterpenos, demostrándose vías por las cuales estos compuestos presentan dicha actividad. Dentro de estas rutas, interesantes de los triterpenos se encuentra la

disminución de los factores de transcripción de proteína específica, Sp1, Sp3 y Sp4 en distintas células de cáncer humano [81, 82, 83].

Los factores de transcripción de proteína de especificidad Sp1, Sp3 y Sp4 son miembros de la familia similar a Sp/Krüppel (KLF), necesarios para el desarrollo embrionario y de la vida temprana, su expresión disminuye con la edad, sin embargo, se expresan altamente en células cancerosas y tumores [82].

La disminución de los factores de transcripción de Sp, ya sea individualmente o en conjunto, da como resultado la inducción de apoptosis dependiente de caspasa y la inhibición del crecimiento [82]. Por lo tanto, se propone que la actividad anticancerígena de los triterpenos se daba en parte, a la regulación negativa de Sp1, Sp3 y Sp4. La regulación negativa de estos factores de transcripción de proteína específica, por parte de estos productos naturales se puede dar por dos mecanismos; dependiente o independiente del proteosoma [81].

El mecanismo dependiente del proteosoma inducido por triterpenos en células de cáncer, mostraron que la regulación a la baja de las proteínas Sp1, Sp3 y Sp4 se revierte con inhibidores del proteasoma y la activación del proteasoma es una vía principal para degradación de los factores de transcripción de Sp (Tabla 8) [81].

Se ha sugerido que en el mecanismo independiente del proteasoma, los triterpenos perturban las mitocondrias, disminuyen el potencial de membrana mitocondrial (MMP) e inducen especies reactivas de oxígeno (ROS) en distintas líneas celulares de cáncer [81, 85, 86, 87], regulando a la baja Sp1, Sp3 y Sp4. Esta respuesta se bloquea en las células tratadas con ácido betulínico (BA) más antioxidantes glutatión (GSH) y ditiotreitól (DTT). Las ROS inducidas por fármacos son un mecanismo de acción importante para muchos fármacos contra el cáncer, como el cisplatino, actuando a través de la disrupción mitocondrial y la disminución del MMP (Figura 11) [81].

Estos resultados demuestran por primera vez que ROS regula a la baja Sp1, Sp3 y Sp4 en líneas celulares de cáncer y esta respuesta juega un papel en la inhibición

del crecimiento celular, inhibición de la angiogénesis, inducción de apoptosis y disminución de la inflamación [81], asociadas con ROS inducida por productos naturales (Figura 11).

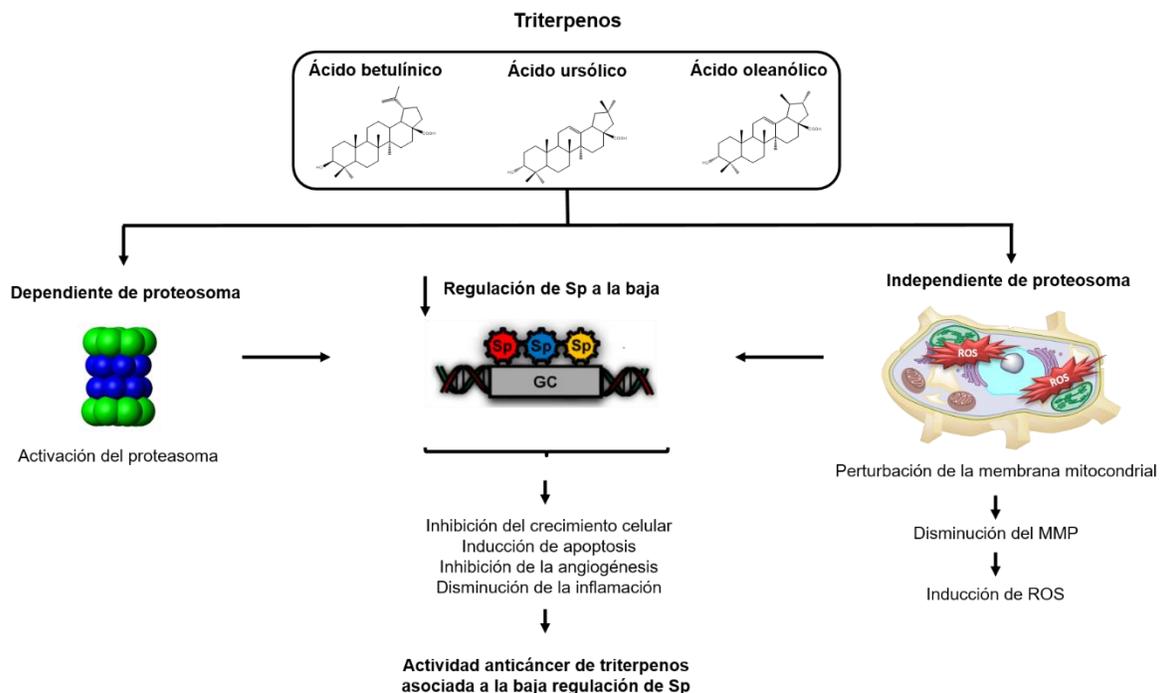


Figura 11 Esquema representativo de los mecanismos de triterpenos para la regulación a la baja de Sp [81].

2.9 Peniocerol aislado de *Myrtillocactus geometrizans*

El peniocerol 3β , 6α -diol-8-eno-colesterol (Figura 12) es un fitoesterol presente en especies pertenecientes a la familia Cactaceae [88], en nuestro grupo este esteroles fue aislado de *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. Ex Pfeiff) Console.

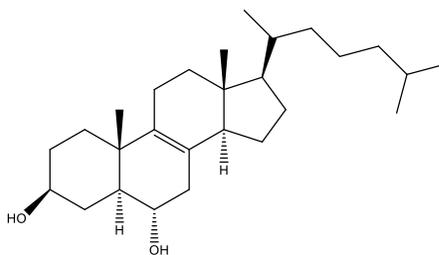


Figura 12 Estructura química del peniocerol (3β , 6α -diol-8-eno-colesterol).

2.9.1 Myrtillocactus geometrizans (Mart. ex Pfeiff.) Console

Taxonomía	
Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Caryophyllidae
Orden:	Caryophyllales
Familia:	Cactaceae
Subfamilia:	Cactoideae
Tribu:	Pachycereeae
Género:	<i>Myrtillocactus</i>
Especie:	<i>M. geometrizans</i> (<i>Mart. ex Pfeiff.</i>) Console

Tabla 8 Clasificación taxonómica de *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. ex Pfeiff.) Console.

2.9.1.1 Descripción botánica de *Myrtillocactus geometrizans*

Myrtillocactus geometrizans es un cactus arbolado (Figura 13) perenne de hasta 4 metros de altura, tronco bien definido, ramas numerosas que a su vez se ramifican, son ligeramente encorvadas, de color verdes azuladas. Presenta 5 o 6 costillas, redondeadas. Areolas distantes entre sí, lanosas, prolíferas, a veces crecen de forma ramificada. Posee espinas radiales generalmente de 5 a 9, cortas y gruesas, rojizas cuando están jóvenes. También posee espinas centrales, muy grandes, en forma de daga, aplanada lateralmente y de color negro. Las flores son pequeñas de color blanco verdoso, varias en la misma areola, en la parte superior. Los frutos son pequeños, de color rojo oscuro, púrpura o azulosos en la madurez, globosos hasta elipsoide, sin espina, son comestibles [88].

Esta especie perteneciente a la familia de las *Cactaceae* es endémica de México, se le conoce comúnmente con el nombre de “Garambullo” y se distribuye desde Tamaulipas hasta Oaxaca, en los mezquitales de los Estados del centro del país; Querétaro, Hidalgo, Guanajuato, San Luis Potosí y por el oeste se extiende hasta Durango, Zacatecas, Jalisco y Michoacán [88, 89].



Figura 13 Imagen de *Myrtillocactus geometrizans*, comúnmente conocido como “Garambullo” en el municipio de San Juan del río, Querétaro. Fotografía tomada por Beatriz Couder, 25 de mayo del 2015.

2.9.1.2 Usos etnobotánicos de *Myrtillocactus geometrizans*

Existen estudios de los usos etnobotánicos en nuestro país de esta especie, en diversos estados, los frutos se consumen como alimento fresco, mientras que los tallos se utilizan como alimento forrajero y la planta entera se utiliza como cerco vivo [90].

Estudios etno-biológicos indican que en la región Mixteca de Oaxaca y en el municipio de Nicolás Flores, hidalgo se utilizan emplastos de los tallos de *M. geometrizans* contra fracturas y golpes fuertes [90, 91, 92].

2.9.2 Antecedentes de la actividad biológica del peniocerol

El peniocerol ha sido estudiado por nuestro grupo en diversos modelos de actividad biológica tales como la regulación del crecimiento de insectos, actividad antiinflamatoria *in vivo*, producción de óxido nítrico en macrófagos de ratón, actividad mieloperoxidasa, proliferación de líneas celulares de cáncer humano y en modelos de permeabilidad mitocondrial. Los estudios antiinflamatorios *in vivo* y

antiproliferativos *in vitro* se tomaron como punto de inicio para el estudio de la actividad antitumoral *in vivo* de este esterol.

2.9.2.1 Actividad antiinflamatoria del peniocerol

Hemos reportado el efecto antiinflamatorio del peniocerol, el cual fue evaluado a través de dos modelos *in vivo*. Uno de ellos fue el modelo de edema de oreja de ratón inducido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) y el otro fue el modelo de edema de pata de rata inducido por carragenina. En ambos modelos, el peniocerol presentó actividad antiinflamatoria de manera dosis dependiente. En el modelo de TPA incluso presentó mejor actividad, con valores menores de la dosis efectiva media (DE₅₀) que el fármaco de referencia, la indometacina (Tabla 9). Lo que sugiere que el peniocerol podría interferir con la biosíntesis de eicosanoides, ya que, en el modelo utilizado, los niveles de eicosanoides comienzan a aumentar en los tejidos tratados y se correlaciona con la respuesta inflamatoria [15].

Modelo	DE ₅₀	
	Peniocerol	Indometacina
Inflamación inducida por TPA	0.091 μmol/oreja	0.272 μmol/oreja
Inflamación inducida por carragenina	31.88 mg/kg	6.68 mg/kg

Tabla 9 Actividad antiinflamatoria *in vivo* del peniocerol en dos modelos.

2.9.2.2 Actividad citotóxica

La actividad citotóxica de peniocerol ha sido evaluada en diferentes líneas celulares de cáncer humano. Entre ellas las del sistema nervioso central (U-251), las de próstata (PC-3), las de leucemia (K-562), las de colon (HCT-15) y las de mama (MCF-7). En todas, la actividad citotóxica fue mediante el ensayo de sulforrodamina B. Aunque en todas las células evaluadas el peniocerol mostró actividad citotóxica, sin embargo, este esterol tuvo mayor efecto en las líneas celulares de mama, colon y sistema nervioso central (Tabla 10) [15].

Compuesto	CI ₅₀ (μM)				
	U-251	PC-3	K-562	HCT-15	MCF-7
Peniocerol	24.73±3.9	19.35±0.45	10.37±0.73	10.87±2.36	10.17±0.79
Doxorrubicina	0.09±0.02	0.32±0.02	0.28±0.01	0.23±0.01	0.14±0.01

Tabla 10 Citotoxicidad del peniocerol en ensayo de sulforrodamina B en varias líneas celulares.

En otro estudio, se evaluó la actividad citotóxica, *in vitro*, dependiente del tiempo. La evaluación se realizó mediante el método colorimétrico de cristal violeta a las 24 y 48 horas, en dos líneas celulares de cáncer humano; de colon HCT-15 y de mama MCF-7. (Tabla 11) [15].

Compuesto	Línea celular	Tiempo de incubación	
		24 h	48 h
		CI ₅₀ (μM)	
Peniocerol	HCT-15	41.66±0.41	28.85±0.60
	MCF-7	48.17±0.35	21.77±0.39
Doxorrubicina	HCT-15	0.36±0.03	0.16±0.02
	MCF-7	0.37±0.02	0.28±0.01

Tabla 11 Citotoxicidad inducida por el peniocerol a las 24 y 48 horas en las líneas HCT-15 y MCF-7 en ensayo de cristal violeta.

2.9.2.3 Inducción de apoptosis

Posteriormente se evaluó mediante la inducción de apoptosis un ensayo de citometría de flujo con Anexina V/ yoduro de propidio (AV/IP). En la línea celular de cáncer de colon (HCT-15) el peniocerol indujo apoptosis a las 24 horas, mientras que en las MCF-7 se observó a las 48 horas (Figura 14) a 40 y 60 μM [14]. También se evaluó magdougallina, otro esteroide presente en *M. geometrizans*.

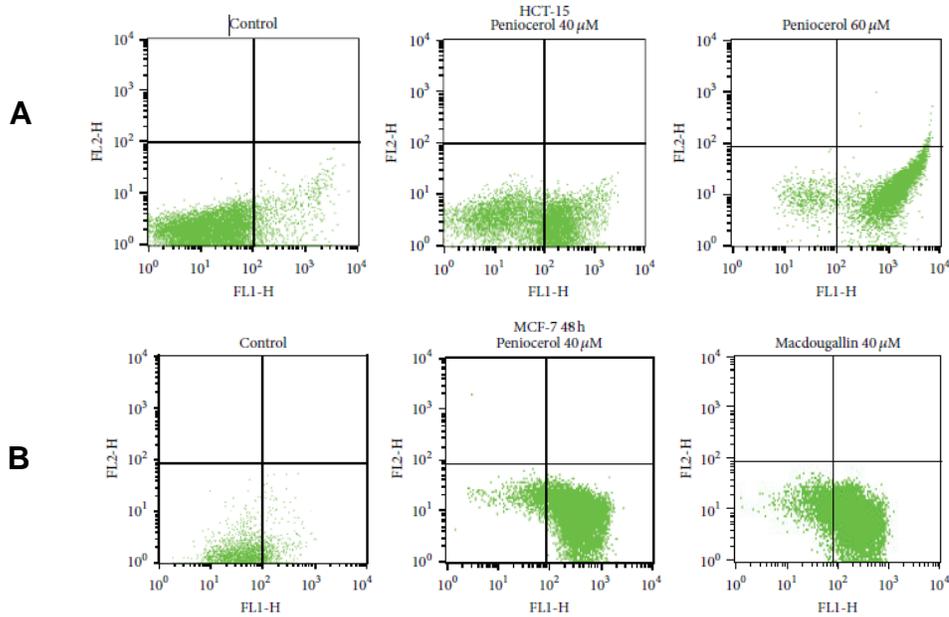


Figura 14 Inducción de apoptosis por el penicercol en las líneas celulares de A) HCT-15 y B) MCF-7. Los ensayos se llevaron a cabo mediante citometría de flujo con los marcadores Anexina V/Yoduro de propidio (AV/IP). En los gráficos se representa a las células viables en el cuadrante inferior izquierdo (AV negativo, IP negativo), a las células en apoptosis temprana en el cuadrante inferior derecho (AV positivo, IP negativo), a las células en apoptosis tardía en el cuadrante superior derecho (AV positivo, IP positivo) y a las células necróticas en el cuadrante superior izquierdo (AV negativo, IP positivo).

Adicionalmente el penicercol indujo apoptosis mediante la escisión de PARP en ambas líneas celulares de cáncer (Figura 15) [14].

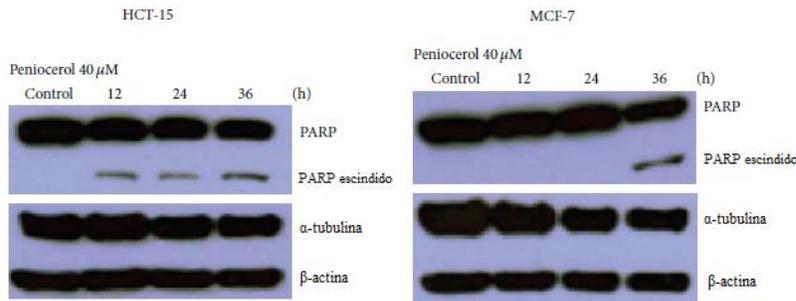


Figura 15 Indicación de apoptosis por penicercol mediada por la escisión de PARP en las líneas celulares HCT-15 y MCF-7. Los ensayos fueron realizados mediante western blot.

2.9.2.4 Arresto del ciclo celular

Mediante citometría de flujo en ambas líneas celulares, se determinó el efecto del penicercol a las 24 horas en la distribución del ciclo celular. El penicercol tanto en

HCT-15 como en MCF-7 presentó mayor incremento en el porcentaje en la fase G0/G1 (Tabla 12) [14].

Compuesto	Fase G1	
	HCT-15	MCF-7
Control (DMSO)	49.82±0.61	59.6±0.78
Peniocerol	40 µM	75.29±1.65
	60 µM	78.49±0.70
Timina	82.18±1.09	70.16±1.5
Nocodazol	9.2±0.85	3.90±0.92

Tabla 12 Fase de arresto celular inducido por peniocerol determinación realizada por citometría de flujo con el marcador yoduro de propidio (IP).

2.10 Metodologías en el descubrimiento de nuevos fármacos contra el cáncer

Para el descubrimiento de compuestos bioactivos una gran cantidad de ensayos de análisis se pueden utilizar. Los estudios preclínicos pueden ser a nivel celular (*in vitro*), animal (*in vivo*) o molecular. Se pueden aplicar dos enfoques complementarios la llamada farmacología clásica y la farmacología inversa. En la farmacología clásica, también conocida como descubrimiento fenotípico de fármacos. En la farmacología clásica, los primeros pasos de la investigación del desarrollo de fármacos contra el cáncer se basan en la evaluación *in vitro* en líneas celulares establecidas de cada tipo de cáncer, mientras que las líneas celulares no cancerosas se usan como control [93]. En la farmacología inversa el descubrimiento de fármacos está basado en objetivos, en la formulación y prueba de hipótesis moleculares específicas [93, 94].

2.10.1 Evaluación antiproliferativa

La evaluación antiproliferativa o citotóxica se realiza mediante ensayo de células viables teñidas con diferentes colorantes. Durante la muerte celular, las células muertas se desprenden de las placas de cultivo celular, esta característica se puede usar para la cuantificación indirecta de la muerte celular y para determinar las diferencias en la proliferación tras la estimulación con agentes inductores de la

muerte. Un método simple para detectar la adherencia mantenida de las células es la tinción de las células adherentes con cristal violeta, el cual se une a las proteínas y al ADN. Cuando las células que sufren la muerte celular se desprenden de la placa celular, por lo tanto, la cantidad de tinción violeta cristal es reducida [93].

La citometría de flujo se ha utilizado para detectar células vivas y muertas. Es una técnica que permite la detección rápida de células dañadas. Varios estudios han informado sobre la efectividad del citómetro de flujo como una herramienta para pruebas de detección de apoptosis con Anexina V/yoduro de propidio (AV/IP). Esta técnica proporciona resultados reproducibles rápidamente [95].

2.10.2 Estudio de xenotrasplante *in vivo* en ratones de la cepa *nu/nu*

Los ratones atímicos son un modelo válido, utilizado como herramienta en la fase preclínica, particularmente como un segundo paso para confirmar el efecto del fármaco con actividad *in vitro* [93, 94]. También se utiliza para la evaluación de nuevas formas o combinaciones de terapia convencional y la resistencia a los medicamentos. Un aspecto importante para considerar el uso de modelos de xenotrasplante es el hecho de que el efecto de los compuestos estudiados contra el cáncer en cultivos celulares *in vitro* a menudo no es similar a condiciones en las que los tumores crecen *in vivo* [96]. Tomando en cuenta lo anterior, se hace imprescindible que en la fase preclínica de la investigación contra el cáncer debe incluir modelos *in vivo* que imiten al menos en cierta medida la situación clínica en un organismo vivo [93, 94, 95].

La primera descripción de ratones atímicos desnudos fue presentada por Flanagan en 1966 en el Reino Unido. Este descubrimiento se realizó en un conjunto de ratones albinos. Posteriormente describió sus rasgos fenotípicos y genéticos. El efecto de la falta visible de pelo se debe a un nuevo gen recesivo (localizado en el cromosoma 11), al que llamó desnudo (cuya abreviatura es *nu*, a menudo se usa para describir el gen o la combinación de alelos *nu/nu*) [96].

Un aspecto muy importante es que la falta de timo en los ratones desnudos causa una deficiencia de células T [97]. El tipo específico de inmunidad mediada por células T es destruir las células infectadas o células malignas. Los linfocitos T son responsables de la reacción del huésped frente al injerto, que ocurre cuando un huésped rechaza un alotrasplante o xenotrasplante [96]. Por lo tanto, la deficiencia de linfocitos T compromete inmunológicamente considerablemente a los ratones y permite el trasplante, así como su crecimiento y, finalmente, la metástasis de las células tumorales del xenotrasplante. En comparación con otros ratones desnudos o ratones inmunodeficientes, el BALB/c-nu tiene una tasa relativamente alta de formación de tumores [96].

En el método experimental de xenotrasplantes existen tres modelos básicos de inducción tumoral. Estos se clasifican de acuerdo con la administración de las células cancerosas a los sujetos de experimentación. En el modelo ortotópico, las células se implantan quirúrgicamente o se inyectan en el sitio de origen del tumor. En el modelo heterotópico, las células se inyectan en un espacio subcutáneo. En el modelo metastásico, las células tumorales se inyectan en la vena lateral de la cola del ratón o en la zona intracardiaca [96].

Al final del tratamiento, se sacrifican los animales, se extraen los tumores y se pesan. Para evaluar la posible actividad anticancerosa de una sustancia, se pueden establecer varios puntos finales, como un cambio en la tasa de crecimiento tumoral, retraso en el crecimiento, supervivencia celular o niveles de marcador sustituto apropiado como PCNA y PARP-1.

2.10.3 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares se refieren a proteínas específicas u otros factores cuya presencia en células en proliferación, división activa o muerte celular sirve como un indicador de células tumorales. Uno de los marcadores moleculares que se revelan por técnicas inmunohistoquímicas es el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Por otro lado, en diversos estudios se ha utilizado como indicador de muerte celular por apoptosis al marcador Poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) escindido.

2.10.3.1 Antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA)

El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) es un marcador del ciclo celular, ampliamente utilizado en clínica. Esta proteína fue identificada por primera vez en 1978 y se le dio este nombre porque se observó en el núcleo de las células en división [98]. Dos años después, otro grupo identificó una proteína ácida con diferente expresión durante el ciclo celular, la denominó ciclina y otros experimentos revelaron que PCNA y ciclina eran la misma proteína [98].

Este marcador de proliferación juega papeles importantes en el metabolismo del ácido nucleico. Su función principal es la replicación del ADN, pero también participa en la reparación de la escisión del ADN, el control del ciclo celular, el ensamblaje de la cromatina y la transcripción del ARN [99].

El PCNA tiene importancia significativa en la clínica, el hecho de que la expresión celular de PCNA esté significativamente elevada durante las fases S y G2 del ciclo celular, pero muy baja en células inactivas, hace de esta proteína un buen marcador de proliferación celular. La tinción inmunohistoquímica de PCNA se ha utilizado ampliamente en el diagnóstico y pronóstico del cáncer [100].

2.10.3.2 Poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1)

PARP-1 es la enzima poli (ADP-ribosilación) más conocida, que desempeña una modificación postraduccional de proteínas implicadas en procesos como la muerte celular [101].

PARP-1, es un sensor de ADN y utiliza βNAD^+ para formar polímeros de ADP-ribosa que se unen además a los aceptores de proteínas nucleares. Para regular estrictamente el recambio de poli (ADP-ribosa), su degradación está asegurada por la enzima poli (ADP-ribosa) glicohidrolasa (PARG). Durante la apoptosis, PARP-1 juega dos roles opuestos: su estimulación conduce a la síntesis de poli (ADP-ribosa), mientras que las caspasas causan la escisión e inactivación de PARP-1. La proteólisis de PARP-1 produce un fragmento C-terminal de 89 kDa, con una actividad catalítica reducida, y un péptido N-terminal de 24 kDa, que retiene los dominios de unión al ADN [101, 102].

III. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

De acuerdo con la OMS, el cáncer es una de las 10 principales causas de defunción, responsable de más de 18 millones de muertes al año. A pesar de que hoy en día se cuenta con varios fármacos anticancerosos, desafortunadamente muchos de ellos inducen efectos colaterales intensos en los pacientes. Adicionalmente la toxicidad que presentan varios fármacos anticancerosos su actividad terapéutica es baja y en ocasiones nula. Por lo que surge la necesidad de utilizar todas las alternativas posibles para generar nuevos agentes anticancerosos, un buen ejemplo de ello son los productos naturales. Actualmente en la clínica existen quimioterapias con productos naturales o derivados de estos, como el taxol aislado de *Taxus brevifolia* o los alcaloides de la vinca aislados de *Catharanthus roseus*. Por lo anterior, la búsqueda de fármacos anticancerosos a partir de moléculas de origen vegetal es una actividad permanente [14, 106, 109]. Por ejemplo, nuestro grupo ha informado de la actividad citotóxica a líneas de cáncer humano, así como la potente actividad antiinflamatoria del peniocerol, un fitoesterol aislado de *Myrtillocactus geometrizans*.

IV. HIPÓTESIS

Se sabe que la inflamación crónica es un precursor de la tumorigénesis, asimismo es conocido que algunos fitoesteroles antiinflamatorios han presentado actividad antitumoral en experimentos *in vivo*, por lo que es factible que el peniocerol, el cual posee una actividad antiinflamatoria potente *in vivo*, pudiera presentar actividad antitumoral *in vivo*.

V. OBJETIVOS

5.1 General:

Evaluar la actividad antitumoral *in vivo* del peniocerol aislado de *Myrtillocactus geometrizans*.

5.2 Específicos:

- Aislar y purificar el peniocerol a partir de la corteza de *Myrtillocactus geometrizans*.
- Evaluar la actividad citotóxica del peniocerol en las líneas celulares de cáncer de colon (HCT-116, HCT-15 y SW-620), mama (MDA-MB-231) así como en la no cancerosa de mama (MCF-10A). Todas las líneas celulares son de origen humano.
- Evaluar mediante citometría de flujo la inducción de apoptosis como posible mecanismo de muerte celular inducida por el peniocerol.
- Evaluar la actividad citotóxica de la combinación de peniocerol y antioxidantes en las líneas de cáncer de colon (HCT-116) y de mama (MDA-MB-231).
- Determinar la toxicidad del peniocerol en ratones de las cepas *nu/nu*.
- Evaluar la actividad antitumoral del peniocerol en modelos *in vivo* de cáncer de colon.
- Determinar un posible mecanismo de inhibición del crecimiento tumoral en los tejidos de tumores extraídos, mediante la presencia de marcadores moleculares detectados por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.

VI. METODOLOGÍA

6.1. Aislamiento de peniocerol

El peniocerol se aisló de *Myrtillocactus geometrizans* una cactácea que crece abundantemente en la región central de México. *M. geometrizans* se colectó en los alrededores del municipio San Juan del Rio en el estado de Querétaro. Para su procesamiento se separó la raíz de la parte aérea. La corteza de la raíz fue separada y secada a temperatura ambiente durante 48 horas. El material vegetal fue triturado y sometido a maceración consecutiva con hexano, acetato de etilo y metanol. La destilación a presión reducida, mediante el uso de un rotavapor, de los disolventes permitió obtener los respectivos extractos. La destilación del disolvente del extracto indujo la precipitación del peniocerol. La purificación del peniocerol se logró mediante cristalizaciones repetidas con hexano (Figura 16). La identificación del peniocerol se realizó mediante análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono 13.

Para la extracción se utilizaron disolventes de grado industrial que fueron destilados en el laboratorio. Los reactivos empleados para la purificación, análisis fueron de grado reactivo analítico (Sigma).

6.2. Líneas y cultivos celulares

Para los experimentos *in vitro* se utilizaron las células de carcinoma de colon: HCT-15, HCT-116 y SW-620. Así como las células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 y células no tumorigénicas de mama humano MCF-10A. Todas las líneas celulares fueron obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC). Las células fueron cultivadas en medio (DMEM, DMpQ8-1L): suplementado con 10% de suero fetal bovino (S1810), 100 UI de penicilina/mL, y 100 g de estreptomycin/mL, DMEM para las líneas de adenocarcinoma de colon y mama; DMEM/F12 suplementado hidrocortisona (0.4 µg/µL), EGF (20 ng/µL) e insulina (100 mu/µL) para MCF-10A, en condiciones de temperatura controlada a 37°C, 5% de CO₂ y 95% humedad. Se utilizó tripsina (15400054) fue utilizado para la remoción celular.

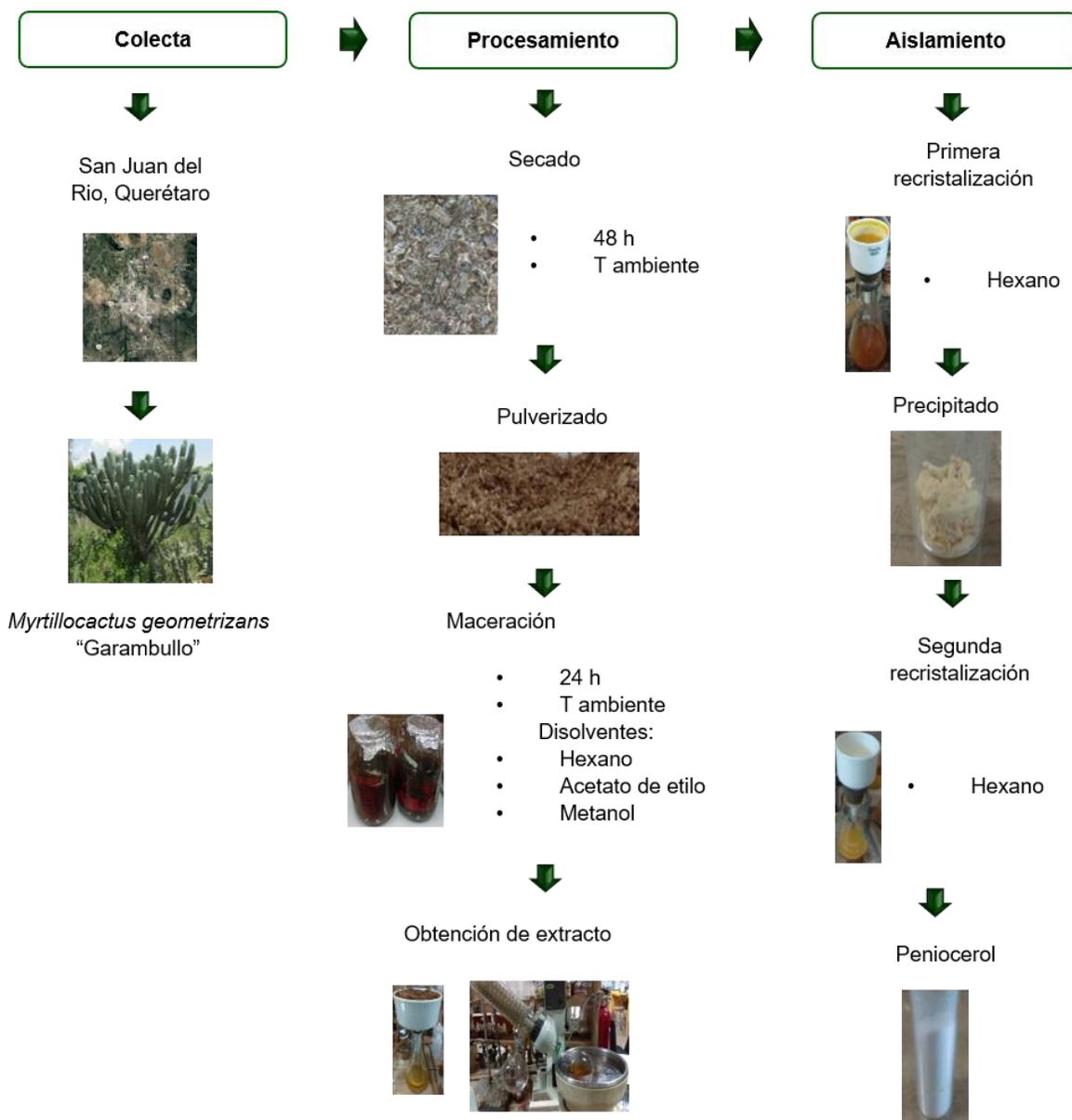


Figura 16. Esquema representativo del aislamiento del peniocerol.

6.3 Animales

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron ratones de la cepa *nu/nu*, de 6 a 8 semanas de edad y alimento *ad libitum*. Los animales fueron mantenidos en microaisladores libres de patógenos, a temperatura ambiente de 22°C, humedad relativa de 55% y ciclos de luz oscuridad 12/12h. El comité de investigación Animal aprobó los procedimientos experimentales, que fueron realizados de acuerdo con las guías

para el cuidado y el uso de animales del Laboratorio Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México.

6.4. Soluciones

Para los experimentos *in vitro* se preparó una solución concentrada de 25 mg/mL de peniocerol disuelta en (Dimetilsulfóxido) DMSO (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA. Cat. D-4540-100mL) y una solución de cisplatino (Sigma-Aldrich dicloruro de *cis*-diaminaplato (II) 479306-5G) de 1 mg/kg, las cuales fueron almacenadas a -20°C. Las diluciones seriadas de peniocerol (80, 40, 20 y 10 µM) se prepararon con el medio correspondiente y la concentración de DMSO fue menor al 0.2%. Las diluciones seriadas de cisplatino (10, 5, 2.5 y 1.25 µM) se prepararon en el medio correspondiente. Para los experimentos *in vivo* se prepararon soluciones concentradas de 25 mg/mL disuelto en DMSO al 5% y aceite de ajonjolí y cisplatino 10 mg/kg en solución salina. Todas las soluciones fueron preparadas el día de la administración.

6.5. Evaluación de la actividad citotóxica

La actividad citotóxica del peniocerol y los controles se evaluaron mediante el ensayo de cristal violeta. Las células de cáncer de colon (HCT-15, HCT-116 y SW-620), de cáncer de mama (MDA-MB-231), y las no tumorigénicas de mama humano (MCF-10A) fueron sembradas en placas de 48 pozos con una densidad de 4×10^4 células por cm^2 en su respectivo medio. Las células fueron incubadas por 24 horas en una atmosfera de 5% de CO_2 y 95% de humedad a 37°C. Posterior a las 24 horas las células fueron tratadas con concentraciones seriadas de 80, 40, 20 y 10 µM de peniocerol.

La viabilidad celular se evaluó a las 24, 48 y 72 horas después del tratamiento con los compuestos. Después de la incubación con los diferentes tratamientos, las células adheridas a los pozos fueron fijadas con DMEM/F12, SFB 2% y glutaraldehído 1.1% por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, a las células se les retiró el medio de fijación, se dejaron secar, fueron teñidas con 200

μL de cristal violeta por 15 minutos, se retiró el cristal violeta y finalmente la proteína teñida fue solubilizada con 500 μL de ácido acético al 10 %.

Los valores de densidad óptica fueron obtenidos en un lector de microplacas a una longitud de onda de 595 nm. Una curva dosis respuesta fue graficada para cada compuesto y la IC_{50} fue estimada usando el programa estadístico Excel mediante una regresión lineal.

6.6. Evaluación de la inducción de apoptosis

El ensayo de inducción de apoptosis del peniocerol y los controles se llevó a cabo mediante citometría de flujo con la identificación de los marcadores Anexina V y yoduro de propidio. Las células de cáncer de colon (HCT-116) y cáncer de mama (MDA-MB-231) fueron sembradas en placas de 6 pozos con una densidad de 1.5×10^5 células por pozo. Las células fueron incubadas por 24 horas en una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de humedad a 37°C . Posterior a las 24 horas las células fueron tratadas con vehículo, peniocerol (20 μM) y camptotecina (2 μM) como control positivo (cada tratamiento se realizó por triplicado), a diferentes tiempos (24, 48 y 72 hr), posterior a los tiempos de incubación, las células fueron cosechadas con tripsina, lavadas con PBS y centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. El agregado de células fue re-suspendido en 500 μL de buffer, posteriormente se agregaron 5 μL de Anexina V-FITC, 5 μL de yoduro de propidio y finalmente se incubaron por 5 minutos, de acuerdo con las recomendaciones de GeneTex Annexin V-FITC Apoptosis detection kit. Las células fueron analizadas utilizando un citómetro de flujo FACS Can del Laboratorio Nacional de Citometría de flujo, 10000 células fueron analizadas con el programa BD Cell Quest Pro Software.

6.7 Evaluación de la actividad citotóxica en presencia de antioxidantes

Las líneas celulares de cáncer de colon HCT-116 y de mama MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 48 pozos con una densidad de 5×10^4 células por cm^2 en su respectivo medio. Las células fueron incubadas por 24 horas en una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de humedad a 37°C . Posterior a las 24 horas las células fueron

tratadas con concentraciones seriadas de 80, 40, 20 y 10 μM de peniocerol cada una con la adición de diversos antioxidantes, el sintético ditioneitol (DTT) (0.125 mM) y el ácido norhidroguayarético aislado de *Larrea tridentata* ácido norhidroguayarético (ANDG) (5 μM), por separado.

La viabilidad celular se evaluó a las 48 horas después del tratamiento con los compuestos. Después de la incubación con los diferentes tratamientos, las células adheridas a los pozos fueron fijadas con DMEM, SFB 2% y glutaraldehído al 1.1% por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, a las células se les retiró el medio de fijación, se dejaron secar, fueron teñidas con 200 μL de cristal violeta por 15 minutos, se retiró el cristal violeta y finalmente la proteína teñida fue solubilizada con 500 μL de ácido acético al 10%.

Los valores de densidad óptica fueron obtenidos en un lector de microplacas a una longitud de onda de 595 nm. Una curva dosis respuesta fue graficada para cada compuesto y la IC_{50} fue estimada usando el programa estadístico Excel mediante una regresión lineal.

6.8 Evaluación de la toxicidad en ratones *nu/nu*

Para la determinación de la dosis letal media (DL_{50}) mediante la fórmula $\text{DL}_{50} = (\text{M}_0 + \text{M}_1)/2$ donde M_0 es la dosis que no causa muerte en ningún ratón del grupo y M_1 es la dosis que causa la muerte de al menos un ratón del grupo [103] y dos esquemas distintos de tratamientos. Los ratones fueron administrados de forma intraperitoneal, como se explica en la Figura 17. El peso y conducta de los ratones fueron monitoreados cada tercer día, durante el tratamiento. Los ratones fueron sacrificados el día 21 de la evaluación. Se realizaron análisis de sangre en el Departamento de Patología de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4. Control positivo: 2 mg/kg de cisplatino, tres veces por semana.
5. Peniocerol 1: 30 mg/kg una vez por semana.
6. Peniocerol 2: 15 mg/kg una vez por semana.
7. Peniocerol 3: 15 mg/kg tres veces por semana.

Se monitoreó el peso de los ratones, así como también el crecimiento tumoral mediante la medición con un calibrador (Vernier digital) tres veces por semana. El volumen tumoral fue calculado usando la formula $V = \pi/6 \times (\text{diámetro mayor} \times [\text{diámetro menor}]^2$ [104].

El experimento se llevó a cabo durante 21 días, al final del experimento, los animales fueron pesados, sacrificados y los tumores fueron extraídos y embebidos en formaldehído al 10%.

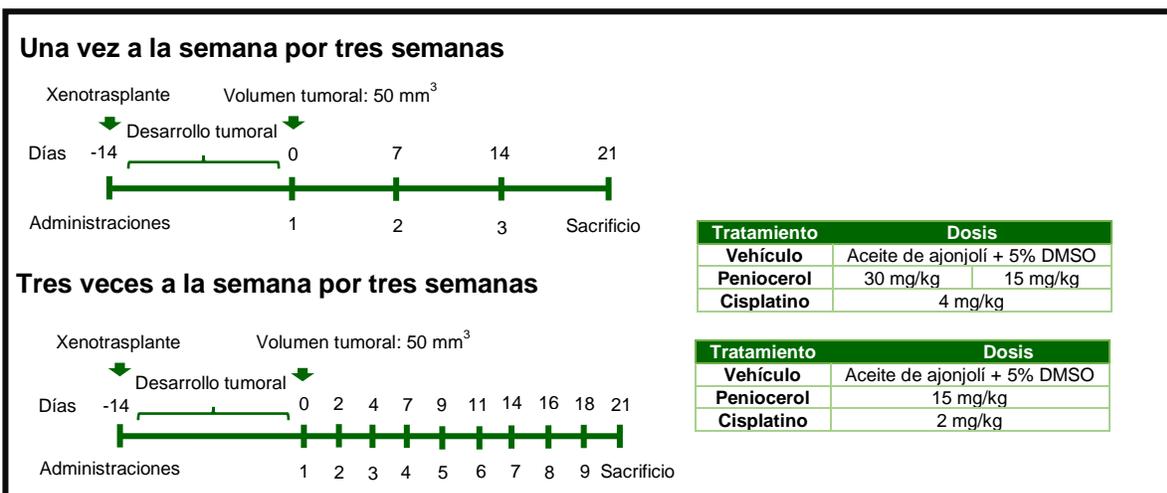


Figura 18 Esquemas de tratamientos para la evaluación antitumoral en ratones de la cepa *nu/nu*.

6.10. Análisis de los tumores tratados con peniocerol

La tinción con hematoxilina-eosina e inmunofluorescencia 4',6-diamidino2-fenilindol se llevaron a cabo en secciones histológicas 5 µm obtenidos a partir de cortes de los tumores tratados.

6.10.1 Tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E)

La observación de la estructura tisular se realizó mediante la técnica de tinción con hematoxilina-eosina (H-E). Las secciones histológicas fueron expuestas a una temperatura de 60°C por 15-30 minutos y rehidratadas con las siguientes soluciones por 5 minutos: xilol (x2), etanol/xilol 50:50, etanol 100%, etanol 96%, etanol 80%, etanol 70%, etanol 50%, agua destilada y PBS. La membrana celular fue subsecuentemente permeabilizada con una disolución de Tritón x-100 al 0.5% durante 30 minutos, seguido de 2 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Se agregó hematoxilina 150 µL a la muestra por 2 minutos, se lavó con agua destilada y se cubrió con eosina durante 20 segundos, se lavó con agua destilada y se realizó el montaje. Las muestras fueron analizadas en un Microscopio invertido Olympus IX71, se capturaron las imágenes mediante el programa QImaging en la Unidad de microscopía del Instituto de investigaciones Biomédicas de la UNAM.

6.10.2 Evaluación de núcleos apoptóticos por tinción con 4',6-diamidino2-fenilindol (DAPI)

La visualización de la muerte celular ocasionada por el peniocerol se logró mediante la visualización de núcleos fragmentados/ condensados mediante tinción con 4',6-diamidino2-fenilindol (DAPI). Las secciones histológicas fueron expuestas a una temperatura de 60°C por 15-30 minutos y se rehidrataron por 5 minutos, con las siguientes soluciones: xilol (x2), etanol/xilol 50:50, etanol 100%, etanol 96%, etanol 80%, etanol 70%, etanol 50%, agua destilada y PBS. La membrana celular fue subsecuentemente permeabilizada con una disolución de Tritón x-100 al 0.5% durante 30 minutos, seguido de 2 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. El kit

utilizado fue medio de montaje Vectashield para fluorescencia con DAPI de Vector Laboratories.

6.10.3 Determinación del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA)

Para determinar si el efecto de inhibición del crecimiento tumoral del peniocerol era debido a un efecto antiproliferativo se realizó el ensayo de inmunohistoquímica del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA). Las secciones histológicas fueron expuestas a una temperatura de 60°C por 15-30 minutos y se rehidrataron por 5 minutos, con las siguientes soluciones: xilol (x2), etanol/xilol 50:50, etanol 100%, etanol 96%, etanol 80%, etanol 70%, etanol 50%, agua destilada y PBS. La membrana celular fue subsecuentemente permeabilizada con una disolución de Tritón x-100 al 0.5% durante 30 minutos, seguido de 2 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. La exposición del antígeno se llevó a cabo calentando las muestras hasta ebullición en una solución de citrato de sodio 0.25mM a pH. 6.2 por 20 minutos. Después se dejan a T° ambiente por 20 minutos y se hacen 2 lavados de PBS por 5 minutos. La peroxidasa endógena se bloqueó, exponiendo los tejidos a 3% H₂O₂ por 30 minutos, seguido de 2 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. La permeabilización de la membrana se realizó con una disolución de Tritón x-100 al 0.5% durante 30 minutos, seguido de 2 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Posteriormente, se bloqueó la señal inespecífica, delimitaron el área de las muestras previamente con un lápiz de cera, el bloqueo se realizó con H₂O₂ al 1% + albumina al 5%, en PBS durante 30 minutos, seguido de 1 lavado con PBS de 5 minutos. Se incubó con el anticuerpo primario, para lo cual se utilizó el anticuerpo anti-PCNA, adquirido de las compañías PCNA (sc-25280, Santa Cruz Biotechnology, INC). La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C, seguido de 2 lavados con PBS cada uno de 5 minutos. La incubación con el anticuerpo secundario por 60 m a 37°C (anti-mouse IgG para PCNA, GTX77315, GeneTex). El revelado, la detección de las señales inmunohistoquímicas se realizó con diaminobenzidina (DAB) por 10 minutos, se removió el excedente con agua destilada. La contratinción: con el fin de diferenciar los núcleos marcados con productos inmunoreactivos o con hematoxilina; se realizó una tinción con

hematoxilina de Harris durante 3 a 5 minutos en cada tejido, posteriormente se removió el excedente con agua destilada. Se cubrió con Li_2CO_3 durante 15 segundos, posteriormente se removió el excedente con agua destilada. Y una vez que las muestras se secan por completo, se realizó el montaje con EcoMount de Biocare Medical y se cubrió con un cubreobjetos. Para el análisis cualitativo de células positivas a PCNA se llevó a cabo mediante el paquete de procesamiento de imagen ImageJ-win64 [100].

6.10.4 Determinación de la poli [ADP-ribosa] polimerasa 1 (PARP-1)

Para determinar si el efecto de inhibición del crecimiento tumoral del peniocerol era debido a un efecto apoptótico se realizó el ensayo de inmunohistoquímica de PARP-1. Las secciones histológicas fueron expuestas a una temperatura de 60°C por 15-30 minutos y se rehidrataron por 5 minutos, con las siguientes soluciones: xilol (x2), etanol/xilol 50:50, etanol 100%, etanol 96%, etanol 80%, etanol 70%, etanol 50%, agua destilada y PBS. La membrana celular fue subsecuentemente permeabilizada con una disolución de Tritón x-100 al 0.5% durante 30 minutos, seguido de 2 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. La exposición del antígeno se llevó a cabo calentando las muestras hasta ebullición en una solución de citrato de sodio 0.25mM a pH. 6.2 por 20 minutos. Después se dejan a T° ambiente por 20 minutos y se hacen 2 lavados de PBS por 5 minutos. La peroxidasa endógena se bloqueó, exponiendo los tejidos a 3% H_2O_2 por 30 minutos, seguido de 2 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. La permeabilización de la membrana se realizó con una disolución de Tritón x-100 al 0.5% durante 30 minutos, seguido de 2 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Posteriormente, se bloqueó la señal inespecífica, delimitaron el área de las muestras previamente con un lápiz de cera, el bloqueo se realizó con H_2O_2 al 1% + albumina al 5%, en PBS durante 30 minutos, seguido de 1 lavado con PBS de 5 minutos. Se incubó con el anticuerpo primario, para lo cual se utilizó el anticuerpo anti-PARP-1, adquirido de las compañías PARP-1 (anti-mouse IgG for PARP-1, GTX77315, GeneTex). La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C , seguido de 2 lavados con PBS cada uno de 5 minutos. La incubación con el anticuerpo secundario por 60 m a 37°C (anti-mouse IgG para PARP-1,

GTX77315, GeneTex). El revelado, la detección de las señales inmunohistoquímicas se realizó con diaminobenzidina (DAB) por 10 minutos, se removió el excedente con agua destilada. La contratinción: con el fin de diferenciar los núcleos marcados con productos inmunoreactivos o con hematoxilina; se realizó una tinción con hematoxilina de Harris durante 3 a 5 minutos en cada tejido, posteriormente se removió el excedente con agua destilada. Se cubrió con Li_2CO_3 durante 15 segundos, posteriormente se removió el excedente con agua destilada.

Las muestras secas se colocaron con EcoMount de Biocare Medical y se cubrió con un cubreobjetos. Para el análisis cualitativo de células positivas a PCNA se llevó a cabo mediante el paquete de procesamiento de imagen ImageJ-win64 [105].

6.11 Análisis estadístico

Los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado o sextuplicados. Los datos son representados como la media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticas fueron determinadas usando el software GrapdPAd Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Comparación entre los tratamientos con peniocerol y los grupos controles fue realizado con la prueba t-test unpaired y de ANOVA de dos vías. Una diferencia estadística de $*P < 0.05$ fue considerada significativa.

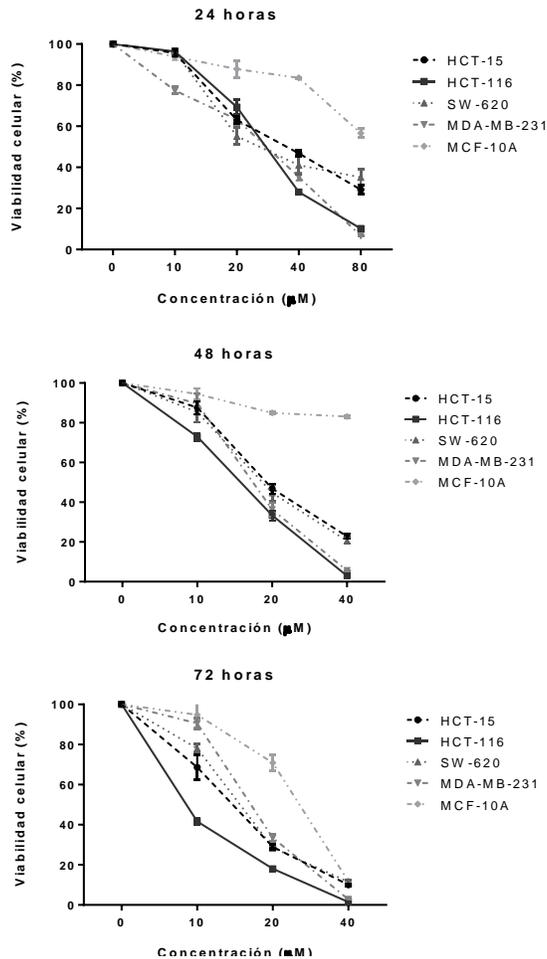
VII. RESULTADOS

7.1 Obtención del peniocerol

El peniocerol fue aislado a partir del extracto de acetilo de la corteza de la raíz de *Myrtillocactus geometrizans*. El material vegetal pulverizado inicial fue 3.016 kg pulverizado, lo que proporciono 203.8531 g de extracto de acetato de etilo y 6.5089 g de peniocerol. El fitoesterol fue purificado al 99% y su identificación se realizó mediante la comparación de del punto de fusión y resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C , previamente reportadas por Salazar *et al.*, 2010. El peniocerol puro total obtenido fue 6.3419 g.

7.2 Evaluación de la actividad citotóxica del peniocerol

Para la evaluación del efecto citotóxico del peniocerol en las líneas de cáncer de colon HCT-15, HCT-116, SW-620 y de mamá MDA-MB-231, así como la no tumorigénica de mama MCF-10A, se realizó el ensayo de cristal violeta. Las curvas de viabilidad celular (%) con respecto a la concentración (μM) del peniocerol en las diferentes líneas celulares a 24, 48 y 72 horas fueron graficadas y se determinaron las CI_{50} (Figura 19). La línea celular más susceptible al peniocerol fue la HCT-116 a los tres tiempos, en comparación con las otras líneas, por lo que la línea celular HCT-116 fue utilizada para los subsecuentes experimentos *in vivo*. Por otro lado, la línea celular menos susceptible al peniocerol fue la no tumorigénica MCF-10A.



CI ₅₀ (µM) 24 horas		
Línea celular	Tratamiento	
	Penicicero	Cisplatino
HCT-15	48.89±0.95	12.14±0.5
HCT-116	39.14±0.1	2.87±0.3
SW-620	47.19±0.31	13.58±0.4
MDA-MB-231	35.82±0.42	16.87±0.7
MCF-10A	96.05±5.02	18.37±0.5

CI ₅₀ (µM) 48 horas		
Línea celular	Tratamiento	
	Penicicero	Cisplatino
HCT-15	34.72±0.4	8.54±0.3
HCT-116	18.68±0.35	0.87±0.1
SW-620	23.10±0.18	10.14±0.9
MDA-MB-231	20.75±0.16	4.03±0.1
MCF-10A	58.19±2.01	12.37±0.9

CI ₅₀ (µM) 72 horas		
Línea celular	Tratamiento	
	Penicicero	Cisplatino
HCT-15	23.57±0.19	3.46±0.8
HCT-116	13.20±0.004	0.34±0.05
SW-620	19.59±0.1	4.32±0.5
MDA-MB-231	19.97±0.23	1.34±0.9
MCF-10A	34.57±1.58	9.34±0.7

Figura 19 Actividad citotóxica del penicicero en las líneas celulares de cáncer de colon HCT-15, HCT-116, SW-620, de mama MDA-MB-231 y no cancerosa MCF-10A. Gráficos de viabilidad celular representados en porcentaje con respecto a las concentraciones (µM) ascendentes de penicicero en diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas), con sus respectivas tablas que muestran la CI₅₀ (µM) en cada línea celular del penicicero y cisplatino como control positivo. Las barras en los gráficos representan la desviación estándar de tres experimentos independientes por cuadruplicado y en las tablas se representan los promedios ± DE de tres experimentos independientes por cuadruplicado.

7.3 Evaluación de la inducción de apoptosis por el penicicero

La muerte celular por apoptosis fue evaluada mediante citometría de flujo y utilizando la tinción de AV/IP. Las evaluaciones se realizaron en las líneas celulares HCT-116 y MDA-MB-231 las cuales fueron incubadas con 20 µM de penicicero durante 48 y 72 horas.

En la Figura 20 se puede observar que, a mayor tiempo de tratamiento de peniocerol, mayor es la inducción de apoptosis en las HCT-116 con respecto a las células tratadas con vehículo, las células apoptóticas se incrementan después de las 72 horas de tratamiento.

Sin embargo, el análisis citométrico revela que el tratamiento con peniocerol induce presencia de células necróticas. Por lo que, considerando las células necróticas y apoptóticas, como el porcentaje total de células muertas, las células muertas a las 48 y 72 horas fueron de $80.05 \pm 0.26\%$ y $89.78 \pm 0.26\%$, respectivamente, lo cual demuestra que la muerte celular por peniocerol es mayor que la inducida por camptotecina el fármaco de referencia.

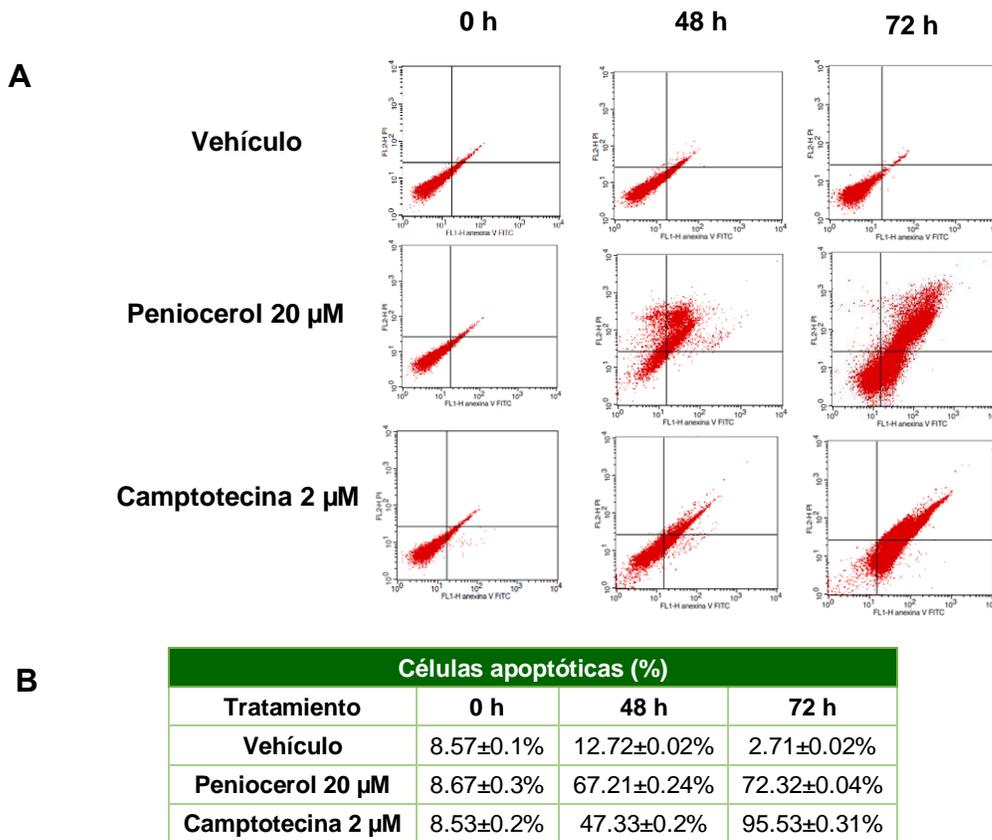


Figura 20 Inducción de apoptosis por peniocerol en la línea celular HCT-116 a 0, 48 y 72 horas. Los ensayos se realizaron mediante citometría de flujo con los marcadores Anexina V/Yoduro de propidio (AV/IP). A) Representaciones gráficas de puntos de células HCT-116 tratadas con vehículo, peniocerol 20 μM y camptotecina 2 μM. B) Tabla de porcentajes de células en apoptosis inducida por peniocerol. Los números representan el promedio de tres experimentos independientes ± DE.

En la Figura 21 se puede observar un comportamiento similar al de las HCT-116 en las MDA-MB-231 tratadas con penicero, a mayor tiempo de exposición del compuesto, mayor es la inducción de apoptosis con respecto a las células tratadas con vehículo. Las células apoptóticas incrementan de $32.4 \pm 3.5\%$ a las 48 horas a $90.1 \pm 1.6\%$ después de las 72 horas de tratamiento. También revela que el tratamiento con penicero induce necrosis, siendo el porcentaje de células muertas a las 48 horas de $62.47 \pm 4.12\%$, por lo que la muerte celular por penicero en esta línea celular es mayor que la inducida por camptotecina.

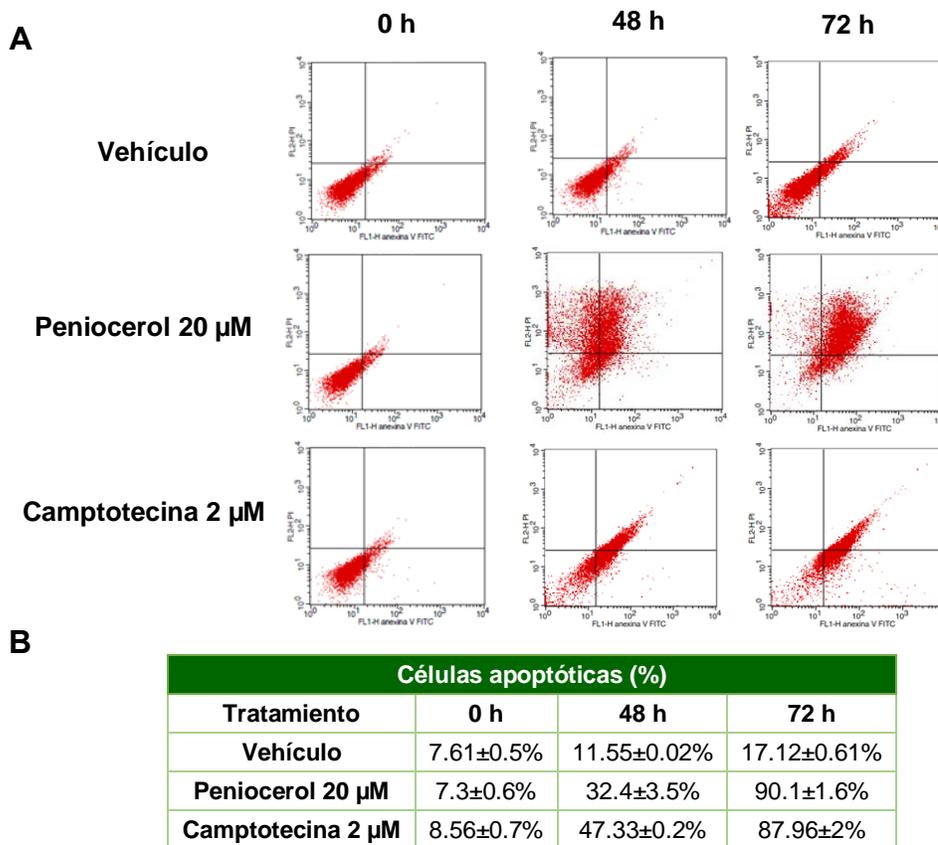


Figura 21 Inducción de apoptosis por penicero en la línea celular MDA-MB-321 a 0, 48 y 72 horas. Los ensayos se realizaron mediante citometría de flujo con los marcadores Anexina V/Yoduro de propidio (AV/IP). A) Representaciones gráficas de puntos de células HCT-116 tratadas con vehículo, penicero 20 μM y camptotecina 2 μM . B) Tabla de porcentajes de células en apoptosis inducida por penicero. Los números representan el promedio de tres experimentos independientes \pm DE.

7.4 Evaluación de la actividad citotóxica del peniocerol en presencia de un antioxidante

Mediante el ensayo de cristal violeta se evaluó si el efecto citotóxico del peniocerol en las líneas celulares HCT-116 y MDA-MB-231 era mayor o menor en combinación con un antioxidante. En la Figura 22 se grafica la viabilidad celular (%) con respecto a la concentración (μM) ascendente del peniocerol en adición de un antioxidante sintético (DTT) o un producto natural (ANDG), las concentraciones de los antioxidantes fueron 0.125 mM y 5 μM , respectivamente. Ninguna de las concentraciones utilizadas de los antioxidantes mostró actividad citotóxica. En las tablas se muestran las CI_{50} de todos los tratamientos.

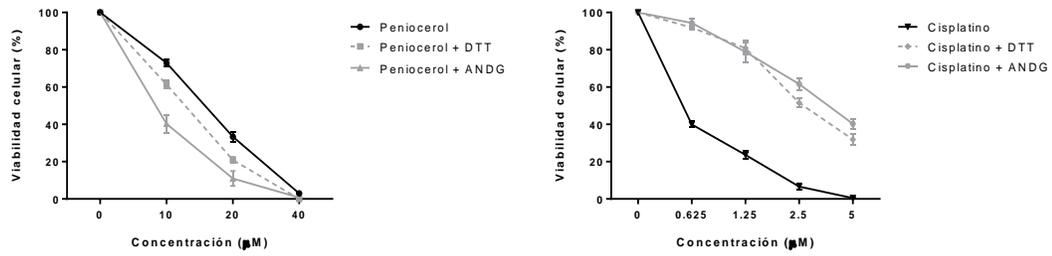
Los resultados muestran que, en presencia del antioxidante, ya sea DTT o ANDG el efecto del peniocerol mejora en ambas líneas celulares, caso contrario ocurre con el cisplatino que, en adición de un antioxidante, su actividad disminuye.

7.5 Evaluación de la toxicidad del peniocerol en ratones de la cepa *nu/nu*

La dosis letal media (DL_{50}) del peniocerol en ratones *nu/nu* se determinó utilizando la dosis de 125 mg/kg y 62.5 mg/kg. Tomando en cuenta la fórmula matemática de Chinedu *et al*, 2013 en la cual se calcula la DL_{50} mediante el producto de la suma de la dosis que le causó la muerte a por lo menos un ratón del grupo más la dosis que no le quitó la vida a ningún ratón. Los datos experimentales indicaron una DL_{50} de 93.75 mg/kg para el peniocerol en ratones *nu/nu*.

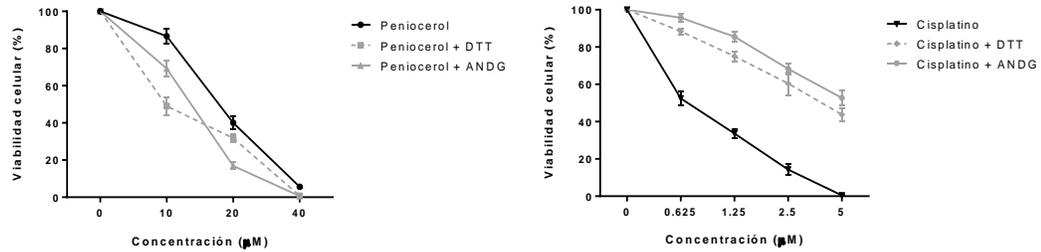
El peniocerol a dosis mayores de 93.75 mg/kg es tóxico, como se puede observar en la Tabla 13. Tomando en cuenta lo anterior se buscó las dosis que no ocasionaran ningún daño tóxico en los ratones, en los esquemas de administración que serían posteriormente utilizados en los modelos de xenotrasplantes.

A



Tratamiento	CI ₅₀ (µM)		
	Sin antioxidante	+ DTT	+ ANDG
Penicerozol	20.75±0.16	15.51±0.49****	16.18±0.27****
Cisplatino	1.24±0.04	4.03±0.1****	5.0±0.038****

B



Tratamiento	CI ₅₀ (µM)		
	Sin antioxidante	+ DTT	+ ANDG
Penicerozol	18.68±0.35	15.70±0.15****	12.27±0.85****
Cisplatino	0.87±0.1	3.39±0.03****	3.98±0.03****

Figura 22 Actividad citotóxica mejorada del penicerozol en adición de un antioxidante (DTT o ANDG) en líneas celulares de cáncer. A) HCT-116 y B) MDA-MB-231. Gráficas de la viabilidad celular representada en porcentaje con respecto a las concentraciones ascendentes de penicerozol o cisplatino en µM, con sus respectivas tablas que muestran las CI₅₀ de cada tratamiento. Las barras en las gráficas representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes por cuadruplicado y en las tablas se representan los promedios ± desviación estándar de 3 experimentos independientes por cuadruplicado. Los datos fueron analizados y comparados contra el tratamiento sin antioxidante ****p<0.0001 (t test).

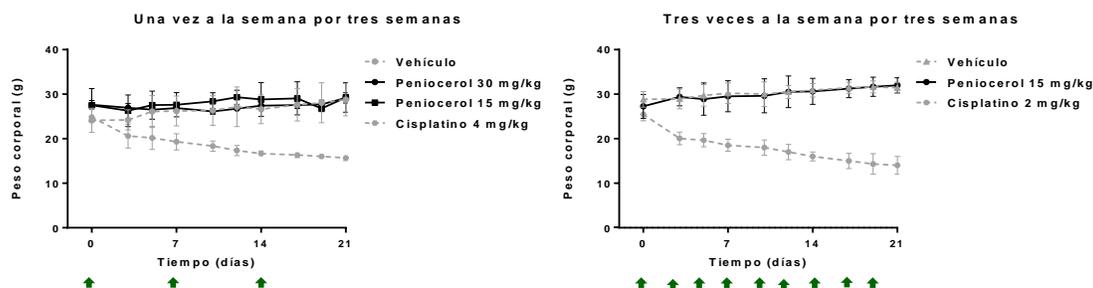
Tratamiento	Síntomas de toxicidad
Vehículo	No existió cambio en el comportamiento, ni en el peso de los ratones.
125 mg/kg	Cambio de comportamiento a los 5 minutos después de la administración. A las 3 horas: diarrea y letargo. Antes de 24 horas: muerte de tres ratones. Antes de las 48 horas: muerte de los otros dos ratones.
62.5 mg/kg	No ocasionó la muerte de ningún ratón. Cambio en su comportamiento. A las 5 horas: diarrea. Al término del experimento se observó la recuperación del peso de los ratones.

Tabla 13 Síntomas de toxicidad del penicerozol en ratones de la cepa *nu/nu* con una dosis.

Considerando que la dosis de 62.5 mg/kg de peniocerol fue la mayor dosis de este esterol que no fue tóxica, entonces se decidió utilizar la dosis de 30 mg/kg, aproximadamente 50% de la dosis de 62.5 mg/kg. También se utilizó la dosis de 15 mg/kg. Primero se evaluó el peso corporal de los ratones. En la Figura 23A se muestran los gráficos de los pesos corporales (g) con respecto al tiempo, se puede observar que no hay diferencia estadística significativa en los pesos de los ratones que fueron tratados con peniocerol a 30 y 15 mg/kg una vez a la semana durante 21 días, con respecto al vehículo. En contraste la administración de cisplatino produjo un decremento significativo en el peso corporal de los ratones comparado con el control ($p < 0.0001$). El peso de los ratones tratados con cisplatino se redujo en un 42%, lo que sugiere un efecto tóxico inducido por el cisplatino. La administración de 15 mg/kg de peniocerol tres veces a la semana durante 21 días, tampoco produce cambios en el peso corporal de los animales comparado con el control negativo. Por el contrario, cisplatino administrado en una dosis más baja de 2 mg/kg, induce decremento significativo del peso corporal comparado con el control negativo ($p < 0.0001$).

El daño potencial del peniocerol fue analizado en la salud del ratón, mediante un análisis bioquímico de sangre, incluyendo glucosa, hemoglobina, urea, creatinina, alanina transferasa y alanina transferasa y un conteo celular incluyendo leucocitos, linfocitos y eritrocitos. Los resultados son mostrados en la Figura 23B. El análisis revela que el peniocerol a esas dosis no produce ningún cambio en los componentes bioquímicos y celulares de la sangre comparado con los ratones que recibieron el vehículo. De manera contrastante, la administración de cisplatino resultó en un decremento significativo en leucocitos, linfocitos y hemoglobina ($p < 0.05$) y un incremento en la concentración de enzimas del hígado alanina transferasa y aspartato transferasa ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que el peniocerol (15 mg/kg y 30 mg/kg) no presenta toxicidad y que los ratones sanos lo toleran bien.

A



B

Análisis sistémico del penicicero en ratones <i>nu/nu</i>							
Análisis bioquímico	Referencia [110]	Vehículo	Cisplatino		Penicicero		
			4 mg/kg	2 mg/kg 3 veces/semana	15 mg/kg	30 mg/kg	15 mg/kg 3 veces/semana
Leucocitos ($\times 10^9/L$)	3.2 - 7.0	4.57 \pm 0.5	2.06 \pm 0.12*	1.61 \pm 0.23*	3.77 \pm 0.25	3.6 \pm 0.56	3.23 \pm 0.23
Linfocitos ($\times 10^9/L$)	3.16 - 7.8	3.17 \pm 0.65	0.52 \pm 0.04*	0.52 \pm 0.08*	3.58 \pm 0.39	3.37 \pm 0.25	3.57 \pm 0.21
Eritrocitos ($\times 10^{12}/L$)	7.1 - 10.2	7.17 \pm 1.04	7.37 \pm 0.46	7.14 \pm 0.26	7.43 \pm 0.45	7.23 \pm 0.85	7.63 \pm 0.32
Hemoglobina (g/L)	149 - 170	152.33 \pm 10.5	115.33 \pm 1.53	113.33 \pm 1.53	155 \pm 13	151 \pm 14.73	153 \pm 8.54
Glucosa (mmol/L)	6.6 - 8.5	7.6 \pm 1.39	8.56 \pm 0.15	7.83 \pm 0.45	7.93 \pm 0.40	8 \pm 0.8	8.17 \pm 0.49
Urea (mmol/L)	2.6 - 3.5	3.07 \pm 0.67	7.57 \pm 0.4	9.06 \pm 0.45	2.53 \pm 0.25	2.83 \pm 0.61	3.33 \pm 0.15
Creatinina (mmol/L)	8.8 - 26.5	24.33 \pm 2.08	29.06 \pm 1.9	43.33 \pm 0.68*	23.33 \pm 2.52	24.33 \pm 2.08	25 \pm 3
Alanina transferasa (U/L)	46 - 55	52.33 \pm 2.52	62.89 \pm 1.21*	75.06 \pm 1.68*	49 \pm 4.58	48.33 \pm 3.21	51.67 \pm 0.58
Aspartato transferasa (U/L)	85 - 101	92.33 \pm 2.52	151.25 \pm 1.35	197.32 \pm 1.18*	96 \pm 2	94.67 \pm 2.51	93.67 \pm 1.53

Figura 23 Toxicidad del penicicero evaluada en ratones de la cepa *nu/nu*. Esquema de tratamiento: una vez por semana durante tres semanas, las administraciones se realizaron los días 0, 7 y 14. En el esquema de tres veces por semana durante tres semanas, se realizaron administraciones, los días 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 18. En ambos esquemas, los animales fueron sacrificados el día 21. A) Gráficos de toxicidad: una vez una semana durante tres semanas, dosis de 30 mg/kg y 15 mg/kg de penicicero, 4 mg/kg de cisplatino y aceite de sésamo + DMSO 5% como vehículo; tres veces a la semana durante tres semanas, dosis de 15 mg/kg de penicicero, 2 mg/kg de cisplatino y aceite de sésamo + DMSO al 5% como vehículo. El peso de los ratones se monitoreo tres veces por semana durante tres semanas. Las flechas indican los días de administración. Los resultados mostrados son la media \pm desviación estándar de la monitorización de tres ratones. La diferencia significativa **** $p < 0,0001$ se comparó con el control negativo (prueba t). C) Tabla de análisis sistémico de penicicero en ratones administrados una vez por semana y tres veces por semana durante tres semanas. Los datos mostrados son los valores medios \pm DE de tres ratones por grupo. Diferencia significativa * $p < 0.05$ en comparación con el vehículo (prueba t).

7.6 Evaluación de la actividad antitumoral del penicicero

7.6.1 Tratamiento una vez a la semana por tres semanas

Para la prueba del efecto potencial del penicicero en el crecimiento tumoral *in vivo*, se estableció un modelo en ratones usando la línea celular HCT-116, debido a que esta línea fue la más sensible al compuesto, en comparación con las otras líneas

de colon y mama. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 50 mm³ los ratones fueron tratados con dosis de peniocerol, cisplatino o con vehículo. Como se puede ver en la Figura 23A, ambas concentraciones de peniocerol inhibieron significativamente ($p < 0.01$) del volumen tumoral al final del experimento. En la Figura 23B se puede observar la diferencia en el tamaño de los tumores. Como se esperaba, el tratamiento con cisplatino fue el que mejor efecto inhibitorio significativo del volumen tumoral ($p < 0.0001$). Finalizado el experimento los tumores fueron removidos y pesados. Los resultados presentados en la Figura 23C demuestran que peniocerol indujo una reducción en el peso tumoral de 75.2% a 76.4% cuando fueron administradas las dosis de 30 mg/kg y 15 mg/kg, respectivamente, comparado con el peso de los tratados con vehículo.

7.6.2 Tratamiento tres veces a la semana por tres semanas

Nuestros resultados sugieren que el peniocerol tiene un efecto antitumoral significativo en los ratones, así que se decidió investigar si un incremento en la frecuencia de dosis podría producir un mayor efecto. Los resultados muestran que la administración de nueve dosis de 15 mg/kg de peniocerol induce una significativa inhibición en el volumen tumoral comparado con las dosis anteriores ($p < 0.05$) (Figura 25A). Sin embargo, no se alcanzó los niveles de inhibición producida por los tratamientos con cisplatino (Figura 25B, C).

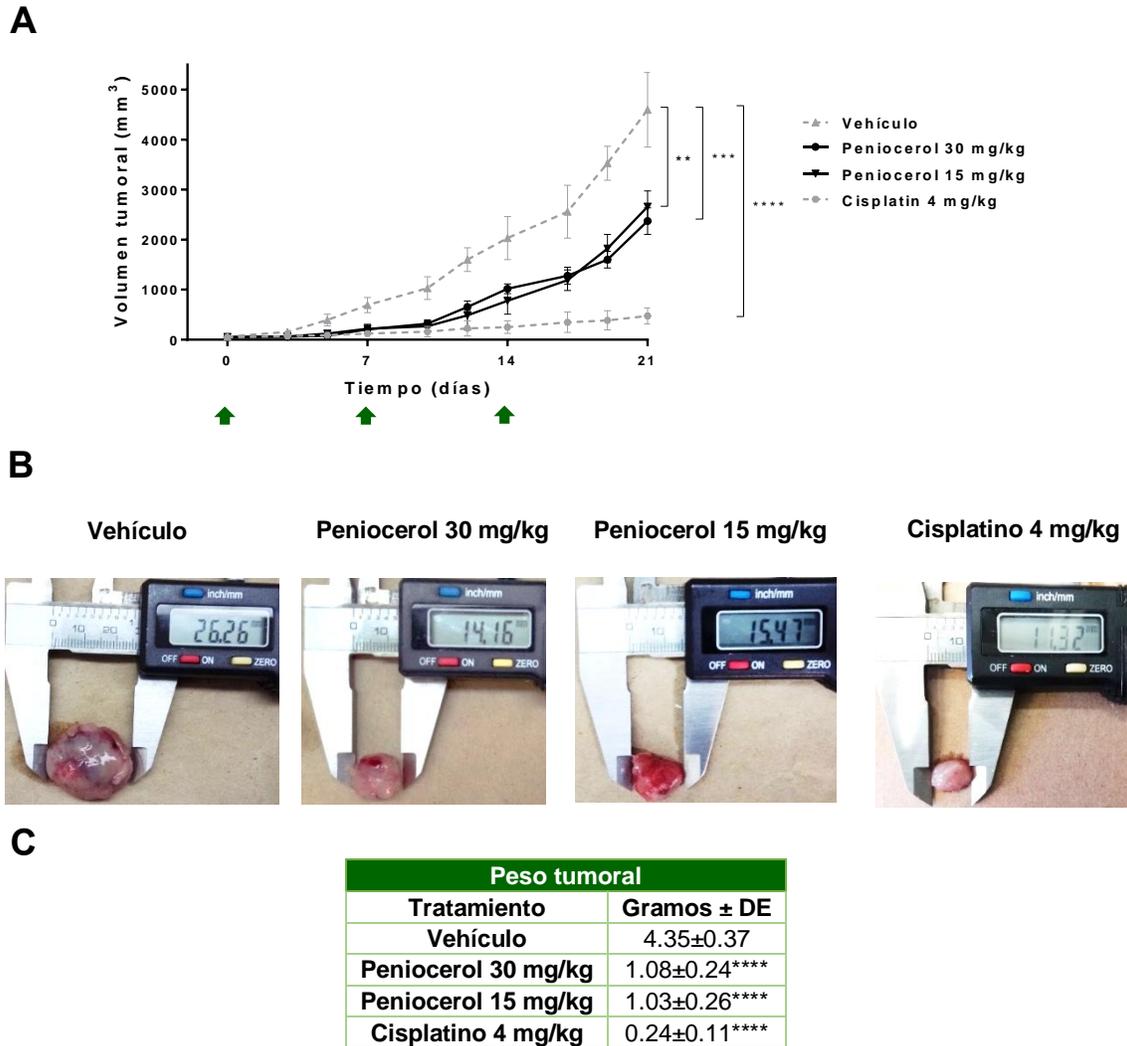
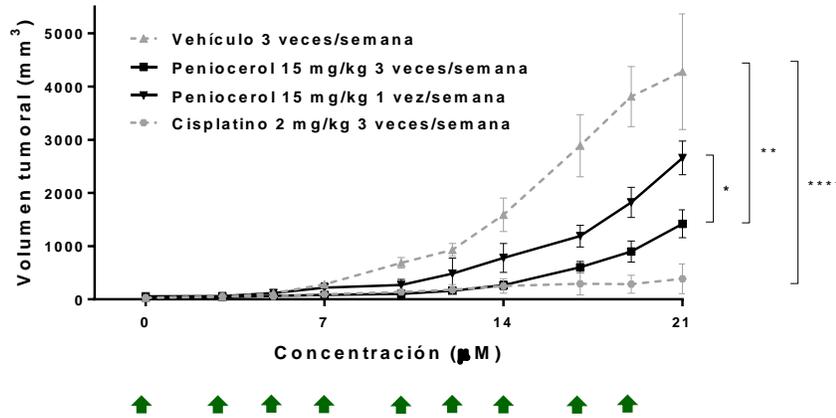


Figura 24 Actividad antitumoral de penicicero evaluada en ratones de la cepa *nu/nu*. Esquema de tratamiento: una vez por semana durante tres semanas. El tratamiento comenzó cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 50 mm³, en los días 0, 7 y 14. Los animales fueron sacrificados el día 21. A) Gráficos de actividad antitumoral. Grupos de seis ratones *nu/nu* fueron inoculados con 1.5×10^6 células HCT-116 y tratados una vez por semana durante tres semanas con 30 mg/kg y 15 mg/kg de penicicero, 4 mg/kg de cisplatino y aceite de sésamo + 5% DMSO como vehículo, los días 0, 7 y 14 (flechas). Los tumores se midieron tres veces por semana. Las barras indican la DE de la media ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ en comparación con el vehículo (ANOVA y prueba t). B) Fotografías de los tumores al final del experimento. C) Tabla de pesos tumorales ± DE.

A



B



C

Peso tumoral	
Tratamiento	Gramos±DE
Control negativo	4.34±0.48
Penicicero 15 mg/kg	0.78±0.12****
Cisplatino 2 mg/kg	0.23±0.10****

Figura 25 Evaluación de la actividad antitumoral del penicicero en ratones de la cepa *nu/nu*. Esquema de tratamiento: tres veces por semana durante tres semanas. se realizaron un total de nueve administraciones, cuando el tumor alcanzó un volumen aproximado de 50 mm³, en los días 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 y 18. Los animales fueron sacrificados el día 21. A) Gráfico de actividad antitumoral. Grupos de seis ratones *nu/nu* inoculados con 1.5 x 10⁶ células HCT-116 fueron tratados tres veces por semana durante tres semanas, las dosis probadas fueron 30 mg/kg y 15 mg/kg de penicicero, 2 mg/kg de cisplatino y se usó como control negativo el vehículo (aceite de sésamo + 5% DMSO). El tamaño de los tumores se midió tres veces por semana. Las barras indican la desviación estándar de la media ** p <0.01, *** p <0.001 y **** p <0.0001 en comparación con el vehículo (prueba ANOVA y t). B) Fotografías de los tumores al final del experimento. C) Tabla de pesos tumorales ± DE al final del experimento.

7.7 Análisis inmunohistológico de los tumores

Los cortes histológicos fueron obtenidos de los tumores diseccionados de los ratones una vez finalizado el modelo de xenotrasplante. En el ensayo de H-E se mostró una modificación en la morfología celular que puede ser observado por su forma amorfa y condensada en las muestras de tumor que fueron tratados con peniocerol (30 mg/kg y 15 mg/kg, una vez a la semana y 15 mg/kg tres veces a la semana), comparado con el tratado con vehículo (Figura 26A).

Para explorar el efecto del peniocerol en las características morfológicas del núcleo celular del tejido se hizo una tinción con DAPI. Como se puede ver en la Figura 26B, el núcleo presentó condensación o fragmentación, lo cual es un indicador de apoptosis. Estos cambios se observaron, principalmente en el tratamiento con 30 mg/kg (Figura 26B).

Para determinar si el tratamiento con peniocerol era capaz de inhibir la proliferación celular, los cortes histológicos fueron incubados con un anticuerpo anti-PCNA (Figura 26C). Los resultados de la inmunotinción específica indican que ambas dosis 30 mg/kg y 15 mg/kg una vez a la semana y 15 mg/kg tres veces a la semana de peniocerol, inhiben la proliferación celular, en comparación del grupo que solo recibió vehículo ($p < 0.0001$). En las dosis de 30 mg/kg y 15 mg/kg administrados una vez a la semana, un porcentaje de 150.07 ± 17.14 y 143.1 ± 34 de células marcadas fueron detectadas respectivamente; mientras que la dosis de 15 mg/kg administrada tres veces a la semana, 95.57 ± 18.85 células fueron marcadas, comparado con el tratamiento con vehículo que fue de 328.3 ± 64.07 de células marcadas (Figura 27C).

Finalmente, para la determinación de la muerte celular por apoptosis, los cortes de los tejidos fueron expuestos a la inmunotinción con anti-PARP-1 (Figura 26D). Los resultados indican que la administración de peniocerol induce apoptosis mediante la escisión de PARP-1, ya que todos los tratamientos con este fitoesterol en comparación con el vehículo presentan una disminución significativa ($p < 0.0001$) en la cuantificación de PARP-1 en el núcleo, así como también un aumento significativo ($p < 0.0001$) en la cuantificación de PARP-1 escindido en el citoplasma (Figura 27B).

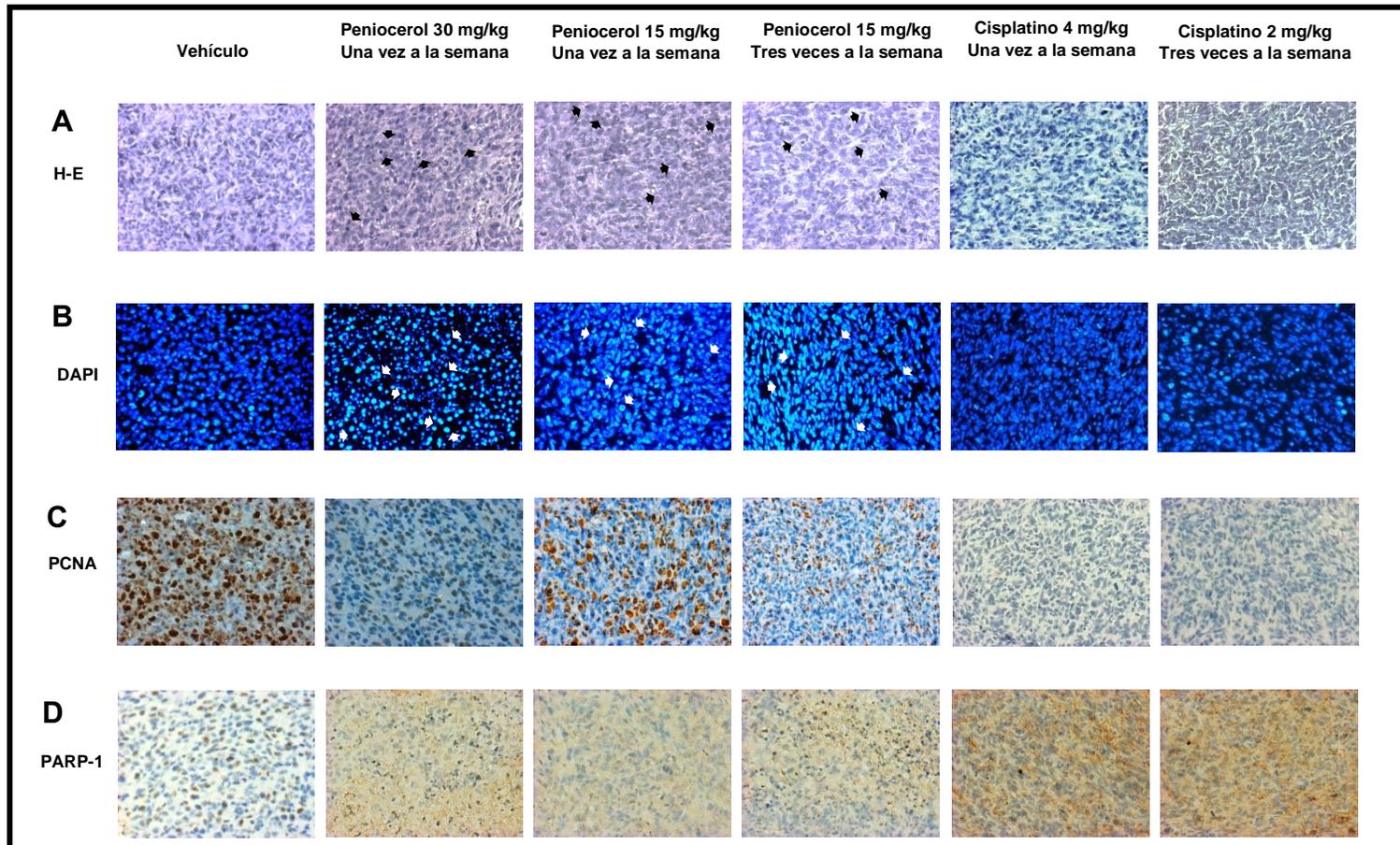
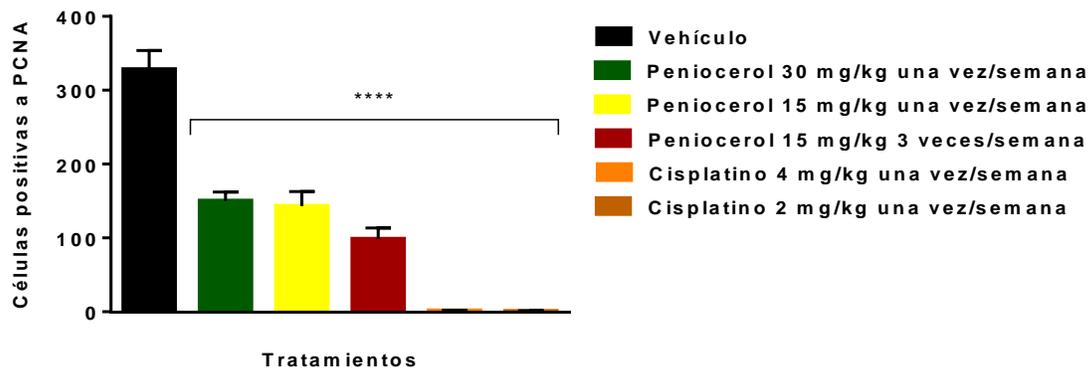


Figura 26 Efecto antiproliferativo y apoptótico del peniceroel determinado mediante fotomicrografías de tejidos obtenidas de tumores xenotrasplantados con células HCT-116. Los tejidos fueron teñidos con: A) Hematoxilina-eosina (HE) (las flechas negras indican forma condensada y amorfa de las células). B) 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (las flechas blancas indican condensación y fragmentación de los núcleos). C) Inmunotinción específica para el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) (las marcas marrones muestran las células positivas para PCNA). D) Inmunotinción específica para poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP-1) (núcleo marrón) y PARP-1 escindido (citoplasma marrón). El texto en la parte superior indica el tratamiento para cada grupo experimental. La adquisición de las imágenes se realizó a 20x en la escala microscópica en el software de captura Q capture pro 5 QImaging.

A



B

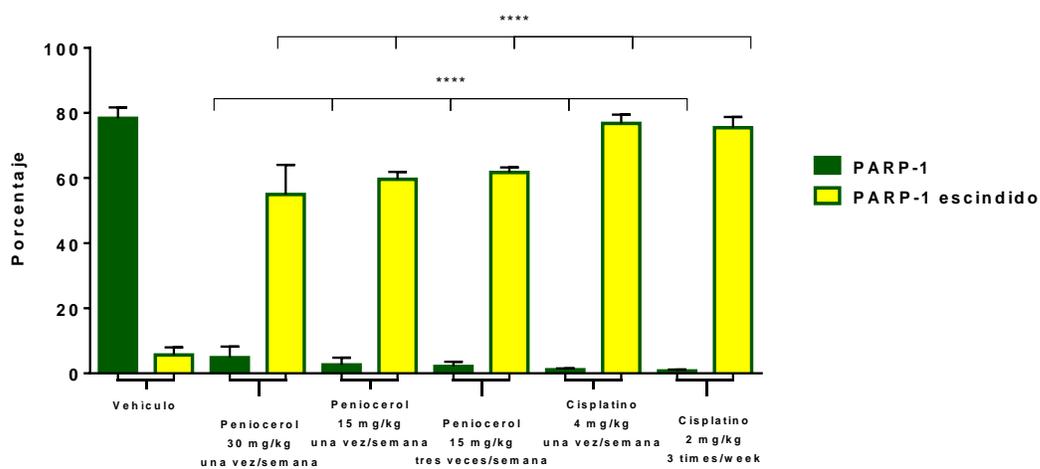


Figura 27 Efecto antiproliferativo y apoptótico del penicero 15 mg/kg determinado mediante la cuantificación de marcadores moleculares. A) Efecto antiproliferativo del penicero 15 mg/kg sobre el marcador de proliferación celular PCNA en los tejidos de tumores xenotrasplantados con células HCT-116. B) Efecto de muerte celular apoptótica del penicero 15 mg/kg sobre el marcador PARP-1 y el marcador PARP-1 escindido en los tejidos de tumores xenotrasplantados con células HCT-116. Las barras representan el promedio de células positivas \pm desviación estándar de tres tejidos analizados por cada grupo experimental. Los datos fueron analizados y comparados con el control negativo **** $p < 0,0001$ (prueba t).

VIII. DISCUSIÓN

El Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI, USA), ha definido cierta actividad antineoplásica mínima para seleccionar compuestos potenciales anticancerosos a partir de productos naturales. Aunque no es una regla formal, son considerados activos cuando presentan una $DE_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$ [101, 102]. Bajo esta premisa, muchos compuestos de origen natural podrían ser considerados inactivos. Sin embargo, parece existir una probable relación entre las propiedades antiinflamatorias de los metabolitos secundarios y sus efectos antitumorales *in vivo*, como algunos fitoesteroles y triterpenos antiinflamatorios lo han mostrado [62, 65, 66, 67, 68, 69, 73, 78, 81].

En estudios previos, nuestro grupo indico la potente actividad antiinflamatoria del peniocerol y su modesta actividad citotóxica contra diversas líneas celulares de cáncer humano *in vitro* [14, 15]. Tomando en cuenta la posible relación entre compuestos antiinflamatorios y su posible actividad antitumoral *in vivo*, en este trabajo se propuso la evaluación de la actividad antitumoral del peniocerol en modelo de xenotrasplante en ratón.

Para elegir la línea de cáncer más adecuada para los estudios *in vivo* se realizaron evaluaciones con varias líneas de cáncer humano. Así, el peniocerol mostró actividad citotóxica en cuatro líneas celulares de cáncer (HCT-15, HCT-116, SW-620 y MDA-MB-231). Sin embargo, la línea más susceptible fue la HCT-116, por lo que se eligió para los experimentos subsecuentes (Figura 19). En estudios anteriores, habíamos demostrado que el peniocerol podría desencadenar las vías apoptóticas tanto dependientes como independientes de caspasa [108]. En el presente estudio se demostró, por citometría de flujo, el porcentaje de apoptosis inducida *in vitro* por el peniocerol en las líneas HCT-116 y MDA-MB-231 (Figura 20 y 21).

En la búsqueda de un mecanismo de muerte celular mediado por la perturbación de la membrana mitocondrial, como lo hacen triterpenos estructuralmente parecidos a este fitoesterol, un resultado no esperado fue el aumento de la actividad

antiproliferativa *in vitro* del peniocerol cuando fue evaluado en presencia de antioxidantes (Figura 22). Este resultado es un poco sorprendente ya que previamente habíamos detectado la actividad del peniocerol en la mitocondria iniciando de esta manera el proceso de apoptosis [108]. Se ha postulado que en este proceso de apoptosis están involucradas especies reactivas de oxígeno. Por lo tanto, el incremento de la actividad del peniocerol en un ambiente reductor indicaría posiblemente un nuevo mecanismo de acción de este fitoesterol. Indiscutiblemente nuestro resultado es preliminar, sin embargo, abre una nueva línea de investigación.

Dado que se decidió evaluar la actividad antitumoral en ratones *nu/nu*, por lo tanto, se evaluó previamente la toxicidad del peniocerol en esta cepa. Nuestros resultados mostraron que a dosis de 15 o 30 mg/kg de peniocerol bajo la administración de tres o una vez por semana, no tuvo modificación significativa en el peso corporal en comparación con aquellos animales que solamente se les administró el vehículo. Por otro lado, el grupo cisplatino mostró hasta el 42% de la pérdida de peso corporal (Figura 23).

Adicionalmente, a los grupos de ratones tratados con peniocerol se les realizó un análisis bioquímico de sangre. El análisis reveló que el peniocerol no produjo ningún cambio en los componentes bioquímicos y celulares de la sangre en comparación con los observados en ratones que solo recibieron vehículo. Este análisis también reafirma la toxicidad tan intensa que el cisplatino induce en ratones. Por ejemplo, la administración de cisplatino dio como resultado un aumento significativo de alanina y aspartato transferasa, así como la disminución de hemoglobina, linfocitos y leucocitos. Estos resultados mostraron que a pesar de que ambos compuestos mostraron una actividad antitumoral similar, no obstante, cuando se administran tres veces a la semana, la toxicidad del cisplatino es bastante más intensa que la inducida por el peniocerol (Figura 23A). Adicionalmente, estos hallazgos indicaron que una mayor frecuencia de administración del peniocerol, pero a una dosis menor mejora su actividad antitumoral (Figura 24 y 25). Resultados que podrían sugerir que la frecuencia de administración es más significativa que la dosis.

Las propiedades antitumorales del peniocerol están de acuerdo con otros resultados para este tipo de compuestos. Varios estudios han demostrado que la ingesta de fitoesteroles reduce el riesgo de padecer diversos tipos de cáncer. En estudios experimentales *in vivo* de neoplasias de ovario, mama, colon y otros, se observó que el consumo de β -sitosterol o fitoesteroles mixtos en la dieta, reducía el número de animales con tumores o el tamaño de estos [60, 62, 66, 67, 69]. Adicionalmente, en estudios epidemiológicos, la ingesta de β -sitosterol y estigmasterol se asoció con un menor riesgos de cáncer de esófago [54] y de ovario [55], respectivamente. Además, se ha informado que las poblaciones femeninas que presentan un riesgo mínimo de cáncer de seno tienen un mayor consumo de fitoesteroles en la dieta comparadas con aquellas que presentan alto riesgo [57].

Nuestros hallazgos muestran que la inhibición del crecimiento tumoral de peniocerol está relacionada con un efecto anti proliferativo y de inducción de apoptosis. El marcador celular antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) se usa en clínicas como herramienta de diagnóstico y pronóstico de la proliferación celular [100]. La disminución significativa en la expresión de PCNA en las muestras tumorales tratadas con el peniocerol indica una acción antiproliferativa inducida por este esteroide (Figuras 26C y 27A). Por otro lado, PARP-1 es una enzima nuclear abundante y ubicua relacionada con la reparación del ADN [101]. Su sobreexpresión está relacionada con el desarrollo de algunos tipos de cáncer. Por lo tanto, la inhibición de PARP-1 inhibe selectivamente varios tipos de células tumorigénicas [102]. En nuestro caso el peniocerol indujo una disminución significativa de PARP-1 en el núcleo y un aumento significativo de PARP-1 escindido en el citoplasma indicando una muerte celular por apoptosis (Figura 26D y 27B).

Por último, en la Figura 28 se ilustran y resumen los efectos del peniocerol relacionadas con su actividad antitumoral realizados por nuestro grupo de investigación.

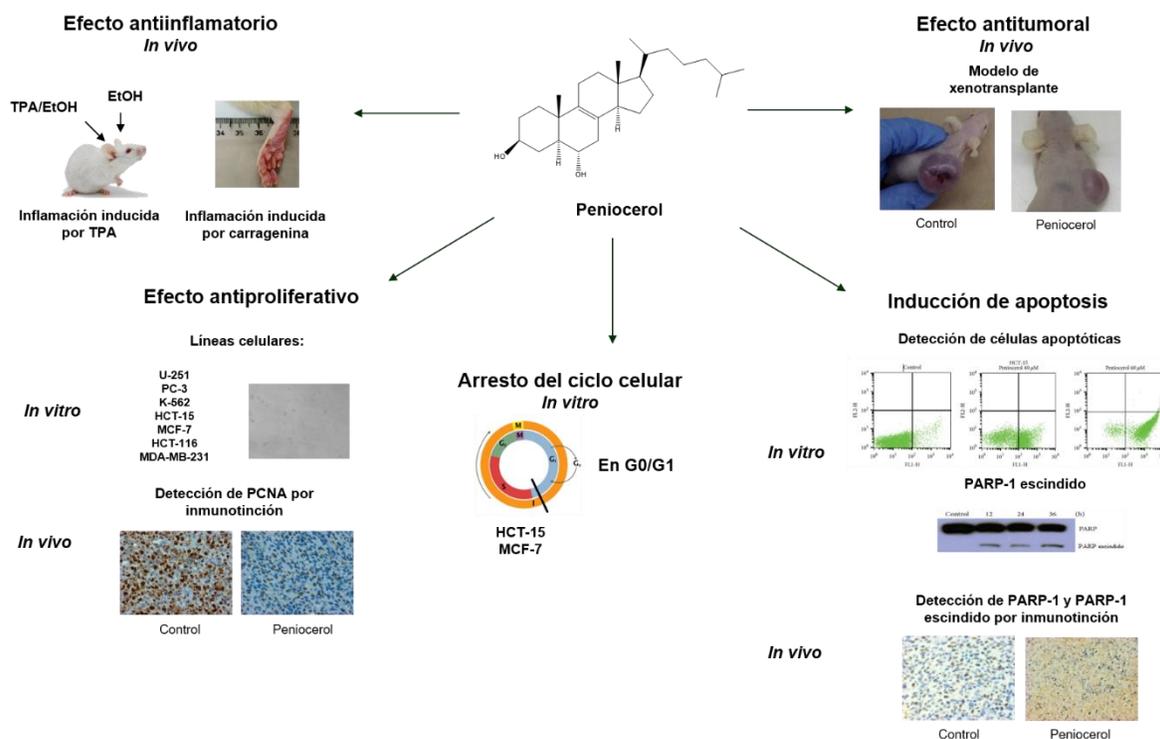


Figura 28 Esquema representativo de los efectos antiinflamatorio *in vivo*, antiproliferativo *in vitro*, inducción de apoptosis, arresto del ciclo celular del peniocerol relacionados con su actividad antitumoral *in vivo*.

IX. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados indican que el peniocerol y el cisplatino muestran resultados similares cuando se evaluaron en las mismas condiciones en un ensayo de xenotrasplante con células HCT-116 de colon. Sin embargo, se sugiere que el peniocerol no induce una toxicidad tan intensa como el cisplatino. De hecho, un análisis de bioquímica sanguínea demostró que los valores de los grupos control y de aquellos tratados con peniocerol no mostraron diferencias.

Así mismo demostramos que la administración de peniocerol con una frecuencia más alta, pero con una dosis más baja proporciona un mayor efecto terapéutico, lo que sugiere la posibilidad de desarrollar un medicamento contra el cáncer a partir de este fitoesterol.

X. PERSPECTIVAS

La actividad antitumoral interesante del peniocerol en esta investigación, nos permite proponer que en posteriores estudios este fitoesterol puede ser utilizado en combinación con el cisplatino, el cual tuvo mejor efecto antitumoral, esta combinación podría ser en dos esquemas de tratamiento, es decir, a la par del tratamiento con cisplatino o podría ser un tratamiento previo con el fitoesterol y posteriormente el tratamiento con cisplatino, con la finalidad de disminuir los efectos tóxicos de este último. Por otra parte, en el estudio *in vitro* en el que el peniocerol en combinación con antioxidantes, el efecto antiproliferativo mejora, nos permite sugerir que podría realizarse *in vivo*, con la finalidad de tener un mayor efecto antitumoral. Y finalmente, en estudios previos el peniocerol demostró un efecto antiinflamatorio *in vivo* interesante, el cual considero debería ser estudiado el mecanismo de acción.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (24 de mayo de 2018). *Las 10 principales causas de defunción*. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- [2]. Bray F, Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global and Regional Estimates of the Incidence and Mortality for 38 Cancers: GLOBOCAN 2018. Lyon: International Agency for Research on Cancer/World Health Organization; 2018 [update 2019; cited 2019 Sep 10]. Disponible de: <https://gco.iarc.fr/>.
- [3]. Bacchetti, T., Masciangelo, S., Bicchiega, V., Bertoli, E., & Ferretti, G. (2011). Phytosterols, phytostanols and their esters: from natural to functional foods. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 4:165–172.
- [4]. Nes, W.D., Song, Z.H., Dennis, A.L., Zhou, W.X., Nam, J., & Miller, M.B. (2003). Biosynthesis of phytosterols - kinetic mechanism for the enzymatic Cmethylation of sterols. *J Biol Chem*, 278, 34505-34516. doi:10.1074/jbc.M303359200.
- [5]. Jones, P.J., & AbuMweis, S.S. (2009). Phytosterols as functional food ingredients: linkages to cardiovascular disease and cancer. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 12 (2), 147–151. doi:10.1097 / MCO.0b013e328326770f.
- [6]. Plat, J., Hendriks, T., Bieghs, V., Jeurissen, M.L., Walenbergh, S.M., Van Gorp, P.J., *et al.* (2014). Protective role of plant sterol and stanol esters in liver inflammation: insights from mice and humans. *PLoS One*, 9 (10) e110758. doi:10.1371/journal.pone.0110758.
- [7]. Shirwaikar, A., Punitha, I.S.R., Upadhye, M., & Dhiman, A. (2007). Antidiabetic activity of alcohol root extract of *Holostemma annulare* in NIDDM rats. *Pharm Biol*, 45, 440-445. <https://doi.org/10.1080/13880200701388989>.
- [8]. Misawa, E., Tanaka, M., Nomaguchi, K., Nabeshima, K., Yamada, M., Toida, T., *et al.* (2012). Oral ingestion of aloe vera phytosterols alters hepatic gene expression profiles and ameliorates obesity-associated metabolic disorders

Capítulo X. Referencias bibliográficas

- in zucker diabetic fatty rats. *J. Agric. Food Chem*, 60 (11), 2799–2806. doi:10.1021/jf204465j.
- [9]. Ramprasath, V.R., & Awad, A.B. (2015). Role of phytosterols in cancer prevention and treatment. *J. AOAC Int*, 98 (3), 735–738. doi:10.5740/jaoacint.SGERamprasath.
- [10]. Woyengo, T.A., Ramprasath V.R., & Jones, P.J.H. (2009). Anticancer effects of phytosterols. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63 (7), 813–820. doi:10.1038 / ejcn.2009.29.
- [11]. Gupta, M.B., Nath, R., Srivastava, N., Shanker, K., Kishor, K., & Bhargava, K.P. (1980). Anti-Inflammatory and Antipyretic Activities of β -Sitosterol. *Planta Med*, 39 (6), 157-163. doi:10.1055/s-2008-1074919.
- [12]. Choi, Y.H., Kong, K.R., Kim, Y.A., Jung, K.O., Kil, J.H., Rhee, S.H., *et al.* (2003). Induction of Bax and activation of caspases during β -sitosterol-mediated apoptosis in human colon cancer cells. *International Journal of Oncology*, 23 (16) 1657-1662. doi: <https://doi.org/10.3892/ijo.23.6.1657>.
- [13]. Bradford, P.G., & Awad, A.B. (2007). Phytosterols as anticancer compounds. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51 (2), 161-170, 2007. doi:10.1002/mnfr.200600164.
- [14]. Bolaños-Carrillo, M.A., Ventura-Gallegos, J.L., Saldívar-Jiménez, A.D., Zentella-Dehesa, A., & Martínez-Vázquez, M. (2015). Effect of Sterols Isolated from *Myrtillocactus geometrizans* on Growth Inhibition of Colon and Breast Cancer Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015, 1-10. doi:10.1155/2015/589350.
- [15]. Salazar, J.R., Martínez-Vázquez, M., Cespedes, C.L., Ramírez-Apan, T., Nieto-Camacho, A., Rodríguez-Silverio, J., *et al.* (2011). Anti-inflammatory and cytotoxic activities of chichipegenin, peniocerol and macdougallin isolated from *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. ex Pfeiff.) Con. *Zeitschrift für Naturforschung*, 66, 24–30. <https://doi.org/10.1515/znc-2011-1-204>.
- [16]. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2019). *Cáncer*. Recuperado de: <https://www.who.int/topics/cancer/es/>.

Capítulo X. Referencias bibliográficas

- [17]. Hanahan, D., & Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100 (1); 57-70. doi:10.1016/s0092-8674 (00) 81683-9.
- [18]. Hanahan, D., & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-674. doi:10.1016 / j.cell.2011.02.013.
- [19]. Stein, C.J., & Colditz G. A. (2004). Modifiable risk factors for cancer. *British Journal of Cancer*, 90, 299 – 303. doi:10.1038 / sj.bjc.6601509.
- [20]. Wu, S., Powers, S., Zhu, W., & Hannun, Y.A. (2016). Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature*, 529, 43–47. doi:10.1038/nature16166.
- [21]. Islami, F., Sauer, A.G., Miller, K.D., Siegel, R.L., Fedewa, S.A., Jacobs, E.J., McCullough, M.L., Patel, A.V., Ma, J., Soerjomataram, I.; Flanders, W:D:, Brawley, O.W., Gapstur, S.M., & Jemal, A. (2017). Proportion and Number of Cancer Cases and Deaths Attributable to Potentially Modifiable Risk Factors in the United States. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68 (1), 31-54. doi:10.3322/caac.21440.
- [22]. Rahel, G. G., Surbhi, G., Melody, J.X., Linus, T.C., Hannah, S. (2017). Cervical cancer control in HIV-infected women: Past, present and future. *Gynecologic Oncology Reports*, 21; 101–108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gore.2017.07.009>.
- [23]. Delecluse, H.J., Feederle, R., O'Sullivan, B., & Taniere, P. (2007) Epstein_Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist. *J. Clin. Pathol*, 60;1358-1364. doi:10.1136/jcp.2006.044586.
- [24]. Yoshida, M. (2010). Molecular approach to human leukemia: Isolation and characterization of the first human retrovirus HTLV-1 and its impact on tumorigenesis in Adult T-cell Leukemia. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, 86(2); 117-130. doi:10.2183/pjab.86.117.
- [25]. Lin, C., & Zhang, J. (2017). Inflammasomes in Inflammation-Induced Cancer. *Front. Immunol*, 8:271. doi:10.3389/fimmu.2017.00271
- [26]. Balkwill, F., & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet*, 357:539-5. doi:10.1016 / S0140-6736 (00) 04046-0

Capítulo X. Referencias bibliográficas

- [27]. Multhoff, G., Molls, M., & Radons, J. (2012). Chronic inflammation in cancer development, 98 (2); 1-17. doi:10.3389/fimmu.2011.00098.
- [28]. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454; 436-444. doi:10.1038/nature07205.
- [29]. Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867. doi:10.1038 / nature01322.
- [30]. Smith, A., Parkes, M. A. F., Atkin-Smith, G. K., Tixeira, R., & Poon I. K. H. (2017). Cell disassembly during apoptosis. *WikiJournal of Medicine*, 4 (1): 8. doi:10.15347/wjm/2017.008.
- [31]. Fernald, K., & Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends in Cell Biology*, 23 (12): 620–633. doi:10.1016 / j.tcb.2013.07.006.
- [32]. Vucic, D.A.D. (2012). The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Experimental Oncology*, 34: 200-211.
- [33]. Hassan, M., Hidemichi, W., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., & Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *BioMed Research International*, 2014; 1- 23. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/150845>.
- [34]. Boivin, W.A., Cooper, D.M., Hiebert, P.R., & Granville, D.J. (2009). Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma. *Laboratory Investigation*, 89; 1195–1220. doi:10.1038/labinvest.2009.91.
- [35]. Siegel, R., DeSantis, C., Virgo, K., Stein, K., Mariotto, A., Smith, T., Cooper, D., Gansler, T., Lerro, G., Fedewa, S., Lin, C., Leach, C., Cannady, R. S., Cho, H., Scoppa, S., Hachey, M., Kirch, R., Jemal, A., & Ward, E. (2012). Cancer Treatment and Survivorship Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62; 220-241. doi: <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21149>.
- [36]. Suhag, V. (2005). Palliative Therapy in Cancer Patients: An Overview. *JK SCIENCE*, 7(2); 61-66.
- [37]. Arruebo, M., Vilaboa, N., Sáez-Gutiérrez, B., Lambea, J., Tres, A., Valladares, M., & González-Fernández, A. (2011). Assessment of the

Capítulo X. Referencias bibliográficas

- Evolution of Cancer Treatment Therapies. *Cancers*, 3, 3279-3330. doi:10.3390/cancers3033279.
- [38]. Benjamin, D.J. (2014). The efficacy of surgical treatment of cancer – 20 years later. *Medical Hypotheses* 82; 412–420. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2014.01.004>.
- [39]. Chen, H.H.W., & Kuo, M:T. (2017). Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges. *Oncotarget*, 8 (37); 62742-62758. doi:10.18632/oncotarget.18409.
- [40]. Arruebo, M., Vilaboa, N., Sáez-Gutiérrez, B., Lambea, J., Tres, A., Valladares, M., & González-Fernández, A. (2011). Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies. *Cancers*, 3 (3), 3279–3330. doi:10.3390/cancers3033279.
- [41]. Chabner, B., & Roberts, T. (2005). Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*, 5, 65–72. doi:10.1038/nrc1529.
- [42]. Falzone, L., Salomone, S., & Libra, M., (2018). Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Front. Pharmacol*, 9:1300. doi:10.3389/fphar.2018.01300.
- [43]. Días, D.A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*, 2, 303-336. doi:10.3390/metabo2020303.
- [44]. Amaral, R.G., Dos Santos, S.A., Andrade, L.N., Severino, P., Carvalho, A.A. (2019). Natural Products as Treatment against Cancer: A Historical and Current Vision. *Clin Oncol*, 4: 1562.
- [45]. Chikezie, P.C., Ibegbulem, C.O., & Mbagwu, F.N. (2013). Bioactive Principles from Medicinal Plants. *Research Journal of Phytochemistry*, 9 (3): 88-115, 2015. doi:10.3923/rjphyto.2015.88.115.
- [46]. Aldini, R., Micucci, M., Cevenini, M., Fato, R., Bergamini, C., *et al.* (2014) Antiinflammatory Effect of Phytosterols in Experimental Murine Colitis Model: Prevention, Induction, Remission Study. *PLoS ONE*, 9 (9): e108112. doi:10.1371/journal.pone.0108112.

Capítulo X. Referencias bibliográficas

- [47]. Plat, J., Hendriks, T., Bieghs, V., Jeurissen, M:L.; Walenbergh, S:M., Van Gorp, P:J., De Smet, E., Konings, M., Vreugdenhil, A:C., Guichot, Y.D., Rensen, S.S., Buurman, W.A., Greve, J.W., Lütjohann, D., Mensink, R.P., & Shiri-Sverdlov, R. (2014). Protective role of plant sterol and stanol esters in liver inflammation: insights from mice and humans. *PLoS One*, 9 (10); e110758. doi:10.1371/journal.pone.0110758. eCollection 2014.
- [48]. Peter J.H. Jones, P.J.H., & AbuMweisb, S.S. (2009). Phytosterols as functional food ingredients: linkages to cardiovascular disease and cancer. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 12:147–151. doi:10.1097 / mco.0b013e328326770f.
- [49]. Misawa, E., Tanaka, M., Nomaguchi, K., Nabeshima, K., Yamada, M., Toida, T., Iwatsuki, K. (2012). Oral ingestion of aloe vera phytosterols alters hepatic gene expression profiles and ameliorates obesity-associated metabolic disorders in Zucker diabetic fatty rats. *J. Agric. Food Chem*, 60 (11); 2799–2806. doi:10.1021 / jf204465j.
- [50]. Shahzada, N., Khanb, W., Shadab MD, Alid, A., Salujae, S.S., Sharmad, S., Al-Allaff, F.A., Abduljaleelf, Z., Aziz, I.A., Abdel-Wahaba, A.F., Afifya, M.A., Al-Ghamdia, S.S. (2017). Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 88; 786–794. doi:10.1016 / j.biopha.2017.01.068.
- [51]. Bacchetti, T., Masciangelo, S., Bicchiega, V., Bertoli, E., & Ferretti, G. (2011). Phytosterols, phytostanols and their esters: from natural to functional foods. *Mediterr. J. Nutr. Metab*, 4 (3), 165–172. doi:10.3233 / s12349-010-0049-0.
- [52]. Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J., & Lampi, A.M. (2000). Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80; 939-966.
- [53]. Lagarda, M.J., García-Llatas, G., & Farré, R. (2006). Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41; 1486–1496. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.02.052>.

Capítulo X. Referencias bibliográficas

- [54]. De Stefani, E., Boffetta, P., Ronco, A.L., Brennan, P., Deneo-Pellegrini, H., Carzoglio, J.C., Mendilaharsu, M. (2000). Plant sterols and risk of stomach cancer: a casecontrol study in Uruguay. *Nutr. Cancer*, 37 (2); 140–144. doi:10.1207 / S15327914NC372_4.
- [55]. McCann, S.E., Freudenheim, J.L., Marshall, J.R., Graham, S. (2003). Risk of human ovarian cancer is related to dietary intake of selected nutrients, phytochemicals and food groups. *J. Nutr*, 133 (6); 1937–1942.
- [56]. Mendilaharsu, M., De Stefani, E., Deneo-Pellegrini, H., Carzoglio, J., Ronco, A. (1998). Phytosterols and risk of lung cancer: a case-control study in Uruguay. *Lung Cancer*, 21 (1); 37–45. doi:10.1016 / s0169-5002 (98) 00044-0
- [57]. Ling, W.H., & Jones, P.J. (1995). Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci*, 57 (3); 195–206. doi:10.1016 / 0024-3205 (95) 00263-6.
- [58]. Ifere, G.O., Barr, E., Equan, A., Gordon, K., Singh, U.P., Chaudhary, J., Igietseme, J.U., & Ananaba, G.A. (2009). Differential effects of cholesterol and phytosterols on cell proliferation, apoptosis and expression of a prostate specific gene in prostate cancer cell lines. *Cancer Detect. Prev*, 32 (4); 319–328. doi:10.1016 / j.cdp.2008.12.002.
- [59]. O'Callaghan, Y., Kenny, O., O'Connell, N.M., Maguire, A.R., McCarthy, F.R., O'Brien, N.M. (2013). Synthesis and assessment of the relative toxicity of the oxidised derivatives of campesterol and dihydrobrassicasterol in U937 and HepG2 cells. *Biochimie*, 95 (3); 496–503. doi:10.1016/j.biochi.2012.04.019.
- [60]. Awad, A.B., Chen, Y.C., Fink, C.S., & Hennessey, T. (1996). Beta-sitosterol inhibits HT-29 human colon cancer cell growth and alters membrane lipids. *Anticancer Res*, 16 (5A); 2797–2804.
- [61]. Von Holtz, R.L., Fink, C.S., & Awad, A.B. (1998). Beta-sitosterol activates the sphingomyelin cycle and induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Nutr. Cancer* 32 (1); 8–12. doi:10.1080/01635589809514709.

Capítulo X. Referencias bibliográficas

- [62]. Awad, A.B., Hernandez, A.Y., Fink, C.S., & Mendel, S.L. (1997). Effect of dietary phytosterols on cell proliferation and protein kinase C activity in rat colonic mucosa. *Nutr. Cancer*, 27 (2); 210–215. doi:10.1080/01635589709514527.
- [63]. Liagre, B., Bertrand, J., Leger, D.Y., & Beneytout, J.L. (2005). Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in COX-2 deficient K562 cells with activation of the p38 MAP kinase signalling and inhibition of NF-kappaB binding. *Int. J. Mol. Med*, 16 (6); 1095–1101. <https://doi.org/10.3892/ijmm.16.6.1095>.
- [64]. Chang, L.C., Tsai, T.R., Wang, J.J., Lin, C.N., & K.W. Kuo. (1998). The rhamnose moiety of solamargine plays a crucial role in triggering cell death by apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 242 (1); 21–25. doi:10.1006/bbrc.1997.7903.
- [65]. Llaverias, G., Escolà-Gil, J.C., Lerma, E., Julve, J., Pons, C., Cabré, A., Cofán, M., Ros, E., Sánchez-Quesada, J.L., Blanco-Vaca, F. (2013). Phytosterols inhibit the tumor growth and lipoprotein oxidizability induced by a high-fat diet in mice with inherited breast cancer. *J. Nutr. Biochem*, 24 (1); 39–48. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.01.007.
- [66]. Raicht, R.F., Cohen, B.I., Fazzini, E.P., Sarwal, A.N., Takahashi, M. (1980). Protective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats. *Cancer Res*, 40 (2); 403–405.
- [67]. Deschner, E.E., Cohen, B.I., Raicht, R.F. (1982). The kinetics of the protective effect of beta-sitosterol against MNU-induced colonic neoplasia. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*, 103 (1); 49–54. doi:10.1007/bf00410305.
- [68]. Awad, A.B., Downie, A.C. & Fink, C.S. (2000). Inhibition of growth and stimulation of apoptosis by beta-sitosterol treatment of MDA-MB-231 human breast cancer cells in culture, *Int. J. Mol. Med*, 5 (5) (2000) 541–545. doi:10.3892/ijmm.5.5.541.
- [69]. Rubis, B., Paszel, A., Kaczmarek, M., Rudzinska, M., Jelen, H., Ryczyńska, M. (2008). Beneficial or harmful influence of phytosterols on

Capítulo X. Referencias bibliográficas

- human cells?. Br. J. Nutr, 100 (6); 1183–1191. doi:10.1017/S0007114508981423.
- [70]. Klippel, K.F., Hittl, D.M., Schipp, B. (1997). A multicentric, placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol (phytosterol) for the treatment of benign prostatic hyperplasia. German BPH-phyto study group, Br. J. Urol, 80 (3); 427–432. doi:10.1046/j.1464-410X.1997.t01-1-00362.x.
- [71]. Berges, R.R., Windeler, J., Trampisch, H.J., & Senge, T. (1995). Randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol in patients with benign prostatic hyperplasia. Beta-sitosterol study group. Lancet, 345 (8964); 1529–1532. doi:10.1016/s0140-6736 (95) 91085-9.
- [72]. Berges, R.R., Kassen, A., & Senge, T. (2000). Treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia with beta-sitosterol: an 18-month follow-up. BJU Int, 85 (7); 842–846. doi:10.1046/j.1464-410x.2000.00672.x.
- [73]. Navarro, A., De Las Heras, B., & Villas, A. (2001). Anti-Inflammatory and Immunomodulating Properties of a Sterol Fraction from *Sideritis foetens* CLEM. Biol. Pharm. Bull. 24(5) 470—473. doi:10.1248/bpb.24.470.
- [74]. Aldini, R., Micucci, M., Cevenini, M., Fato R, Bergamini C, Nanni, C., Massimiliano Cont, M., Camborata, C., Spinozzi, S., Montagnani, M., Roda. G., D’Errico-Grigioni, A., Rosini, F., Roda, A., Mazzella, G., Chiarini, A., & Budriesi, R. (2014) Antiinflammatory Effect of Phytosterols in Experimental Murine Colitis Model: Prevention, Induction, Remission Study. PLoS ONE, 9(9): e108112. doi:10.1371/journal.pone.0108112.
- [75]. Peniagua-Pérez, R., Flores-Mondragón, G., Reyes-Legorreta, C., Herrera-López, B., Cervantes-Hernández, I., Madrigal-Santillán, O., Morales-González, J.A., Álvarez-González, I., & Madrigal-Bujaidar, E. (2017). Evaluation of the anti-inflammatory capacity of beta-sitosterol in rodent assays. Afr J Tradit Complement Altern Med, 14 (1): 123-130. doi:10.21010/ajtcam.v14i1.13.
- [76]. Antwi A.O., Obiri, D.D., & Osafo. N. (2017) Stigmasterol Modulates Allergic Airway Inflammation in Guinea Pig Model of Ovalbumin-Induced Asthma. Mediators of Inflammation, 2017; 1-11. doi:10.1155/2017/2953930.

Capítulo X. Referencias bibliográficas

- [77]. Pei-Chun, L., Ming-Hoang, L., Kuang-Ping, H., Yueh-Hsiung, K., Jie, C., Ming-Chih, T., Chun-Xiang, L., Xi-Jiang, Y., Narumon, J., & Kuo-Ping, L.C. (2018). Identification of β -Sitosterol as in Vitro Anti-Inflammatory Constituent in *Moringa oleifera*. *J. Agric. Food Chem*, 66 (41), 10748-10759. doi:10.1021/acs.jafc.8b04555.
- [78]. Yin. Y., Liu, X., Liu J., Cai, E., Zhu, H., Li, H., Zhang L., Li P., & Zhao, Y. (2018). Beta-sitosterol and its derivatives repress lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute hepatic injury by inhibiting the oxidation and inflammation in mice. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28; 1525–1533. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.03.073>.
- [79]. Phillips, D. R., Rasbery, J. M., Bartel, B. & Matsuda, S. P. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Curr. Opin. Plant Biol*, 9, 305–314 (2006). doi:10.1016/j.pbi.2006.03.004.
- [80]. Karen T. Liby, Mark M. Yore and Michael B. Sporn. (2007). Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. *Nat Rev Cancer*, 7, 357–369. doi:10.1038/nrc2129.
- [81]. Safe, S.H., Prather, P.L., Brents, L.K., Chadalapaka, G., & Jutooru, I. (2012). Unifying Mechanisms of Action of the Anticancer Activities of Triterpenoids and Synthetic Analogs. *Anticancer Agents Med Chem*, 12(10): 1211–1220. doi:10.2174/187152012803833099.
- [82]. Chintharlapalli, S., Papineni, S., Lei, P., Pathi, S., & Safe, S. (2011) . Betulinic acid inhibits colon cancer cell and tumor growth and induces proteasomedependent and -independent downregulation of specificity proteins (Sp) transcription factors. *BMC Cancer*, 11(371): 1-12. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/371>.
- [83]. Chintharlapalli, S., Papineni, S., Lei, P., Shashi K. Ramaiah, S.K., & Safe, S. (2007). Betulinic Acid Inhibits Prostate Cancer Growth through Inhibition of Specificity Protein Transcription Factors. *Cancer*, 67(6): 2816-2823. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3735.
- [84]. Hedrick, E., Cheng, Y., Jin, U.H., Kim, K., & Safe, S. (2016). Specificity protein (Sp) transcription factors Sp1, Sp3 and Sp4 are non-oncogene

Capítulo X. Referencias bibliográficas

- addiction genes in cancer cells. *Oncotarget*, 7, (16); 22245-22256. doi:10.18632 / oncotarget.7925.
- [85]. Fulda, S., Scaffidi, C., Susin, S.A., Krammer, P.H., Kroemer, G., Peter, M.E., & Debatin, K.M. (1998). Activation of Mitochondria and Release of Mitochondrial Apoptogenic Factors by Betulinic Acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(51): 33942–33948.
- [86]. Potze, L., FB Mullauer, F.B., Colak, S., Kessler, J.H., and Medema, J.P. (2014). Betulinic acid-induced mitochondria-dependent cell death is counterbalanced by an autophagic salvage response. *Cell Death and Disease*, 5(e1169): 1-8. doi:10.1038/cddis.2014.139.
- [87]. Fulda, S. & Kroemer, G. (2009). Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers. *Drug Discovery Today*, 14 (17/18): 885-890. doi:10.1016/j.drudis.2009.05.015.
- [88]. Salazar, J., R. 2011. Determinación del mecanismo anti-inflamatorio de peniocerol y chichipegenina aislados de *Myrtillocactus geometrizans*. Tesis Profesional. UNAM.
- [89]. Bravo-Hollis, H. (1978), Las cactáceas de México. Vol. I. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
- [90]. Bolaños Carrillo, M., A. (2015). Determinación del mecanismo inducido por esteroides y triterpenos aislados de *Myrtillocactus geometrizans*. Tesis Profesional. UNAM.
- [91]. Luna-Morales, C.C., & Aguirre R.R. (2001). Clasificación tradicional, Aprovechamiento y Distribución Ecológica de la Pitaya Mixteca en México. *Interciencia*, 26: 18-24.
- [92]. Sánchez-González, A., Granados-Sánchez, D., Simón-Nabor, R. (2008). Uso medicinal de las plantas por los otomíes del municipio de Nicolás Flores, Hidalgo, México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 14: 271-279.
- [93]. Lage, O.M., Ramos, M.C., Calisto R., Almeida, E., Vasconcelos, V., & Vicente, F. (2018). Current Screening Methodologies in Drug Discovery for Selected Human Diseases. *Mar. Drugs*, 16, 279. doi:10.3390/md16080279.

Capítulo X. Referencias bibliográficas

- [94]. Magalhaes L.G., Ferreira L.G. L. & Andricopulo A.D. (2018). Recent Advances and Perspectives in Cancer Drug Design. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90: 1233-1250. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820170823>.
- [95]. Archana, M., Bastian, N., & Yogesh, T.L., Kumaraswamy, K.L. (2013). Various methods available for detection of apoptotic cells--a review. *Indian J Cancer*, 50: 274-283. doi:10.4103/0019-509X.118720.
- [96]. Szadvari, I., Krizanova, O., & Babula, P. (2016). Athymic Nude Mice as an Experimental Model for Cancer Treatment. *Physiol. Res.* 65; S441-S453.
- [97]. Pantelouris, E.M. (1973). Athymic development in the mouse. *Differ Res Biol Divers*, 1; 437-450. doi:10.1111/j.1432-0436.1973.tb00143.x.
- [98]. Juríkováa M., Danihelb, L., Poláka, S., & Varga, I. (2016). Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochemica*, 118; 544–552. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2016.05.002>.
- [99]. Stoimenov, I., & Helleday, T. (2009). PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem. Soc. Trans*, 37, 605–613; doi:10.1042/BST0370605.
- [100]. Bologna-Molina, R., Mosqueda-Taylor, A., Molina-Frechero, N., Ana-Dolores, Mori-Estevez, A.D., & Sánchez-Acuña, G. (2013). Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 1;18 (2):e174-9. doi:10.4317/medoral.18573.
- [101]. Curtin, N.J. (2005). PARP inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev. Mol. Med.* 7, 1–20. doi:10.1017/S146239940500904X.
- [102]. Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., *et al.* (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 434, 913–917. doi:10.1038/nature03443.

Capítulo X. Referencias bibliográficas

- [103]. Chinedu, E., Arome, D., & Ameh F.S. (2013). A new method for determining acute toxicity in animal models. *Toxicology International*, 20, 224-226. doi:10.4103/0971-6580.121674.
- [104]. Shanmugan, M.K., Rajendran, P., Li, F., Nema, T., Vali, S., Abbasi, T., Kapoor, S., *et al.* (2011). Ursolic acid inhibits multiple cell survival pathways leading to suppression of growth of prostate cancer xenograft in nude mice. *J. Mol*, 89, 713-727. doi:10.1007/s00109-011-0746-2.
- [105]. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I., Frise, E. *et al.* (2012), "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", *Nature methods* 9(7): 676-682, PMID 22743772, doi:10.1038/nmeth.2019 (on Google Scholar).
- [106]. Sánchez-Monroy, MB, Jacobo-Herrera, NJ, Zentella-Dehesa, A, Hernández-Téllez, B, & Martínez-Vázquez, M. (2017). Masticadienonic and 3-OH Masticadienoic Acids Induce Apoptosis and Inhibit Cell Proliferation and Tumor Growth in Prostate Cancer Xenografts In Vivo. *Molecules*, 22, 1-12. doi:10.3390/moléculas22091479.
- [107]. 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. *Journal of Ethnopharmacology*, 133 (3) 945–972. doi:10.1016/j.jep.2010.11.055.
- [108]. Dalla Via, L., García-Argáez, A.N., Martínez-Vázquez, M., Grancara, S., Martinis, P., & Toninello, A. (2014). Mitochondrial Permeability Transition as Target of Anticancer Drugs. *Current Pharmaceutical Design*, 20; 223-244. doi:10.2174/13816128113199990033.
- [109]. Alcántara, F.E., Brechu, 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. doi:10.3390/molecules201219757.
- [110]. Cruz, Rojas, M.C., Delgado, Buenrostro N.L., y Revuelta, Miranda, M.E. (2009). *Guía Básica Ilustrada para el manejo de animales de laboratorio*:

Capítulo X. Referencias bibliográficas

Ratón, rata, hámster, jerbo, cobayo y conejo. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

XII. ANEXOS

11.1 Otros experimentos

A lo largo de este trabajo de investigación, también se realizaron otros experimentos, en la búsqueda de la mejora del efecto citotóxico del peniocerol con la modificación estructural, además del mecanismo de acción del fitoesterol y la evaluación de la toxicidad en otra cepa de ratones, por lo que se plantearon los siguientes objetivos específicos:

11.1.1 Objetivos específicos:

Modificar estructuralmente el peniocerol mediante una reacción de acetilación.

Evaluar la actividad citotóxica del peniocerol diacetilado en líneas celulares de cáncer de colon (HCT-116 y SW-620), de mama (MDA-MB-231) y no tumorigénica de mama humano (MCF-10A).

Evaluar la inducción de senescencia del peniocerol en la línea celular HCT-116 mediante el ensayo de β -galactosidasa.

Determinar la DL_{50} en ratones de la cepa CD1.

La metodología y los resultados se muestran a continuación:

11.1.2 Modificación estructural del peniocerol a peniocerol diacetilado

Se pesaron 50 mg de Peniocerol y se colocaron en un matraz balón de 100 ml. El Peniocerol se disolvió con 5 ml (0.06 mol) de piridina mediante agitación constante. Una vez disuelto en la piridina, se adicionaron 5 ml de anhídrido acético (0.05 mol) por las paredes del matraz conservando la agitación. Se colocó un refrigerante sobre el matraz de la reacción y se mantuvo la reacción a temperatura ambiente y con agitación durante 15 horas.

Una vez transcurridas las 15 horas, se adicionó hielo sobre el matraz de reacción directamente hasta obtener la solución acuosa. La fase orgánica fue extraída con acetato de etilo (3 x 10 ml) y cada una de las fases orgánicas se colectaron en un

matraz Erlenmeyer de 250 ml. La fase orgánica fue lavada con una solución de HCl al 10% (3x10 ml) y finalmente un último lavado con agua destilada (2 x 10 ml).

La fracción orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro, y filtrada en un matraz balón de 250 ml. El disolvente fue retirado mediante el rotavapor y el producto resultante fue recristalizado con metanol destilado, el cual fue filtrado sobre una capa de celita para obtener el compuesto puro como un polvo blanco cristalino (Figura 29).



Figura 29 Esquema de la metodología para la obtención del peniocerol diacetilado.

11.1.3 Obtención del peniocerol diacetilado

Se obtuvo el peniocerol diacetilado a partir de la reacción de acetilación del peniocerol (Figura 30).

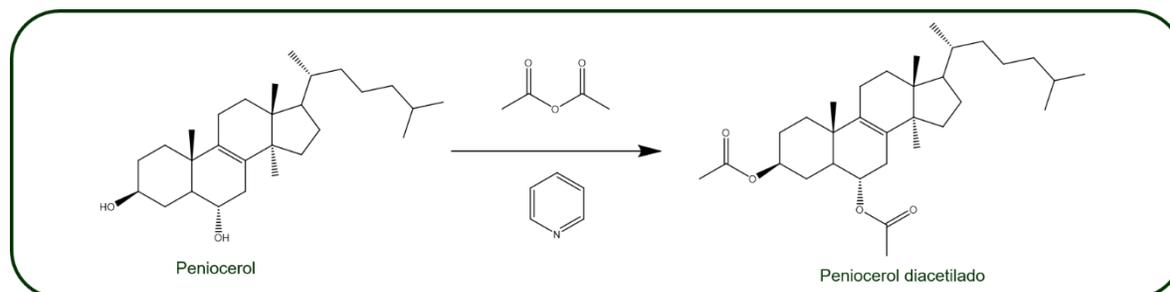


Figura 30 Reacción de acetilación del peniocerol.

El peniocerol diacetilado fue corroborado mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (¹H) en donde podemos observar la aparición de los dos grupos CH₃ pertenecientes a los acetilos y las dos señales en carbono-13, correspondientes a cada uno de los acetilos (Figura 31).

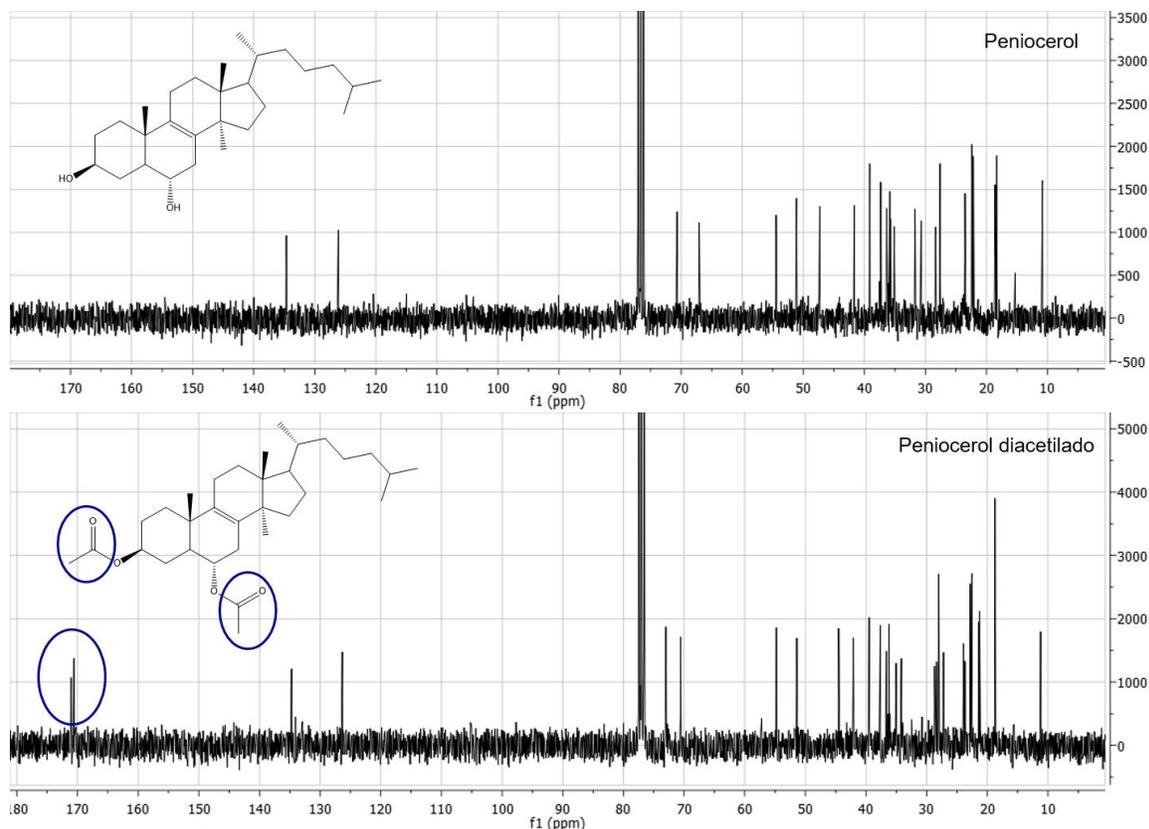


Figura 31 Comparación para la determinación del peniocerol diacetilado mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H)

11.1.4 Evaluación de la actividad citotóxica del peniocerol diacetilado

La actividad citotóxica del peniocerol diacetilado se evaluó mediante el ensayo de cristal violeta. Las células de cáncer de colon (HCT-15, HCT-116 y SW-620), de cáncer de mama (MDA-MB-231), y las no tumorigénicas de mama humano (MCF-10A) fueron sembradas en placas de 48 pozos con una densidad de 4×10^4 células por cm^2 en su respectivo medio. Las células fueron incubadas por 24 horas en una atmosfera de 5% de CO_2 y 95% de humedad a 37°C . Posterior a las 24 horas las células fueron tratadas con concentraciones seriadas de 80, 40, 20 y $10 \mu\text{M}$ de peniocerol.

La viabilidad celular se evaluó a las 48 horas después del tratamiento con los compuestos. Después de la incubación con los diferentes tratamientos, las células

adheridas a los pozos fueron fijadas con DMEM/F12, SFB 2% y glutaraldehído 1.1% por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, a las células se les retiró el medio de fijación, se dejaron secar, fueron teñidas con 200 μ L de cristal violeta por 15 minutos, se retiró el cristal violeta y finalmente la proteína teñida fue solubilizada con 500 μ L de ácido acético al 10 %.

Los valores de densidad óptica fueron obtenidos en un lector de microplacas a una longitud de onda de 595 nm. Una curva dosis respuesta fue graficada para cada compuesto y la IC₅₀ fue estimada usando el programa estadístico Excel mediante una regresión lineal.

11.1.5 Resultados de la actividad citotóxica del peniocerol diacetilado

El peniocerol diacetilado no presentó actividad citotóxica a ninguna concentración (10, 20, 40 y 80 μ M) a las 48 horas, en las diferentes líneas celulares de cáncer humano evaluadas. En la Figura 32, se muestra que la concentración máxima evaluada (80 μ M) no presentó diferencia significativa con respecto al control celular.

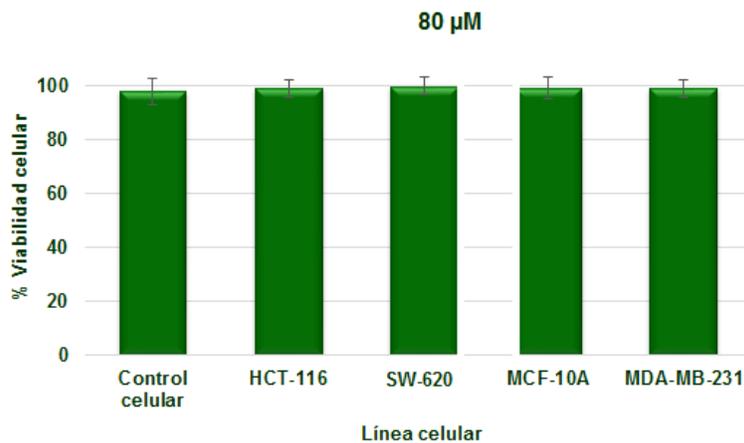


Figura 32 Citotoxicidad nula del peniocerol diacetilado en diferentes líneas celulares de cáncer humano.

11.1.6 Evaluación de la inducción de senescencia

La evaluación de la inducción del peniocerol se llevó a cabo mediante la tinción citoquímica de SA- β -galactosidasa. Las líneas celulares anteriormente mencionadas fueron sembradas en placas de 24 pozos, con 2 mil células por pozo,

se incubaron con 2.5 μM de peniocerol a 24, 48 y 72 h. Se realizó la tinción citoquímica con SA- β -Galactosidasa Staining Kit, utilizando las instrucciones del mismo, al término de los respectivos tiempos de incubación se retiró cuidadosamente el medio de las células y se lavaron con 500 μL de PBS, después se añadió solución fijadora al 1x por 15 minutos, transcurrido el tiempo se lavaron nuevamente con PBS dos veces, la placa fue incubada a 37°C por 14 horas sin CO_2 y se añadió la solución de mantenimiento al 1x, previamente ajustada a un pH de 6.0. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, el conteo celular se realizó mediante un microscopio de campo claro Nikon T-MSF. Las células teñidas de azul son las que resultaron positivas para SA-B-Galactosidasa y se determinó el porcentaje de células senescentes contando tanto las células teñidas como las teñidas por campo, teniendo en cuenta contabilizar aproximadamente 300 células por 10 campos de cada muestra.

Y los resultados mostraron que la modificación estructural del peniocerol, es decir, el peniocerol diacetilado, no presenta actividad citotóxica en las líneas celulares de cáncer humano evaluadas. Así como tampoco, su mecanismo de acción es por senescencia.

11.1.7 Resultados de inducción de senescencia

El peniocerol no induce senescencia a la concentración de 2.5 μM , en la línea células HCT-116, en un tiempo de incubación de 24, 48 y 72 horas, debido a que no presenta diferencia estadística significativa en comparación con el control negativo (Figura 33).

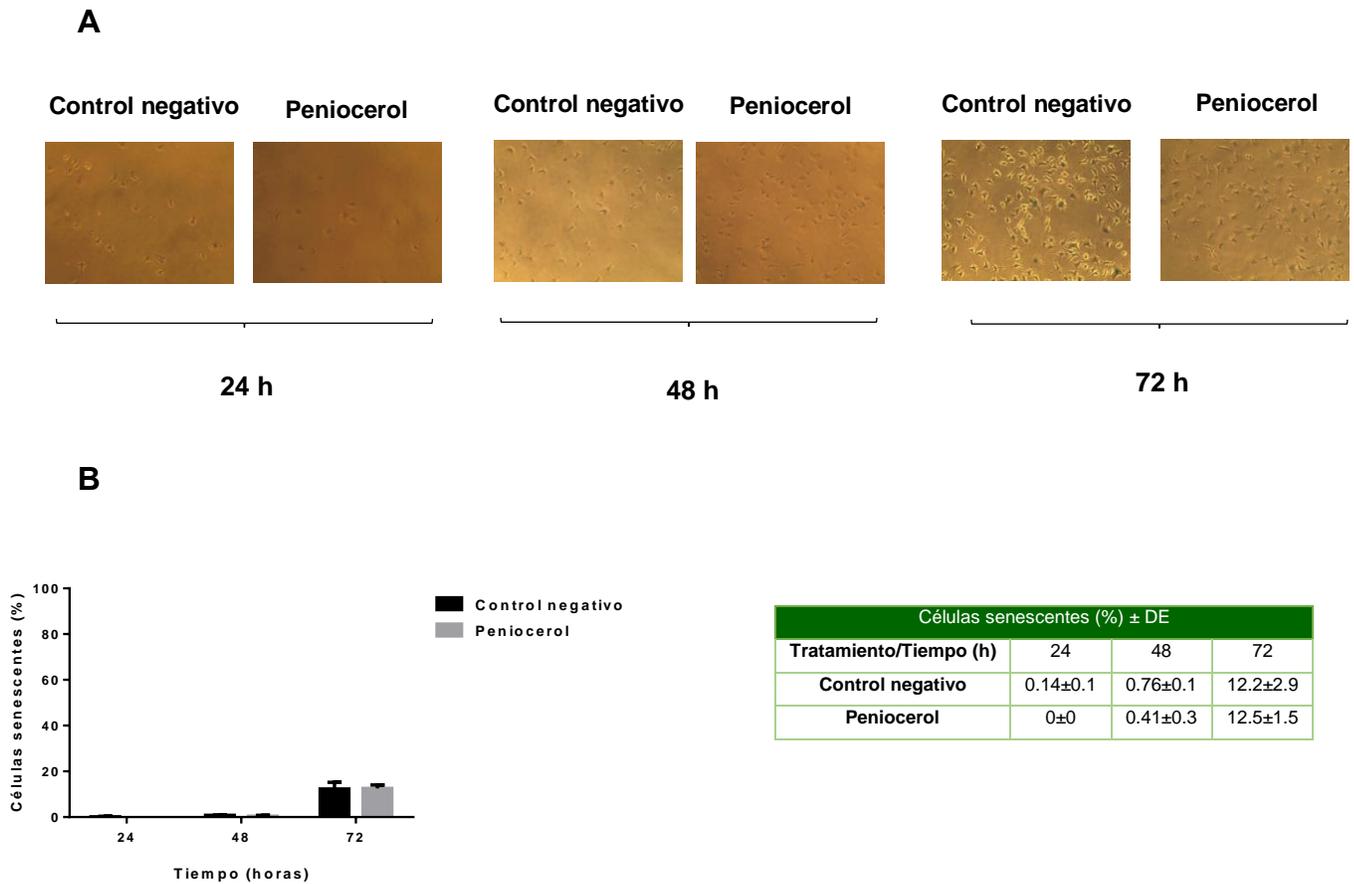


Figura 33 Inducción de senescencia nula del peniocerol. A) Fotomicrografías del peniocerol a las 24, 48 y 72 horas de evaluación en comparación con el control negativo. B) Gráfica del porcentaje de células senescentes inducidas por el peniocerol con respecto al tiempo (24, 48 y 72 horas), en comparación con el control negativo. C) Tabla de los resultados de las células senescentes (%). Los resultados representan la media ± DE de tres experimentos independientes.

11.1.8 Determinación de la DL₅₀ en ratones de la cepa CD1

La dosis letal media se determinó mediante la evaluación de las dosis de 175 y 55 mg/kg, se utilizó la fórmula $DL_{50} = (M0 + M1)/2$ donde M0 es la dosis que no causa muerte en ningún ratón del grupo y M1 es la dosis que causa la muerte de al menos un ratón del grupo [92]. El peso y conducta de los ratones fueron monitoreados cada tercer día, durante el tratamiento. Los ratones fueron sacrificados el día 21 de la evaluación.

11.1.9 Resultado de la determinación de la DL₅₀ en ratones de la cepa CD1

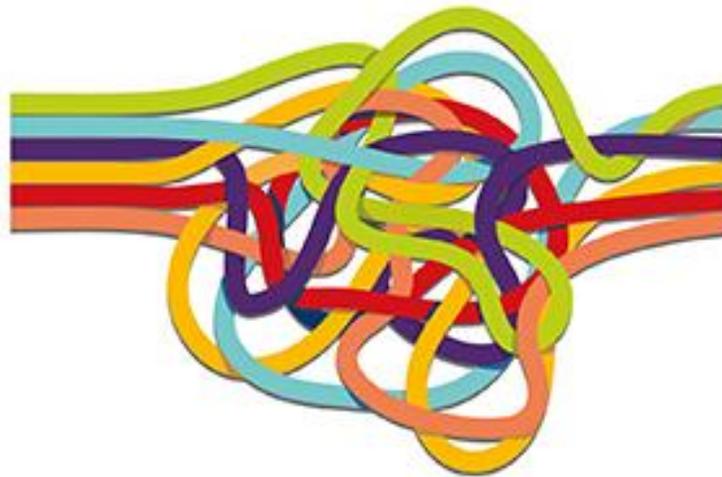
La dosis de 175 mg/kg fue tan tóxica que mató a todos los ratones administrados con peniocerol, mientras que la dosis de 55 mg/kg no presentó signos de toxicidad a simple vista, en la Tabla 14 se describen los efectos de toxicidad que fueron observados. La dosis letal media del peniocerol en ratones de la cepa CD1 fue de 115 mg/kg.

Tratamiento	Síntomas de toxicidad
Vehículo	No existió cambio en el comportamiento, ni en el peso.
Peniocerol 175 mg/kg	20 min: cambio de comportamiento, letargo, piloerección, ojos casi cerrados. 40 min: espasmos musculares, respiración agitada, temblor. 24 horas: 2 ratones murieron y los vivos no recuperaron peso y hay presencia de piloerección. 48 horas: los 3 ratones restantes murieron.
Peniocerol 55 mg/kg	No ocasionó la muerte de ningún ratón. No hubo cambio en su comportamiento. No presentaron signos de toxicidad

Tabla 14 Síntomas de toxicidad del peniocerol en ratones de la cepa CD1 a una dosis.

11.2 Artículo publicado

Couder-García, B.C., Jacobo-Herrera, N.J., Zentella-Dehesa, A., Rocha-Zavaleta, L., Tavares-Santamaría, Z., & Martínez-Vázquez, M. (2019). The Phytosterol Peniocerol Inhibits Cell Proliferation and Tumor Growth in a Colon Cancer Xenograft Model. *Front. Oncol*, 9:1341. doi: 10.3389/fonc.2019.01341.





The Phytosterol Penicoceryl Inhibits Cell Proliferation and Tumor Growth in a Colon Cancer Xenograft Model

Beatriz del Carmen Couder-García¹, Nadia J. Jacobo-Herrera², Alejandro Zentella-Dehosa^{2,3}, Leticia Rocha-Zavaleta⁴, Zaira Tavares-Santamaría¹ and Mariano Martínez-Vázquez^{1*}

¹Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, México, ²Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México City, México, ³Departamento de Medicina Genética y Toxicología Ambiental & Programa Institucional de Cáncer de Mama, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, México, ⁴Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, México

Objective: This study aimed to evaluate the cytotoxic activity of penicoceryl against human colon cancer cell lines and its antitumor effect *in vivo* in a xenograft model using *nu/nu* mice.

Materials and Methods: SW-620, HCT-15, and HCT-116 colon cancer cell lines were treated with penicoceryl for cytotoxicity by crystal violet technique. Cell apoptosis induction was detected by flow cytometry, and the antitumor activity of penicoceryl was evaluated in a xenograft model of HCT-116 in *nu/nu* mice. After treatment, the effect of penicoceryl was analyzed in histological sections of tumors by immunohistochemistry using DAPI, anti-PCNA, and PARP-1 antibodies.

Results: Penicoceryl inhibited cell growth and induced apoptosis *in vitro* in a time and dose-dependent manner. Besides, penicoceryl administration (30 or 15 mg/kg) inhibited tumor growth and induced apoptosis in the xenograft mice. The lack of penicoceryl toxicity was proved by a biochemical blood analysis of healthy *nu/nu* mice administrated with this sterol.

Conclusions: Our results proved that penicoceryl induces apoptosis *in vitro* and *in vivo* assays.

Keywords: phytosterol, cytotoxicity, antiproliferative, antitumor, xenograft, apoptosis, colon cancer

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CC) is second cancer with the highest mortality rate worldwide, responsible for more than 880 thousand deaths, and is the third most common cancer, with almost 2 million incidents in both sexes and all ages (1). Although several chemotherapeutic options are available, 5-fluorouracil (5-FU) is still the base drug for the treatment of colorectal cancer in combination with other anticancer agents. For instance, the combination of oxaliplatin, 5-FU, and leucovorin is used after tumor surgery for patients undergoing treatment with curative intent for stage III (2). However, the drug with the desirable activity and adequate toxicity has not been developed yet. Therefore, searching for better antitumor drugs is not concluded. In this sense, the so-called natural

OPEN ACCESS

Edited by:
Antonio Giuseppe Niccolini,
University of Pisa, Italy

Reviewed by:
Hsiuh-Wai Cheng,
Kaohsiung Medical University, Taiwan
Georg F. Weber,
University of Cincinnati, United States

*Correspondence:
Mariano Martínez-Vázquez
mariaz@unam.mx

Specialty section:
This article was submitted to
Cancer Metabolism,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 16 September 2019
Accepted: 15 November 2019
Published: 03 December 2019

Citation:
Couder-García BC,
Jacobó-Herrera NJ,
Zentella-Dehosa A, Rocha-Zavaleta L,
Tavares-Santamaría Z and
Martínez-Vázquez M (2019) The
Phytosterol Penicoceryl Inhibits Cell
Proliferation and Tumor Growth in a
Colon Cancer Xenograft Model.
Front. Oncol. 9:1341.
doi: 10.3389/fonc.2019.01341

products are a rich source of bioactive compounds that could be considered as prototypes against this cancer.

Phytosterols are plant sterols, structural components of the cell membrane that participate in the regulation of fluidity and permeability associated with the membrane (3). They are byproducts of a complex isoprenoid biosynthesis pathway through the squalene (4). Phytosterols belong to a family of more than 200 different compounds. The most common are β -sitosterol, campesterol, and stigmasterol (3). They have demonstrated protection against various chronic diseases such as cardiovascular, liver, diabetes, and different types of cancer (5–9). Cancer prevention studies show that a diet rich in phytosterols can reduce the risk of different types of cancer (10). For example, the intake of β -sitosterol, an anti-inflammatory agent (11), can prevent colon cancer (12, 13). In this context, we have previously published the anti-inflammatory activity *in vivo* and the cytotoxic activity *in vitro* against human breast and colon cancer cells of the penicocero, a sterol isolated from the cactus *Myrtillocactus geometrizans* (Mart Ex Pfeiff) Console (14, 15). In this article, we show the apoptotic activity of the penicocero both *in vitro* against the colon cancer cell line HCT-116, as well as its antitumor effect *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Extraction and Isolation

Penicocero (3β , 6 α -diol-cholest-8-ene) was isolated from *Myrtillocactus geometrizans* and purified as previously described (15). Copies of the original spectra are obtainable from the author.

Cell Lines and Cell Culture

Colon carcinoma cells SW-620, HCT-15, and HCT-116 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Cells were cultured in proper media (DMEM, DMPQ8-11) as previously reported.

Animals

Male *nu/nu* mice, 6–8 weeks old were used. The animals were housed, fed, and maintained following the recommendations of the ethics committee. The Animal Research Committee approved the experimental procedures and were carried out in accordance to the Guidelines for the Care and Use of Animals of the Bioterium Laboratory of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Mexico City, Mexico.

Solutions

Working solutions of penicocero (25 mg/mL) were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Cat. D4540–100 mL) and stored at -20°C . The penicocero dilutions (80, 40, 20, and 10 μM) were prepared with DMEM and the DMSO concentration was $<0.2\%$. Cisplatin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Cat. 479306-1G), was included as a positive control (1 mg/kg), dissolved in DMEM. For *in vitro* experiments, 25 mg/mL concentrated penicocero solutions were prepared, dissolved in sesame oil and 5% DMSO and cisplatin 10

mg/kg in saline solution. All solutions were prepared on the day of administration.

Cytotoxicity

The cells HCT-15, HCT-116, and SW-620 were seeded in 48-well-plates at a density of 4×10^4 cells per cm^2 in DMEM plus 10% FBS. The cells were incubated for 24 h in an atmosphere of 5% CO_2 and 95% humidity at 37°C . After 24 h the cells were treated with serial concentrations of penicocero (80, 40, 20, and 10 μM). Cell viability was evaluated at 24, 48, and 72 h. Cisplatin was used as a positive control at concentrations $<10 \mu\text{M}$. Medium plus DMSO was included as a negative control. After incubation, the cells were fixed with DMEM, 2% FBS, and 1.1% glutaraldehyde for 15 min at room temperature. Subsequently, the fixation medium was removed from the cells, allowed to dry, stained with 200 μL of violet crystal for 15 min, the violet crystal was removed and finally, the stained protein was solubilized with 500 μL of 10% acetic acid. Optical density values were determined at a wavelength of 595 nm. A dose-response curve was plotted for each compound and the IC_{50} was estimated using the Excel statistical program using linear regression. The tests were carried out in quadruplicate in three independent experiments.

Flow Cytometric Detection of Apoptotic Cells

Apoptotic cell death was determined using flow cytometry with the identification of Annexin V and propidium iodide markers (GTX85591, GeneTex). HCT-116 colon cancer cells were seeded in 6-well-plates with a density of 1.5×10^5 cells per well. The cells were incubated for 24 h in an atmosphere of 5% CO_2 and 95% humidity at 37°C . After 24 h the cells were treated with vehicle, penicocero (20 μM) and camptothecin (2 μM) as a positive control (each treatment was done in triplicate), at different times (24, 48, and 72 h). After incubation times, the cells were harvested with trypsin, washed with PBS and centrifuged at 1,500 rpm for 5 min. The cell aggregate was resuspended in 500 μL of binding buffer, then 5 μL of Annexin V-FITC, 5 μL of propidium iodide were added and finally incubated for 5 min, according to the manufacturer's instructions. The cells were analyzed using a FACS Can flow cytometer from the National Flow Cytometry Laboratory, 10,000 cells were analyzed with the BD Cell Quest Pro Software program.

Toxicity Assessment in *nu/nu* Mice

Lethal dose 50 (LD_{50}) determination was performed using two groups of three female mice each. One group was treated with 125 mg/kg and the second with 62.5 mg/kg of penicocero. Food and water were administered up to 4 h after treatment. Mortality was observed during the first 4 h. The LD_{50} was determined by the formula $\text{LD}_{50} = (M0 + M1)/2$ where M0 is the dose that does not cause the death of any mouse in the group and M1 is the dose that causes the death of at least one mouse in the group (16). The determination of the doses that did not induce toxic effects was carried out using female *nu/nu* mice distributed in groups of three mice. Penicocero was administered intraperitoneally (i.p.) in two treatment schemes, once a week, and three times a week both for 21 days (Figure 3A). The weight and behavior of the

mice were monitored every third day during treatment. Mice were sacrificed on day twenty-one. Blood tests were performed in the Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Mexico City, México.

Antitumor Activity Evaluation in Xenografted Mice

Male *na/na* mice were distributed in seven groups of 6 mice each. The animals were xenografted with 1.5×10^5 HCT-116 cells resuspended in 100 μ l of PBS and inoculated via subcutaneous in the right flank from the back of the animal. The treatments were administered (i.p.) in two schemes, once a week or three times a week, both for 21 days. The treatments started when the tumors reached a volume of 50 mm³. The groups were organized as follows:

1. Negative control: 5% DMSO dissolved in sesame oil, once a week.
2. Negative control: 5% DMSO dissolved in sesame oil, three times a week.
3. Positive control: cisplatin 4 mg/kg once a week.
4. Positive control: cisplatin 2 mg/kg, three times a week.
5. Penicicero: 30 mg/kg once a week.
6. Penicicero: 15 mg/kg once a week.
7. Penicicero: 15 mg/kg three times per week.

The weight of the mice and the tumor growth were measured three times a week. Tumor volume was calculated using the formula $V = \pi/6 \times (\text{larger diameter} \times [\text{smaller diameter}]^2)$ (17). The experiment was carried out for 21 days, at the end of the experiment, the animals were weighed, euthanized and the tumors were extracted, fixed in formalin, and embedded in paraffin.

Histologic Evaluation of Tumors

Paraffin-embedded tumors were cut in histologic sections of 5 μ m thick and used for subsequent analysis with hematoxylin-eosin, DAPI, and immunohistochemistry. The samples were analyzed in an Olympus IX71 microscope, with the QImaging program at the Microscopy Unit of the Biomedical Research Institute, UNAM, Mexico.

Hematoxylin-Eosin Staining (H-E)

Tissue slides were exposed at a temperature of 60°C for 15–30 min and rehydrated with the following solution for 5 min: Xylol (twice), ethanol/xylol 50:50, 100% ethanol, 96% ethanol, 80% ethanol, 70% ethanol, 50% ethanol, distilled water, and PBS. The cell membrane was subsequently permeabilized with a 0.5% Triton solution x-100 for 30 min, followed by two washes with PBS of 5 min each. One hundred fifty microliter of hematoxylin was added to the sample for 2 min, washed with distilled water, and covered with eosin for 20 s, washed with distilled water and assembled.

4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) Immunofluorescence

The dewaxing and rehydrated of tissues were performed as previously described for H-E staining. Then, the membrane was

permeabilized with a 0.5% Triton solution x-100 for 30 min, followed by two washes with PBS of 5 min each. The kit used was Vectashield mounting medium for fluorescence with DAPI from Vector Laboratories.

Nuclear Antigen of Proliferation Cells (PCNA) Determination

The dewaxing and rehydrated of tissues were performed as previously described for H-E staining. The membrane was permeabilized with a 0.5% Triton solution x-100 for 30 min, followed by two washes with PBS of 5 min each. Antigen exposure was carried out heating the samples in a 0.25 mM sodium citrate solution at pH 6.2 for 20 min in a microwave oven. Then, samples were left at room temperature for 20 min and slides were washed twice with PBS for 5 min. Endogenous peroxidase was inhibited by exposing the tissues to 3% H₂O₂ for 30 min, followed by two washes with PBS for 5 min each. The cell membrane permeabilization was performed with a 0.5% Triton solution x-100 for 30 min, followed by two washes with PBS of 5 min each. Subsequently, the non-specific signal was blocked by incubation with 1% H₂O₂ + 5% albumin, in PBS for 30 min, followed by one wash with PBS of 5 min. The slides were incubated with the primary anti-PCNA antibody (sc-25280, Santa Cruz Biotechnology, INC). Incubation was performed overnight at 4°C, followed by two washes with PBS for 5 min. The slides were incubated with the secondary antibody for 60 min at 37°C (anti-mouse IgG for PCNA, GTX77315, GeneTex). The detection of immunohistochemical signals was performed with diaminobenzidine (DAB) for 10 min, the excess was removed with distilled water. Counterstain: Harris hematoxylin staining was performed for 3–5 min on each tissue, then the excess was removed with distilled water. It was covered with Li₂CO₃ for 15 s; then the excess was removed with distilled water. Once the samples dried completely, the assembly was carried out with EcoMount from Biotcare Medical and covered with a coverslip. Qualitative analysis of PCNA positive cells was carried out using the ImageJ-win64 image processing package.

Poly(ADP-Ribose) Polymerase

(PARP-1) Determination

The dewaxing and rehydrated of tissues were performed as previously described for H-E staining. The membrane was permeabilized with a 0.5% Triton solution x-100 for 30 min, followed by two washes with PBS of 5 min each. Antigen exposure was carried out, heating the samples in a 0.25 mM sodium citrate solution at pH 6.2 for 20 min in a microwave oven. Then, the samples were left at room temperature for 20 min, and slides were washed twice with PBS for 5 min. Endogenous peroxidase was inhibited by exposing the tissues to 3% H₂O₂ for 30 min, followed by two washes with PBS for 5 min each.

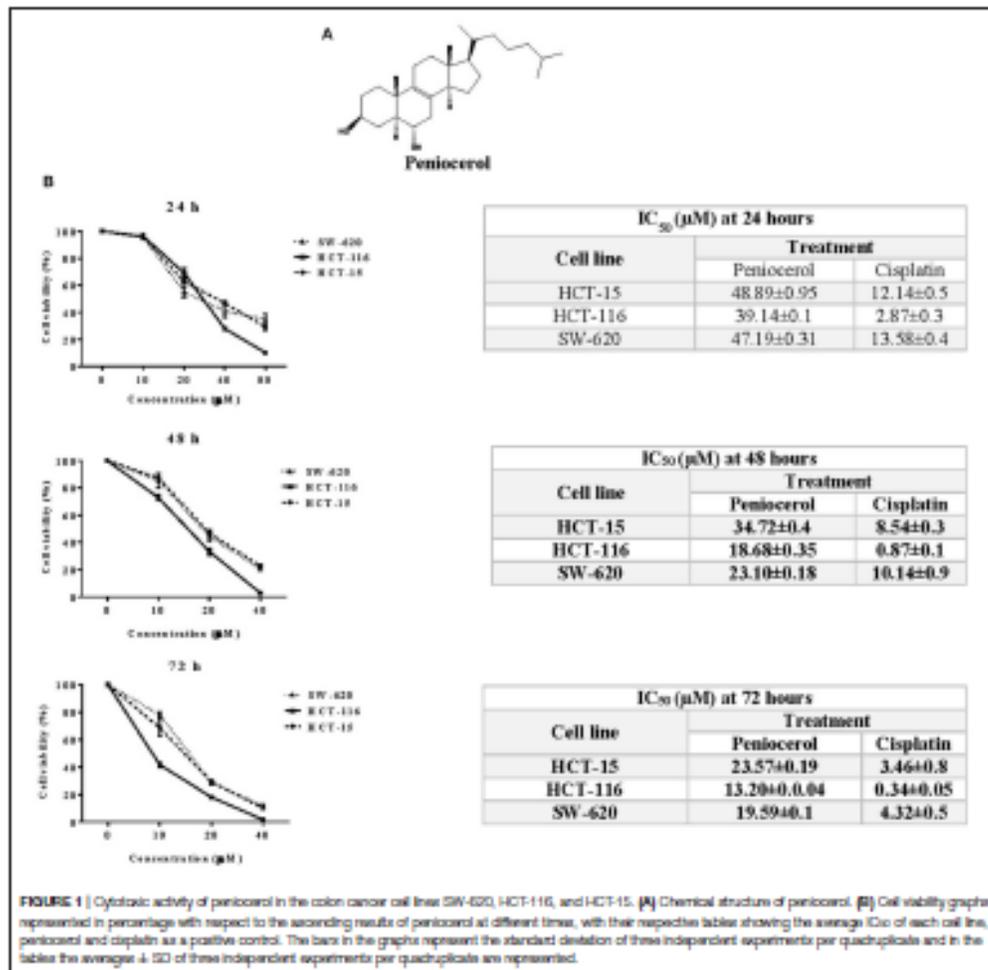
The cell membrane permeabilization was performed with a 0.5% Triton solution x-100 for 30 min, followed by two washes with PBS of 5 min each. Subsequently, the non-specific signal was blocked by incubation with 1% H₂O₂ + 5% albumin in PBS for 30 min, followed by one wash with PBS of 5 min. The slides were incubated with the primary anti-PARP-1 antibody (sc-8007, Santa Cruz Biotechnology, INC). Incubation was performed

overnight at 4°C, followed by two washes with PBS for 5 min. The slides were incubated with the secondary antibody for 60 min at 37°C (anti-mouse IgG for PARP-1, GTX77315, GeneTex). The detection of immunohistochemical signals was performed with diaminobenzidine (DAB) for 10 min. The excess was removed with distilled water. Counterstain: Harris hematoxylin staining was performed for 3–5 min on each tissue, then the excess was removed with distilled water. It was covered with Li₂CO₃ for 15 s; then, the excess was removed with distilled water. Once the samples dried completely, the assembly was carried out with EcoMount from Biocare Medical and covered with a coverslip. Qualitative analysis of PARP-1 positive and

claved-PARP-1 cells was carried out using the ImageJ-wtn64 image processing package.

Data Analysis

Each experiment was performed in triplicate. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments. Statistical differences were determined using the GraphPad Prism 6.0 software program (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Comparisons between the treated and control groups were made in the *t*-test of unpaired data and the two-way ANOVA. All comparisons are made concerning untreated controls. A statistical difference in **P* < 0.05 was considered.



RESULTS

Cytotoxicity of Penicicercol

The chemical structure of penicicercol is shown in Figure 1A. The cytotoxic activity of penicicercol was assessed using the crystal violet cell staining technique. The HCT-116 cells were the most susceptible to penicicercol (Figure 1B), in comparison to the other two cell lines. Therefore, the HCT-116 line was used for subsequent experiments.

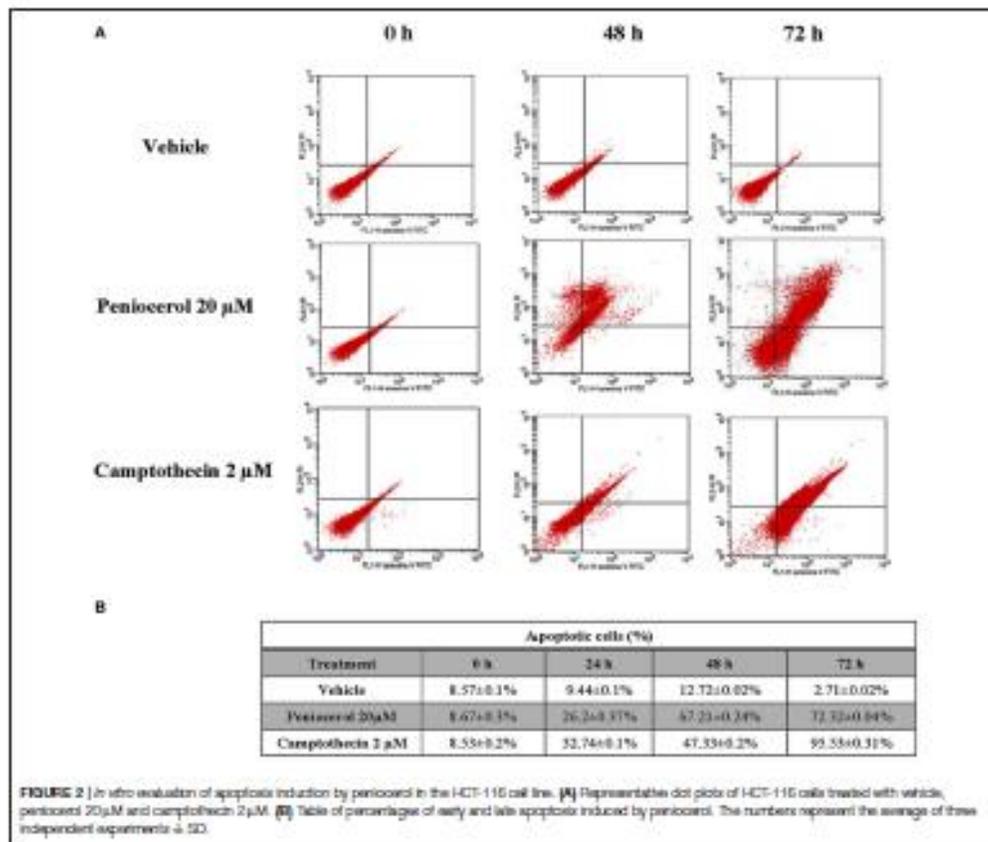
Detection of Apoptosis

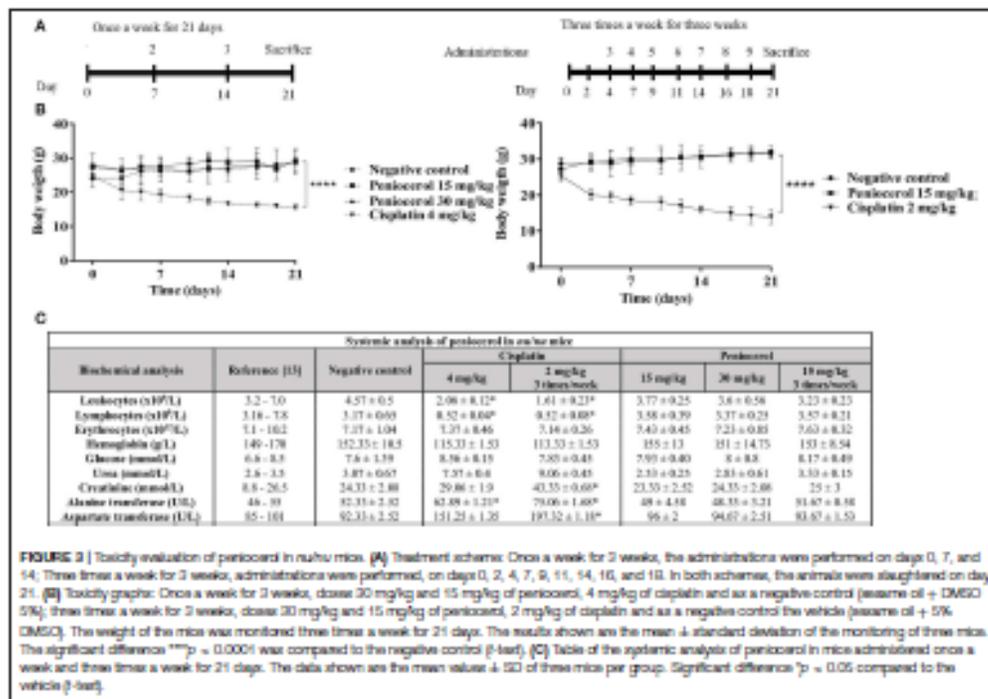
HCT116 cells treated with penicicercol experienced apoptosis in a time-dependent manner. As shown in Figure 2A, cell death was observed after 48 h of treatment and increased after 72 h, 67.21 ± 0.24, and 72.32 ± 0.04%, respectively. The level of apoptosis induced by penicicercol was similar to that produced by camptothecin (Figure 2B). These results are totally in agreement with those previously obtained where it was proved, through

cleavage of PARP-1 and flow cytometry, that this steroid induced apoptosis in several human cancer lines (14, 18).

Toxicity of Penicicercol of Penicicercol Was Evaluated in Female *nu/nu* Mice, Using Two Different Schemes of Treatment

We first evaluated the effect of penicicercol administered once a week during 21 days at 15 or 30 mg/kg doses. Our results showed that no significant modification in body weight were noticed compare with those of animal control. As shown in Figure 3B, when mice received penicicercol three times a week at different doses, also no significant differences in weight were detected. In contrast, the administration of cisplatin one time a week produced a significant decrease in body weight compared with the negative control ($p < 0.0001$). The weight of mice treated with cisplatin was reduced by 42%, which suggests a toxic effect of the positive control. Administration of 15 mg/kg of penicicercol





three times a week for 21 days did not produce a change in the weight of the animals as compared with the negative control. On the contrary, cisplatin administered in the lower dose (2 mg/kg) three times a week induced a significant decrease in body weight compared with the negative control ($p < 0.0001$).

To further analyze the potential toxic effect of penicercol in healthy mice, we performed a biochemical blood analysis including glucose, hemoglobin, urea, creatinine, alanine transferase, and aspartate transferase, and a cell count including leukocytes, lymphocytes and erythrocytes (Figure 3C). The analysis revealed that penicercol did not produce any change in blood biochemical and cellular components compared with those observed in mice that received the vehicle. In sharp contrast, administration of cisplatin resulted in a significant decrease in leukocytes, lymphocytes, and hemoglobin ($p < 0.05$) and an increase in the concentrations of liver enzymes alanine transferase and aspartate transferase ($p < 0.05$). These results suggest that penicercol (15 mg/kg and 30 mg/kg) is less toxic than cisplatin, and that healthy mice tolerate it well.

Anti-tumor Activity of Penicercol

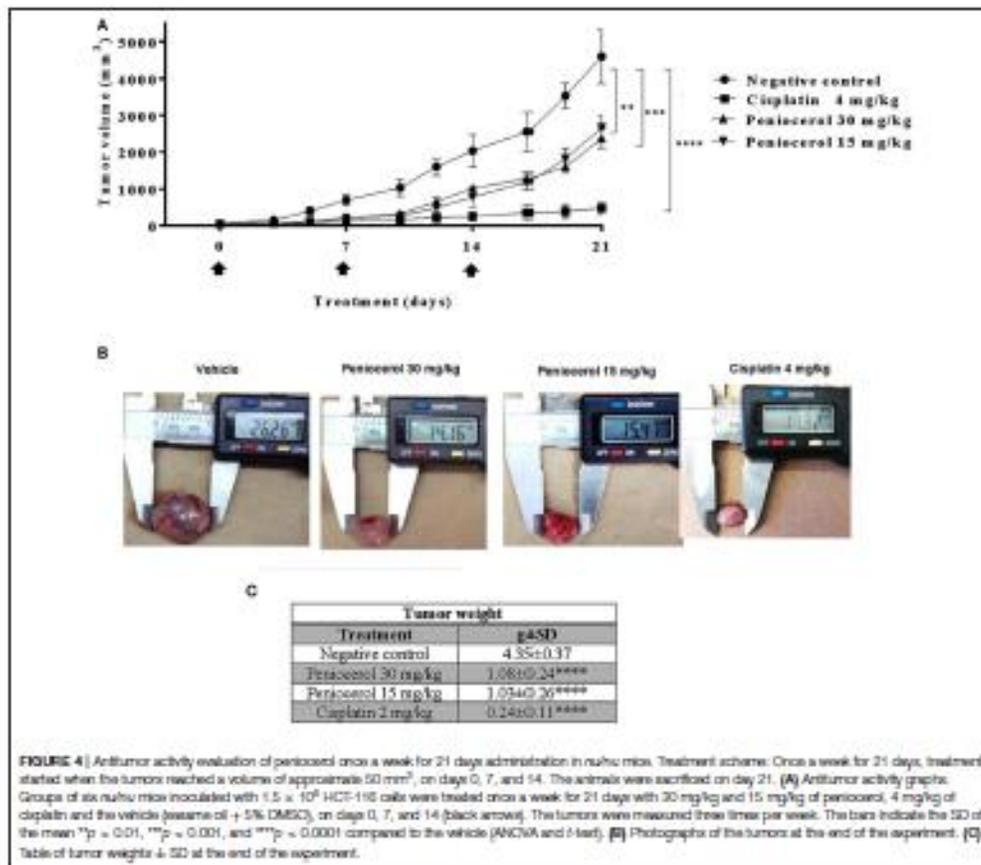
To test the potential effect of penicercol on tumor growth *in vivo*, we established a xenograft model in mice using the HCT-116 cell line. When the tumors reached a mean of 50 mm³ mice were treated with penicercol (15 or 30 mg/kg doses) one time

a week for 21 days, cisplatin (4 mg/kg) also one time a week for 21 days. As seen in Figure 4A, both concentrations of the penicercol induced a significant reduction of tumor volume at the end of the experiment ($p < 0.01$). As expected, treatment with cisplatin-induced a highly significant reduction of tumor volume ($p < 0.0001$). At the finale of the experiment the remaining tumor masses were dissected and weighed, the results presented in Figures 4B,C demonstrated that penicercol induced a reduction of tumor weight of 75.2 and 76.4% when administered at 30 or 15 mg/kg, respectively.

Our results suggest that penicercol has a significant anti-tumor effect on mice, so we decided to investigate whether an increase of frequency of administration of the lower doses evaluated of penicercol would produce a major effect. Administration of penicercol at 15 mg/kg doses three times a week for 21 days induced a significant decrement of tumor volume compared to that produced by the previously administration ($p < 0.05$; Figure 5A). However, it did not reach the level of inhibition produced by treatment with cisplatin (Figures 5B,C).

Immunohistological Analysis of Tumors

Tissue slides were obtained from tumors dissected after treatment. H-E showed a precise modification of cell morphology that can be observed by their amorphous and condensed shape in



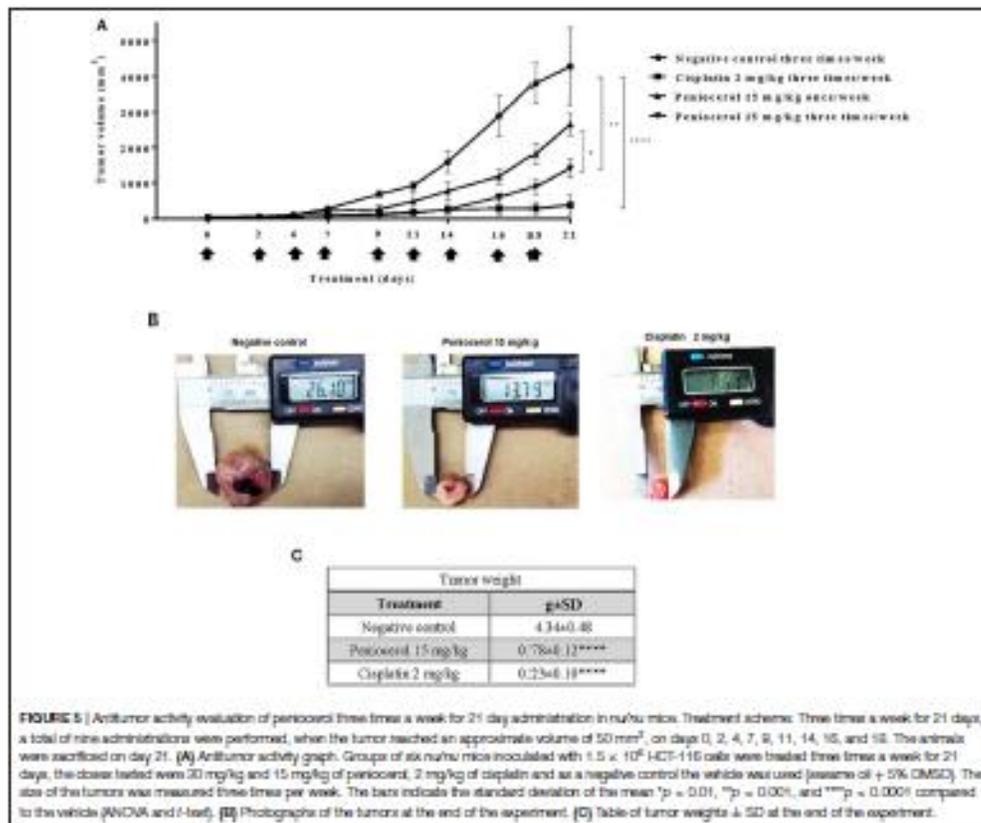
the tumor samples that were treated with penicercol (30 and 15 mg/kg, once a week and 15 mg/kg three times a week), compared to the positive control (Figure 6A).

Furthermore, the nuclei tissues were stained with DAPI. As shown in Figure 6B, nuclei with condensation or fragmentation, indicative of apoptosis, can be seen in penicercol treatments.

To determine if penicercol was able to inhibit cell proliferation, tumor slides were incubated with an anti-PCNA. Results of specific immunostaining indicate that both doses 30 and 15 mg/kg once a week and 15 mg/kg three times a week of penicercol, decreased the number of positive cells compared to the negative control (Figure 6C). The results show that penicercol significantly inhibited ($p < 0.0001$) the expression of PCNA at all three doses compared to the positive control. In the doses of 30 mg/kg and 15 mg/kg administered

once a week, 150.07 ± 17.14 and 143.1 ± 34.7 labeled cells were detected respectively, while the dose of 15 mg/kg administered three times a week, 95.57 ± 18.85 cells were marked, compared with the negative control that was 328.3 ± 64.07 labeled cells (Figure 7A).

The induction of apoptosis in histological sections was determined with the specific immune staining of anti-PARP-1 (Figure 6D). The results show that independently of the penicercol doses, there is a significant decrease ($p < 0.0001$) in the expression of PARP-1 in the nucleus, compared to the vehicle ($78.34 \pm 3.32\%$). On the contrary, in the expression of cleaved PARP-1, the doses of 30 mg/kg ($54.96 \pm 2.28\%$) and 15 mg/kg ($59.96 \pm 9.09\%$) once a week, and 15 mg/kg three times a week ($61.7 \pm 1.56\%$), significantly increase the percentage compared to the vehicle ($5.64 \pm 2.35\%$). Penicercol treatments effected similarly to that of cisplatin (Figure 7B).



DISCUSSION

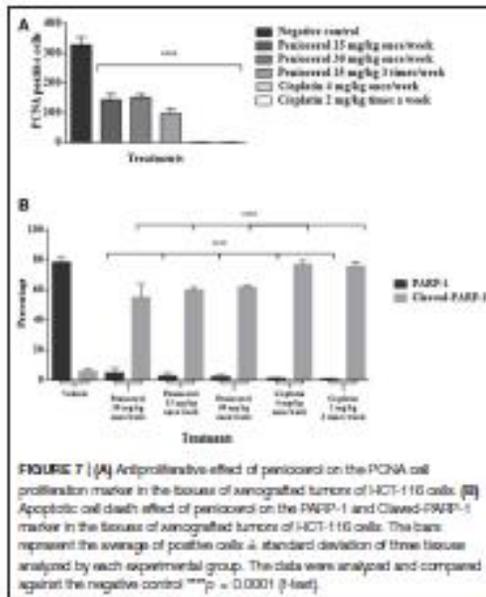
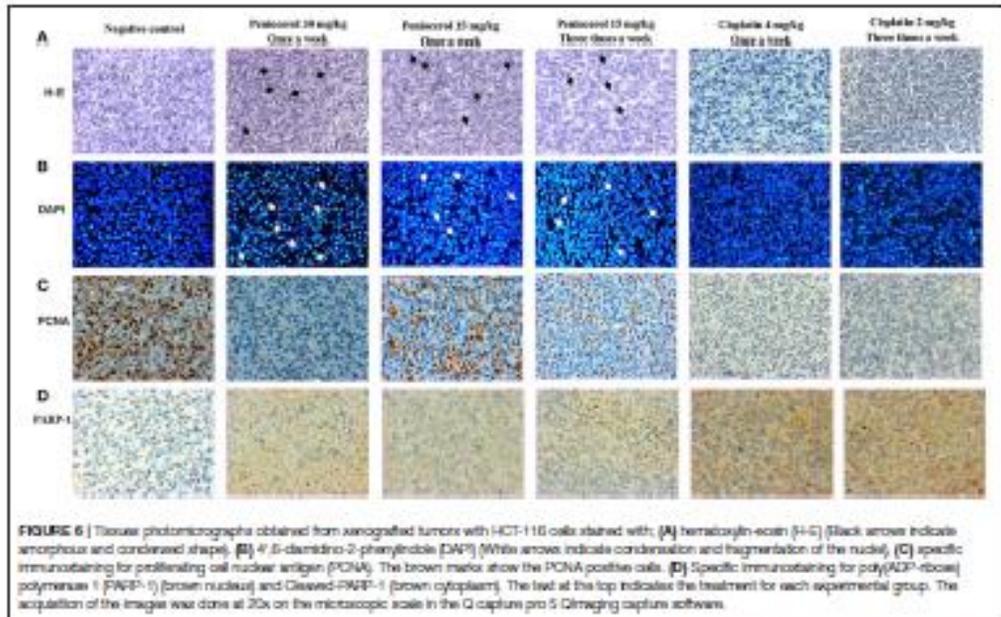
The National Cancer Institute (NCI, USA), has regulated the natural products antineoplastic activity to select potential compounds. Although it is not a formal rule, they are considered active when $ED_{50} \leq 4 \mu\text{g/ml}$ (19, 20). Under this premise, many compounds of natural origin, including phytosterols, would be considered inactive. However, there seems to be a probable relationship between the anti-inflammatory properties of some secondary metabolites such as the phytosterols, and their antitumor effects *in vivo* (21, 22). Our research group published the exceptional anti-inflammatory activity of penicoceryl and its modest cytotoxic activity against the HCT-15 and the MCF-7 cancer cell lines *in vitro* (14). Consequently, we evaluated the antitumor activity of penicoceryl in xenografted mice.

Although penicoceryl showed cytotoxic activity on the colon cancer lines, HCT-15, HCT-116, and SW-620, the HCT-116 line was the most susceptible, so it was chosen for the next experiments. The level of apoptosis induced by penicoceryl was

similar to that produced by camptothecin *in vitro* (Figure 2B). In earlier studies, we proved that penicoceryl might trigger both the caspase-dependent and caspase-independent apoptotic pathways (18).

To determine the toxicity of penicoceryl female nu/nu mice were used. Our results showed that at 15 or 30 mg/kg doses of penicoceryl under three or once a week administration, there was no significant modification in body weight compared with the untreated mice. It is worth to note that the cis-platin group showed until 42% of body weight loss (Figures 3A,B).

Biochemical blood analysis was performed to evaluate the potential effect of penicoceryl in healthy animals. The analysis revealed that penicoceryl did not produce any change in blood biochemical and cellular components compared with those observed in mice that received the vehicle. This analysis also reaffirms the toxicity so substantial that cisplatin induces in mice. For example, the administration of cisplatin resulted in a significant increase of alanine- and aspartate transferase as well as the decrease of hemoglobin, lymphocytes, and leukocytes. These



results showed that in spite that both compounds showed similar antitumoral activity in the three times a week administration, their toxicity is quite different (Figure 3C).

The results registered that a higher frequency of administration of penicoceryl improved its antitumor activity (Figure 5) and could suggest that the frequency of administration is more significant than the dose. Several studies have shown that dietary intake of phytosterols reduces the risk of suffering from diverse types of cancer. In experimental studies in vivo of ovarian, breast, colon and others neoplasia, was observed that the consumption of β -sitosterol or mixed phytosterols in diet, reduced the number of animals with tumors, or reduced the size of tumors (23–28). In epidemiological studies, the intake of β -sitosterol and stigmasterol was associated with lower risks of esophageal (29) and ovarian cancers (30), respectively. Moreover, it was reported that in female populations with minimal risk of breast cancer have a greater consume of phytosterols in the diet than those at high risk (31, 32).

Our findings show that the penicoceryl tumor growth inhibition is related to an antiproliferative effect and induction of apoptosis. The PCNA is used in clinics as a classic marker of cell proliferation as a diagnostic and prognostic tool (33). PARP-1 is an abundant and ubiquitous nuclear enzyme related to DNA repair (34); its overexpression is linked to the development of some types of cancer. Therefore, PARP-1 inhibition selectively ends several types of tumorigenic cells (35). The significant

decrease in the expression of PCNA in the tumor samples shows a condensation and fragmentation of the nucleolus, thus an antiproliferative action (Figures 6C, 7A). Moreover, a significant decrease of PARP-1 in the nucleus and a significant increase of cleaved PARP-1 in the cytoplasm (Figures 6D, 7B) indicates apoptosis cell death.

In summary, the administration of pentocerol with a higher frequency, but with a lower dose provides a greater therapeutic effect, suggesting the possibility to develop an anticancer drug from this phytosterol.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Most of the data (Figures 1–7) used to support the findings of this study are included within the article. Copies of the pentocerol spectra are available upon request to the responsible author.

ETHICS STATEMENT

The Animal Research Committee approved the experimental procedures and were carried out in accordance to the Guidelines for the Care and Use of Animals of the Bioterium Laboratory of the National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán, México.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MM-V contributed to the conception, writing, and discussion of the article. BC-G, contributed in all the experiments that

were performed as well as in the discussion of the article. NJ-H contributed substantially in the conduct of animal experiments as well as in the writing and discussion of the manuscript. LJ-Z contributed to the conduct of molecular biology experiments as well as the writing and discussion of the article. ZT-S contributed to the performance of some of the experiments. AZ-D contributed significantly to the discussion on molecular biology of the article. All authors discussed, reviewed, and approved the final version of the manuscript to be published.

FUNDING

This study was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). The present work was performed by BC-G in partial fulfillment of the requirements of the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, with doctoral scholarship from CONACYT (Reg. No. 442677).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Victor Alberto Castro Torres from the Instituto de Química UNAM, MSc. Cecilia Aguilar and Dr. Miguel Tapia Rodríguez from the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, MC, José Arselmo López Méndez and MC, José Luis Ventura Gallegos from the Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán.

REFERENCES

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A, et al. Global and Regional Estimates of the Incidence and Mortality for 36 Cancers: GLOBOCAN. Lyon: International Agency for Research on Cancer; World Health Organization (2018). Available online at: <https://gco.iarc.fr/> (accessed 04 September 10, 2019).
2. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hicklin T, Topham C, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol*. (2009) 27:3109–16. doi: 10.1200/JCO.2008.20.6771
3. Bacchetti T, Masciangelo S, Bicchieri V, Berillo E, Ferretti G. Phytosterols, phytostanols and their esters: from natural to functional foods. *Mediter J Nutr Metab*. (2011) 4:165–72. doi: 10.1007/s12349-010-0049-0
4. Niu WD, Song ZH, Dennis AL, Zhou WX, Nam J, Miller ML. Biosynthesis of sterols - kinetic mechanisms for the enzymatic C-methylation of sterols. *J Biol Chem*. (2003) 278:34305–14. doi: 10.1074/jbc.M303355200
5. Jones PJ, AbuMweis SS. Phytosterols as functional food ingredients: linkages to cardiovascular disease and cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. (2009) 12:347–51. doi: 10.1097/MCO.0b013e318126770f
6. Plat J, Hendriks T, Bieghs V, Kuriosen ML, Wakenbergh SM, Van Gorp PJ, et al. Protective role of plant sterol and stanol esters in liver inflammation: insights from mice and humans. *PLoS ONE*. (2014) 9:e103758. doi: 10.1371/journal.pone.0103758
7. Shrivastava A, Parthiba ISR, Upadhye M, Dhiman A. Antidiabetic activity of alcohol root extract of *Holopternema annulare* in NIDDM rats. *Pharm Res*. (2007) 45:440–5. doi: 10.1080/13880000701389989
8. Mizawa E, Tanaka M, Nomaguchi K, Nabeshima K, Yamada M, Toida T, et al. Oral ingestion of *silva* vera phytosterols alters hepatic gene expression profiles

- and ameliorates obesity-associated metabolic disorders in Zucker diabetic fatty rats. *J Agric Food Chem*. (2012) 60:2799–806. doi: 10.1021/jf2044603
9. Ramprasad VR, Awad AR. Role of phytosterols in cancer prevention and treatment. *J AOAC Int*. (2015) 98:735–8. doi: 10.5740/jaoacint.15CJ03ramprasad
10. Woyengo TA, Ramprasad VR, Jones PJJ. Anticancer effects of phytosterols. *Eur J Clin Nutr*. (2009) 63:813–20. doi: 10.1038/sj.ejcn.2009.29
11. Gupta ML, Nath R, Srivastava N, Shanker K, Kishor K, Bhargava KP. Anti-inflammatory and antipyretic activities of beta-sitosterol. *Planta Med*. (1980) 39:157–63. doi: 10.1055/s-0008-3074919
12. Choi YH, Kong KR, Kim YA, Jung KC, Kim JH, Rhee SH, et al. Induction of bax and activation of caspases during beta-sitosterol-mediated apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Oncol*. (2003) 23:1657–62. doi: 10.3892/ijo.23.6.1657
13. Cruz Rojas MC, Delgado Escarotero NL, Revuelta Miranda ML. (2009). *Guía técnica ilustrada para el manejo de animales de laboratorio: Ratón, ratas, hamster, jirafa, conejo y canguro*. México: Universidad Nacional Autónoma de México; Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
14. Bolaños-Carrillo MA, Ventura-Gallegos JL, Saldaña-Jiménez AD, Zerilinda-Deluna A, Martínez-Vázquez M. Effect of sterols isolated from *Myristicocactus geometrizans* on growth inhibition of colon and breast cancer cells. *Divid Basic Complement Altern Med*. (2015) 2015:589350. doi: 10.1155/2015/589350
15. Salazar JR, Martínez-Vázquez M, Cispedes CL, Ramírez-Aparó T, Nieto-Camacho A, Rodríguez-Silverio J, et al. Anti-inflammatory and cytotoxic activities of chiclepogenin, pentocerol and macdougallin isolated from *Myristicocactus geometrizans* (Mart. ex Pfeil.) Con. Z. *Naturforsch C J Biosci*. (2011) 66:24–30. doi: 10.1515/znc-2011-1-204
16. Chiroda E, Aronow D, Arush FS. A new method for determining acute toxicity in animal models. *Toxicol Int*. (2013) 29:224–6. doi: 10.4103/0971-6580.121674

17. Sharmagan MK, Rajendran P, Li B, Nema T, Vaid S, Abbasi T, et al. Ursolic acid inhibits multiple cell survival pathways leading to suppression of growth of prostate cancer xenograft in nude mice. *J Mol*. (2011) 89:213–27. doi: 10.1007/s00109-011-0746-2
18. Via LJ, García-Anglés AN, Martínez-Vázquez M, Gascón S, Martínez E, Torresillo A. Mitochondrial permeability transition as target of anticancer drugs. *Curr Pharm Des*. (2014) 20:223–44. doi: 10.2174/1381612813319999033
19. Sánchez-Monroy MA, Jaco-Herrera NJ, Zentella-Dehesa A, Hernández-Teller B, Martínez-Vázquez M. Methylglucosinolate and 3 α -OH methylglucosinolate induce apoptosis and inhibit cell proliferation and tumor growth in prostate cancer xenografts *in vivo*. *Molecules*. (2017) 22:1–12. doi: 10.3390/molecules22091479
20. Alonso CA, Villarreal MI, Salazar OLA, Gómez SM, Domínguez E, García CA. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J Ethnopharmacol*. (2011) 133:945–72. doi: 10.1016/j.jep.2010.11.035
21. Lotens S, Lekakis I, Christou GP, Moutafios P. Beta-sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Mol Nutr Food Res*. (2010) 54:551–8. doi: 10.1002/mnfr.200900012
22. Kangnamkin T, Chaibongyot S, Wootthichairangan C, Hanchaisri R, Tangphewitritkul C, Svanit J. Lupenol and stigmasterol suppress tumor angiogenesis and inhibit cholangiocarcinoma growth in mice via downregulation of tumor necrosis factor- α . *PLoS ONE*. (2017) 12:e0189628. doi: 10.1371/journal.pone.0189628
23. Raichl R, Cohen H, Fuzini E, Sarwal AN, Takahashi M. Protective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats. *Cancer Res*. (1980) 40:403–5.
24. Awad AB, García MD, Fink CS. Effect of dietary phytosterols on rat tissue lipids. *Nutr Cancer*. (1997) 29:212–6. doi: 10.1080/01635589709514626
25. Deschere EE, Cohen H, Raichl R. The kinetics of the protective effect of beta-sitosterol against MNU-induced colonic neoplasia. *J Cancer Res Clin Oncol*. (1982) 103:49–54. doi: 10.1007/BF00410305
26. Rabit B, Puzel A, Kaczmarek M, Radzińska M, Jelen H, Rybczyńska M. Beneficial or harmful influence of phytosterols on human cells? *Br J Nutr*. (2008) 100:1183–91. doi: 10.1017/S0007114508981423
27. Ju YH, Clausen LM, Alfred KJ, Almada AI, Hellrich WG. Beta-sitosterol, beta-sitosterol glucoside, and a mixture of beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen-responsive breast cancer cells *in vitro* and in ovariectomized athymic mice. *J Nutr*. (2004) 134:1145–51. doi: 10.1093/jn/134.5.1145
28. Awad AB, Hernandez AY, Fink CS, Mendel SL. Effect of dietary phytosterols on cell proliferation and protein kinase C activity in rat colonic mucosa. *Nutr Cancer*. (1997) 22:210–5. doi: 10.1080/01635589709514527
29. De Stefano E, Boffetta F, Rosco AI, Beerman F, Demis-Pellegrini H, Carnoglio JC, et al. Plant sterols and risk of stomach cancer: a case-control study in Uruguay. *Nutr Cancer*. (2000) 37:140–4. doi: 10.1207/s15327914NC372_4
30. McCann SE, Freudenhefer JL, Marshall JR, Graham S. Risk of human ovarian cancer is related to dietary intake of selected nutrients, phytochemicals and food groups. *J Nutr*. (2003) 133:1937–42. doi: 10.1093/jn/133.6.1937
31. Ling WH, Jones PJ. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci*. (1995) 57:195–206. doi: 10.1016/0024-3285(95)00263-6
32. Menzies M, Barnes S. The role of soy products in reducing risk of cancer. *J Natl Cancer Inst*. (1991) 83:541–5. doi: 10.1093/jnci/83.3.541
33. Estrada AC, Synovels T, Pflieger K, Lunow O, Büchtele B, Schimura PJ, et al. Tirucallic acids are novel pleckstrin homology domain-dependent Akt inhibitors inducing apoptosis in prostate cancer cells. *Mol Pharmacol*. (2010) 73:378–87. doi: 10.1124/mol.109.066475
34. Carlin NJ. PARP inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev Mol Med*. (2005) 7:1–20. doi: 10.1017/S1462399405000940X
35. Bryant HJ, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower ID, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Nature*. (2005) 434:513–7. doi: 10.1038/nature03443

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Coadar-García, Jaco-Herrera, Zentella-Dehesa, Rocha-Zavala, Torres-Santamaría and Martínez-Vázquez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.