



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**“Evaluación citotóxica de compuestos naturales y
seminaturales derivados de *Heterotheca inuloides*, en la
línea celular HCT-15 y la proyección *in silico* de su
mecanismo de acción”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA

RODRÍGUEZ BAUTISTA KARLA MELISA

ASESORA EXTERNA

DRA. DANIELA ARAIZA OLIVERA TORO

ASESORA INTERNA

DRA. DOLORES MOLINA JASSO

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. MÉX., 2022



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: Tesis y examen profesional

Evaluación citotóxica de compuestos naturales y seminaturales derivados de Heterotheca inuloides, en la línea celular HCT-15 y la proyección in silico de su mecanismo de acción.

Que presenta la pasante: Karla Melisa Rodríguez Bautista
Con número de cuenta: 313278006 para obtener el título de: Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de Marzo de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Azucena Lee Mendoza	
VOCAL	Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles	
SECRETARIO	Dra. Dolores Molina Jasso	
1er. SUPLENTE	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
2do. SUPLENTE	Dra. Sofia Piña Olmos	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue gracias al financiamiento otorgado por el Instituto de Química UNAM, bajo la tutela de la Dra. Daniela Araiza Olivera Toro en el Laboratorio de Biomacromoléculas I.

A mi querida tutora, Dra. Daniela, por su ayuda, paciencia y dedicación, así como los conocimientos compartidos. Y mis colegas del Instituto por los consejos y conocimientos que me compartieron.

Y a todas las personas que me apoyaron e hicieron posible que este trabajo se realice con éxito.

Índice

INTRODUCCIÓN	6
MARCO TEÓRICO	7
1. Cáncer.....	7
1.1 Generalidades	7
1.2 Tipos de cáncer	8
1.3 Proceso carcinogénico	9
2. Cáncer colorrectal.....	10
2.1 Definición	10
2.1 Clasificación.....	11
2.3 Epidemiología	13
2.4 Factores de riesgo.....	14
2.5. Tratamientos.....	15
3. Carcinogénesis asociada a la inflamación en cáncer colorrectal	16
3.1 Mecanismos implicados en la promoción del desarrollo del cáncer relacionados con la inflamación.....	18
3.2 Estrés oxidativo	20
4. Heterotheca inuloides	24
4.1 Composición química y actividad biológica	24
4.2 Sesquiterpenos tipo cadinanos	25
OBJETIVOS.....	28
HIPÓTESIS.....	28
METODOLOGÍA	29
Cultivo y tratamiento celular.....	29
Determinación de viabilidad celular por ensayo de MTT	29
Determinación de proliferación celular por ensayo del colorante de exclusión cristal violeta	30
Cuantificación de migración celular por ensayo de <i>wound-healing</i>	30
Predicción <i>in silico</i> del espectro de actividades de las sustancias aislada naturales y semisintéticas (PASS prediction).....	31
RESULTADOS.....	32
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	48
PERSPECTIVAS	48
REFERENCIAS	49

Índice de figuras.

Figura 1. Hallmarks o características distintivas del cáncer.	8
Figura 2. Estadios del cáncer colorrectal.	13
Figura 3. Cifras estimadas por año de casos y muertes por distintos tipos de cáncer en ambos sexos y en todas las edades.	14
Figura 4. Diagrama de las vías que conectan la inflamación y el cáncer.	18
Figura 5. Visión integrada de los mecanismos involucrados en la promoción del desarrollo carcinogénico.	20
Figura 6. Representación esquemática de varios factores de transcripción modulados por especies reactivas de oxígeno.	23
Figura 7. Clasificación de los compuestos aislados de <i>Heterotheca inuloides</i>	25
Figura 8. Productos naturales tipo cadinanos aislados de <i>Heterotheca inuloides</i>	26
Figura 9. Síntesis de los compuestos seminaturales.	27
Figura 10. Efecto del compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenol sobre la viabilidad en distintas líneas celulares.	33
Figura 11. Efecto citotóxico de 7-hidroxycadalenol sobre distintas líneas celulares.	34
Figura 12. Efecto de los compuestos seminaturales en la línea celular HCT-15, con diferentes tiempos de exposición.	35
Figura 13. a. Efecto en la viabilidad celular en la línea celular HCT-15. b. Efecto del fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadalenol en el control sano de células. c. Validación del método.	37
Figura 14. Efecto en la proliferación celular.	38
Figura 15. Efecto en la migración celular.	40

Índice de tablas.

Tabla 1. Principales compuestos aislados de los extractos de <i>H. inuloides</i> y sus propiedades terapéuticas.	24
Tabla 2. Predicción de espectros de actividad de los compuestos naturales y seminaturales evaluados.	40

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AP-1	Proteína activadora 1
CAC	Cáncer asociado a colitis
CCR	Cáncer colorrectal
COX	Ciclooxigenasa
COX2	Ciclooxigenasa 2
CTE	Cadena transportadora de electrones
CU	Colitis Ulcerosa
CXCR4	Receptor 4 de quimiocinas CXC
EII	Enfermedad Inflamatoria del Intestino
GPx	Glutación peroxidasa
HIF1A	Factor inducible por hipoxia1
HNPCC	Cáncer colorrectal hereditario no polipósico
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
MMR	Genes de reparación de errores de emparejamiento.
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NF-kB	Factor nuclear kappa beta
NO	Oxido nítrico
NOX	NADPH oxidasas
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
RONs	Especies reactivas de nitrógeno y oxígeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Suero fetal bovino
SOD	Superóxido dismutasa
STAT3	Transductor de la señal y activador de la señal 3
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNM	Tumor ganglio metástasis
XO	Xantina oxidasa

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad común y letal a nivel global. La etiología de este cáncer frecuentemente es asociada con eventos inflamatorios presentes en enfermedades comunes. Diversos estudios experimentales, clínicos y epidemiológicos sugieren que agentes antiinflamatorios son terapias prometedoras: dicho antecedente ha facilitado la investigación y desarrollo de nuevas moléculas coadyuvantes al tratamiento de este cáncer. Se han logrado aislar diversos compuestos de *Heterotheca inuloides* (árnica mexicana), entre ellos los cadalenos, derivados que a la vez han sido modificados añadiendo un grupo carbamato en el carbono siete sustituyendo a un grupo hidroxilo. Siendo el 7-hidroxicadaleño y el 7-hidroxi-3,4-hidrocadaleño los compuestos naturales, así como el fenilcarbamato de 7-cadaleñoilo y el fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadaleñoilo los compuestos seminaturales que se evaluaron con el fin de determinar la actividad citotóxica en células de adenocarcinoma colorrectal (HCT-15). Se determinó la viabilidad celular de cada uno de los compuestos, la IC₅₀ resultante del fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadaleñoilo fue de 0.25 µM, siendo este el más prometedor debido a la mejor actividad citotóxica concentración-tiempo que presentó en comparación con los demás compuestos. Dicha efectividad se atribuye al grupo carbamato, el cual se ha reportado que mejora la estabilidad química y su capacidad de penetrar la membrana celular. Las lesiones displásicas por lo general son precursoras del CCR y se caracterizan por la proliferación excesiva de las células, por lo que se puso a prueba la capacidad antiproliferativa del compuesto seleccionado. La actividad proliferativa de HCT-15 se vio afectada aproximadamente un 40% con respecto al control, demostrando reducir la tasa de división celular satisfactoriamente. De igual forma la tasa de migración ejerció un evidente efecto inhibitorio. En la predicción *in silico*, los cuatro compuestos, presentaron probabilidad de ser antiinflamatorios, en especial los naturales, sin embargo, los seminaturales también presentaron actividad clave como la probable estimulación del Factor Nuclear Eritroide 2 (Nrf2), y la inhibición del Factor Inducible por Hipoxia (HIF1A). El perfil citotóxico primario de los cuatro compuestos permitió seleccionar al más prometedor, siendo el fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadaleñoilo el cual mostró efectos relevantes en la inhibición de la viabilidad, proliferación y migración celular, en conjunto con la predicción *in silico* el cual de forma teórica de la actividad biológica sientan las bases para un estudio más específico en el futuro, con el fin de elucidar su mecanismo de acción.

INTRODUCCIÓN

El CCR inicia y tiene lugar en colon o recto, considerándose una enfermedad heterogénea que surge a partir de múltiples vías tumorigénicas. Los adenocarcinomas de colon y recto son consecuencia de una progresión gradual del tejido normal al epitelio displásico y al carcinoma, esto se conoce como secuencia adenoma-carcinoma. Este cáncer es considerado un problema de salud pública mundial, ya que ocupa el tercer lugar del cáncer más mortal en todo el mundo y el cuarto más comúnmente diagnosticado (Sierra MS, Forman D., 2016) (Rawla P., 2019; Macrae A., 2020). Por lo general los casos de CCR son esporádicos, factores ambientales, así como genéticos contribuyen al riesgo de desarrollarlo. Además, el cáncer colorrectal está estrechamente relacionado con la inflamación del colon y recto, por lo que también es un factor de riesgo importante. Pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino, colitis ulcerosa, o colitis de Crohn tienen un mayor riesgo de desarrollar CCR(Thomas A. Ullman, Steven H. Itzkowitz, 2011).

Estudios experimentales, clínicos y epidemiológicos sugieren que agentes antiinflamatorios son terapias prometedoras, esto ha facilitado la investigación y desarrollo de nuevas moléculas coadyuvantes al tratamiento de este cáncer. Actualmente se sigue estudiando una planta con alta relevancia etnofarmacológica: *Heterotheca inuloides*, es decir: árnica mexicana, la cual se conoce por su actividad antiinflamatoria, antioxidante, citotóxica, antimicrobiana, inhibidora de la peroxidación lipídica y antiparasitaria. (Rodríguez-Chávez, et. al., 2017) Estudios fitoquímicos han logrado aislar varios constituyentes de *H. inuloides* principalmente sesquiterpenos tipo cadinanos, flavonoides y fitoesteroles. (Gené R., Segura L., 1998; Rodríguez-Chávez, Coballase U., 2015) Los cadalenos, derivados que a la vez han sido modificados añadiendo un grupo carbamato en el carbono siete sustituyendo a un grupo hidroxilo, con el fin de mejorar su actividad, ya que el carbamato se emplea como sustituto del enlace peptídico, lo que ofrece oportunidades para la modulación de las propiedades biológicas y la mejora de la estabilidad y las propiedades farmacocinéticas (Fig. 8) (Egas V., et al., 2017). Siendo el 7-hidroxicadalenol y el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenol los compuestos naturales, así como como el fenilcarbamato de 7-cadalenol y el fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadalenol los compuestos seminaturales que se evaluaron en el presente trabajo como posible tratamiento coadyuvante contra este problema de salud pública.

MARCO TEÓRICO

1. Cáncer

1.1 Generalidades

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por la división incontrolada de células anormales producto de cambios genéticos o epigenéticos, y que pueden invadir tejidos cercanos e incluso otras partes del cuerpo (National Cancer Institute, 2015).

Cuando ocurre un proceso canceroso en un individuo, las fases del ciclo de vida de las células se alteran, particularmente en la transición de las fases G1/S donde ocurren la mayoría de los defectos relacionados con el cáncer, y a medida que se vuelven más anormales, estas células pueden dividirse sin detenerse y de ese modo formar una masa anormal de tejido llamado tumor (aunque en algunos tipos de cáncer, como leucemia, no forma tumores sólidos). Dichos tumores pueden ser clasificados como benignos y cancerosos o malignos, éstos últimos tienen potencialmente la capacidad de crecer y diseminarse a otras partes del cuerpo, proceso conocido como metástasis que, a diferencia de dichos, un tumor benigno sólo puede crecer sin diseminarse (Molinari M.,2000; National Cancer Institute, 2015; Weinberg R., 2014).

Lo que caracteriza dicho proceso canceroso son un conjunto de anomalías que conlleva al cambio morfológico, funcional, así como la alteración del ciclo de vida de las células normales produciendo de esta forma células neoplásicas las cuales, según Hanahan y Weinberg (2011), poseen las siguientes características distintivas o *hallmarks*: señalización proliferativa constante, evasión de los supresores de crecimiento, resistencia a la apoptosis, inmortalidad replicativa, promoción de la angiogénesis, invasión y metástasis, evasión del sistema inmune y desregulación del metabolismo energético. También se ha descrito que la inestabilidad genómica e inflamación son características que permiten el desarrollo tumoral y favorecen o facilitan la manifestación de los *hallmarks* mencionados (Hanahan D., Weinberg R. A.,2011).

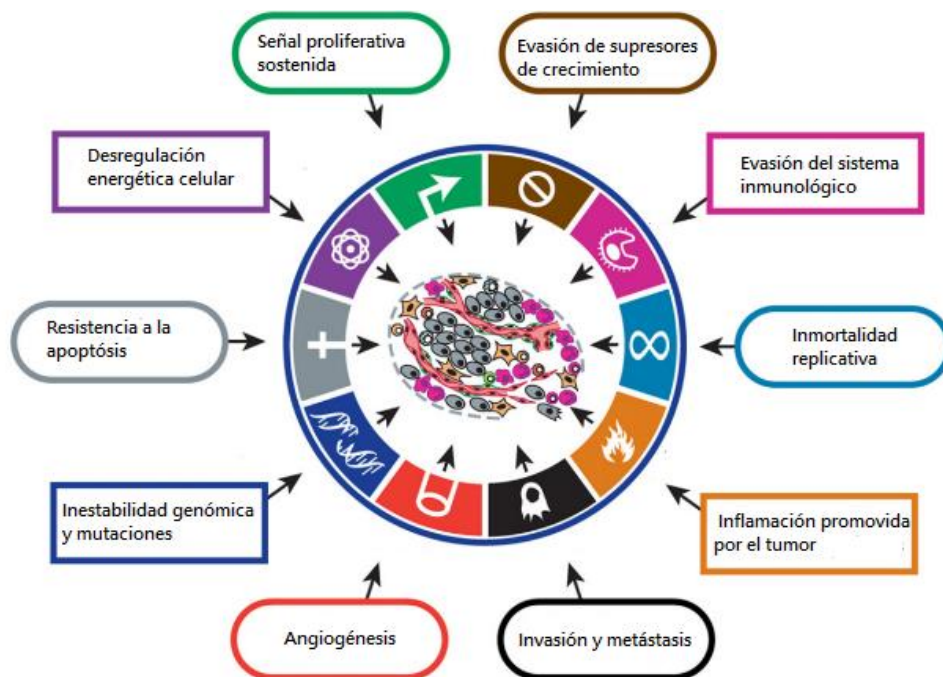


Figura 1. Hallmarks o características distintivas del cáncer.
(Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011)

1.2 Tipos de cáncer

El cáncer suele describirse según el tipo de célula en el que se originó el tumor, que incluyen:

Carcinoma, es aquel que tiene como origen células epiteliales, es el tipo más común de cáncer y dentro de éstos encontramos a los adenocarcinomas, que son aquellos que tienen origen en estructuras glandulares de tejido epitelial. Entre ellos están los carcinomas de células escamosas, carcinomas basocelulares y carcinomas de células de transición (Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al., 2000).

Sarcoma, surge a partir de células mesenquimales que conforman el tejido conectivo y que por lo tanto pueden desarrollarse en huesos y tejidos blandos, incluidos músculos, tejido adiposo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y tejido fibroso como tendones y ligamentos (Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al., 2000).

Leucemia, este tipo de cáncer al igual que los linfomas y mielomas no forman tumores sólidos. Su origen radica en la acumulación de glóbulos blancos anormales (Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al., 2000).

Linfoma, la acumulación de linfocitos anormales en el sistema linfático da lugar a esta clase de cáncer (Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al., 2000).

1.3 Proceso carcinogénico

El desarrollo del cáncer o carcinogénesis es un proceso complejo que consta de múltiples etapas y está caracterizado por alteraciones genéticas, que incluyen anomalías cromosómicas, mutaciones genéticas y cambios epigenéticos que alteran el crecimiento y la división celular normal (Peng, F., et. al. 2016).

Las etapas que generalmente conforman dicho proceso son: iniciación, promoción, progresión y metástasis.

La iniciación implica la alteración, mutación o cambios genéticos que ocurren como consecuencia de diversos eventos multifactoriales, surgiendo espontáneamente o inducidos por la exposición a un agente carcinogénico. Estas alteraciones genéticas pueden dar lugar a la desregulación de las vías de señalización bioquímica asociadas con la proliferación, supervivencia y diferenciación celular, que pueden verse influidas por varios factores, incluida la tasa y el tipo de metabolismo carcinogénico, así como la respuesta de la función de reparación del ADN (Siddiqui I., Vanna S., et. al., 2015; Weston A, Harris C., 2003).

También se ha descrito que cambios epigenéticos ocurren como eventos tempranos en la carcinogénesis. La metilación del ADN de las regiones promotoras de genes puede silenciar transcripcionalmente genes supresores de tumores que cumplen la función de inhibir la proliferación celular (O'Connor, C. M. & Adams, J. U., 2014).

Por otro lado, la promoción se refiere a la expansión clonal de células iniciadas, transformadas o preneoplásicas, es decir, aquellas que han sufrido cambios en su material genético. Estas células son susceptibles a promotores de tumores, los cuales promueven la proliferación, alterando el equilibrio celular y por tanto produciendo una población mayor de células que está en riesgo de sufrir más alteraciones genéticas y conversión maligna (Weston A, Harris C., 2003). Dichos cambios conducen a la transformación neoplásica, requiriendo exposiciones repetidas y prolongadas de los estímulos promotores. Esta etapa generalmente es prolongada y reversible por lo que agentes quimiopreventivos pueden alterar este proceso y afectar las tasas de crecimiento (Siddiqui I., Vanna S., et. al., 2015).

La progresión comprende la expresión del fenotipo maligno. En este proceso, cambios sucesivos en la neoplasia resultante provocan subpoblaciones celulares cada vez

más agresivas. Dentro de las características que comprende este proceso se puede destacar la propensión de la inestabilidad genómica y el crecimiento descontrolado. Durante esta etapa pueden ocurrir más cambios genéticos y epigenéticos incluyendo nuevamente la activación de protooncogenes y la pérdida funcional de genes supresores de tumores. Como consecuencia se pierde el control del crecimiento, acelera la proliferación, conduce a inestabilidad génica, evade la apoptosis y promueve la metástasis (Weston A, Harris C., 2003; Valdespino-Gómez, Valdespino-Castillo, 2011).

La metástasis implica la propagación de células neoplásicas invadiendo tejidos vecinos o a distancia a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático. Además, la metástasis puede implicar la capacidad de las células tumorales para secretar proteasas que permiten la invasión más allá de la ubicación inmediata del tumor primario. La amplia gama de comportamientos alterados que subyacen a la malignidad puede tener base en proteínas de superficie nuevas o variantes producidas por las células malignas. Dichas estrategias forman parte del conjunto de características distintivas o hallmarks mencionados anteriormente que en conjunto permiten el desarrollo tumoral y la diseminación metastásica (Hanahan D., Weinberg R. A., 2011; Weston A, Harris C., 2003; Civetta M., Civetta J., 2011).

Las enfermedades neoplásicas son por tanto una de las principales causas de muerte en todo el mundo, de las cuales el cáncer colorrectal ocupa el tercer lugar (GLOBOCAN, 2018).

2. Cáncer colorrectal

2.1 Definición

El cáncer colorrectal inicia y tiene lugar en colon o recto, considerándose una enfermedad heterogénea que surge a partir de múltiples vías tumorigénicas. Los adenocarcinomas de colon y recto son consecuencia de una progresión gradual del tejido normal al epitelio displásico y al carcinoma, esto se conoce como secuencia adenoma-carcinoma. Simultáneamente ocurren múltiples alteraciones genéticas que incluyen oncogenes, la activación e inactivación de genes supresores de tumores y alteraciones en la reparación de genes (Sierra MS, Forman D., 2016).

2.1 Clasificación

El cáncer colorrectal puede ser clasificado con base en un criterio histológico, de acuerdo con la OMS en las siguientes categorías:

- Adenocarcinoma: es el más frecuente y se caracteriza por la invasión de la mucosa muscular hacia la submucosa y se clasifica de acuerdo al grado de diferenciación en tumores, moderados o poco diferenciados. Generalmente se asocia con enfermedades inflamatorias crónicas.
- Adenocarcinoma mucinoso: se designa de esta forma sólo si la lesión está compuesta por arriba de un 50% de mucina.
- Carcinoma de células en anillo: se caracterizan por una vacuola de mucina que llena el citoplasma y desplaza al núcleo.
- Carcinoma de células pequeñas: es muy inusual ya que tiene características de carcinoma escamoso y adenocarcinoma.
- Carcinoma medular: se caracteriza por láminas malignas, núcleo vesicular y nucleolos prominentes, se le considera inusual.
- Carcinoma indiferenciado: este tipo carece de evidencia morfológica de diferenciación (Hamilton, S., Aaltonen, L., 2000).

La clasificación de los estadios del cáncer colorrectal también es importante, pues de acuerdo con ello se asigna el tipo de tratamiento adecuado a cada paciente. El tratamiento a elección toma como referencia la clasificación TNM (tumor, ganglio, metástasis, por sus siglas en inglés), así mismo se puede clasificar los estadios mediante las etapas 0, I, II, III o IV. Existen subtipos más específicos de las etapas primarias, por ejemplo, la etapa II se puede dividir en etapas IIa, IIb o IIc, y el subtipo de etapa puede afectar las opciones de tratamiento. La efectividad de un tratamiento puede depender de la etapa en el momento del diagnóstico (National Cancer Institute, 2020; Bethesda M., 2020).

El estadio 0 se caracteriza por la presencia de células anormales en la mucosa (capa más interna del colon y recto). Es la etapa más temprana de este tipo de cáncer y se le conoce como carcinoma *in situ* o carcinoma intramucoso. (Bethesda M., 2020)

En el estadio o etapa I el tumor invade las capas más externas de la pared del colon o recto como la submucosa, sin atravesar la capa muscular y sin diseminación a ganglios linfáticos.

En el estadio IIA se observa la presencia del tumor en capas musculares diseminándose hacia tejido pericorectales sin propagación a ganglios linfáticos; mientras que en el IIB se observa invasión del tumor a través de áreas de inflamación hasta la superficie del peritoneo visceral (National Cancer Institute, 2020; Bethesda M., 2020).

Durante el estadio III, el tumor invade de la mucosa hacia la submucosa extendiéndose hacia las capas más externas de la pared del colon o recto, invadiendo de igual forma la capa de músculo y diseminándose a ganglios linfáticos. Dependiendo de la subclasificación (IIIA, IIIB, IIIC) de este estadio puede haber de 1 a 7 o más ganglios linfáticos regionales positivos a depósitos tumorales. Además, el tumor también puede invadir directamente o se adhiere a órganos o estructuras adyacentes (National Cancer Institute, 2020; Bethesda M., 2020).

Finalmente, en el estadio IV del cáncer colorrectal, el tumor puede crecer más en la pared de colon y recto, diseminándose a distintas partes de peritoneo. Su subclasificación depende de las características específicas de la disposición espacial del tumor entre la pared, así como el número ganglios linfáticos cercanos y distantes invadidos. En esta etapa no es posible evaluar el tumor primario, además se identifica metástasis a dos o más sitios u órganos sin metástasis peritoneal.

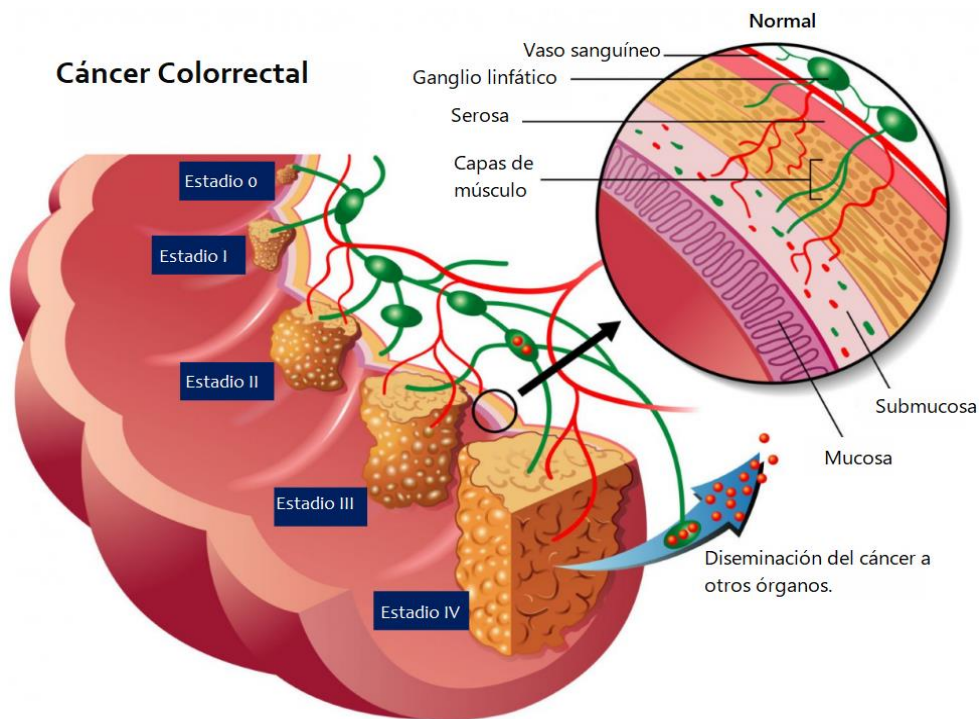


Figura 2. Estadios del cáncer colorrectal.

Las etapas o estadios del cáncer colorrectal están clasificados de acuerdo a la distribución del tumor a través de la pared del colon o recto, así como la invasión del número de ganglios linfáticos cercanos o lejanos al tumor primario. Finalmente, el estadio IV se caracteriza por ser la forma terminal del cáncer colorrectal, provocando la diseminación del cáncer a otros órganos como hígado o pulmón, entre otros (Adaptado de Seong B., 2015).

2.3 Epidemiología

Actualmente el cáncer colorrectal es una enfermedad común y letal, es considerado el tercer cáncer más mortal en todo el mundo y el cuarto más comúnmente diagnosticado. Además, es el segundo cáncer diagnosticado con mayor frecuencia en mujeres y el tercero en hombres, con 1.8 millones de casos nuevos y casi 861,000 muertes en 2018, según GLOBOCAN, base de datos de la Organización Mundial de la Salud (Rawla P., 2019; Macrae A., 2020).

El CCR es la tercera forma de cáncer diagnosticado con mayor frecuencia a nivel mundial y comprende el 11% de todos los diagnósticos con cáncer. Para ese año se estimó una cifra de 1 284 207 casos incidentes en todo el mundo. El CCR es el más común en países desarrollados y en hombres.

Además, es considerado el segundo cáncer más mortal en el mundo, con una cifra estimada de 880 792 muertes para el 2018 (última fecha actualizada). Siendo el

cáncer de colon el quinto cáncer más mortal con 551.000 muertes proyectadas para 2018, lo que representa el 5.8% de todas las muertes por cáncer, mientras que el cáncer de recto es el décimo más mortal, con 310.000 muertes, lo que constituye el 3.2%. En conjunto el CCR constituye aproximadamente el 9% de todas las muertes por cáncer (WHO Global Cancer Observatory (GCO) data, 2018; Rawla, 2019).

Número estimado de casos incidentes y muertes en todo el mundo, ambos sexos, todas las edades.

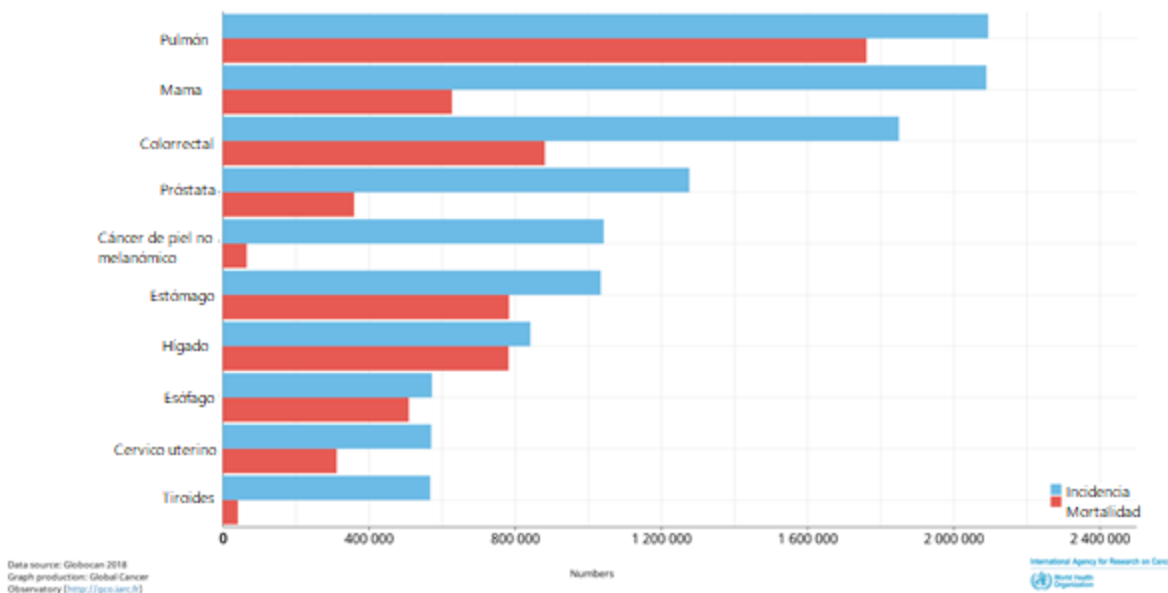


Figura 3. Cifras estimadas por año de casos y muertes por distintos tipos de cáncer en ambos sexos y en todas las edades.

Se puede observar que el cáncer colorrectal se posiciona en el tercer lugar en la mayor incidencia, mientras que la mortalidad de este cáncer se posiciona en el segundo lugar (Adaptado de International Agency for Research on Cancer, 2018).

Por otra parte, en México se diagnostican cerca de 15 mil casos nuevos de personas con cáncer de colon y/o recto cada año, lo que representa un verdadero problema de salud pública ya que además las proyecciones apuntan que al final de la década habrá un aumento relevante (IMSS, 2019; Reynoso N., 2017).

2.4 Factores de riesgo

La mayoría de los casos de CCR son esporádicos, y los factores ambientales y genéticos son importantes como factores de riesgo. La dieta y el estilo de vida contribuyen en gran medida como factores de riesgo para el desarrollo de cáncer colorrectal, incluyendo el abuso en el consumo de alcohol, el tabaquismo, una dieta no saludable baja en fibra, o una dieta alta en carnes rojas, obesidad, y sedentarismo (American Cancer Society, 2017).

Sin embargo, los factores genéticos también contribuyen de manera significativa al desarrollo de este padecimiento. A continuación, se muestran mutaciones genéticas asociadas al desarrollo de múltiples tipos de pólipos: poliposis adenomatosa (gen APC y gen MYH), poliposis hamartomatosa (STK11 en el síndrome de Puetz-Jeghers, SMAD4 y BMPR1A en poliposis juvenil, PTEN en el síndrome de Cowden). Por otro lado, lo que parece ser un cáncer hereditario, el cual frecuentemente no se presenta con múltiples pólipos, como el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC o Síndrome de Lynch), es causado por variantes en los genes de reparación del mal apareamiento del ADN (“mismatch repair genes”, MMR), que son MSH2, MLH1, MSH6 y PMS2 (Weitz, J., Koch, M., et. al. 2005; Patrick M Lynch, 2017).

Existe evidencia de que este tipo de cáncer está estrechamente relacionado con la inflamación del colon y recto, por lo que también es un factor de riesgo importante. Pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino (EII), colitis ulcerosa (CU) o colitis de Crohn tienen un mayor riesgo de desarrollar CCR. Este aumento en el riesgo es más probable que resulte de una inflamación crónica de la mucosa gastrointestinal que de una clara predisposición genética (Thomas A. Ullman, Steven H. Itzkowitz, 2011).

2.5. Tratamientos

El tratamiento del CCR se basa en la ubicación y el estadio del tumor al momento del diagnóstico. Por lo general la extirpación quirúrgica del tumor y ganglios linfáticos cercanos es el tratamiento para el CCR en estadios tempranos (estadio I o II), mientras que para los pacientes en etapas avanzadas la quimioterapia solo o en conjunto con radioterapia son administradas antes o después de una cirugía.

El tratamiento del CCR la mayoría de veces es complejo, por eso es común que durante su tratamiento pacientes en los estadios IIA y IIB pueden recibir quimioterapia adyuvante, así mismo a los pacientes con cualquier tipo de enfermedad en estadio III se les debe ofrecer quimioterapia adyuvante después de cirugía (Steinberg M., 2009).

Diversos regímenes de quimioterapia son utilizados como tratamiento para este padecimiento en sus diferentes etapas. Los medicamentos comunes que se usan en varias combinaciones incluyen capecitabina, fluorouracilo / leucovorina, oxaliplatino, irinotecán y bevacizumab (Steinberg M., 2009).

3. Carcinogénesis asociada a la inflamación en cáncer colorrectal

El desarrollo de cáncer colorrectal puede surgir de distintos mecanismos carcinogénicos ya sea independientemente o en conjunto. Actualmente está ampliamente aceptado que la inflamación conduce a la tumorigénesis (Thomas A. Ullman, Steven H. Itzkowitz, 2011).

La relación inflamación-cáncer puede estar dada por dos vías: la vía extrínseca, impulsada por afecciones inflamatorias que aumentan el riesgo de cáncer (como la EII); y la vía intrínseca que está impulsada por alteraciones genéticas que causan inflamación y neoplasia (como la activación de oncogenes) (Coussens, L. M., Werb, Z., 2002).

Se conoce que la vía intrínseca es activada por eventos genéticos que causan neoplasias, que incluyen la activación de oncogenes por mutaciones, reordenamientos o amplificaciones cromosómicas y la inactivación de genes supresores de tumores. Cuando las células se transforman de esta manera producen mediadores inflamatorios, de tal forma que generan un microambiente inflamatorio en tumores para los que no existe una afección inflamatoria subyacente, como en el CCR esporádico o hereditario (Coussens, L. M., Werb, Z., 2002).

Por otro lado, en la vía extrínseca, las condiciones inflamatorias o infecciosas (es el caso de las enfermedades inflamatorias del intestino incluyendo la EC y la CU), aumentan el riesgo de desarrollar cáncer en sitios anatómicos como colon y recto a menudo involucrando múltiples áreas de estos, provocando un “efecto de campo” más amplio en comparación con el CCR esporádico o hereditario donde las displasias son focales (Rubin D., et al., 2012; Mantovani A. et al., 2008).

Estas vías llegan a converger de modo que resultan en la activación de factores de transcripción, principalmente el factor nuclear-kB (NF-kB), el transductor de señal y activador la de la señal 3 (STAT3) y el factor inducible por hipoxia 1 α (HIF1 α), en células tumorales (figura 4). Dichos factores de transcripción coordinan la producción de mediadores inflamatorios, incluidas citocinas y quimiocinas, así como la producción de ciclooxigenasa 2 (COX2), encargada de metabolizar el ácido

araquidónico en prostaglandinas, que, en una mayor expresión, afecta la proliferación celular, la apoptosis e induce angiogénesis. Estos factores en conjunto reclutan y activan varios leucocitos, en su mayoría células mielomonocíticas. Las citocinas activan los mismos factores de transcripción clave en las células inflamatorias, las células estromales y las células tumorales, que en consecuencia producen más mediadores inflamatorios generando un microambiente inflamatorio relacionado con el cáncer (figura 4) (Thomas A. Ullman, Steven H. Itzkowitz, 2011; Rubin D., et al., 2012; Mantovani A. et al., 2008).

Los mecanismos específicos de la inflamación convergente de ambas vías que resulta en carcinogénesis continúan siendo estudiados, sin embargo, se ha encontrado evidencia que la inflamación interviene en muchas vías (figura 4), incluida la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). La expresión de citocinas y quimiocinas por parte de las células inmunitarias, aumentan el riesgo de mutagénesis, así como las interacciones entre células madre transformadas y el microambiente local del tumor, incluidas las células inmunitarias y miofibroblastos (Berdasco M., Esteller M., 2010).

A diferencia de la mucosa normal del colon, el estado inflamatorio de dicho tejido promueve cambios genéticos como inestabilidad cromosómica, microsatélites inestables e incluso hipermetilación del ADN, antes de que haya una evidencia histológica de displasia o cáncer (Hanahan D., Weinberg R. A., 2011).

Las lesiones displásicas por lo general son precursoras del desarrollo del CCR, en el tipo esporádico, comúnmente suelen ser pólipos adenomatosos (adenoma). Por otro lado, pacientes con enfermedades inflamatorias del intestino, desarrollan lesiones displásicas que pueden ser polipoides, planos, localizados o multifocales. Estos son considerados marcadores de inflamación del colon y representan un mayor riesgo de neoplasia (Ullman T., Itzkowitz S., 2011).

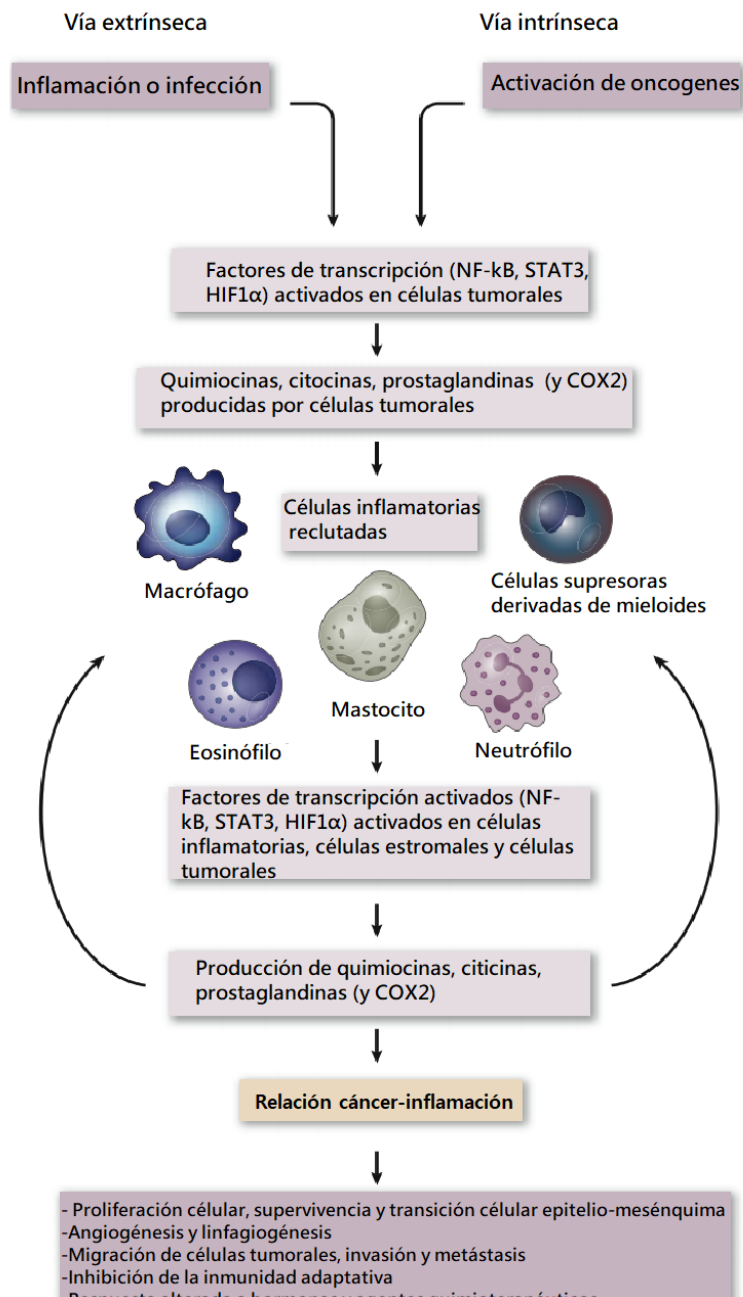


Figura 4. Diagrama de las vías que conectan la inflamación y el cáncer.

(Mantovani et al., 2008)

3.1 Mecanismos implicados en la promoción del desarrollo del cáncer relacionados con la inflamación

Kanda Y., et al. (2017), enlista al menos diez mecanismos en general involucrados en la promoción del desarrollo del cáncer relacionado con la inflamación. Como se mencionó anteriormente, estos mecanismos suelen ser eventos consecuentes de otros previos, formando una cadena de respuestas, sin embargo, el ubicar individualmente los mecanismos pueden ser una buena opción para visualizar los

sitios y eventos que pueden ser blanco para un tratamiento o un agente quimiopreventivo (Kanda Y., 2017; Belpomme D., 2007).

Estos mecanismos son:

- I. Infiltración de células inflamatorias
- II. ROS
- III. Óxido nítrico. (NO)
- IV. Reducción de enzimas antioxidantes
- V. Reducción de antioxidantes
- VI. Activación de NF- kB
- VII. Regulación positiva de citocinas proinflamatorias
- VIII. Regulación a la baja de citocinas antiinflamatorias
- IX. Elevación de quimiocinas
- X. Inducción de ciclooxigenasa (COX)-2

Cuando existe daño tisular, causado por diversos factores, provoca la infiltración de células inflamatorias (figura 5. i), la producción de ROS (5. ii) y NO (5. iii) de origen leucocitario que da como resultado estrés oxidativo / nitrativo (daño del ADN, peroxidación de lípidos, modificación de proteínas y, por tanto, mutación). La disminución de las enzimas antioxidantes **(iv)** y antioxidantes no enzimáticos **(v)**, que eliminan las ROS, conduce a un aumento del estrés oxidativo. Para que la inflamación se vuelva crónica, es necesario un ciclo de retroalimentación positiva entre NF-κB **(vi)** y citocinas proinflamatorias **(vii)**. Las citocinas antiinflamatorias **(viii)** están reguladas a la baja en la carcinogénesis relacionada con la inflamación, mientras que las quimiocinas **(ix)** reclutan leucocitos en sitios inflamatorios. COX-2 además de ROS, NO y citocinas proinflamatorias, **(x)** promueve la proliferación celular, la angiogénesis,

e inhibe la apoptosis y la inmunovigilancia (Kanda Y. et al., 2017; Lambeth, J., 2004; Robinson J., 2008).

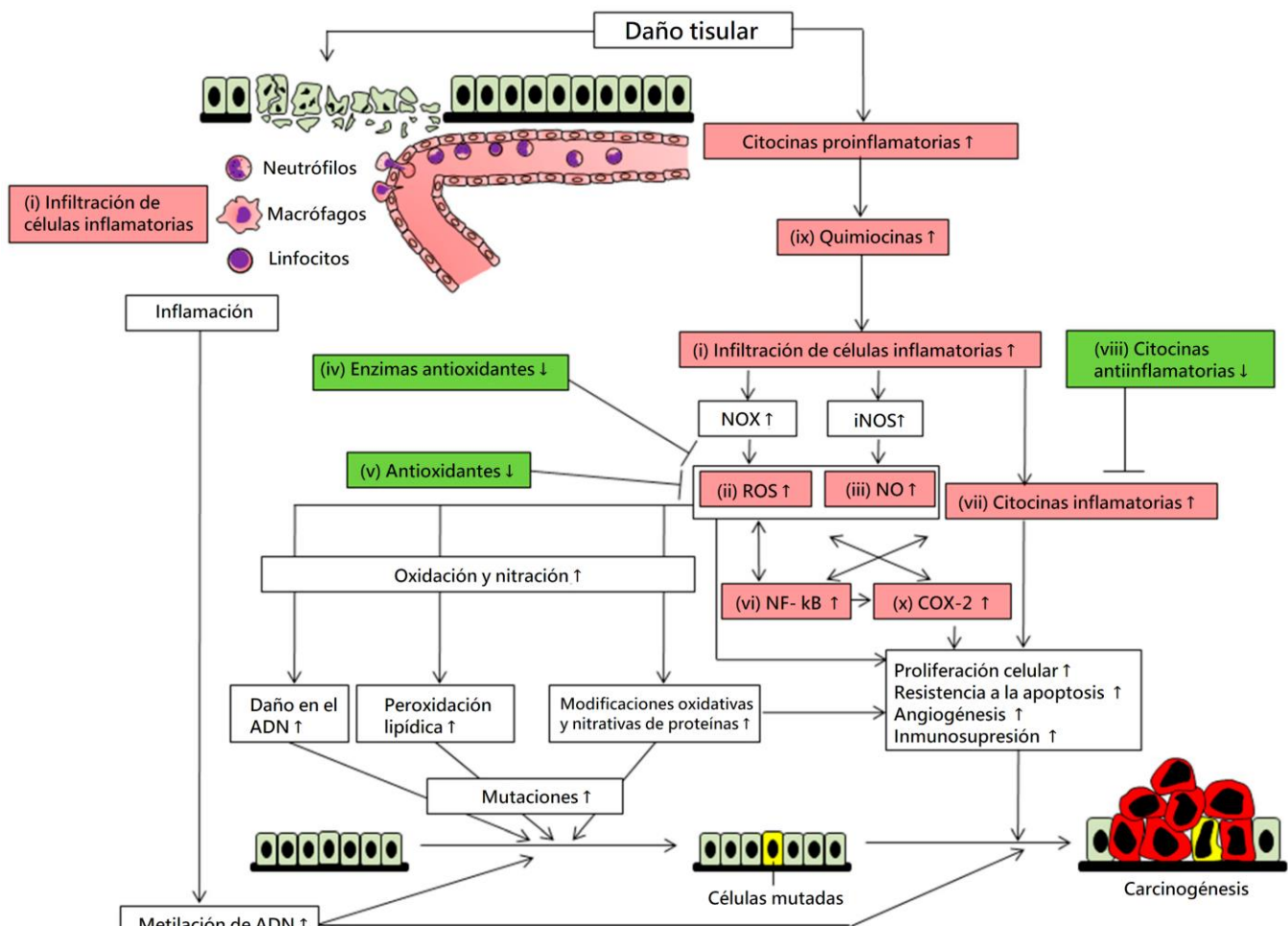


Figura 5. Visión integrada de los mecanismos involucrados en la promoción del desarrollo carcinogénico

En los recuadros rojos se muestran diez posibles dianas quimiopreventivas. Los factores que disminuyen se muestran en los recuadros verdes. Las flechas puntiagudas indican promoción / activación, mientras que las flechas en forma de T indican supresión. (Adaptado de Kanda, et al., 2017)

3.2 Estrés oxidativo

Además de promover la inestabilidad cromosómica, microsatélites y la metilación de las islas CpG, la inflamación contribuye a la carcinogénesis del colon al producir estrés oxidativo. Puede referirse al estrés oxidativo como la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS) en las células y tejidos. Cuando los sistemas antioxidantes no puede neutralizarlas, provocan daño celular y molecular tanto en el ADN, como proteínas y lípidos (Visconti R., 2009; Bartsch H., Nair J., 2006).

i. ROS

Las ROS, se refiere a un tipo de especies reactivas, que se caracterizan por ser moléculas de vida corta, formado por la reducción parcial de oxígeno molecular. Estas pueden contener electrones desapareados (radical libre), sin embargo, no todas las especies reactivas tienen esta naturaleza. Se sabe que algunas moléculas que tienen todos sus electrones apareados, también pueden ser altamente reactivas, por lo tanto, una especie reactiva puede ser un radical libre o no serlo (Moloney J., Cotter T., 2018; Widlansky M., Gutterman, D., 2011).

En condiciones normales las ROS se producen como productos de procesos metabólicos endógenos en la célula mediante la cadena respiratoria mitocondrial. Las células aeróbicas producen ROS como consecuencia de la eficiencia de producción de energía mucho mayor que en organismos anaeróbicos, sin embargo, una desventaja de la respiración aeróbica es la fuga continua de electrones del O_2 durante la síntesis de ATP mitocondrial (Karihtala P., Soini Y., 2007). De hecho, del 1 al 5% del oxígeno total consumido en el metabolismo aeróbico da lugar al anión superóxido ($O_2 \bullet^-$). Otros ejemplos de ROS son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($OH\bullet$) así como los peróxidos orgánicos como productos normales de reducción biológica O_2 . Así mismo, en condiciones hipóxicas, la cadena respiratoria mitocondrial también produce óxido nítrico (NO), que puede generar especies reactivas de nitrógeno (RNS), que a su vez también puede producir otras especies reactivas, como aldehídos reactivos inducidos por la peroxidación de lípidos excesiva (Shobha R., Andallu B., 2009; Klauning J., 2019).

Además de la cadena de transporte de electrones (CTE) en mitocondria, las ROS, también son producidas en el retículo endoplásmico por el sistema encargado del metabolismo de xenobióticos y la introducción de enlaces dobles en los ácidos grasos, constituido por un grupo de citocromos, colectivamente conocidos como citocromo P450, así como por otras fuentes que involucran a las enzimas xantina oxidasas (XO), NADPH oxidasas (NOX) y lipooxigenasas (LOX) (Di Meo et al., 2016; Bartsch H., Nair J., 2006).

La primera línea de defensa que el organismo tiene contra las ROS son los antioxidantes y complejos sistemas enzimáticos, que modulan el estado oxidoreducción (redox) en compartimentos celulares y extracelulares. Las más importantes

de estas enzimas incluyen superóxido dismutasas (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasas, catalasa y peroxiredoxinas (Karihtala P., Soini Y., 2007, Reuter et al., 2010).

Los ROS participan en la regulación de procesos implicados en el mantenimiento de la homeostasis celular, sin embargo, cuando se sobreproducen, el principal objetivo de estas especies son las proteínas, lípidos y el ADN/ ARN. Las modificaciones causadas en estas macromoléculas aumentan las posibilidades de mutagénesis y cuando hay una exposición prolongada pueden producir daños a funciones y estructura celular, incluso la inducción de procesos necróticos y apoptosis. Además, puede inducir mutaciones somáticas y transformaciones preneoplásicas y neoplásicas, así como la proliferación celular, generalmente en la iniciación y progresión del cáncer. Por lo tanto, las ROS están involucradas en un amplio espectro de enfermedades, incluida la inflamación crónica, y una variedad de cánceres (Hussain T., 2016; Visconti R., 2009).

b. Participación de los ROS en las vías de señalización inflamatorias

Diversos estímulos inflamatorios, como el exceso de ROS Y NOS producidas en el metabolismo oxidativo y algunas sustancias naturales o sintéticas, inician el proceso inflamatorio que resultan en la síntesis y secreción de citocinas proinflamatorias. Durante el proceso inflamatorio, los mastocitos y los leucocitos se reclutan al sitio del daño, que conduce a un evento conocido como “estallido respiratorio” debido a una mayor absorción de oxígeno provocando una mayor liberación y acumulación de ROS en el sitio del daño (Coussens, Werb, 2002; Reuter et al., 2010). La acumulación progresiva de ROS en el sitio de daño, por acción de mediadores solubles como metabolitos de ácido araquidónico, citocinas y quimiocinas producidas por las células inflamatorias, puede activar cascadas de transducción de señales e inducir cambios en los factores de transcripción como factor nuclear kappa B (NF-kB), el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), el factor inducible por hipoxia-1 α (HIF1- α), proteína activadora-1 (AP-1), factor nuclear de células T activadas (NFAT) y factor-2 relacionado con NF-E2 (Nrf2), que regulan las respuestas inmediatas al estrés celular. Inducción de ciclooxigenasa-2 (COX-2), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), expresión aberrante de citocinas inflamatorias [factor de necrosis tumoral

(TNF), interleucina-1 (IL-1), IL-6 y quimiocinas, IL-8, el receptor 4 de quimiocinas CXC (CXCR4)], así como las alteraciones en la expresión de microARN específicos, desempeñan un papel en la inflamación inducida por estrés oxidativo. Así mismo, mutaciones en p53 como consecuencia de RONS, suelen ser un evento temprano en el proceso de carcinogénesis en el cáncer asociado a colitis (CAC). Este evento precede a la pérdida de heterocigosidad y está altamente asociado con aneuploidía (Ullman T., Itzkowitz S., 2011).

El microambiente inflamatorio/ oxidativo sostenido formado por estos eventos conduce a un dialelo, ocasionando daño a las células epiteliales y estromales vecinas sanas. Si este estado permanece latente puede conducir a la carcinogénesis (Thomas A. Ullman Steven H. Itzkowitz, 2011; Hussain T., 2016; Bartsch H., Nair J., 2006; Reuter et al., 2010; Federico A., et al., 2007).

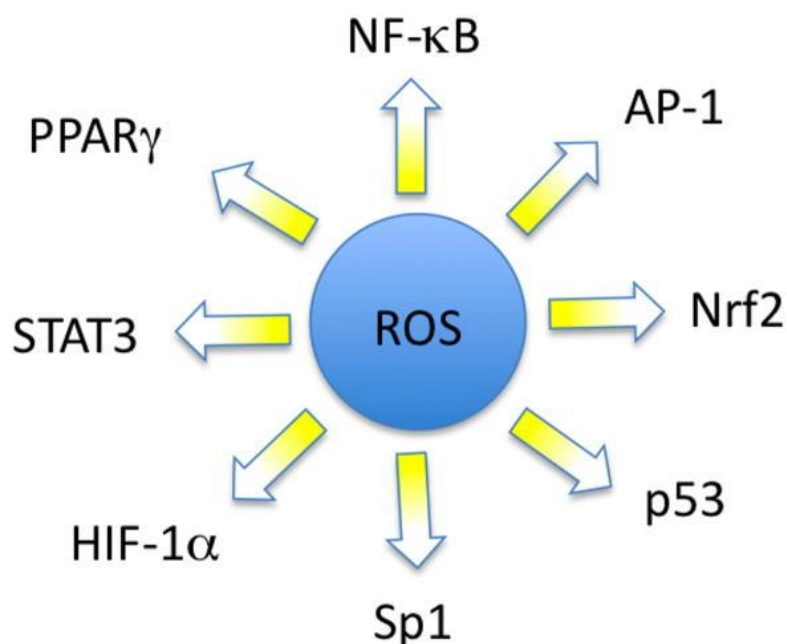


Figura 6. Representación esquemática de varios factores de transcripción modulados por especies reactivas de oxígeno. (Reuter et al., 2010)

Posterior a un estímulo inflamatorio, el inicio de la carcinogénesis mediada por ROS, puede ser directo (oxidación, nitración, halogenación de ADN nuclear, ARN y lípidos) o bien mediada por la activación de vías de señalización por ROS.

4. *Heterotheca inuloides*

Heterotheca inuloides Cass (Asteraceae), popularmente conocida como *árnica mexicana* es una planta endémica de México, utilizada usualmente en la medicina tradicional mexicana para tratar enfermedades inflamatorias, fiebre y como tratamiento tópico para tratar contusiones y heridas.

Por sus propiedades, la etnofarmacología, así como la fitoquímica se ha encargado de estudiar más a fondo esta planta. Estudios fitoquímicos han logrado aislar varios constituyentes de *H. inuloides* principalmente sesquiterpenos tipo cadinanos, flavonoides y fitoesteroles (Gené R., Segura L., 1998; Rodríguez-Chávez, Coballase U., 2015).

4.1 Composición química y actividad biológica

Actualmente se han identificado más de 140 compuestos de *Heterotheca inuloides* mediante el empleo de diversas técnicas, incluidos sesquiterpenos, flavonoides, fitoesteroles, triterpenos, derivados del ácido benzoico y otros tipos de compuestos.

Se ha reportado que estos constituyentes aislados, poseen una importante variedad de propiedades biológicas, entre las que destacan su actividad antiinflamatoria, antioxidante, citotóxica, antimicrobiana, inhibidora de la peroxidación lipídica y antiparasitaria (tabla 1).

Tabla 1. Principales compuestos aislados de los extractos de *H. inuloides* y sus propiedades terapéuticas. (Adaptada de Coballase Urrutia, 2011)

<i>Heterotheca inuloides</i> Extracto	Composición química	Propiedades terapéuticas
Acetónico	Ácido cadalen-15-oico 3,7-dihidroxi-3(4H)-isocadalen-4-ona 7-hidroxicaleno 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalen 1 α hidroxil-1(4H)-isocadalen-4-ona Quercetina Estigmasterol β -sistoterol	Antiinflamatorio Inhibidor de los efectos COX-1 y COX-2 Antioxidante Inhibidor de la peroxidación lipídica
Metanólico	Quercetina Quercetina 3-O-glucósido Kaempferol Kaempferol-3-O-glucósido D-quirositol Espinasterol Espinasterol-3-O- β -D-glucopiranosido 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalen 7-hidroxicaleno	Inhibidor de la actividad de la tirosinasa Antioxidante Inhibidor de la peroxidación lipídica Antiinflamatorio

4.2 Sesquiterpenos tipo cadinanos

Los sesquiterpenos, así como otras clases de terpenos son de interés significativo debido a las funciones que desempeñan en los sistemas biológicos y su utilidad para usos humanos. Gran parte de ello se debe a su diversidad estructural que surge del ensamblaje de los esqueletos de 15 carbonos que forman la base de todos los sesquiterpenos. Por otra parte, se debe a la superposición de los grupos funcionales y sustituyentes sobre los andamios estructurales en distintas formas regionales y estereoespecíficas. Los sesquiterpenos pueden ser acíclicos o contener anillos, clasificándose en familias. Una de ellas son los cadinanos, que a su vez se clasifican en una subfamilia de especial interés para este proyecto: los cadalenos (Figura 7) (Chappell J., Coates M. R., 2010, Breitmeier, 2006, Sharma A., 2013).

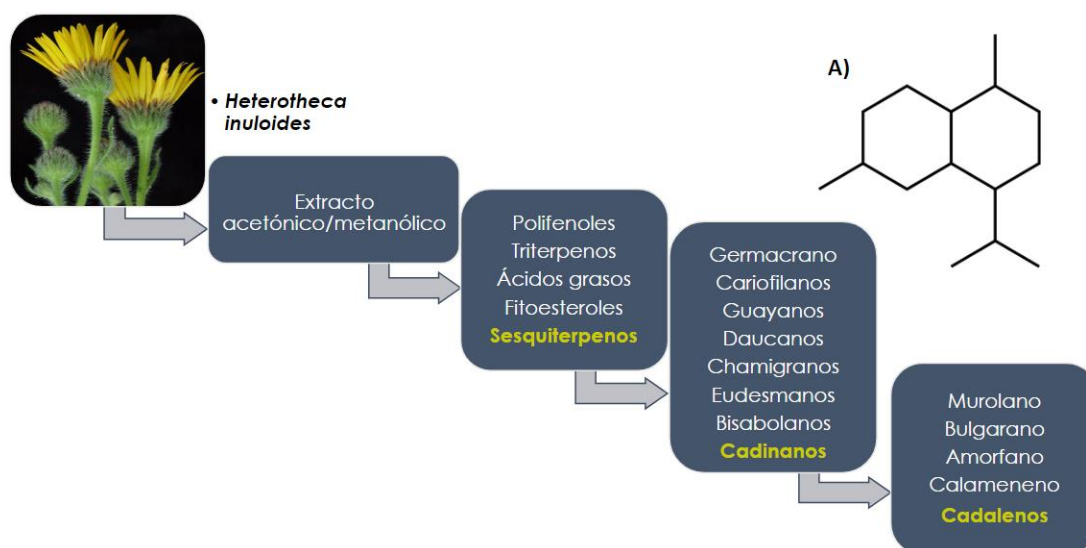


Figura 7. Clasificación de los compuestos aislados de *Heterotheca inuloides*. A). Representación de la estructura química base de un sesquiterpeno tipo cadinano. (Tomado de PubChem 2020)

Uno de los constituyentes más representativos característicos del género *Heterotheca* son los cadinanos, los cuales son un tipo de sesquiterpeno que consta de una decalina que tiene dos sustituyentes metilo en las posiciones 1 y 6, y un constituyente isopropilo en la posición 4 (Figura 7A). Dentro de esta clasificación encontramos a los cadalenos, compuestos de interés para este trabajo (Figura 8.1, 8.2) (Coballase Urrutia, 2011, PubChem, 2020).

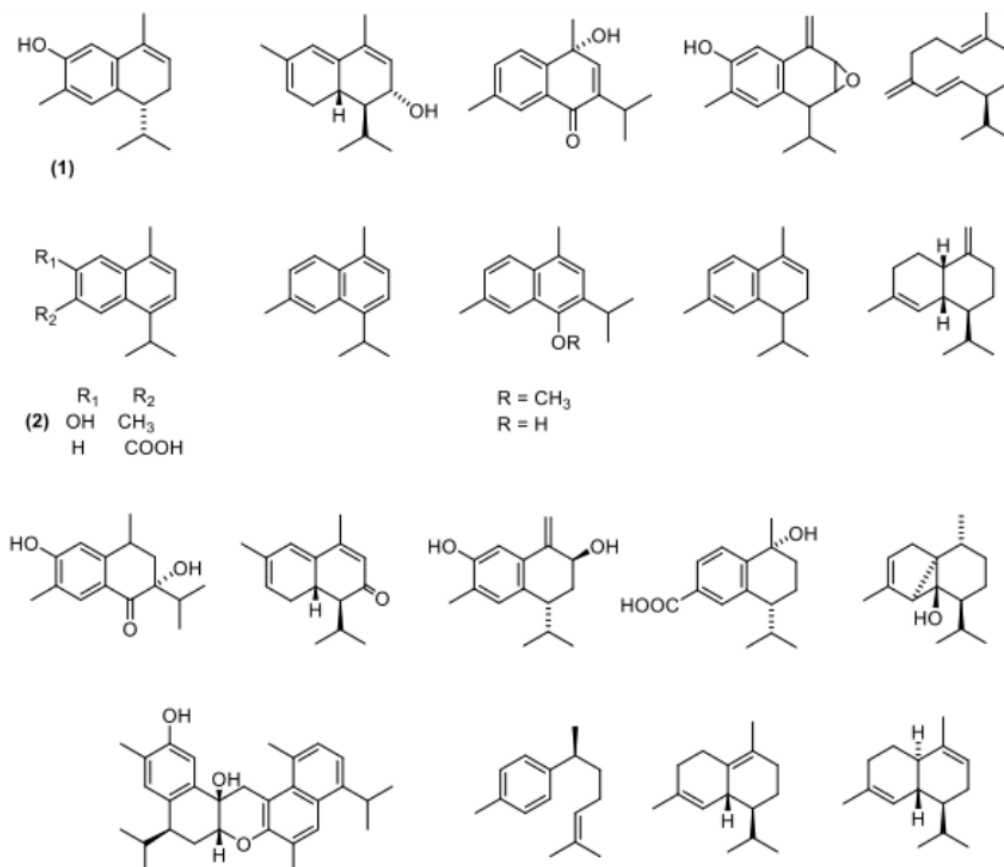


Figura 8. Productos naturales tipo cadinanos aislados de *Heterotheca inuloides*. 1) 7-hidroxi-3,4-hidrocadaleno, 2) 7-hidroxicadaleno. (Egas V., 2015)

4.2.1. Cadalenos

Los cadalenos que se han logrado aislar y presentado mayor actividad biológica son los compuestos 7-hidroxi-3,4-hidrocadaleno y 7-hidroxicadaleno (Figura 8.1 y 8.2). Estos dos metabolitos fueron aislados por métodos cromatográficos de la parte aérea de *H. inuloides* (Egas V., 2015).

La actividad biológica que estos metabolitos presentan es principalmente antiinflamatoria, antimicrobiana y antifúngica, así como inhibición de la peroxidación lipídica y actividad citotóxica-anticancerígena. De esta última, parece estar involucrada en la activación o inhibición de distintas vías metabólicas implicadas en el desarrollo carcinogénico de distintos tipos de cáncer, entre estos el colorrectal (Egas 2015, Rodríguez-Chávez, et al., 2015; Rita de Cássia S., Sá, L., Damião P., 2015).

Al parecer los compuestos 7-hidroxi-3,4-hidrocadaleno y 7-hidroxicadaleno muestran actividad citotóxica-anticancerígena. Egas V. et al. (2015), reportó por primera vez que el efecto de dichos compuestos puede estar involucrado en distintas vías de factores de transcripción como NF- κ B, Nrf2 y STAT3, implicadas en procesos carcinogénicos. Resultando el compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno con actividad anti-NF- κ B y activando la vía antioxidante Nrf2, al igual que el compuesto parecido estructuralmente, el 7-hidroxicadaleno (Egas 2017; Rodríguez-Chávez, 2015).

Existen además compuestos seminaturales como fenilcarbamato de 7-cadalenoilo y fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadalenoilo, los cuales fueron semi sintetizados a partir del 7-hidroxicadaleno y 7-hidroxi-3,4-hidrocadaleno respectivamente. En ambos casos se sustituyó el grupo hidroxilo por un fenilcarbamato en el carbono 7 con el fin de mejorar su actividad, ya que el carbamato se emplea como sustituto del enlace peptídico, lo que ofrece oportunidades para la modulación de las propiedades biológicas y la mejora de la estabilidad y las propiedades farmacocinéticas. (Egas V., et al., 2017, Ghosh K., Brindisi M., 2015).

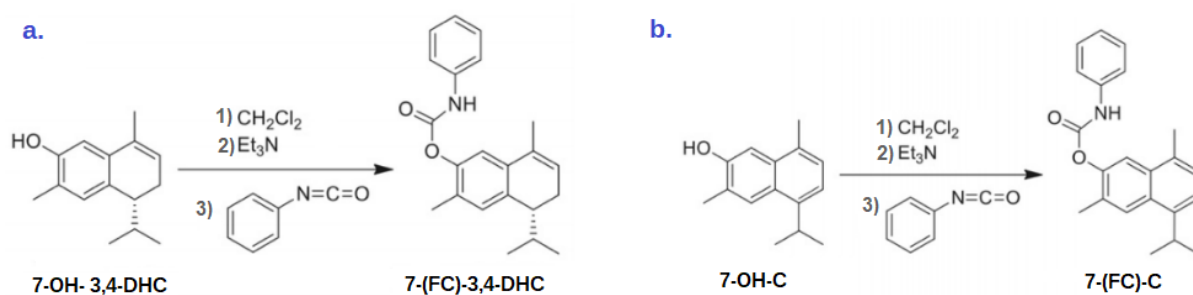


Figura 9. Síntesis de los compuestos seminaturales.

a. 7-(fenilcarbamato)-3,4-dihidrocadaleno (7-(FC)-3,4-DHC), a partir del compuesto natural aislado de *H. inuloides* 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno y **b.** 7-(fenilcarbamato)-cadaleno (7-(FC)-C), a partir del compuesto natural 7-hidroxicadaleno (7-OH-C) (Adaptado de Egas, et al., 2017).

OBJETIVOS

Evaluar la citotoxicidad de compuestos naturales (7-hidroxicaldeno y 3,4-dihidro-7-hidroxicaldeno) y seminaturales (fenilcarbamato de 7-cadalenilo y fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadalenilo) aislados de *Heterotheca inuloides* (árnica mexicana) en la línea celular adenocarcinoma colorrectal (HCT-15) y la predicción *in silico* del compuesto más prometedor con el fin de su estudio a futuro como terapia contra el cáncer colorrectal.

Objetivos particulares

- Establecer la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de los compuestos aislados naturales y seminaturales de *Heterotheca inuloides*.
- Evaluar la proliferación en la línea celular HCT-15 de cáncer colorrectal utilizando la IC₅₀ del compuesto con mayor actividad.
- Evaluar la migración en la línea celular HCT-15 de cáncer colorrectal utilizando la IC₅₀ del compuesto con mayor actividad.
- Realizar la predicción *in silico* de los espectros de actividad con relación al cáncer colorrectal, del compuesto con la mayor actividad para su estudio específico posterior.
- Correlacionar las predicciones de las actividades del compuesto con mayor actividad con posibles mecanismos de acción observados en los experimentos.

HIPÓTESIS

Se sabe que los compuestos derivados de *Heterotheca inuloides* poseen actividad citotóxica potencial como tratamiento contra el cáncer, por lo tanto, se espera que la modificación con un grupo carbamato tenga mejor efecto citotóxico en la línea celular colorrectal HCT-15.

METODOLOGÍA

Cultivo y tratamiento celular

Se utilizó las líneas celulares HCT-15, derivadas de carcinoma colorrectal, así como células HeLa (células de cáncer cervicouterino), COS (fibroblastos de riñón de mono) y HEK-273 (células renales embrionarias), todas obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC, UK). Se cultivó y mantuvo condiciones estándar: medio *Roswell Park Memorial Institute- 1640* (RPMI-1640I), con rojo de fenol, NaHCO₃ 2.0 g/L, enriquecido con suero fetal bovino al 10% y gentamicina 50 mg/mL en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ a 37°C.

Determinación de viabilidad celular por ensayo de MTT

Para determinar la citotoxicidad de los compuestos se utilizó el ensayo de MTT. Se sembraron las células en microplaca de 96 pozos hasta alcanzar una confluencia del 80-90% durante 24 horas. Posteriormente se trataron las células con los cuatro compuestos aislados (7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenol, 7-hidroxicadalenol, 7-(fenilcarbamato)-3,4-dihidrocadalenol y 7-(fenilcarbamato)-cadalenol), así como el control positivo, Paclitaxel, empleando concentraciones crecientes (0.5, 1.0, 10.0, 25.0, 50.0, 75.0 y 100 µM). Para el control positivo, se usó un rango adicional de (0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.75, 1 µM). Posteriormente se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT (compuesto de la familia de las sales de tetrazolio, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, MTT *Sigma-Aldrich*) a las 24, 48 y 72 horas posterior a la aplicación del tratamiento. El medio de cultivo fue reemplazado por 100 µL de MTT (0.33 mg/mL) por pozo y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5% durante 30 minutos en ausencia de luz. Se desechó cuidadosamente el sobrenadante y se añadió 100 µL de DMSO para disolver los cristales de formazán formados por la reducción del MTT. Por medio de un lector de microplacas (Cytation 5, BioTek Instruments, Inc.) se leyó a una longitud de onda de 570 nm la absorbancia de cada muestra. Se determinó gráficamente empleando GraphPad Software versión 7.00, con los ajustes necesarios, la concentración requerida para inhibir el 50% de las células (IC₅₀), con cada compuesto, así como con el control positivo. Se determinó el porcentaje de viabilidad

celular de cada tratamiento comparado contra el control por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad celular} = (\text{células HCT tratadas} / \text{células HCT control negativo}) \times (100)$$

Determinación de proliferación celular por ensayo del colorante de exclusión cristal violeta

Se evaluó la proliferación celular mediante el ensayo de exclusión del colorante cristal violeta. En una placa de 96 pozos se cultivaron células hasta una confluencia del 80 – 90% y se incubaron a distintos tiempos (0, 24, 48 y 72 h) con la IC50 del compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno y con 7-(fenilcarbamato)-3,4-dihidrocadaleno, así como el control negativo. Se desechó el medio de cultivo y posteriormente se les añadió 50 µL de cristal violeta (0.5%) dejando incubar 30 minutos. Tras la incubación, se retira todo el colorante posible, realizado cuidadosamente lavados con agua destilada. Se añadió 100 µL de metanol a cada pozo y se realizó una última incubación de 20 minutos antes de leer la placa a 570 nm, en un lector de microplacas lector (Cytation 5, BioTek Instruments, Inc.). Posteriormente se determinó gráficamente empleando GraphPad Software versión 7.00, con los ajustes necesarios, la proliferación de las células tratadas, en comparación con las células no tratadas. Se determinó el porcentaje de proliferación con tratamiento en comparación del control, por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ proliferación} = (\text{Abs normalizada promedio células HCT tratadas} / \text{Abs normalizada promedio de células HCT control}) \times (100)$$

Cuantificación de migración celular por ensayo de *wound-healing*

Para evaluar la migración celular *in vitro* se sembró células por triplicado en placas de 6 pozos en condiciones estándar hasta alcanzar una confluencia del 90-100%. Se realizó una herida en la monocapa por medio de la punta de una micropipeta, raspando la monocapa lo más uniforme posible y se trató a las células con la IC50 del compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno en medio RPMI suplementado con SFB al 10%. Posteriormente se monitoreo el área de la herida en tiempos diferentes (0, 24,

48 y 72 h) utilizando el multilector de imágenes Cytation 5. Se calculó la tasa de migración utilizando el software ImageJ. En función del tiempo, se evaluó el comportamiento del cierre de la herida, mediante la variación de porcentaje de migración celular, calculado de la siguiente forma:

$$\% \text{ Migración} = 100 - ((\text{Área de herida al tiempo } t / \text{Área de herida tiempo cero}) \times (100))$$

Predicción *in silico* del espectro de actividades de las sustancias aislada naturales y semisintéticas (PASS prediction)

Por medio del Swiss Institute of Bioinformatics, se describió las estructuras de los compuestos evaluados a un sistema de notación lineal simplificado SMILES (*simplified molecular-input line-entry system*). Posteriormente se realizó la predicción online en el sitio *way2drug.com predictive services*, impulsada por Filimonov D.A., Lagunin A.A., Glorizova T.A., Rudik A.V., Druzhilovskii D.S., Pogodin P.V., Poroikov V.V. (2014). Insertando esta notación en el software online PASS, y solicitando los espectros de predicciones, PASS (Predicción de espectros de actividad para sustancias) es un producto de software diseñado como una herramienta para evaluar el potencial biológico general de una molécula orgánica similar a un fármaco. PASS proporciona predicciones simultáneas de muchos tipos de actividad biológica basadas en la estructura de compuestos orgánicos. PASS se puede utilizar para estimar los perfiles de actividad biológica de moléculas virtuales, antes de su síntesis química y prueba biológica (Filimonov D. et. al., 2014).

Análisis estadístico

Todos los datos de las tres réplicas independientes por cada ensayo, fueron analizados y graficados utilizando el software GraphPad Prism versión 7.00 para Windows (GraphPad Software, California USA) y Microsoft Office Excel versión 16.17. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de Tukey y Dunnet comparando las diferentes condiciones. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

RESULTADOS

La IC₅₀ de los cadalenos naturales son menores en la línea celular de adenocarcinoma colorrectal que en otras líneas celulares.

Se determinó la viabilidad de las líneas celulares HCT-15 (Adenocarcinoma colorrectal), HeLa (células de cáncer cervicouterino), COS (fibroblastos de riñón de mono) y HEK-273 (células renales embrionarias) por medio del ensayo de MTT (reducción de sales de tetrazolio) tratada con diferentes compuestos naturales (7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno y el 7-hidroxicadaleno) y seminaturales (7-fenilcarbamato-3,4-dihidrocadaleno y 7-fenilcarbamato-cadaleno), en un gradiente de concentraciones que permitió crear una curva para determinar la IC₅₀ sobre las líneas celulares y determinar la citotoxicidad de cada compuesto.

En primera instancia se evaluó la viabilidad celular en la línea HCT-15 en tratamiento con el compuesto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno. La **Fig. 10a** muestra el gráfico correspondiente a la determinación de la IC₅₀ en dicha línea tratada, en un intervalo de concentraciones de 0.5 μ M- 100 μ M, en un tiempo de exposición de 72h. Se observó que a una concentración de 41.65 μ M, el compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno inhibe la viabilidad de las células de adenocarcinoma colorrectal 50%. Del mismo modo, se determinó que éste compuesto en la línea celular HeLa (**Fig.10.b**) inhibe la viabilidad en una 50% a una concentración de 56.15 μ M, mientras que en las líneas COS y HEK-273 es necesaria una concentración de 89.59 μ M (**Fig.10.c**) y 266.8 μ M respectivamente (**Fig. 10.d**).

Al parecer las células de adenocarcinoma colorrectal son las más afectadas por el compuesto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno, presentando efectos citotóxicos con la menor concentración. Por otro lado, en las células renales embrionarias de la línea HEK-273, el efecto citotóxico se presenta a una concentración de 266.8 μ M, es decir seis veces más que la concentración necesaria para causar efectos citotóxicos en HCT-15.

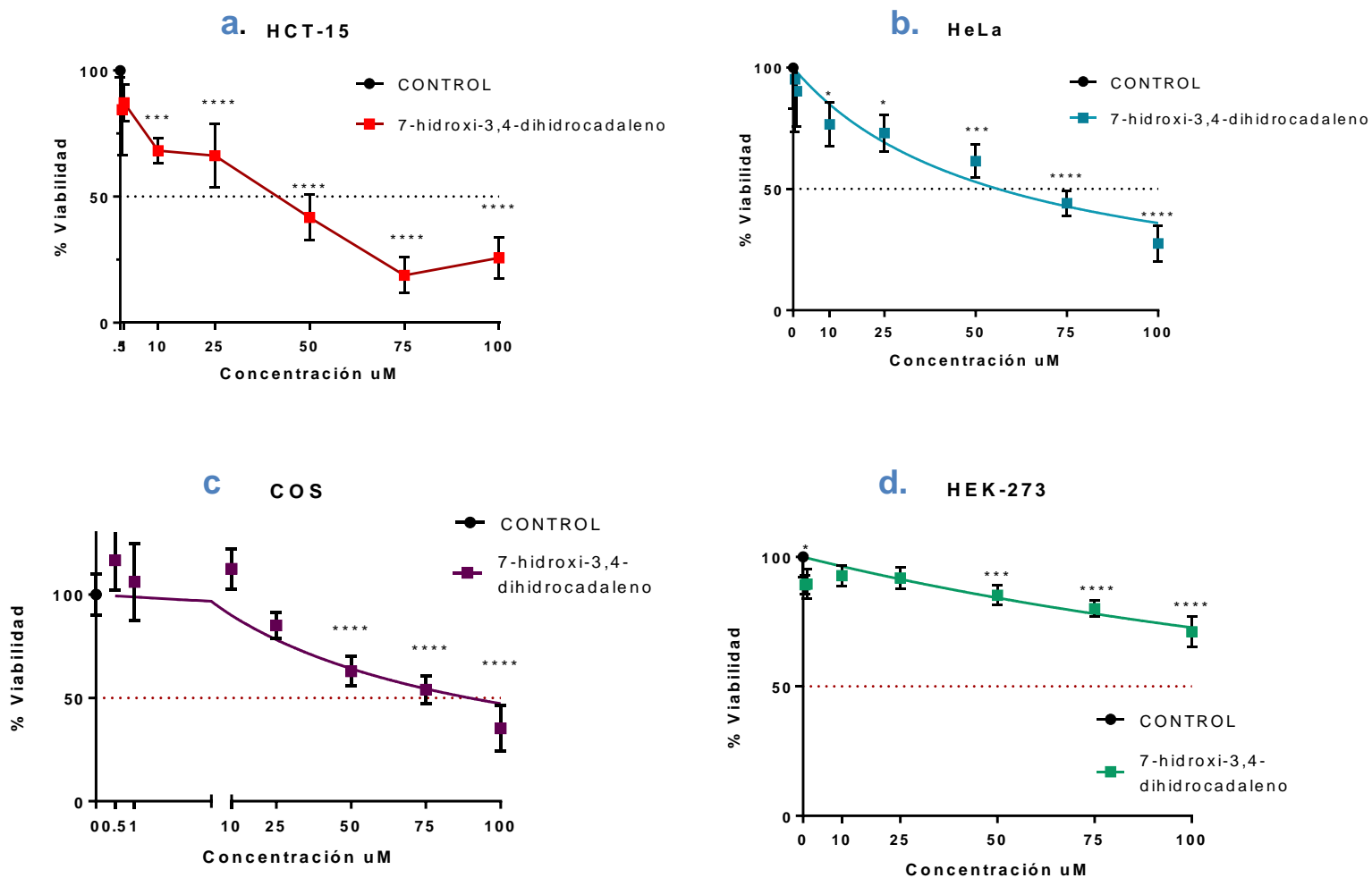


Figura 10. Efecto del compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno sobre la viabilidad en distintas líneas celulares. Curvas de concentración del compuesto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno para determinar la IC₅₀ en un tiempo de exposición de 72h. En la línea celular HCT-15 (a.), en la línea celular HeLa (b.), en la línea celular COS (c.), y en la línea celular HEK-273 (d.). De acuerdo al tratamiento el valor de *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 y **** p<0.001.

También se determinó el efecto citotóxico del segundo compuesto natural, el 7-hidroxicadaleno, tratando con un intervalo de concentraciones de 0.5 μ M- 100 μ M, en las líneas celulares, HCT-15, HeLa y COS. La IC₅₀ de HCT-15 resultante de la linealización de los datos como se muestra en la **Fig. 11.a**, es de una concentración de 29.1 μ M. Por otro lado, en línea celular HeLa, fue de IC₅₀, 48.98 μ M (**Fig.11.b**), y en COS, una concentración de 196.6 μ M (**Fig.11.c**). Se observa que de las tres líneas que fueron tratadas con el segundo compuesto natural, las células de adenocarcinoma colorrectal fueron afectadas con la menor concentración del compuesto, en comparación con las células de cáncer cervicouterino y los fibroblastos de riñón.

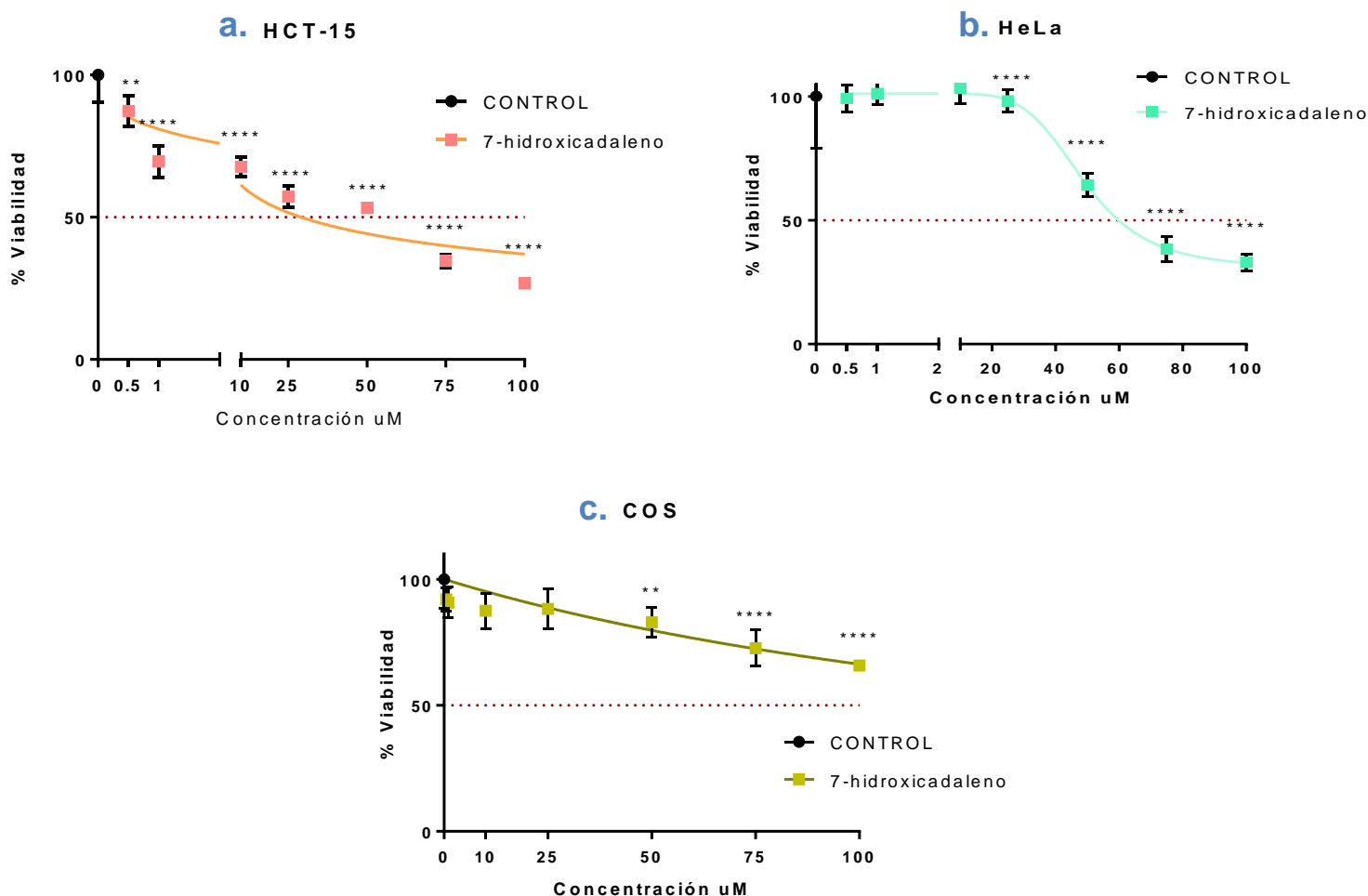


Figura 11. Efecto citotóxico de 7-hidroxicadalenol sobre distintas líneas celulares. Curvas de concentración del compuesto natural 7-hidroxicadalenol para determinar la IC₅₀. Porcentaje de viabilidad de la línea celular HCT-15, (a.) la línea celular HeLa (b.) y la línea COS (c.), en un tiempo de exposición de 72h en cada caso. El análisis estadístico muestra el valor de *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 y **** p<0.001.

El compuesto fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadenoilo presenta efectos citotóxicos en una concentración/tiempo menor que los cadalenos naturales y entre los seminaturales.

Por otra parte, los compuestos seminaturales fenilcarbamato de 7-cadenoilo, así como el fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadalenilo, también fueron evaluados mediante el ensayo de MTT para determinar su citotoxicidad, con sus respectivas IC₅₀.

Como se muestra en la **Fig. 12**, mediante una regresión no lineal de los datos se logró obtener las concentraciones inhibitorias de la viabilidad celular de la línea celular HCT-15, en tres periodos de exposición: 24, 48 y 72 horas.

En el caso del fenilcarbamato de 7-cadenoilo, la IC₅₀ correspondiente al tiempo de exposición de 24h fue de 6.9 μM, a las 48h de 4.5 μM y finalmente a las 72h de 3.45

μM , (**Fig.12a, c, e**) decreciendo la concentración del compuesto en relación al tiempo de exposición al tratamiento.

Caso similar sucedió con el compuesto del fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadaleñoilo, que, a las 24h la concentración necesaria para la inhibición de la viabilidad celular fue de $0.46 \mu\text{M}$, y en 48h /72h de $0.38 \mu\text{M}$. (**Fig.12b, d, f**)

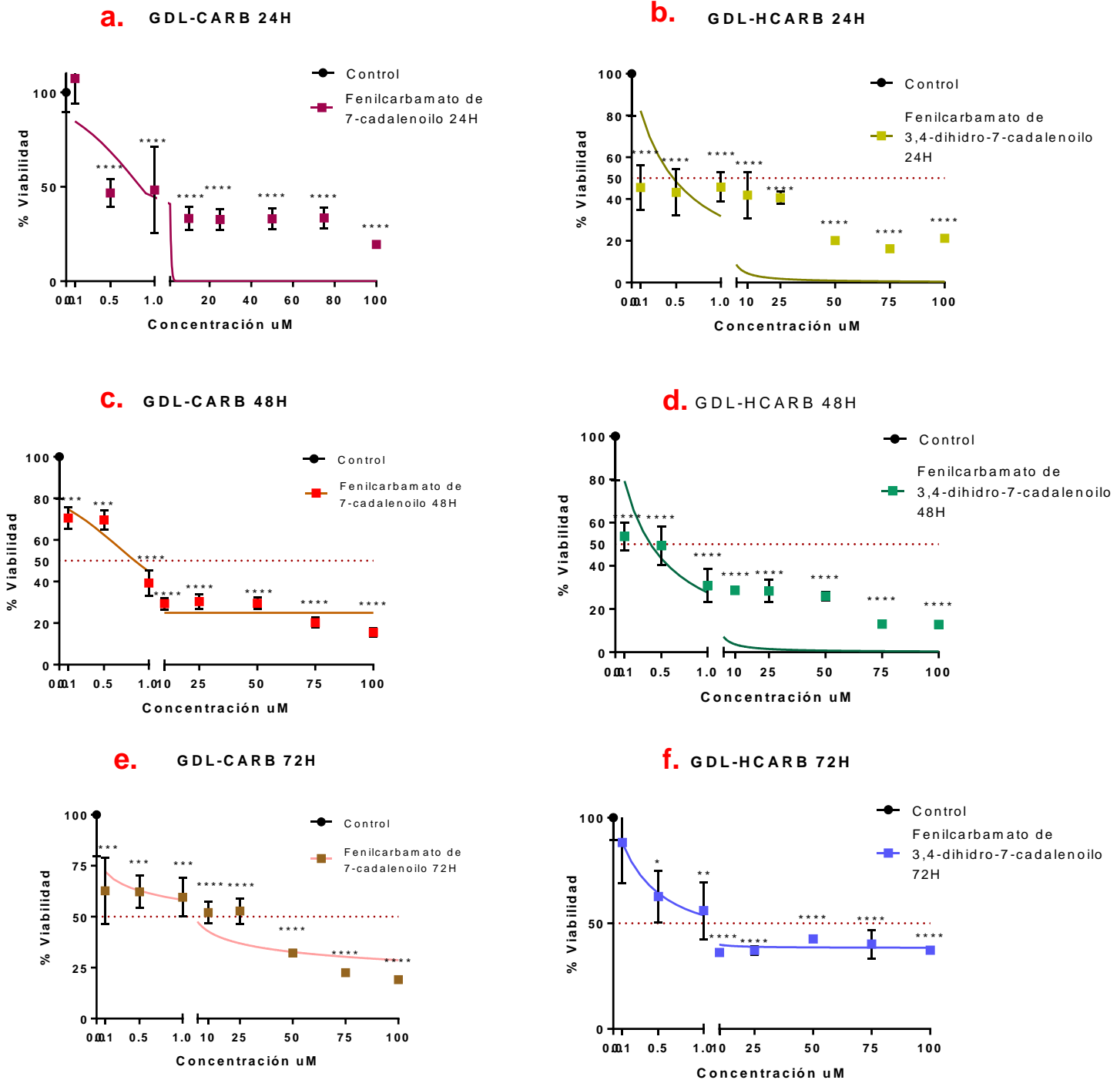
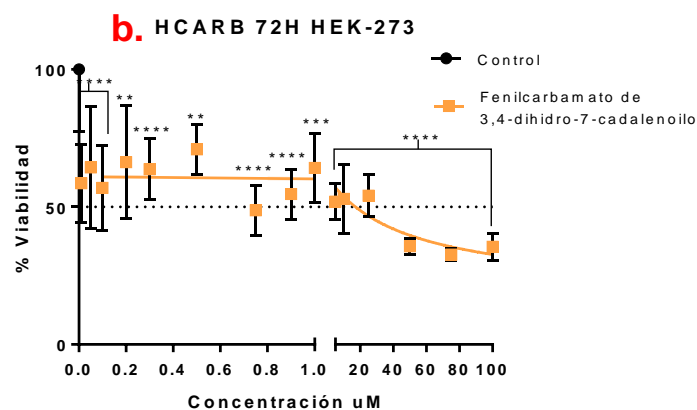
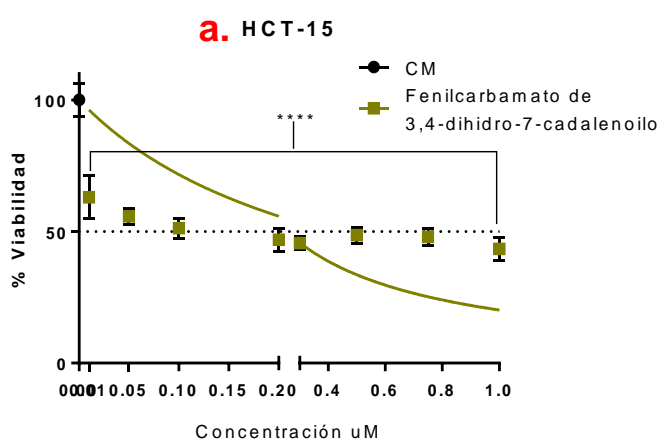


Figura 12. Efecto de los compuestos seminaturos en la línea celular HCT-15, con diferentes tiempos de exposición. Curvas % viabilidad celular de adenocarcinoma colorrectal tratadas con fenilcarbamato de 7-cadaleñoilo (CARB) y fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadaleñoilo (HCARB). **a.** IC50 de CARB a las 24h, **c.** a las 48 h y **e.** a las 72h de exposición. **b.** IC50 de HCARB a las 24 H y **d.** **f** a las 48 y 72 H de exposición respectivamente. El análisis estadístico muestra un valor de * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.001$

El fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadenoilo fue el compuesto seminatural que necesitó menor concentración para lograr efectos citotóxicos en las células de adenocarcinoma colorrectal, por tal motivo se trataron nuevamente las células, pero ahora en un intervalo de concentraciones menor (0.01.-0.1 μ M) para poder establecer la IC50 más exacta. La **Fig. 13a** muestra la curva de concentraciones, por la cual se pudo calcular la IC50 de forma más precisa, resultando ser de 0.25 μ M. Dicha concentración fue la más baja con la cual la línea celular HCT-15 presenta efectos citotóxicos.

En comparación con los compuestos naturales, los compuestos seminaturales o semisintéticos, fueron los que presentaron actividad citotóxica con una menor concentración. De los dos compuestos seminaturales, el fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadenoilo, fue el mejor candidato para seguir con los ensayos posteriores. Se validó el método de MTT que se usó para evaluar la viabilidad celular utilizando un taxano (Paclitaxel), el cual es un agente antimicrotubular que impide la división y duplicación de células cancerosas provocando muerte celular. Resultando una IC50 de 0.32 μ M, en la línea celular HCT-15 en un tiempo de exposición de 72h (**Fig.13b**).



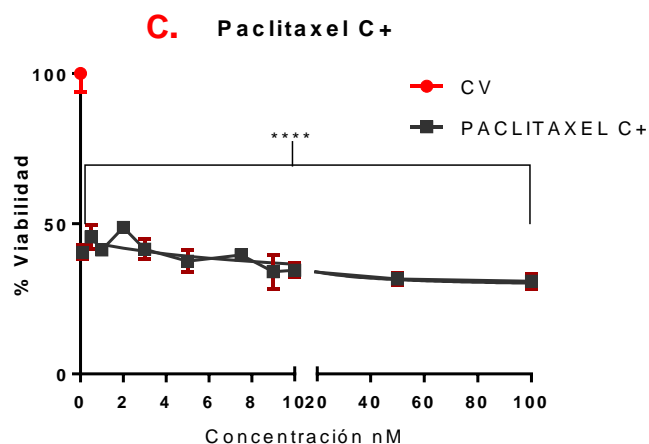


Figura 13. a. Efecto en la viabilidad celular en la línea celular HCT-15, tratada con fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadalenilo en un intervalo de concentraciones de 0.01-1.0 μ M en un tiempo de exposición de 72h. b. Efecto del fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadalenilo en el control sano de células. Curva de % de viabilidad celular de la línea celular HEK-273 con tratamiento a72H. c. Validación del método, por medio del agente antimicrotubular: Paclitaxel, en un intervalo de concentraciones de 0.1-1000 nM, en un tiempo de exposición de 72h. CV: control de vehículo; C+: control positivo. El valor de ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$ y **** $p < 0.001$)**

La actividad citotóxica del compuesto fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadalenilo afecta significativamente a la proliferación y migración de células de adenocarcinoma colorrectal.

Utilizando el compuesto seminatural fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadalenilo, siendo el compuesto más prometedor, se continuó evaluando su actividad citotóxica en las células de adenocarcinoma colorrectal. Se comparó el efecto que tiene dicho compuesto en la proliferación de estas células tratadas con la IC50 y las no tratadas, mediante la cuantificación indirecta por tinción con cristal violeta con un lector de placas multimodal (Cytation Cell Imaging Multi-mode Reader, BioTek).

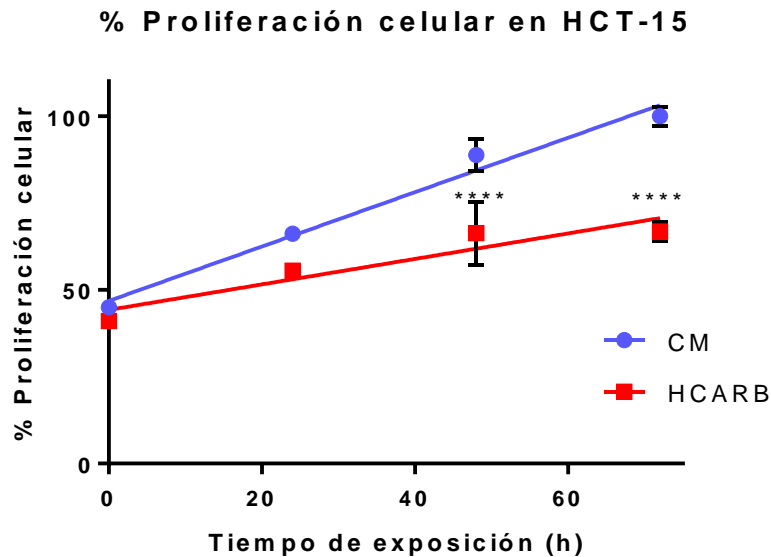


Figura 14. Efecto en la proliferación celular. Cuantificación del porcentaje de proliferación de la línea celular HCT-15, tratada con la IC₅₀ del compuesto fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadalenoilo (HCARB), así como la proliferación de las células sólo con medio de cultivo, sin tratamiento (CM). El valor de **** $p < 0.001$.

La **Fig.14** muestra el porcentaje de proliferación de HCT-15, en tratamiento con la IC₅₀ del compuesto, la cual muestra una diferencia significativa con respecto al control, a las 48 y 72h. El fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadalenoilo muestra una reducción de la proliferación de casi un 25% a partir de las 48 h de exposición y aproximadamente un 50% a las 72h de en comparación con las células sin tratamiento.

Posteriormente se evaluó el efecto del compuesto en la migración de las células de adenocarcinoma colorrectal, por medio del ensayo *wound-healing* y la lectura y fotografía de imágenes, por medio de un lector de placas multimodal (Cytation Cell Imaging Multi-mode Reader, BioTek).

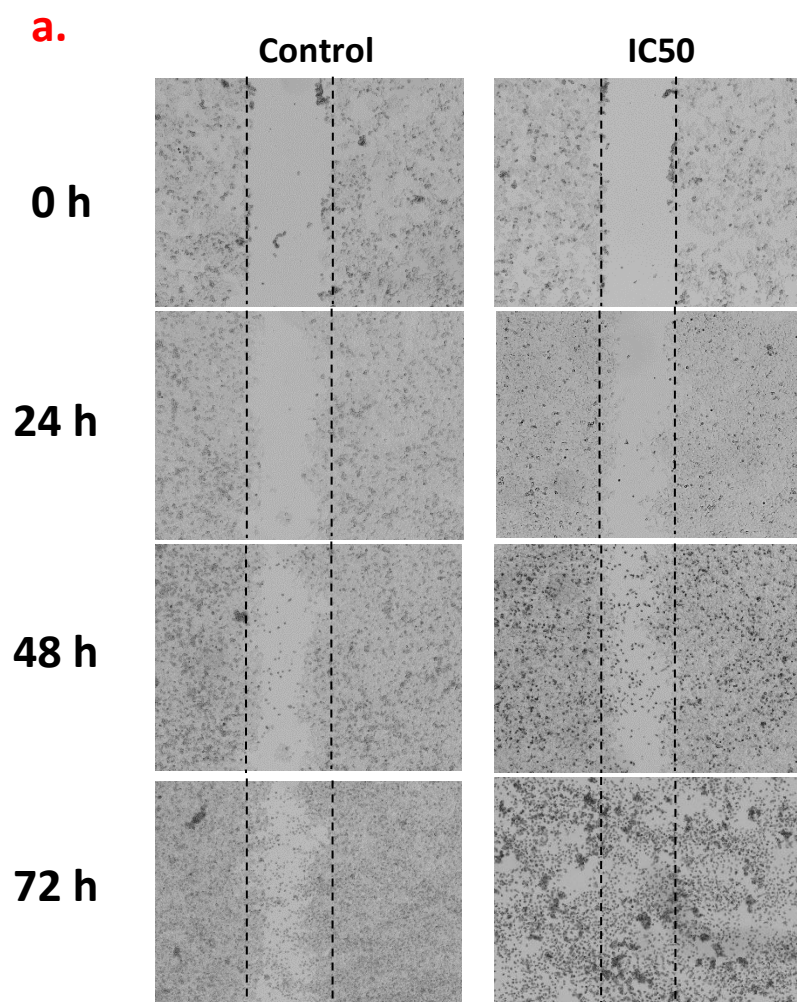
La **Fig.15** en la parte **a**. muestra los efectos en la migración celular causados por el tratamiento con la IC₅₀ del carbamato empleado. Se observan dos secciones de imágenes, la primera muestra a las células HCT-15 no tratadas y la segunda sección aquellas que fueron tratadas, en distintos periodos de exposición.

En la sección del control, se observan cualitativamente a las células que al paso de horas cierran progresivamente la herida que se realizó por la mitad del pozo, y que al cabo de 72h, la herida está casi completamente cerrada. Por el contrario, en la sección de imágenes donde las células están tratadas con la IC₅₀ del carbamato, al paso de las horas con exposición al compuesto se observa baja migración y por ende

cierre de la herida. Cabe destacar que a partir de las 48h se observa una gran cantidad de muerte celular.

Las imágenes se procesaron por medio de un software (ImageJ) para poder cuantificar el porcentaje de cierre de herida, los resultados mostrados en la **Fig. 15.b**, son resultado de las medias más la Desviación Estándar (SD) de seis experimentos independientes, en donde se puede observar que a partir de 24h la diferencia en el porcentaje de migración de HCT-15 con tratamiento es significativa, en comparación con el control sin tratamiento. A las 48h, el porcentaje de cierre de herida de las células sin tratamiento es cercano al 40%, mientras que las células con tratamiento sólo un 10%.

Finalmente, al término de 72h de exposición al compuesto, se hizo imposible cuantificar el porcentaje de herida pues la monocapa estaba en la mayoría de los experimentos despegada, debido a la muerte de las células. Sin embargo, en las células sin tratamiento la migración fue cercana al 60% de cierre de la herida.



b. % Migración HCT-15

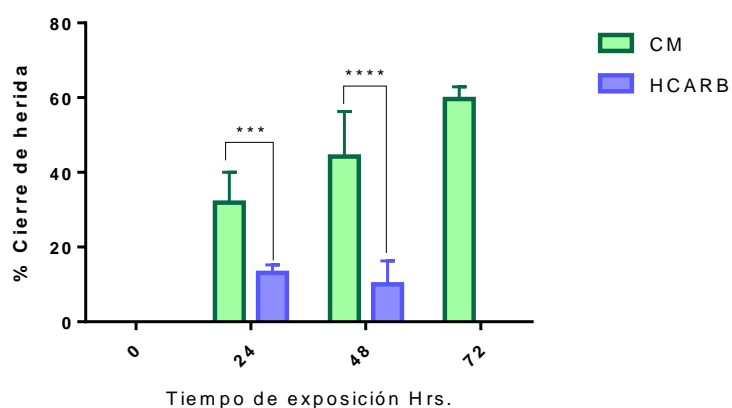


Figura 15. Efecto en la migración celular. **a.** Imágenes de la monocapa de células HCT-15, con la producción de una herida en medio (delimitada con la línea punteada para comparación del cierre), en una misma coordenada, para la observación de efectos cualitativos de la citotoxicidad compuesto, a diferentes periodos de exposición (0, 24, 48 y 72h). **b.** Gráfica comparativa del % de cierre de herida de las células con y sin tratamiento de las medias de seis experimentos independientes con su SD.(CM: Control medio, HCARB: fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadalenilo)

El Fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadalenilo, muestra probables espectros de actividad que podría explicar su comportamiento citotóxico.

Por medio del software *PASS online web resource. Chemistry of Heterocyclic Compounds*, se hicieron las siguientes predicciones *in silico* de todos los compuestos evaluados, mostrando un espectro de actividades con las que podría ser estudiadas en un futuro como parte de la elucidación de su mecanismo de acción de esta familia de compuestos.

En la siguiente tabla se muestra la predicción en cuanto a la actividad anticancerígena de los compuestos naturales y seminaturales.

Tabla 2. Predicción de espectros de actividad de los compuestos naturales y seminaturales evaluados. (Pa: probabilidad de "ser activa"; Pi: probabilidad de "ser inactiva", *PASS online web resource. Chemistry of Heterocyclic Compounds*)

Pa	Pi	Actividad
7-hidroxi-3,4-dihidrocadenoilo		
0,728	0,013	Antiinflamatoria
0,650	0,080	Protector de la mucosa membranal
0,621	0,017	Tratamiento para pólipos adenomatosos
0,526	0,049	Inhibidor de la expresión HIF1A

Fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadalenilo		
0,469	0,066	Antiinflamatoria
0,425	0,063	Antagonista de la integridad membranal
0,415	0,015	Inhibidor de la expresión de HIF1A
0,317	0,085	Tratamiento para pólipos adenomatosos
0,240	0,027	Inhibidor de la formación de microtúbulos
0,290	0,112	Tratamiento de enfermedades asociados a cáncer
0,251	0,082	Estimulante del factor 2 relacionado con NF-E2 (Nrf2)
0,222	0,100	Anticarcinógeno
0,178	0,112	Quimioprotector
7-hidroxicadalenilo		
0,729	0,017	Inhibidor de la expresión de HIF1A
0,658	0,021	Antiinflamatorio
0,635	0,067	Antagonista de la integridad membranal
0,634	0,015	Tratamiento para pólipos adenomatosos
0,543	0,004	Estimulante del factor 2 relacionado con NF-E2 (Nrf2)
0,473	0,036	Inhibidor de la expresión de TNF
0,452	0,033	Potenciador de la permeabilidad membranal
0,408	0,094	Tratamiento de condiciones preneoplásicas
7-fenilcarbamato-cadalenilo		
0,566	0,030	Antagonista de la integridad membranal
0,624	0,091	Protector mucomembranal
0,359	0,033	Tratamiento de enfermedades asociados a cáncer
0,402	0,100	Inhibidor de la expresión de HIF1A
0,317	0,047	Estimulante del factor 2 relacionado con NF-E2 (Nrf2)
0,288	0,093	Tratamiento de pólipos adenomatosos
0,350	0,123	Antiinflamatoria

El compuesto 7-hidroxi-3,4-dihidrocadenilo y el 7-hidroxicadenilo presentaron una alta probabilidad de ser antiinflamatorio con un valor de Pa de 0.728 y 0.729 respectivamente, también el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadenilo presentó buena probabilidad de ser protector de la mucosa y como tratamiento para pólipos adenomatosos, actividades clave para profilaxis de neoplasias.

El otro compuesto natural 7-hidroxicadeno, presentó dentro de la predicción de su espectro de actividades, buena probabilidad de ser Inhibidor de la expresión de HIF1A (Factor 1 inducible por hipoxia) y como tratamiento de pólipos adenomatosos.

Por otra parte, los compuestos seminaturales también presentaron dentro de su espectro de predicción, actividad biológica que podría explicar su citotoxicidad.

El Fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadenilo, así como el fenilcarbamato de 7-cadenilo ambos presentaron probabilidad de ser antagonistas de la integridad de la membrana celular, así mismo, ambos compuestos semisintéticos presentan tener actividad como protector de mucosa, Inhibidor de la expresión de HIF1A (Factor 1 inducible por hipoxia), Estimulante del factor 2 relacionado con NF-E2 (Nrf2), y como antagonistas de la membrana celular en mayor probabilidad.

Dentro del espectro de predicción, los cuatro compuestos presentan actividad antiinflamatoria, siendo los compuestos naturales: 7-hidroxi-3,4-dihidrocadenilo y el 7-hidroxicadeno, los compuestos que presentaron mayor Pa de dicha actividad. Así mismo estos dos compuestos, presentan tener mayor probabilidad de ser activos como tratamiento contra pólipos adenomatosos, que los dos compuestos seminaturales.

DISCUSIÓN

Actualmente el cáncer colorrectal ocupa el tercer lugar en los cánceres más mortales de todo el mundo, y el cuarto más frecuente en México y el mundo, con 1.8 millones de casos nuevos y casi 861,000 muertes (GLOBOCAN, 2018; INCan, INSP, 2020), haciendo de esta enfermedad un problema grave de salud pública.

Se sabe que la etiología del cáncer colorrectal frecuentemente está relacionada con eventos inflamatorios presentes en enfermedades comunes como la enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa o colitis de Crohn. Diversos estudios experimentales, clínicos y epidemiológicos sugieren que agentes antiinflamatorios son terapias prometedoras, éste antecedente facilita la investigación y desarrollo de nuevas moléculas que sean coadyuvantes al tratamiento de este cáncer (Ricchi P. et al., 2003).

Se han logrado aislar diversos compuestos de *Heterotheca inuloides*, mejor conocida como árnica mexicana, entre ellos encontramos a los cadalenos. Estos derivados han sido a la vez modificados añadiendo un grupo carbamato en el carbono siete sustituyendo a un grupo hidroxilo. Siendo el 7-hidroxicadalenol y el 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenol los compuestos naturales, así como como el fenilcarbamato de 7-cadalenol y el fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadalenol los compuestos seminaturales que se evaluaron en el presente trabajo con el fin de determinar la actividad citotóxica en células de adenocarcinoma colorrectal (HCT-15).

Primeramente, se determinó la viabilidad celular por medio del ensayo de MTT, con cada uno de los compuestos. El compuesto natural 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalenol se evaluó en cuatro líneas celulares, resultando ser las células de adenocarcinoma colorrectal las que presentaban un mayor efecto del tratamiento con el compuesto, a una concentración menor que con las líneas HeLa, COS y HEK-273, estas dos últimas, nuestro control de células sanas, en las que su IC_{50} fueron de 89.59 y 266.8 μ M respectivamente. En un tiempo de exposición de 72h, la IC_{50} de este compuesto en la línea HCT-15 fue de 41.65 μ M, valor similar al reportado de Rodríguez-Chávez, Coballase-Urrutia, Sicilia-Argumedo, Ramirez-Apan & Delgado (2015), el cual fue de $59.37 \pm 4.5 \mu$ M, difiriendo de este, por el método de determinación, que fue por un ensayo de sulfonamida B (método de tinción de proteínas de células viables) (Escobar I., 2009).

Del mismo modo se determinó la IC₅₀ del segundo compuesto natural, el 7-hidroxicadalenol, el cual también se evaluó en las líneas celulares HeLa y COS, así como HCT-15, presentando efectos citotóxicos en las células de adenocarcinoma colorrectal con una menor concentración que con las otras líneas celulares, su IC₅₀ fue de 29.1 µM; Rodríguez-Chávez, Coballase-Urrutia, Sicilia-Argumedo, Ramírez-Apan & Delgado (2015), para éste caso reporta una concentración de 18.89 ± 1.2 µM, valor no alejado al experimental, sin embargo se atribuye dicha diferencia a la variación de los métodos utilizados.

Por otro lado, la evaluación de los compuestos seminaturales, realizada con el mismo método de MTT, arrojaron datos más prometedores, pues estos compuestos modificados con un grupo carbamato, presentaron efectos citotóxicos en una concentración-tiempo menor que los compuestos naturales. Ambos compuestos semisintéticos se evaluaron en tres periodos de exposición, 24, 48 y 72 horas.

La concentración que afectó el % de viabilidad en las primeras 24h fue notablemente más baja que con los compuestos naturales a las 72 h de exposición. Así mismo, la concentración de los compuestos semisintéticos utilizada para tener efecto citotóxico a las 72h fue menor en comparación a los compuestos naturales.

De los dos compuestos semisintéticos evaluados, el compuesto fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadenoilo fue aquel que presentó la menor IC₅₀ en la línea celular de interés, en este caso las células de adenocarcinoma colorrectal, siendo esta concentración de 0.25 µM, mientras que el fenilcarbamato de 7-cadenoilo, presentó una IC₅₀ de 3.45 µM. Los valores que Egas, V., Millán, E., Collado, J. A., Ramírez-Apan, T., Méndez-Cuesta, C. A., Muñoz, E., & Delgado, G. (2017) reportaron fueron similares. Usando ambos compuestos semisintéticos determinaron la IC₅₀ de éstos en la misma línea celular (HCT-15), en el caso del fenilcarbamato de 7-cadenoilo, la IC₅₀ reportada es de 3.88 ± 0.5 µM, la cual fue muy parecida a la experimental y en el caso del fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadenoilo, la concentración inhibitoria reportada fue de 0.03 ± 0.01 µM, la diferencia en el valor de la IC₅₀ experimental con respecto a la reportada. Probablemente se deba a un ajuste en el intervalo de concentraciones para realizar la curva, utilizando concentraciones aun menores a pesar del ajuste que se realizó experimentalmente.

La eficacia de los compuestos semisintéticos que contienen un grupo carbamato, se puede atribuir precisamente a éste, pues es bien sabido que en la actualidad juegan

un importante rol en la química medicinal, ya que usualmente es sustituto de enlaces peptídicos, lo que les confiere a las moléculas mayor estabilidad química y sobre todo la capacidad de penetrar membranas celulares. La funcionalidad de un carbamato se debe en parte a que impone un grado de restricción conformacional debido a la deslocalización de electrones no enlazados en el nitrógeno del grupo carboxilo, además dicha funcionalidad participa en el enlace de hidrógeno por medio del grupo carboxilo y el esqueleto NH. Por lo tanto, la sustitución en los O- y N- terminales de un carbamato ofrece oportunidades para la modulación de las propiedades biológicas, así como la mejora de la estabilidad y de las propiedades farmacocinéticas (Gosh A., 2015).

Los valores obtenidos de las IC_{50} en general de los compuestos naturales y seminaturales fueron significativamente mayor en las líneas celulares sanas que en las células de adenocarcinoma colorrectal, lo que revela que la citotoxicidad de los compuestos es selectiva con las células tratadas, lo que da indicio que éstos compuestos sean afines a algún blanco específico presente en estas células.

El ensayo de MTT fue validado usando el agente antimicrotubular, Paclitaxel, con el cual se trató a las células de adenocarcinoma colorrectal, obteniendo una IC_{50} de 9.6 nM. Dicha concentración fue comparada con la reportada en Alfarizal K., Sheikh B., Sarker R. & Mohan G. (2017), con una IC_{50} de 9.15 nM y en Gu, W., Zou, H., Li, L., Garcia Carcedo, I., Xu, Z. P., & Monteiro, M. (2016) una concentración de 9.5 nM.

Ya que el compuesto fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadenoilo fue el más prometedor, debido a la mejor actividad citotóxica concentración-tiempo que presentó en comparación con los compuestos naturales y el fenilcarbamato de 7-cadenoilo, se decidió únicamente continuar con este para los siguientes experimentos.

Las lesiones displásicas por lo general son precursoras del cáncer colorrectal, éstas se caracterizan por la proliferación excesiva de las células, de modo que se puso a prueba la capacidad antiproliferativa del compuesto seccionado, usando la IC_{50} obtenida en la parte anterior. Eficazmente redujo la actividad proliferativa de las células de adenocarcinoma colorrectal (HCT-15), pues a las 48h de exposición con el compuesto se había reducido significativamente ya un 25% y al cabo de 72h aproximadamente un 40% con respecto al control. Por tanto, se observó satisfactoriamente reducción en la tasa de división celular, proceso clave en el desarrollo del CCR. Aparentemente este evento está relacionado con la formación de

lesiones displásicas, como los pólipos, que frecuentemente suelen ser marcadores de inflamación del colon y un presentan un mayor riesgo de neoplasia (Ullman T. & Itzkowitz S., 2011).

También se evaluó el efecto del compuesto en la migración celular de HCT-15 de forma cualitativa y cuantitativa. Las imágenes tomadas de las células con tratamiento con la IC₅₀ del fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadenoilo, mostraron el efecto que tuvo el compuesto sobre las células directamente, pues se observaban agregados celulares periféricos probablemente de células apoptóticas pues la morfología que presentaban eran protuberancias en la membrana y contracción celular (Subramanian, et. al., 2016). Además, durante la inspección después de los tres periodos de exposición, el cierre de la herida en las células control fue evidente, mientras que las células con tratamiento al cabo de las 72h de exposición, estaban en su mayoría muertas.

La eficacia del compuesto sobre la migración de las células de adenocarcinoma colorrectal, se hizo evidente en la cuantificación del % de cierre de herida. Durante todo el tiempo de exposición el porcentaje de cierre de las células tratadas fue mínima (10%) en comparación a las células control que finalmente después de 72h, alcanzaron la mayor tasa de migración, cerrando el 60% de su herida. La citotoxicidad del carbamato provocó el desprendimiento de la mayoría de la monocapa. De modo que, podemos inferir que el fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadenoilo ejerce un efecto en la migración celular de HCT-15, esta característica es distintiva en la propagación de tumores sólidos como el del cáncer de colon. Actualmente existen varios mecanismos moleculares que apoyan la migración autónoma de las células, por lo que, en perspectiva, se podría realizar otros experimentos para concretar el objetivo específico del compuesto y elucidar en parte su mecanismo de acción. (Palmer et al., 2011, Malet-Engra et al., 2015).

Finalmente se realizó un análisis *in silico* de los espectros de actividad de los compuestos analizados, por medio del software *PASS prediction* (Filimonov D.A., Lagunin A.A., Glorizova T.A., Rudik A.V., Druzhilovskii D.S., Pogodin P.V. & Poroikov V.V., 2014.). Se encontró que tanto los compuestos naturales como los seminaturales tenían actividad probable de ser antiinflamatorios y posible tratamiento para pólipos adenomatosos del intestino, así como tratamiento de condiciones preneoplásicas.

Por otro lado, las predicciones de actividad de nuestro compuesto seleccionado revelaron una posible explicación para la inhibición de la migración anteriormente

observada. Es probable que esta se deba a la inhibición de formación de microtúbulos, los cuales son elementos estructurales clave del citoesqueleto para procesos celulares como el transporte, la forma celular, la migración y la mitosis, convirtiéndolos así en objetivos importantes en las terapias contra el cáncer (Nabors et al., 2016; Perez, 2009).

También presenta actividad probable de estimulación del factor 2 relacionado con NF-E2 (Nrf2). Se sabe que este es un regulador emergente de la resistencia celular a los oxidantes, además de controlar la expresión basal e inducida de una serie de genes dependientes de elementos de respuesta antioxidante para regular los resultados fisiológicos y fisiopatológicos de la exposición a oxidantes, formados en respuesta a procesos como la división celular, la inflamación, la función inmunológica, la autofagia y la respuesta al estrés celular, la cual también es causada por la acumulación progresiva de ROS. (Ma, 2013; Finkel, 2011). Dichos eventos están estrechamente relacionados con el cáncer colorrectal (Berdasco M., Esteller M., 2010; Ullman T., Itzkowitz S., 2011). Otro elemento clave dentro de estas predicciones de actividad fue la inhibición de HIF1A (Factor 1 inducible por hipoxia), subunidad del factor de transcripción HIF-1, la cual se sobreexpresa en muchos cánceres, incluido el cáncer colorrectal, y está fuertemente implicada en la promoción del crecimiento tumoral, así como la metástasis, como parte fundamental del inicio de la angiogénesis. Por lo tanto, dicho elemento podría ser parte del mecanismo de acción de este compuesto ya que, al inhibir esta proteína, también podría estar inhibiendo la capacidad proliferativa, así como el desarrollo de la neoplasia como tal (Bos et al., 2001).

CONCLUSIONES

Se obtuvo un perfil citotóxico primario de los derivados de *Heterotheca inuloides*, todos con actividad citotóxica importante, sin embargo, los compuestos modificados con un carbamato fueron aquellos que sobresalieron por la mínima concentración requerida para mostrar efectos citotóxicos en nuestra línea celular de interés, HCT-15.

El compuesto fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadenoilo fue el compuesto más prometedor por ser aquel que mostró la mínima concentración inhibitoria 50 (IC₅₀), y por su selectividad con las células tumorales y no con el control de células sanas. Éste mostró efectos relevantes en la inhibición de la viabilidad, proliferación y migración celular, hallmarks distintivos en el desarrollo de neoplasias como el cáncer colorrectal.

El espectro de actividades predichas *in silico*, de los compuestos estudiados elucidaron de forma tentativa y teórica el mecanismo de acción y su asociación con la inflamación del compuesto fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadenoilo en tratamiento con las células de adenocarcinoma colorrectal (HCT-15), que sienta las bases para un estudio más específico en el futuro.

PERSPECTIVAS

Este trabajo deja la puerta abierta para continuar con futuras indagatorias sobre el mecanismo o mecanismos de acción implicados en la citotoxicidad de células de cáncer colorrectal.

Se planea a futuro realizar ensayos como determinación de especies reactivas de oxígeno y ensayos de biología molecular como evaluación de la expresión y síntesis de las proteínas que suponemos se encuentran involucradas en las vías de señalización celular relacionadas con los procesos inflamatorios, como la evaluación de la actividad de NF- κ B, COX-2, STAT 3, así como de Nrf2, HIF1A, y la actividad antimicrotubular, con el fin de elucidar experimentalmente el mecanismo de acción del fenilcarbamato de 3,4-dihidro-7-cadenoilo.

REFERENCIAS

- Ahn, S. B., Chan, C., Dent, O. F., Mohamedali, A., Kwun, S. Y., Clarke, C., Fletcher, J., Chapuis, P. H., Nice, E. C., & Baker, M. S. (2015). Epithelial and Stromal Cell Urokinase Plasminogen Activator Receptor Expression Differentially Correlates with Survival in Rectal Cancer Stages B and C Patients. *PLOS ONE*, 10(2).
- American Cancer Society (2020) Early Detection, Diagnosis, and Staging Cancer.org. <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging.html>
- American Cancer Society. (2017) Colorectal Cancer Facts & Figures 2017-2019. Atlanta: American Cancer Society.
- Aun K. Ghosh and Margherita Brindisi Organic Carbamates in Drug Design and Medicinal Chemistry *Journal of Medicinal Chemistry* 2015 58 (7), 2895-2940
- Bartsch, H., & Nair, J. (2006). Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 391(5), 499–510.
- Belpomme, D., Irigaray, P., Hardell, L., Clapp, R., Montagnier, L., Epstein, S., & Sasco, A. J. (2007). The multitude and diversity of environmental carcinogens. *Environmental research*, 105(3), 414–429.
- Berdasco, M., & Esteller, M. (2010). Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Developmental Cell*, 19(5), 698–711. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.005>
- Bos, R., Zhong, H., Hanrahan, C. F., Mommers, E. C. M., Semenza, G. L., Pinedo, H. M., Abeloff, M. D., Simons, J. W., van Diest, P. J., & van der Wall, E. (2001). Levels of Hypoxia-Inducible Factor-1 During Breast Carcinogenesis. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 93(4), 309–314.
- Cássia Da Silveira e Sá R, Andrade LN, De Sousa DP. Sesquiterpenes from Essential Oils and Anti-Inflammatory Activity. *Natural Product Communications*. 2015;10(10):1934578X1501001.
- Chappell, J., & Coates, R. M. (2010). Sesquiterpenes. *Comprehensive Natural Products II*, 609–641
- Civetta, María Teresa Martín de, & Civetta, Julio Domingo. (2011). Carcinogénesis. *Salud Pública de México*, 53(5), 405-414. Recuperado el 12 de octubre de 2020, de <https://bit.ly/39ojuJT>
- Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860–867.
- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–44.

- Egas V., Toscano R., Linares E., Bye R., Espinosa-García F., Delgado G. (2015) Cadinane-Type Sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*: Absolute Configuration and Anti-inflammatory Activity. *Journal of Natural Products*, 78(11), 2634-2641.
- Egas, V., Millán, E., Collado, J. A., Ramírez-Apan, T., Méndez-Cuesta, C. A., Muñoz, E., & Delgado, G. (2017). Effect of natural and semi-synthetic cadinanes from *Heterotheca inuloides* on NF- κ B, Nrf2 and STAT3 signaling pathways and evaluation of their in vitro cytotoxicity in human cancer cell lines. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 25(12), 3135–3147. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.03.069>
- Elvia Coballase-Urrutia, José Pedraza-Chaverri et al. (2010) Hepatoprotective effect of acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl₄-induced toxicity in rats, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63(4), 2011, 363-370, ISSN 0940-2993.
- Escobar, L., Alfonso, P., & Aristizábal, F. (2009). Assessing two staining methods for cytotoxicity tests on tumor cell lines. *Rev. Colomb. Biotecnol*, 2, 49–56.
- Federico, A., Morgillo, F., Tuccillo, C., Ciardiello, F., & Loguercio, C. (2007). Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 121(11), 2381–2386.
- Filimonov D.A., Lagunin A.A., Glorizova T.A., Rudik A.V., Druzhilovskii D.S., Pogodin P.V., Poroikov V.V. (2014). Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 50 (3), 444-457.
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *Journal of Cell Biology*, 194(1), 7–15. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102095>
- Gené, R. M., Segura, L., Adzet, T., Marin, E., & Iglesias, J. (1998). *Heterotheca inuloides*: Anti-inflammatory and analgesic effect. *Journal of Ethnopharmacology*, 60(2), 157–162.
- Ghosh, A.K., & Brindisi, M., (2015) Organic Carbamates in Drug Design and Medicinal Chemistry *Journal of Medicinal Chemistry*. 58 (7), 2895-2940 DOI: 10.1021/jm501371s
- Gu, W., Zou, H., Li, L., Garcia Carcedo, I., Xu, Z. P., & Monteiro, M. (2016). Synergistic inhibition of colon cancer cell growth with nanoemulsion-loaded paclitaxel and PI3K/mTOR dual inhibitor BEZ235 through apoptosis. *International Journal of Nanomedicine*. 2016;11:1947-1958 <https://doi.org/10.2147/IJN.S100744>
- Hamilton, S., & Aaltonen, L. (2000). World Health Organization Classification of Tumours International Agency for Research on Cancer (IARC). 60-91 ISBN 92 832 2410 8
- Hanahan D., Weinberg R. A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell Press Journal Review*, 144 (5), P646-674, March 04, 2011.

- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C. B., & Rahu, N. (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–9.
- Instituto Mexicano del Seguro Social (2019) En México cada Año se Diagnostican Cerca de 15 Mil Nuevos Casos de Personas con Cáncer de Colon. Archivo 2019 Prensa, consultado 15 de octubre 2020 de <http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/201903/070>.
- Kaefer, C. M., & Milner, J. A. (2008). The role of herbs and spices in cancer prevention. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(6), 347–361.
- Karihtala P, Soini Y. (2007) Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS*. Feb;115(2):81-103
- Klaunig, J. E. (2019). Oxidative Stress and Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 24(40), 4771–4778.
- Lambeth, J. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4, 181–189 (2004).
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. (2000) *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 24.1, Tumor Cells and the Onset of Cancer.
- Ma, Q. (2013). Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53(1), 401–426.
- Macrae A. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and protective factors (2020) Consultado el 15 noviembre 2020 de <https://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors/print>
- Malet-Engra, G., Yu, W., Oldani, A., Rey-Barroso, J., Gov, Nir S., Scita, G., & Dupré, L. (2015). Collective Cell Motility Promotes Chemotactic Prowess and Resistance to Chemorepulsion. *Current Biology*, 25(2), 242–250.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436–444.
- Molinari, M. (2000). Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Proliferation*, 33(5), 261–274. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2000.00191.x>
- Moloney, Jennifer N.; Cotter, Thomas G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 80(1), 50–64.
- Nabors, L. Burt., Surboeck, B., & Grisold, W. (2016). Complications from pharmacotherapy. *Handbook of Clinical Neurology*, 134: 235–250. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00014-1>
- National Cancer Institute (2015) What Is Cancer? Cancer.gov. Retrieved from <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>

National Cancer Institute Colon Cancer (2020) Treatment (PDQ®)—Health Professional Version. Cancer.gov. Retrieved from; https://www.cancer.gov/types/colorectal/hp/colon-treatment-pdq#_3

O'Connor, C. M. & Adams, J. U. (2014) Essentials of Cell Biology. Cambridge, MA: NPG Education Available from; <https://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010/>

Palmer, T. D., Ashby, W. J., Lewis, J. D., & Zijlstra, A. (2011). Targeting tumor cell motility to prevent metastasis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(8), 568–581.

Park, J. H., McMillan, D. C., Horgan, P. G., & Roxburgh, C. S. (2014). The impact of anti-inflammatory agents on the outcome of patients with colorectal cancer. *Cancer treatment reviews*, 40(1), 68-77.

Patrick M Lynch, (2017) Historia del cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC), *Revista Médica Clínica Las Condes*, 28(4), 512-523, ISSN 0716-8640.

PDQ® Adult Treatment Editorial Board. PDQ Colon Cancer Treatment. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Stages of Colon Cancer. Available at: https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq#_112 Accessed Nov 18, 2020. PMID 26389319.

Peng, F., Huang, Y., Li, M. Y., Li, G. Q., Huang, H. C., Guan, R., Chen, Z. C., Liang, S. P., & Chen, Y. H. (2016). Dissecting characteristics and dynamics of differentially expressed proteins during multistage carcinogenesis of human colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*, 22(18), 4515–4528.

Perez, E. A. (2009). Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(8), 2086–2095.

PubChem. (2020). Cadinane. @pubchem; PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cadinane#section=2D-Structure>

Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterology Review/Przegląd Gastroenterologiczny*, 14(2), 89-103.

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11), 1603–1616.

Reynoso-Noverón, Torres-Domínguez. (2017) Epidemiology of cancer in Mexico: Global burden and projections 2000-2020. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual*, 8(1), 9-15 agosto 2017-enero 2018.

Ricchi, P., Zarrilli, R., di Palma, A. et al. (2003) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer: from prevention to therapy. *Br J Cancer* 88, 803–807

Robinson J. M. (2008). Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochemistry and cell biology*, 130(2), 281–297.

- Rodríguez-Chávez J.L., Coballase-Urrutia E., Nieto-Camacho A., Delgado Lamas G., (2015) Antioxidant Capacity of “Mexican Arnica” *Heterotheca inuloides* Cass Natural Products and Some Derivatives: Their Anti-Inflammatory Evaluation and Effect on *C. elegans* Life Span. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015, 843237. <https://doi.org/10.1155/2015/843237> 2015, Article ID 843237, 11.
- Rodríguez-Chávez, Coballase-Urrutia E., Sicilia-Argumedo G., Ramírez-Apan T., Delgado G. (2015) Toxicological evaluation of the natural products and some semisynthetic derivatives of *Heterotheca inuloides* Cass (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 175 (5, 4) December 2015, Pages, 256-265
- Rubin, D. C., Shaker, A., & Levin, M. S. (2012). Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Frontiers in immunology*, 3, 107. Rubin, D. C., Shaker, A., & Levin, M. S. (2012). Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Frontiers in Immunology*,
- Sharma, A., Bajpai, V.K., Shukla, S. (2013). Sesquiterpenes and Cytotoxicity. In: Ramawat, K., Mérillon, JM. (eds) *Natural Products*. Springer, Berlin, Heidelberg. 3515-3550. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_152 Sharma A., Bajpai Vivek K., Shukla (2013) Sesquiterpenes and cytotoxicity. *Natural Products* 10.1007/978-3-642-22144-6_152, 3515-3550.
- Sheikh, B. Y., Sarker, M., Kamarudin, M., & Mohan, G. (2017). Antiproliferative and apoptosis inducing effects of citral via p53 and ROS-induced mitochondrial-mediated apoptosis in human colorectal HCT116 and HT29 cell lines. *Biomedecine & pharmacotherapie*, 96, 834–846. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.038>
- Siddiqui, I. A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M., & Mukhtar, H. (2015). Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1348(1), 20–31. <https://doi.org/10.1111/nyas.12811>
- Sierra MS, Forman D (2016). Etiology of colorectal cancer (C18-20) in Central and South America. In: *Cancer in Central and South America*. Lyon: International Agency for Research on Cancer. Available from: http://www-dep.iarc.fr/CSU_resources.htm
- Steinberg M. (2009) Pharmacological Management of Colon Cancer. *US Pharm*. 2009;34(3) (Oncol suppl):3-10.
- Subramanian, A. P., Jaganathan, S. K., Mandal, M., Supriyanto, E., & Muhamad, I. I. (2016). Gallic acid induced apoptotic events in HCT-15 colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 22(15), 3952.
- Thomas A. Ullman, Steven H. Itzkowitz, (2011) Intestinal Inflammation and Cancer, *Gastroenterology*, 140(6), 1807-1816.e1, ISSN 0016-5085,
- Ullman, T. A., & Itzkowitz, S. H. (2011). Intestinal Inflammation and Cancer. *Gastroenterology*, 140(6), 1807-1816.e1.

- Valdespino-Gómez & Valdespino-Castillo (2011) Iniciación y progresión del cáncer: un sistema biológico. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 10(6), 358-365
- Visconti R; Grieco D. (2012). New insights on oxidative stress in cancer. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 12(2). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19333869/>
- Weinberg R. A., (2014) *The biology of cancer*. Second edition. New York, Garland Science
- Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Höhler, T., Galle, P. R., & Büchler, M. W. (2005). Colorectal cancer. *The Lancet*, 365(9454), 153–165.
- Weston A, Harris CC. (2003) Multistage Carcinogenesis. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13982/>
- Weston A, Harris CC. (2003) Multistage Carcinogenesis. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13982/>
- Widlansky, M. E. and Gutterman, D. (2011). Regulation of endothelial function by mitochondrial reactive oxygen species. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(6), 1517-153