



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

“Evaluación de un extracto de *Kalanchoe flammula* con acetato de etilo en los eventos biológicos neoplásicos del cáncer de próstata y su caracterización fitoquímica”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

IVÁN ARIAS GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. CYNTHIA ORDAZ PICHARDO



MÉXICO, D. F. 2016



DIRECTOR DE TESIS

Dra. Cynthia Ordaz Pichardo

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Laurence Annie Marchat Marchau

Dr. Juan Santiago Salas Benito

Dra. Aracely Evangelina Chávez Piña

Dr. Alberto Mendoza Herrera



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 25 de Marzo del 2015

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de Biotecnología en su sesión ordinaria No. 3 celebrada el día 25 del mes de Marzo conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Arias	González	Iván
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre (s)
Con registro:		
A	1	2
0	3	3
2		

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Evaluación de un extracto de *Kalanchoe flammea* con acetato de etilo en los eventos biológicos neoplásicos del cáncer de próstata y su caracterización fitoquímica.

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

- Evaluación de la inhibición de características biológicas suscitadas en el cáncer, como proliferación celular, apoptosis, metástasis, etc., cuando las células están en contacto con el extracto de *K. flammea*.
- Caracterización fitoquímica del extracto de *K. flammea* con acetato de etilo

2.- Se designa como Director de Tesis al Profesor:
Dra. Cynthia Ordaz Pichardo

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:
La Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Director(a) de Tesis

Dra. Cynthia Ordaz Pichardo

Aspirante

M. en C. Iván Arias González

Presidente del Colegio

M. en C. Manuel Ledesma



CONSTANCIA

El que suscribe hace constar que el Proyecto de Tesis:

"Evaluación de un extracto de *Kalanchoe Flamma* con acetato del etilo en los eventos biológicos neoplásicos del cáncer de próstata y su caracterización fitoquímica"

Propuesto ante el Comité de Bioética, por el alumno:

IVÁN ARIAS GONZÁLEZ

El presente proyecto recibe una opinión favorable por parte del Comité de Bioética, por considerarlo seguro en el sentido de que las instalaciones de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación cuenta con las condiciones de Bioseguridad para el desarrollo del mismo, además no implica ningún daño a los participantes, terceras personas, ni al medio ambiente en general.

Se emite este Acuerdo dentro del marco de la reunión del Comité de Bioética celebrada el día miércoles 30 de septiembre del 2015. (No. de registro: ENMH-CB-148 -2015).

Se extiende la presente, para los fines legales que al(a) interesado(a) convengan, al día 16 del mes de octubre del año Dos Mil Quince.

A T E N T A M E N T E
"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"

DRA. VICTORINA ELIZABETH JIMENEZ SÁNCHEZ
PRESIDENTA DEL COMITÉ DE BIOÉTICA

COMITÉ DE BIOÉTICA
"PROGRAMA DE ESTUDIOS DE LA CARRERA DE MÉDICO CIRUJANO Y HOMEÓPATA ACREDITADO POR COMAEM 2014/2019"
"PROGRAMA DE ESTUDIOS DE LA CARRERA DE MÉDICO CIRUJANO Y PARTERO ACREDITADO POR COMAEM 2011/2016"
Guillermo Massieu Helguera, No. 239, Fracc. "La Escalera", Ticomán, C.P. 07320 México, D.F.
Tels. 57-29-60-00 ext. 55512
E-mail: enmh@ipn.mx

Bhm)

México D.F., 11 de Diciembre de 2015

Prohibición de uso de obra

Dra. Ana Laura Luna Torres

Jefa Interina de la SEPI, ENMyH.

En At'n. Dr. Juan Manuel Martínez Hernández

Jefe Interino del Departamento de Posgrado

Presente

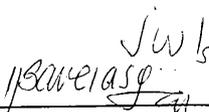
Por este medio solicito a usted se realicen los trámites correspondientes, ante el colegio de Profesores de Posgrado de la ENMyH, para que se autorice la prohibición y/o explotación de uso de obra de la tesis titulada: "Evaluación de un extracto con acetato de etilo de *Kalanchoe flammula* en los eventos biológicos neoplásicos del cáncer de próstata y su caracterización fitoquímica", por cinco años. Esta petición la hago de acuerdo al artículo 57 del reglamento de Estudios de Posgrado del IPN, y debido a que se publicaran los resultados contenidos en la misma.

Sin otro particular por el momento y esperando verme favorecido en mi petición, me despido de usted.

Atentamente



Dra. Cynthia Ordaz Pichardo
Directora de tesis



M.C. Iván Arias González
Alumno

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Celular y Productos Naturales, de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Cynthia Ordaz Pichardo, así como en el Laboratorio de Virus y Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología a cargo del Dr. Alejandro García Carrancá.

Durante la realización de este proyecto, el alumno contó con la beca de Doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con No. de Registro 335006 y con la Beca del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) y de la Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) del Instituto Politécnico Nacional, como parte de los proyectos SIP 20121122, 20131784, 20140979 y 20150719.

CONTENIDO

	PÁG.
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
1.1 EL CÁNCER	1
1.2 LA BIOLOGÍA DEL CÁNCER	2
1.2.1 Señalización proliferativa continua	3
1.2.2 Evasión de los Supresores de crecimiento	4
1.2.3 Resistencia a muerte celular	5
1.2.4 Inmortalidad replicativa	5
1.2.5 Inducción de angiogénesis	6
1.2.6 Activación de la invasión y metástasis	6
1.2.7 Reprogramación de la energía metabólica	7
1.2.8 Evasión de la respuesta inmune	8
1.2.9 Microambiente tumoral	9
1.3 LA PRÓSTATA	9
1.3.1 Tipos de células prostáticas	10
1.3.2 Regulación del crecimiento prostático por esteroides y factores de crecimiento	11
1.3.3 El cáncer de próstata	11
1.3.4 Desarrollo del cáncer de próstata	12
1.3.5 Bases moleculares del cáncer de próstata	14
1.3.6 Hormono independencia	20
1.3.7 Estadios	21
1.3.8 Grado Gleason	21
1.3.9 Tratamiento Del Cáncer De Próstata	22
1.4 COMPUESTOS DE ORIGEN NATURAL Y SU VALOR COMO QUIMIOTERAPÉUTICOS	26
1.4.1 Los Productos Naturales en el descubrimiento de fármacos	27

	PÁG.
1.4.2 Estrategia terapéutica en un fármacoantineoplásico	27
2. ANTECEDENTES	29
2.1 Familia <i>Crassulaceae</i>	29
2.1.1 Género <i>Kalanchoe</i>	29
2.1.2 Estudios relacionados con el tratamiento del Cáncer En El Género <i>Kalanchoe</i>	30
2.1.3 Estudios Realizados A <i>Kalanchoe Flammea</i>	31
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. OBJETIVO GENERAL	36
4.1 Objetivos Específicos	36
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	37
6. MATERIALES Y MÉTODOS	38
<i>6.1 Evaluación de la citotoxicidad del extracto y sus fracciones en una línea celular de cáncer de próstata (PC3) y en una línea celular normal de epitelio prostático (PrEC)</i>	38
6.1.1 Cultivo Celular	38
6.1.2 Almacenamiento y congelamiento	38
6.1.3 Evaluación de la citotoxicidad	39
6.1.3.1 Técnica de MTT	39
6.1.3.2 Procedimiento	39
6.1.3.3 Análisis de los resultados	40
<i>6.2 Efecto del extracto con acetato de etilo de <i>Kalanchoe flammea</i> contra algunas características de una célula neoplásica de próstata</i>	41
6.2.1 Análisis del efecto en la progresión del ciclo celular	41
6.2.1.1 Procedimiento	41
6.2.1.2 Análisis de datos	42
6.2.2 Evaluación en la resistencia a la muerte celular por apoptosis	42
6.2.2.1 Determinación de la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno	42
6.2.2.1.1 Procedimiento	43
6.2.2.1.2 Análisis de datos	43

	PÁG.
6.2.2.2 Evaluación de proteínas activadoras de la apoptosis	42
6.2.2.2.1 Procedimiento	43
6.2.2.3 Determinación de fragmentación oligonucleomal	46
6.2.2.3.1 Ensayo de la escalera del ADN	46
6.2.2.3.1.1 Procedimiento	46
6.2.2.3.1.2 Electroforesis	46
6.2.2.3.2 Ensayo de TUNEL	47
6.2.2.3.2.1 Procedimiento	47
6.2.2.3.2.2 Análisis de datos	48
6.3 Evaluación del efecto antitumoral en un modelo murino	48
6.3.1 Procedimiento	48
6.3.2. Tinción con Hematoxilina-Eosina (H&E) de cortes histológicos de órganos de ratones de los diferentes grupos experimentales	49
6.4 Ensayo de Genotoxicidad in vivo: Micronúcleos	50
6.4.1 Procedimiento	50
6.4.2 Análisis de datos	51
6.5 Ensayo de Toxicidad aguda: Prueba TG 423 o Dosis letal (DL)	52
6.5.1 Procedimiento	52
6.5.2 Análisis de datos	52
6.6 Caracterización fitoquímica de un extracto con acetato de etilo de Kalanchoe flammaea	53
6.6.1 Separación de compuestos obtenidos de fracciones biológicamente activas	53
6.6.1.1 Procedimiento	55
7. RESULTADOS	56
7.1 Efecto del extracto KfAcOEt y compuestos mayoritarios en la viabilidad de células neoplásicas y no neoplásicas de cáncer de próstata	56
7.2 Efecto del extracto KfAcOEt y su fracción secundaria KF8-3 en la progresión del ciclo celular	63
7.3 Efecto del extracto KfAcOEt en la resistencia a la muerte celular por apoptosis	64
7.3.1 Efecto del extracto KfAcOEt en la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno	64

	PÁG.
7.3.2 Efecto del extracto KfAcOEt la activación de proteínas ejecutoras de la apoptosis	67
7.3.3 Determinación del efecto de KfAcOEt en fragmentación oligonucleosomal del ADN	70
7.3.4 Efecto del extracto KfAcOEt en los cambios de la membrana plasmática y el encogimiento celular	75
7.4 Actividad genotóxica del extracto KfAcOEt en sangre periférica de ratones CD1 (Ensayo de Micronúcleos)	78
7.5 Toxicidad aguda del extracto KfAcOEt (Dosis letal (DL))	82
7.6 Efecto de KfAcOEt en el desarrollo de tumores de células PC3 en ratones atímicos	83
7.6.1. Análisis del peso de ratones atímicos con tumor inducido de células PC3 tratados con el extracto KfAcOEt	85
7.6.2. Análisis histopatológico de los órganos de ratones atímicos tratados con el extracto KfAcOEt	86
7.7 Caracterización fitoquímica del extracto KfAcOEt	89
7.7.1 Análisis de compuestos mayoritarios obtenidos por Cromatografía en Placa Preparativa de las Fracciones F4 y F8	89
7.7.2 Análisis de compuestos mayoritarios de las Fracciones F4 y F8 por Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico	91
7.7.3 Separación y análisis de F8-3 por HPLC y RMN 'H	96
8. DISCUSIÓN	100
9. CONCLUSIONES	108
10. PERSPECTIVAS	112
11. REFERENCIAS	113
ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1. Decesos por cáncer en México	2
Figura 2. Fenotipo de una célula neoplásica	3
Figura 3. Microambiente tumoral	9
Figura 4. Corte transversal de la próstata	10
Figura 5. Porcentaje de fármacos derivados de productos naturales	27
Figura 6. <i>Kalanchoe pinnata</i>	30
Figura 7. <i>Kalanchoe flammula</i>	33
Figura 8. Estrategia experimental	37
Figura 9. Efecto del extracto KfAcOEt en la viabilidad de células de cáncer de próstata (PC3)	59
Figura 10. Efecto del extracto KfAcOEt en la viabilidad de células de epitelio sano de próstata (PrEC)	60
Figura 11. Efecto del extracto KfAcOEt en la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	60
Figura 12. Efecto de las fracciones secundarias de la Fracción 4 en la viabilidad de células de Cáncer de Próstata (PC3) y células de epitelio prostático (PrEC)	62
Figura 13. Efecto de las fracciones secundarias de la Fracción 8 en la viabilidad de células de Cáncer de Próstata (PC3) y células de epitelio prostático (PrEC),	64
Figura 14. Concentración inhibitoria al 50% de una curva dosis (log) vs. Respuesta de células tratadas con la fracción KF8-3	65
Figura 15. Ciclo celular de células PC3 tratadas con la CI_{50} del extracto KfAcOEt y la CI_{50} de la Fracción KF8-3	67
Figura 16. Sobreproducción de especies reactivas de oxígeno de células PC3 tratadas con el extracto KfAcOEt	68
Figura 17. Intensidad media de fluorescencia del DCF en células PC3 tratadas con el extracto KfAcOEt	69
Figura 18. Efecto del extracto KfAcOEt en la liberación de Citocromo C de proteínas diferencialmente extraídas	70

	PÁG.
Figura 19. Efecto del extracto KfAcOEt en la activación de la Caspasa-3	71
Figura 20. Efecto del extracto KfAcOEt en la expresión de Bcl-2	72
Figura 21. Efecto del extracto KfAcOEt en la Fragmentación del ADN (Ensayo de escalera)	73
Figura 22. Efecto del extracto KfAcOEt en la Fragmentación del ADN (Prueba de TUNEL)	74
Figura 23. Efecto del extracto KfAcOEt en el Citoesqueleto y Fragmentación del ADN	75
Figura 24. Efecto del extracto KfAcOEt en la inactivación de PARP-1	77
Figura 25. Efecto del extracto KfAcOEt en la reducción del tamaño celular	79
Figura 26. Morfología y dinámica de las membranas celulares de células tratadas con el extracto KfAcOEt	80
Figura 27. Porcentaje de Reticulocitos detectados en sangre periférica de ratones CD1 administrados oralmente con el extracto KfAcOEt.	81
Figura 28. Porcentaje de Reticulocitos Micronucleados detectados en sangre periférica de ratones CD1 administrados oralmente con el extracto KfAcOEt	82
Figura 29. Porcentaje de Eritrocitos Normocrómicos Micronucleados detectados en sangre periférica de ratones CD1 administrados oralmente con el extracto KfAcOEt	83
Figura 30. Efecto de la inhibición del crecimiento tumoral en ratones atímicos tratados con diferentes dosis del extracto KfAcOEt	86
Figura 31. Efecto del extracto KfAcOEt en la inhibición del crecimiento tumoral de células PC3 en ratones atímicos	87
Figura 32. Efecto del extracto KfAcOEt en el aumento del peso relativo de ratones atímicos	89
Figura 33. Análisis histopatológico de órganos extraídos de ratones atímicos de diferentes grupos experimentales de la evaluación del efecto antitumoral de KfAcOEt	90
Figura 34. Diagrama de flujo del fraccionamiento bio-dirigido y separación de componentes del extracto KfAcOEt	92
Figura 35. Perfil cromatográfico de la Fracción 4	93
Figura 36. Perfil cromatográfico de la Fracción 8	94

	PÁG.
Figura 37. Cromatograma correspondiente a un Alcaloide obtenido de la Fracción 4 del extracto KfAcOEt detectado por Espectrometría de Masas por impacto Electrónico	95
Figura 38. Cromatograma correspondiente a un Esterol obtenido de la Fracción 8 del extracto KfAcOEt, detectado por Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico	96
Figura 39. Cromatograma correspondiente a un Glucósido Cardiotónico obtenido de la Fracción 8 del extracto KfAcOEt, detectado por Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico	97
Figura 40. Cromatograma de la separación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de los componentes de la fracción secundaria KF8-3 del extracto KfAcOEt, detectado a 220 nm	99
Figura 41. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno de P1	100
Figura 42. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno de P2	101

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁG.
Tabla 1. Valores de concentración inhibitoria al 50% (CI ₅₀) del extracto KfAcOEt en diferentes tipos de líneas celulares y células no neoplásicas	59
Tabla 2. Porcentajes de población celular en cada una de las fases del ciclo celular de células PC3 tratadas con la CI ₅₀ del extracto KfAcOEt y la CI ₅₀ de la Fracción KF8-3	65
Tabla 3. Porcentajes de RET, MN-RET y MN-CNE en sangre periférica de ratón tratado con el extracto KfAcOEt	82
Tabla 4. Peso de ratones CD-1 en la prueba de Dosis Letal Media	82

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad compleja que involucra la multiplicación descontrolada de las células y con capacidad de diseminarse a tejidos adyacentes (metástasis) en nuestro organismo. En la población masculina, el Cáncer de Pulmón ocupa el primer lugar de incidencia y mortalidad, seguido por el Cáncer de Próstata. El estudio de la bioactividad de los productos naturales ha sido relevante en la química medicinal ya que han sido utilizados como referencia para la síntesis de principios activos en algunos fármacos comercializados en la actualidad. También, los compuestos obtenidos de productos naturales han jugado un papel importante para el tratamiento del cáncer, del cual se han derivado fármacos utilizados en la quimioterapia (Paclitaxel, Camptotecina y Vincristina, entre otros). El Cáncer de Próstata es una enfermedad de lento crecimiento, caracterizado por un desbalance entre la división y muerte celular. La falta de muerte celular programada (apoptosis) representa el principal factor de acumulación gradual de células neoplásicas en la próstata; a su vez, la apoptosis también está asociada al proceso de progresión de cáncer localizado de condición hormono-dependiente hacia un estado metastásico de condición hormono-independiente. Considerando esto, un fármaco anticancerígeno ideal, sería aquel que destruya las células cancerosas sin causar un daño excesivo en células normales, situación que es lograda a través de la inducción de la apoptosis en células cancerosas.

Antecedentes relacionados al género *Kalanchoe* (Crassulaceae) indican que posee metabolitos (Glucósidos cardiotónicos, Alcaloides, entre otros) con actividad biológica en diversas líneas celulares de cáncer. *Kalanchoe flammula* es una planta utilizada en la Medicina Tradicional Mexicana para tratar diferentes enfermedades, incluyendo el cáncer. Con base en esto, un extracto con acetato de etilo de *K. flammula* (KfAcOEt) fue analizada en cuanto a su actividad biológica (*in vitro* e *in vivo*) en células de adenocarcinoma prostático (PC3) de condición hormono-independiente y en células de epitelio prostático (PrEC) como control de células no cancerosas, así como en linfocitos de sangre periférica. En los ensayos de citotoxicidad, la viabilidad celular de ambas líneas celulares disminuyeron de manera dosis-respuesta, presentando cierto índice de selectividad sobre las células neoplásicas. La concentración inhibitoria media fue de $1.361 \pm 1.14 \mu\text{g/mL}$ (PC3) y 127.0 ± 1.19 (PrEC), y en contraste, no se observó efecto citotóxico en Linfocitos de sangre periférica. De las fracciones obtenidas en el ensayo

bio-dirigido, KF8-3 fue la fracción con mayor actividad en células PC3 ($1.057 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$), manteniendo su selectividad hacia células neoplásicas.

De acuerdo a las recomendaciones del Comité de Nomenclatura de Muerte Celular, se realizaron las pruebas necesarias para caracterizar el efecto apoptótico inducido por el extracto KfAcOEt en las células PC3. El extracto KfAcOEt evaluado a la concentración inhibitoria al 50% mostró un efecto de sobreproducción de especies reactivas de oxígeno como parte del evento de inicio de la apoptosis, desde las 6 h de exposición al extracto. También se determinó la liberación de Citocromo C de la mitocondria al citosol y la activación de Caspasa-3 desde las 12 h de tratamiento, estos últimos eventos bioquímicos claves en la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. Aún cuando la participación de Bcl-2 es importante, no se encontraron cambios en los niveles de expresión de esta proteína. Finalmente, las células expuestas al extracto KfAcOEt, resultaron positivas a la prueba de TUNEL, la cual nos indica fragmentación del ADN como evento final de la apoptosis, en los cuales también fueron observados los cambios dinámicos de la membrana plasmática y la pérdida de la morfología celular relacionados al encogimiento celular observado. En el análisis del ciclo celular que se realizó, las células PC3 tratadas con el extracto KfAcOEt mostraron arresto celular en la fase de Síntesis a las 12 y 24 h de exposición. También este efecto fue observado a las 24 h en células PC3 tratadas con la fracción citotóxicamente activa KF8-3.

En relación a los ensayos *In vivo* realizados, el extracto KfAcOEt mostró actividad inhibitoria del crecimiento tumoral y ninguno de los ratones perdió peso como indicativo de un efecto tóxico, el cual fue confirmado al hacer el análisis histológico de los principales órganos extraídos (Hígado, Bazo y Riñón). El ensayo de Micronúcleos se realizó con la finalidad de comprobar si el extracto KfAcOEt era capaz de ejercer un daño genotóxico, resultando negativo a la formación de micronúcleos en Reticulocitos y Eritrocitos, con la dosis administrada de 1000 mg/kg a los ratones. También se evaluó la Dosis Letal Media, asignando al extracto KfAcOEt en la categoría 5 (DL50 > 5000 mg/kg) de la OECD en los ratones evaluados, es decir extracto “seguro”.

Finalmente, algunos compuestos de las fracciones secundarias fueron separados por cromatografía en placa preparativa e identificados cualitativamente mediante espectrometría de masas por impacto electrónico. Los resultados obtenidos fueron comparados con una base de datos que indicó la presencia de alcaloides, esteroides y glucósidos cardiotónicos. De la fracción KF8-3 obtenida, que resultó citotóxica en las células PC3, se separaron algunos compuestos mediante cromatografía líquida de alta

resolución (HPLC) y se obtuvieron tres compuestos; dos de éstos compuestos mayoritarios se analizaron por resonancia magnética nuclear de protones para la elucidación de su estructura molecular, estos datos se compararon con referencias de compuestos obtenidos de otras especies de *Kalanchoe*; sin embargo, no corresponden a los ya reportados en la literatura, por lo tanto es posible que sean compuestos aún no descritos a los cuales se le están realizando otras pruebas para identificarlos.

ABSTRACT

Cancer is a complex disease involving a disregulated proliferation of cells and comprise the ability to spread to adjacent tissues (metastases) in our body. Among men population, Lung Cancer ranked the first in incidence and mortality, followed by prostate cancer. Biological activity of natural products has been important in medicinal chemistry since they have been used as reference in the synthesis of active ingredients in some current drugs approved for clinical use. Also, compounds derived from natural products have played an important role in cancer treatment, considering that some chemotherapeutic drugs have been derived of plants (Paclitaxel, Camptothecin and Vincristine, etc.).

Prostate Cancer is a slow-growing disease characterized by dysregulation of the balance between proliferation and cell death. Apoptosis suppression is the responsible of progressive accumulation of cancer cells in prostatic tissue, apoptosis is also associated with cancer progression from localized tumor cells (hormono-dependent) to highly metastasic tumor cells (hormono-independent). According to this issue, an optimal anticancer drug is considered when is capable to destroy cancer cells without causing an excessive damage to normal cells, this situation is achieved through induction of apoptosis exclusively in cancer cells. Publications related to *Kalanchoe* (Crassulaceae) genre, indicate they posses metabolites (Cardiac glycosides , alkaloids , etc.) with biological activity in various cancer cell lines. *Kalanchoe flammaea* is a plant used in Mexican traditional medicine to treat some diseases, including cancer. Based on this, a crude extract with ethyl acetate *K. flammaea* (KfAcOEt) was studied in order to evaluate their biological activity (*in vitro and in vivo*) on hormone-independent prostate adenocarcinoma cells (PC3) and prostate epithelial cells (PrEC) as control of non-cancerous cells as well as in peripheral blood lymphocytes.

Cytotoxicity assays in both cell lines show a dose-dependent inhibition of cell viability, presenting a selectivity index on neoplastic cells. The fifty percent inhibitory concentration was 1.361 ± 1.14 mg/mL (PC3) and 127.0 ± 1.19 (PrEC), and non cytotoxic effect was observed in peripheral blood lymphocytes. From the bio-assay guided fractionation, the KF8-3 fraction showed the highest citotoxicity activity in PC3 cells (1.057 ± 0.06 mg/mL), maintaining its selectivity for neoplastic cells.

The assays to characterize the apoptotic effect of the KfAcOEt extract on PC3 cells were assessed according to the recommendations of the Nomenclature Committee of Cell Death. The fifty percent inhibitory concentration of the KfAcOEt extract was used to determine the initiation phase of apoptosis, an overproduction of reactive oxygen species was detected at 6 h of exposure in PC3 cells, moreover; release of Cytochrome C from the mitochondria to the cytosol and activation of Caspase-3 at 12 h of treatment with the KfAcOEt extract was observed as a distinctive biochemical event of the intrinsic pathway in the execution phase of apoptosis. In this pathway, involvement of Bcl-2 protein is important, but we can not find changes in expression levels of this protein.

Finally, in cells exposed to KfAcOEt extract, TUNEL-positive nuclei were observed, which indicates DNA fragmentation as part of the final event of apoptosis, in which also were observed dynamic changes of the plasma membrane and loss of morphology cell related to cell shrinkage observed. Cell cycle analyses revealed that KfAcOEt treatment induces S-phase arrest in prostate cancer cells at 12 and 24 h. This effect was also observed at 24 h in PC3 cells treated with the cytotoxically active fraction KF8-3.

In relation to *in vivo* tests, KfAcOEt extract showed tumor-growth inhibitory activity in xenograft mice model and none of the animals show any weight loss at the end of the observation period as an indicative of toxicity, which was confirmed by the histological analysis of major organs of treated mice (liver, spleen and kidney). The micronucleus assay was carried out in order to assess if KfAcOEt extract was able to exert genotoxic damage. Samples of treated mice with the administered dose (1000 mg/kg) were negative to micronuclei induction in reticulocytes and erythrocytes. Lethal Dose 50 was evaluated and according to OECD guideline and classification, KfAcOEt was ranked as closely to category 5 ($LD_{50} > 5000$ mg/kg), which is of low acute toxicity hazard.

Finally, compounds obtained of secondary fractions of KfAcOEt extract were separated by preparative thin-layer chromatography and identified by electron-impact mass spectrometry. The results were compared with the database indicating the presence of alkaloids, sterols and cardiac glycosides. The cytotoxic KF83B-fraction evaluated in PC3 cells, was separated by high performance liquid chromatography (HPLC) to obtain three compounds. Two of major compounds were analyzed by Proton Nuclear Magnetic Resonance for further structural elucidation, the data obtained was compared with reported compounds isolated from other *Kalanchoe* species; however, none of this

correspond to those reported in literature, indicating the possibility they could be new compounds still for elucidate.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL CÁNCER

El cáncer permanece como uno de los más serios cambios en el cuidado de la salud del mundo moderno y a su vez, como una de las enfermedades con mayores casos de mortalidad y morbilidad en el mundo. Según la Sociedad Americana del Cáncer (American Cancer Society), basada en las estadísticas del GLOBOCAN de la Organización Mundial de la Salud, estima que cerca de 14.1 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes a causa del cáncer ocurrieron en el 2012 en todo el mundo (Torres *et al.*, 2015). En el 2030, se espera que crezca a 21.4 millones de nuevos casos de cáncer y 13.2 millones de muertes, esto debido al crecimiento y envejecimiento de la población, así como las reducciones en la mortalidad infantil y muertes por enfermedades infecciosas en los países en desarrollo (IARC, 2015).

De acuerdo al Informe Mundial sobre el Cáncer, la incidencia del cáncer podría aumentar en un 50% hasta el año 2020, en el que habría 15 millones de nuevos casos, este informe revela que el cáncer ha pasado a ser un importante problema de salud pública en los países en desarrollo, igualando el efecto que tiene en los países industrializados. En nuestro país, los tumores malignos son unas de las principales causas de mortalidad, un país como México, que se encuentra en una fase especial de la transición epidemiológica, en la que le aquejan padecimientos tanto infectocontagiosos como crónicos no transmisibles, debe prestar atención a todos los problemas de salud pública que tiene, y el cáncer es uno de los principales. Los padecimientos crónicos no transmisibles, cobran especial atención en países en desarrollo, al participar con más del 50% de las defunciones por estas causas a nivel mundial (**Figura 1**) (SSA, 2014).

El cáncer es una enfermedad que engloba muchos conceptos, por ello de manera general podría describirse como un desorden a nivel celular de carácter hiperproliferativo, que a su vez involucra una transformación biológica. Es importante mencionar que las neoplasias se originan de alteraciones de uno o más genes en el organismo, éstas pueden ser hereditarias (que pasan de generación en generación) o adquiridas por el daño del material genético. Hay dos tipos de genes involucrados en la aparición de tumores: Los oncogenes que al mutar promueven una proliferación no controlada de las células y los genes supresores de tumor que normalmente están

encargados de evitar una replicación desmedida de las células; por lo que cualquier daño en éstos llevaría a la aparición de cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000).

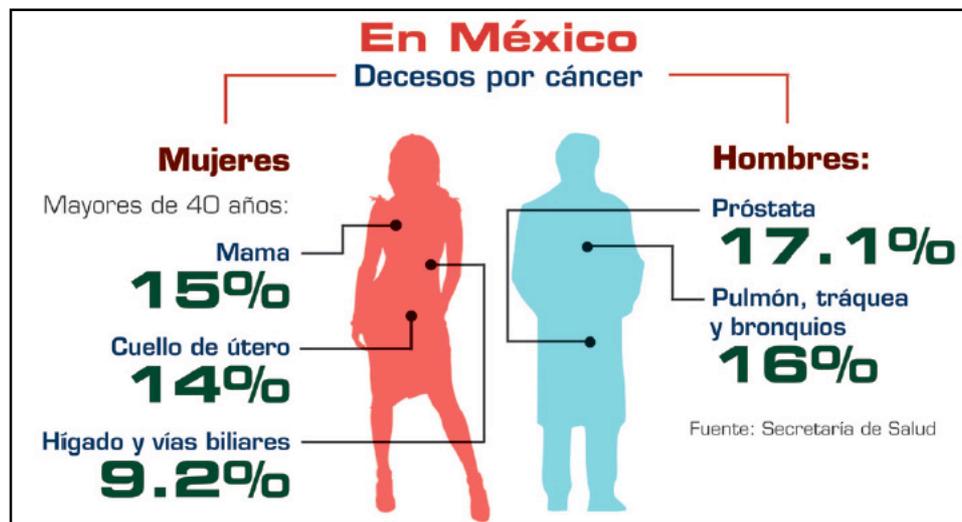


Figura 1. Decesos por cáncer en México SSA, 2014

1.2 LA BIOLOGÍA DEL CÁNCER

El cáncer está comprendido actualmente por seis capacidades ó fenotipos biológicos que son adquiridos cuando un tumor se desarrolla, éstos constituyen un principio de organización que nos muestra la complejidad de esta enfermedad neoplásica.

Estas capacidades biológicas celulares son la señalización proliferativa continua, la evasión de los supresores de crecimiento, la resistencia a la muerte celular, inmortalidad celular replicativa, la inducción de la angiogénesis y la activación de la invasión, así como la metástasis. Cabe destacar, que bajo éstas características, existen otros factores que contribuyen, como lo son la inestabilidad genómica, lo cual genera la diversidad genética que acelera su adquisición, así como también la inflamación, la cual propicia múltiples funciones de estas capacidades biológicas. Recientemente, se ha descrito el surgimiento de otras capacidades que adquieren las células neoplásicas, éstas son la reprogramación de energía metabólica y la evasión de la destrucción por el sistema inmune. Pese a todo lo anterior, existen otros factores que aumentan la complejidad tumoral, y que se encuentran involucrados en contribuir a la adquisición de las capacidades biológicas, esto es el reclutamiento de células normales, creando de esta manera un “microambiente tumoral”.

De esta manera, podemos llegar al entendimiento de que los tumores son más que masas insulares de células proliferando y que en vez de ello, entenderlos como un tejido complejo compuesto de múltiples y distintos tipos celulares que participan de tal manera que hacen interacciones heterotípicas entre unos con otros (**Figura 2**) (Hanahan y Weinberg, 2011).

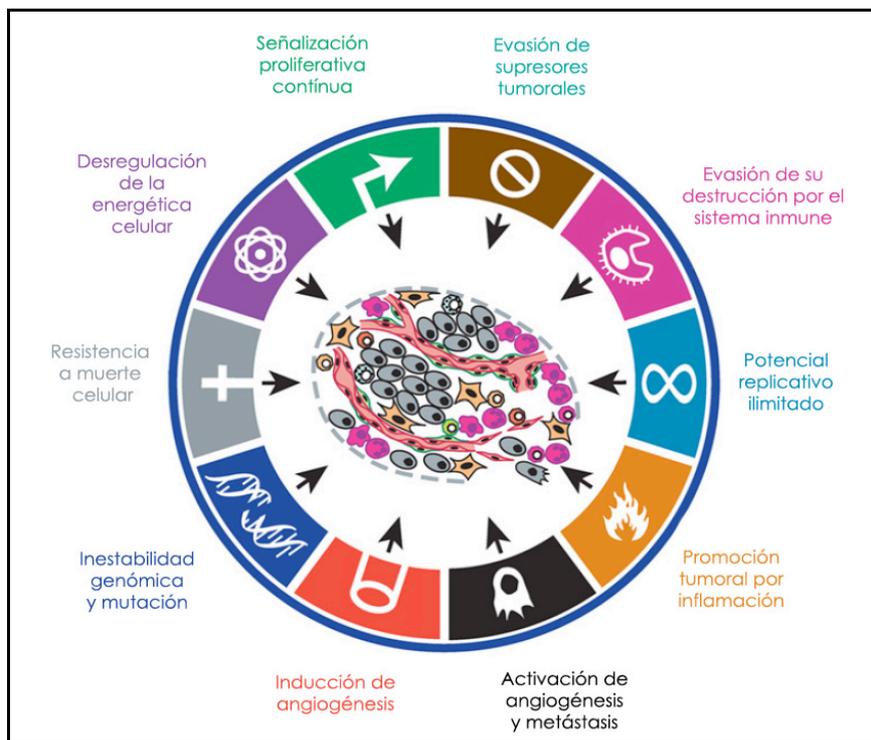


Figura 2. Fenotipo de una célula neoplásica Hanahan, 2011

1.2.1 SEÑALIZACIÓN PROLIFERATIVA CONTINUA

Podría decirse que el rasgo fundamental de las células cancerígenas es su capacidad de sostener una proliferación crónica. Los tejidos normales cuidadosamente controlan la producción y liberación de señales que promueven el crecimiento que instruyen la entrada y progresión a través del crecimiento y ciclo celular, asegurando la homeostasis del número de células y así mantener la arquitectura normal del tejido y su función. Las células cancerosas al desregular estas señales llegan a controlar su propio destino. La activación de estas señales es lograda en gran parte por factores de crecimiento que se unen a receptores de la superficie celular, típicamente aquellos que contienen un dominio intracelular de tirosin cinasas. Este último emitirá señales a través de una cascada de señalización que regulará la progresión a través del ciclo celular, así como

del crecimiento celular (que es, incrementar el tamaño celular); frecuentemente estas señales también influyen en otras propiedades biológicas de las células, tales como la energética de su metabolismo y su sobrevivencia. La biodisponibilidad de los factores de crecimiento es regulada por su reclutamiento en el espacio pericelular y la matriz extracelular, y por la acción de una compleja red de proteasas, sulfatasas y posiblemente de otras enzimas que se liberan y las activan, aparentemente con alta especificidad y comportamiento localizado. Sin embargo, la precisa identidad y recursos de las señales proliferativas que operan dentro de un tejido normal es poco entendido actualmente (Hanahan y Weinberg, 2011).

Las células cancerosas pueden obtener su capacidad proliferativa de diferentes maneras: Pueden producir factores de crecimiento para sí mismas, para lo cual pueden responder expresando sus receptores correspondientes, resultando de una estimulación proliferativa autocrina. Por otro lado, las células cancerosas pueden enviar señales para estimular células normales adyacentes, y de esta manera proveerles con factores de crecimiento. Otro punto importante dentro de esta característica son las mutaciones somáticas que activan vías de señalización adicionales (Cheng *et al.*, 2008).

1.2.2 EVASIÓN DE LOS SUPRESORES DE CRECIMIENTO

Además de mantener las señales estimuladoras de crecimiento, las células cancerosas deben de eludir los programas que regulan negativamente la proliferación celular, muchos de estos programas dependen de la acción de genes supresores de tumores. Muchos supresores de tumores que operan de diferentes maneras para limitar el crecimiento celular y la proliferación, se ha descubierto que se encuentran de manera inactiva de varias formas en muchos cánceres. Los dos supresores de tumores típicos son los que codifican las proteínas RB y TP53; éstos operan como nodos de operación central dentro de dos claves complementarias de circuitos regulatorios que gobiernan las decisiones de las células a proliferar o alternativamente a activar la senescencia y los programas apoptóticos. Aunque estos dos supresores de la proliferación TP53 y RB tienen una prominente importancia en regular la proliferación celular, varias líneas de evidencia indican que cada uno opera por distintas vías de una larga red que redundan en funcionalidad (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.2.3 RESISTENCIA A MUERTE CELULAR

El concepto de que la muerte celular programada por apoptosis sirve como una barrera natural para el desarrollo del cáncer, ha sido bien establecida por estudios concluyentes sobre su función en las últimas dos décadas. La elucidación de los circuitos de señalización que regulan el programa de apoptosis ha revelado como ésta se desencadena en respuesta a varias tensiones fisiológicas y que las células cancerosas experimentan durante el curso de la tumorigénesis o como un resultado de la terapia anti cáncer. La maquinaria apoptótica está compuesta por componentes reguladores que censan las señales, tanto externas como internas en la célula (Adams *et al.*, 2007). Éstos reguladores a su vez, son divididos en dos grandes vías, una que es censada y procesada extracelularmente y que es inducida por señales de muerte (**programa apoptótico extrínseco**), que involucra receptores como Fas ligando/Fas receptor), y la otra censando e integrando una variedad de señales de origen intracelular (**programa apoptótico intrínseco**), con lo cual la célula es progresivamente desensamblada y finalmente consumida por células fagocíticas especializadas. Las células tumorales involucran una variedad de estrategias para limitar o evitar la apoptosis. La más comúnmente conocida es la pérdida de la función del supresor de tumores PT53. Aunque también estas células pueden lograr esta finalidad con el incremento de la expresión de proteínas anti-apoptóticas reguladoras (Bcl-2, Bcl-X_L), o por señales de sobrevivencia (Igf1/2), o por bajo regular factores pro-apoptóticos, entre otros. La multiplicidad de evadir los mecanismos apoptóticos presumiblemente refleja la diversidad de señales de apoptosis que la población de células cancerosas encuentra durante la evolución hacia un estado de malignidad (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.2.4 INMORTALIDAD REPLICATIVA

Se ha aceptado ampliamente que las células requieren de un potencial replicativo ilimitado para generar tumores macroscópicos. Esta capacidad se encuentra en marcado contraste al comportamiento de la mayoría de linajes celulares normales en el cuerpo, los cuales son capaces de pasar a través de un limitado número de crecimiento y ciclos celulares. Esta limitación ha sido asociada con dos distintas barreras de la proliferación: La senescencia, una típica e irreversible entrada a un estado viable de no replicación, y a una fase de crisis que involucra la muerte celular. La eventual immortalización de las

variantes celulares que proceden a formar tumores ha sido atribuida a su capacidad para mantener el ADN telomérico a longitudes suficientes para evitar la senescencia o apoptosis, lo cual es logrado comúnmente por sobre regular la expresión de la telomerasa o, menos frecuente, un mecanismo de mantenimiento de los telómeros basado en una vía de recombinación alternativa. Así, el acortamiento de los telómeros ha llegado a ser como un cronómetro que determina el potencial replicativo de las células normales y por lo tanto que debe de ser superado por las células cancerosas (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.2.5 INDUCCIÓN DE ANGIOGÉNESIS

Al igual que en los tejidos normales, los tumores necesitan de sustento en nutrientes y oxígeno, así como de la habilidad de desechar residuos metabólicos y bióxido de carbono. El proceso de neo-vasculatura generada por tumores es denominado angiogénesis, con el cual cumplen estas necesidades. Durante la progresión tumoral un “interruptor angiogénico” está siempre activo, causando vascularización para generar continuamente nuevos vasos que ayudan a sustentar el crecimiento neoplásico (Hanahan *et al.*, 1996).

Hay completa evidencia que indica que este interruptor angiogénico se rige por factores compensatorios que pueden tanto inducir como evitar la angiogénesis (Baeriswyl *et al.*, 2009). Algunos de éstos reguladores angiogénicos son proteínas de señalización que se unen para estimular o inhibir receptores de superficie celular de células endoteliales vasculares. Los factores involucrados tanto para la inducción como inhibición de la angiogénesis son el factor de crecimiento endotelial vascular-A (VEGF-A) y la trombospondina 1 (TSP-1), respectivamente. Anteriormente la angiogénesis era concebida para ser importante solo cuando se formaba rápidamente el tumor macroscópico, pero datos más recientes indican que la angiogénesis también contribuye a la fase pre-maligna microscópica de la progresión neoplásica (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.2.6 ACTIVACIÓN DE LA INVASIÓN Y METÁSTASIS

El proceso de invasión y metástasis se ha esquematizado como una secuencia de pasos discretos frecuentemente denominado como cascada de invasión – metástasis

(Talmadge *et al.*, 2010). Las células cancerosas típicamente desarrollan alteraciones en su forma, así como en su adhesión a otras células y a la matriz extracelular (MEC). La alteración involucrada más característica es la pérdida de E-caderinas en las células cancerosas, la cual es una molécula clave en la adhesión célula-célula. Mediante la formación uniones adherentes con células epiteliales adyacentes, E-caderinas ayudan a ensamblar en capas el epitelio celular y mantienen el orden de las células dentro de estas capas. El incremento en la expresión de E-caderinas fue establecido como un antagonismo de la invasión y la metástasis, así la reducción de su expresión fue relacionada a potenciar estos fenotipos. La frecuente baja expresión y a veces ocasional inactivación de E-caderinas en cánceres de seres humanos provee de información fundamental para involucrarlo como clave en esta característica (Berx *et al.*, 2009).

Un concepto adicional, involucra la facilidad con el que las células cancerosas invaden gracias a la ayuda de células inflamatorias que se reúnen en los límites tumorales, produciendo enzimas que degradan la MEC y otros factores que habilitan el crecimiento invasivo; un ejemplo son los macrófagos que se localizan en la periferia tumoral y que proveen de metaloproteinasas y cistein-catepsin proteasas, este proceso se cree es mediado por las células tumorales que secretan IL-6 (Kessenbrock *et al.*, 2010). Esta función puede obviar la necesidad de las células cancerosas para producir quimioatrayentes que reclutan células inflamatorias en vez de producir ellas mismas estas enzimas (Qian *et al.*, 2010).

La metástasis puede dividirse en dos fases: La diseminación física de las células cancerosas desde un tumor primario a tejidos distantes y la adaptación de estas células en microambientes de tejidos diferentes que resulta en la colonización exitosa (Talmadge *et al.*, 2010).

1.2.7 REPROGRAMACIÓN DE LA ENERGÍA METABÓLICA

La frecuente y descontrolada proliferación celular que representa la esencia de una enfermedad neoplásica involucra no solo desregular el control del ciclo celular, sino también ajustar la energía del metabolismo en orden para impulsar el crecimiento y la división celular. Bajo condiciones aeróbicas, el metabolismo de la glucosa en las células normales es primero hacia piruvato por la vía de la glucólisis en el citosol y posteriormente hacia dióxido de carbono, bajo condiciones anaeróbicas, la glucólisis es favorecida y relativamente poco piruvato es enviado a las mitocondrias. Actualmente se

sabe que una característica anómala de las células cancerosas es que aún en presencia de oxígeno, puede reprogramar su metabolismo de la glucosa, y así producir energía, por limitar su metabolismo energético dentro de la glucólisis, llevando a un estado el cual ha sido denominado “glucólisis anaeróbica” (Hanahan y Weinberg, 2011).

Curiosamente, se ha encontrado que algunos tumores tienen dos subpoblaciones de células cancerosas que difieren en sus vías de obtención de energía. Una población de ellas son dependientes de glucosa (efecto Warburg) que secretan lactato, y la otra población preferencialmente importan y utilizan el lactato producido por las células vecinas para así mantener su recurso energético, empleando parte del ciclo del ácido cítrico para hacerlo (Kennedy *et al.*, 2010). Estas dos poblaciones evidentemente funcionan de manera cooperativa: Las células cancerosas hipóxicas dependen de la glucosa como energía y así secretan lactato como residuo, el cual es importado y preferencialmente usado como combustible por sus células vecinas mejor oxigenadas. Aunque este mecanismo simbiótico no ha sido generalizado aún, la cooperación entre secretar lactato y utilizar el lactato por otras células para impulsar el crecimiento tumoral no es una invención de las células tumorales, sino un proceso de cooptación como mecanismo fisiológico normal (Kennedy *et al.*, 2010). Además es cada vez más evidente que la oxigenación que va desde normoxia a hipoxia, no es necesariamente un proceso estático en los tumores, y a su vez fluctúa temporal y regionalmente (Hardee *et al.*, 2009); probablemente este es el resultado de la inestabilidad y la caótica desorganización de la neovasculatura en los tumores (Hanahan *et al.*, 2011).

1.2.8 EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

Hay poca evidencia en el posible papel del sistema inmune en la limitación de la formación de más del 80% de los tumores con etiología no viral. Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado la evidencia de que el sistema inmune opera como una barrera importante para la formación y progresión de un tumor, al menos en los cánceres no inducidos por virus (Hanahan y Weinberg, 2011).

Se sabe que las células cancerosas evaden el sistema inmune por deshabilitar los componentes del sistema inmune que han sido enviados para eliminarlas. Por ejemplo, las células cancerosas pueden paralizar la infiltración de Linfocitos T citotóxicos (CTL) y células Natural Killer (NK cells), mediante la secreción de TGF- β u otros factores inmunosupresivos (Yang *et al.*, 2010). Mecanismos más sutiles operan a través del

reclutamiento de células inflamatorias que son activamente inmunosupresores, incluyendo células T regulatorias y células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs). Ambas pueden suprimir la acción de los linfocitos T citotóxicos (Mougiakakos *et al.*, 2010).

1.2.9 MICROAMBIENTE TUMORAL

Un ensamble de distintos tipos celulares constituyen la mayoría de tumores sólidos. Tanto el parénquima como el estroma de los tumores contienen distintos tipos y subtipos celulares que colectivamente permiten el crecimiento tumoral y la progresión (**Figura 3**) (Hanahan y Weinberg, 2011).

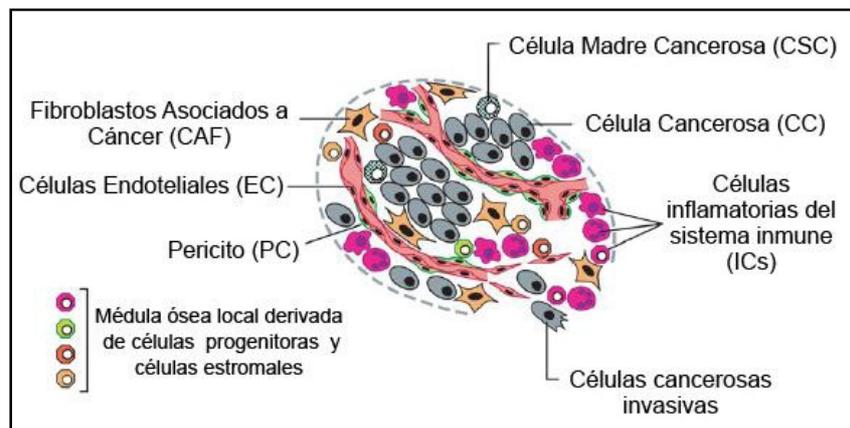


Figura 3. Microambiente tumoral Hanahan, 2011

1.3 LA PRÓSTATA

La próstata (gr. *prostata*, quien esta delante) es la glándula sexual accesoria más grande del hombre. Mide unos 2 x 3 x 4 cm de espesor, largo y ancho y pesa alrededor de 20 g. La próstata rodea la primera parte de la uretra y su parte posterior la recorren los dos conductos eyaculadores.

Desde el punto de vista anatómico macroscópico, la próstata se divide en lóbulos, pero por la histología y la clínica se distingue tres zonas concéntricas que rodean la parte de la porción prostática de la uretra: La **zona periuretral**, la **zona central** y la **zona periférica** (**Figura 4**). La secreción prostática es un líquido muy fluido que contiene cantidades importantes de ácido cítrico, por lo que el pH es algo ácido.

También contiene fosfatasa ácida y antígeno específico de la próstata (PSA) (Geneser, 2008).

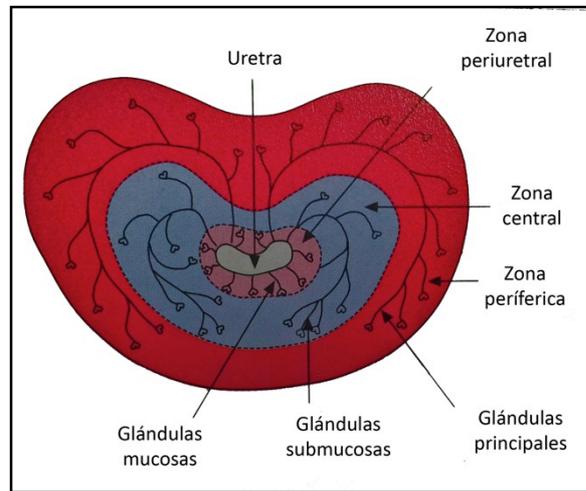


Figura 4. Corte transversal de la próstata ^{Geneser, 2008}

1.3.1 TIPOS DE CÉLULAS PROSTÁTICAS

El epitelio prostático en el hombre está compuesto por dos diferentes tipos de células, las células epiteliales y las células estromales. El **compartimento prostático epitelial** consiste de células madre, células epiteliales basales, células amplificadoras de tránsito, células neuroendócrinas y células epiteliales secretorias luminales terminalmente diferenciadas. El **compartimento estromal** sirve como un soporte estructural y consiste predominantemente de tejido conectivo, células de músculo liso y fibroblastos.

El desarrollo y el mantenimiento de la anatomía de la próstata en estado normal, se da a través de la regulada morfogénesis del tejido en procesos que involucran la diferenciación celular, proliferación y apoptosis. La comunicación a través de numerosas interacciones intracelulares es direccionada al citoesqueleto intracelular y después a la matriz nuclear, la cual controla una variedad de funciones transcripcionales que controlan el tamaño celular y la forma, la motilidad celular, recambio celular epitelial y la proliferación, así como la diferenciación (Geneser, 2008).

1.3.2 REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO PROSTÁTICO POR ESTEROIDES Y FACTORES DE CRECIMIENTO

Hay múltiples niveles de regulación del crecimiento prostático que incluye la acción de hormonas esteroidales, factores de crecimiento y comunicación directa entre célula y célula, así como interacciones con la matriz extracelular. Estos tipos de interacciones de control de crecimiento son llevadas a cabo por varios sistemas que incluyen factores endócrinos (testosterona, estrógenos, prolactina y gonadotropinas), señales neuroendócrinas (serotonina, acetilcolina y norepinefrina), factores parácrinos (factores solubles de crecimiento de tejido), factores autócrinos (factores que son producidos y secretados por la misma célula), factores intracrinos (factores que funcionan de manera similar a los factores autócrinos pero funcionan dentro de la célula), factores de matriz extracelular e interacciones célula-célula (integrinas y células de adhesión celular) (Ramírez-Balderrama *et al.*, 2013).

1.3.3 EL CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer de próstata (CaP) es la segunda patología maligna masculina en frecuencia en el mundo occidental (sólo superado por el cáncer de pulmón). Aparece sobre todo en las glándulas principales de la zona periférica. Debido a su localización, a menudo el cáncer sólo produce síntomas miccionales en las etapas tardías de la patología, lo cual implica, lamentablemente, que ya se ha generado metástasis. En consecuencia, tiene especial interés que, en condiciones normales, se detecta muy escasa concentración de fosfatasa ácida plasmática, mientras que en las células cancerosas (al igual que las células epiteliales normales prostáticas) contienen fosfatasa ácida y liberan la enzima al torrente sanguíneo, sobre todo después de la metástasis del tumor. Por lo tanto, la determinación de la concentración de fosfatasa ácida en el plasma sanguíneo es un importante eslabón para el diagnóstico del cáncer de próstata (Ramírez-Balderrama *et al.*, 2013).

Al igual que la hiperplasia prostática benigna, el cáncer de próstata es sensible a la acción de andrógenos, que estimulan el crecimiento tumoral. En consecuencia, además de la cirugía del tumor, a menudo se complementan el tratamiento con la orquidectomía (extirpación de los testículos), que disminuyen o detiene el crecimiento tumoral y que incluso puede causar la regresión de la metástasis. Se obtienen resultados similares

mediante la aplicación de tratamientos con estrógenos, por la acción directa sobre las células cancerosas y por el efecto inhibitorio sobre la secreción de LH (Hormona Luteinizante) y la consecuente disminución de la secreción de testosterona (Ramírez-Balderrama *et al.*, 2013).

1.3.4 DESARROLLO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

El ciclo celular se realiza de una manera especial en las células prostáticas. La mitosis es dependiente de elementos agonistas como los andrógenos (en especial la dihidrotestosterona) y de los factores de crecimiento (FC) excepto el “*Factor transformante de crecimiento tipo B*” TGF- β , que es antagonista del crecimiento en condiciones normales. En la próstata, específicamente en el estroma, el complejo receptor androgénico-dihidrotestosterona (AR-DHT) activa la secreción de los factores de crecimiento, que cruzan la membrana basal hacia el compartimiento epitelial que contiene células basales y secretorias luminales, aquí los factores de crecimiento se unen a receptores de membrana plasmática específicos e inician la señal para la proliferación y supervivencia de las células epiteliales secretorias. Una vez que se inicia la señal, los factores de crecimiento actúan como efectores positivos o negativos de los procesos celulares (proliferación, diferenciación y muerte celular del tejido sano y canceroso). La transmisión de señales desde los receptores de membrana específicos, crea la síntesis de una cascada de proteínas y la activación o represión de un número de genes blanco. Cuando se desarrolla el cáncer, se utilizan esas proteínas y genes a su favor (Uribe, 2005).

Existen cuatro familias de factores básicos de crecimiento que se consideran activadores y que tienen en común un dominio para la unión, dependiente de un tipo de cinasa específica denominada la *tirosin cinasa* y un factor de crecimiento cuya cinasa específica de unión es la serina - treonina cinasa. Entre éstos se encuentran:

Factor de crecimiento epidérmico (EGF): Éste induce la proliferación de todos los tipos celulares normales. Es el principal factor de crecimiento en la HPB y en tejido normal. En CaP incrementa la proliferación en líneas andrógeno sensibles, sugiriendo una vía autocrina para células que son epiteliales. Originalmente es autocrino, solo de las células del estroma, hecho que desaparecen cuando se desarrolla el cáncer. En esta familia de factores se incluye el “*Factor de crecimiento transformante alfa*” TGF- α , no relacionado con TGF- β (Daves y Eaton, 1991).

Factor de crecimiento semejante a la insulina (IGFs): Es un sistema que incluye dos proteínas: Tipo I y II. Entre sus funciones esta el aumentar la proliferación celular, se secreta en células estromales y actúa en celular epiteliales, típico de los factores de crecimiento. Tienen funciones antiapoptóticas, así como mitogénicas. Cuando este factor se sobreexpresa hay mayor posibilidad de desarrollar cáncer (Story, 1995).

Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF): Se secreta en muchas células de tejidos del sistema urinario. Es un fuerte factor mitogénico y proliferativo. Tiene relación directa con la inflamación y es muy importante en la génesis de HBP (Story, 1995).

Factor de crecimiento fibroblástico (FGF): En CaP, diferentes tipos de alteraciones en esta familia de factores se da durante la progresión del estado de dependencia hormonal al independiente, que interrumpe la comunicación entre el estroma y el epitelio, lo cual da como resultado la autonomía de las células con cáncer. Estos cambios incluyen: 1. La pérdida del receptor FGFR2IIIb, al cual se une FGF-7 derivado del estroma, esto promueve tanto el crecimiento como la limitación del mismo, así como la diferenciación, 2. Activación del receptor FGFR1, la cual está limitada al estroma, junto con la activación de FGFs que actúa en este receptor de manera autocrina. Se sobreexpresa en HPB (Matsubara *et al.*, 1999).

Factor de crecimiento transformante tipo β : Los factores de crecimiento pueden funcionar como inhibidores del crecimiento. Su dominio de unión se encuentra en la *serina-treonina cinasa* a diferencia de los otros en las que este se encuentra en la *tirosin-cinasa*. El TGF- β es una superfamilia de 5 isoformas que incluyen: Activina, Inhibina, proteínas morfogénicas óseas (TGF β 1 y TGF β 3) y Factor inhibidor del Müller. El TGF- β activa el crecimiento estromal e inhibe el crecimiento epitelial en el tejido normal. En cáncer de próstata funciona de manera inversa, las células pierden la habilidad de ser inhibidas por esta familia de factores. En el CaP, el TGF- β se encarga de promover la angiogénesis y limitar la respuesta inmune contra el tumor. En los procesos tumorigénicos es sobreexpresado (Story, 1995).

En condiciones normales la función vital del epitelio glandular prostático es secretar PSA (Prostatic Specific Antigen) que es fundamental para la reproducción de la especie y otras sustancias secundarias, pero cuando existe una transformación maligna, se activará una vía aberrante de producción de los mismos factores de crecimiento, de predominio autocrino y siempre a favor del crecimiento del tumor, con tal número de divisiones que tenderá a la inmortalidad. El tumor usará la DHT disponible que sin

embargo ya no es indispensable. Para la conversión de testosterona a DHT en el tumor, donde intervendrá la 5- α reductasa-isoenzima-1; la 5- α reductasa isoenzima-2 del estroma, la cual permanece de manera normal en la glándula y el tumor será capaz de retroalimentarse en forma autocrina con factores de crecimiento sintetizados para favorecerse y al igual que otras sustancias como andrógenos suprarrenales, estrógenos y progesterona, que antes eran de menor importancia que la DHT. Cuando ocurre la transformación a cáncer, los mecanismos paracrinos de acción en el receptor androgénico son reemplazados por un mecanismo autocrino emergente, las células cancerosas son cada vez menos dependientes de los factores celulares estromales (Carson III y Rittmaster, 2003).

1.3.5 BASES MOLECULARES DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer de próstata es caracterizado por una heterogeneidad biológica y clínica, lo que ha complicado sus estudios moleculares y epidemiológicos, por esta razón es necesario un entendimiento profundo de los cambios moleculares que inician y dirigen al CaP, aunque en la actualidad no se conocen los mecanismos exactos por los cuales se desarrolla esta enfermedad se han identificado alteraciones genéticas específicas y caracterizado su papel dentro del CaP en los varios estadios donde pueden ser importantes (Yu *et al.*, 2005).

Receptores de Andrógeno (RA): Los receptores de andrógenos y proteínas relacionadas a las cascadas de señalización que éstos activan, son críticos para el desarrollo y diferenciación de un epitelio prostático normal. Sin embargo, esta señalización también conlleva al CaP y a su progresión. Los andrógenos usualmente en forma de DHT, se unen a su receptor en el citoplasma. El complejo formado por esta unión se transloca al núcleo, donde promueve elementos de respuesta a andrógenos en ciertas regiones promotoras de genes. Aquí el complejo altera los genes de transcripción que directa o indirectamente estimulan la proliferación.

La función crítica mitogénica de la señalización de los receptores androgénicos (RA) forma la base de una de las terapias para el CaP, sin embargo cuando éste es tratado con antiandrógenos, las células tumorales se convierten en andrógeno independiente, lo que lleva consigo a mutaciones en los RA. Algunas de éstas mutaciones alteran la especificidad del ligando, dando como consecuencia un RA mutante que es activo

cuando se une a un Antiandrógeno. Otro factor que coopera con los RA para causar la malignización del CaP es el microambiente tumoral (Yu *et al.*, 2005).

Oncogenes y Receptores de Factores de Crecimiento: En la etapa temprana del desarrollo de una malignización, las mutaciones acontecidas en las células usualmente activan proto-oncogenes y conllevan a la transformación maligna. En contraste los genes supresores de tumor codifican proteínas que sirven como reguladores negativos del crecimiento celular y la proliferación (Yu *et al.*, 2005). En CaP, la activación de oncogenes y el producto de su expresión ha sido particularmente decepcionante, ya que los estudios realizados no han correlacionado ningún oncogén que pueda ser un marcador para la detección de la maligniciencia prostática o para identificar una ruta en particular que conlleve al desarrollo del CaP o la predicción de alguna manera en un fenotipo predecible (Foster *et al.*, 1999). Aunque la familia de proto-oncogenes RAS ha sido encontrada en muchos tipos de canceres humanos, las mutaciones en estos no son relativamente comunes en CaP y no ofrecen utilidad en el pronóstico del mismo. Sin embargo, RAS juega un papel importante en la transducción de señales de los receptores de factores de crecimiento (GFRs), lo que sugiere que la vía de señalización realizada por estos receptores está implicada en el desarrollo, crecimiento y metástasis del CaP. Los factores de crecimiento epidérmico (EGFR) actúan como mitógenos para las células epiteliales normales de la próstata; de tal manera que son expresados en altos niveles en el CaP. En el epitelio normal y en el del CaP se expresan los EGFR, los cuales activan la vía de señalización de las MAPK cuando ésta es activada por factores de crecimiento epidérmico (EGF) o factores de crecimiento transformantes (TGF- α). La activación de la señalización de EGFR está ligada a la proliferación celular, transformación maligna y la progresión de la enfermedad (Yu *et al.*, 2005).

Genes Supresores de Tumor (TSG): Un segundo grupo de genes que son considerados importantes moduladores del fenotipo maligno de una célula, son los genes supresores de tumor (TSGs). Aunque las funciones normales de la secuencia de estos genes no se encuentran bien definidas, es probable que ellos estén involucrados en promover la diferenciación celular, además de mediar el arresto celular en la proliferación mediante citocinas inhibitoras de crecimiento. Algunos de los TSGs considerados son el gen de **Retinoblastoma (RB)** localizado en el cromosoma humano 13q, del cual algunos estudios confirman la presencia de mutaciones en este gen, en una subpoblación de CaP, lo que soporta la probabilidad de que la mutación de este gen es responsable de la supresión tumoral y que esto puede ser un importante paso en la

génesis de al menos algunos CaP. La pérdida de la heterocigocidad (LOH) para RB ha sido mostrada en el 60% de pacientes con CaP. Otro TSG es el gen **p53**, que se encuentra mutado en muchos cánceres humanos (Selivanova, 2001), el producto de este gen es una proteína nuclear que regula la entrada y progresión al ciclo celular. En células normales se encuentra en el citoplasma en asociación con el citoesqueleto y en células transformadas, esta proteína es usualmente localizada en el núcleo. La identificación de altos niveles de esta proteína indica que p53 se encuentra mutado, debido a que éste en su forma normal tiene una vida media corta. Un tercer gen supresor de tumores es **KAI1**, que se encuentra localizado en el cromosoma 11p11.2, el cual parece estar activo en algunos CaP. La proteína de este gen se encuentra reducida en líneas celulares derivadas de CaP metastásico. De la proteína codificada por el gen de KAI1 aun no se ha confirmado su función, su localización membranal y su excesiva glicosilación sugiere que tiene función en la interacción célula – célula e interacciones célula con la matriz extracelular y que son importantes en invasión y metástasis. Además de KAI1, la expresión de genes como **MRP-1** y **ME491**, que son otros dos genes de la misma familia, también ha sido correlacionada con la metástasis (Foster *et al.*, 1999).

Otros genes supresores de tumores que se encuentran alterados en CaP son el **Glutación S-Transferasa**, el cual cataliza la conjugación de glutatión con componentes electrofílicos, protegiendo al ADN de daño oxidativo y el **Homólogo de la fosfatasa y tensina (PTEN)** el cual es una fosfatasa que actúa en la tirosina de fosfoproteínas y en los sustratos fosfolípidos de la cinasa de fosfoinositol trifosfato (PI3K), donde la pérdida de la expresión de PTEN activa la vía de señalización de AKT, la cual se encuentra asociada con el incremento de la sobrevivencia celular. En CaP, el gen de PTEN esta mutado y silenciado por hipermetilación, además de que esta pérdida de expresión correlaciona con el estado avanzado y alto grado de maligniciencia en los tumores de CaP (Yu *et al.*, 2005).

Índices de proliferación: La evaluación de la proporción de células proliferando dentro de un tumor puede predecir la probable progresión hacia una tumoración. La expresión de una proteína como Ki67 es necesaria a lo largo de todo el ciclo celular, por consiguiente al disminuir su expresión se inhibe la proliferación celular. Se ha comprobado que existe una significativa correlación entre la expresión de esta proteína y el grado de malignidad en todos los tumores de próstata (Foster *et al.*, 1999).

Apoptosis: Mucha atención ha sido enfocada al control molecular de la apoptosis y los métodos para potenciar la muerte celular en el tumor con terapia anti-cancerígena. Los valores de apoptosis llegan a ser alterados durante la iniciación, progresión y metástasis de los cánceres de próstata humano. El tratamiento con ablación androgénica primero produce una reducción en la densidad tumoral, pero las células continúan proliferando y se tornan a un estado andrógeno independiente, el cual no responde por mucho tiempo a la terapia antiandrógeno. El mecanismo o mecanismos por los cuales las células adquieren andrógeno independencencia puede ser a través de defectos en la producción autocrina y/o en respuesta a citocinas TGF- β 1 (Foster *et al.*, 1999).

Bcl-2 y proteínas de genes relacionados: La proteína oncogénica Bcl-2 y su familia de genes relacionados ocupan un papel central en la regulación de la apoptosis. Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w y Mcl-1 son antagonistas de la muerte celular, mientras que Bax, Bak, Bcl-X_s, Bad y Bik son agonistas. Las proporciones de éstos influyen la respuesta al estímulo apoptótico tales como la ablación androgénica, la pérdida del anclaje a proteínas de la matriz extracelular y fármacos anticancerígenos. Bax se encuentra presente tanto en células basales como en células luminales, pero en altos niveles de expresión en células secretorias, mientras que Mcl-1 y Bcl-x son equitativamente expresadas en ambas. Se sabe que el ratio de expresión de antagonistas y agonistas determina si una célula responde a una señal apoptótica. Este ratio puede ser afectado por muchos estímulos de manera diferente, que incluyen proteínas de la matriz extracelular, Raf-1 y p53 en su forma normal.

Se ha demostrado que la expresión de Bcl-2 es un marcador de pronóstico independiente en células de CaP, y niveles altos de ésta proteína han sido encontradas en células hormono refractarias, lo que explica la supervivencia de este tipo de células, y que esta proteína sea utilizada como un blanco terapéutico potencial, ya que se ha demostrado que incrementa la resistencia a la muerte celular tanto por quimioterapia y radioterapia, así como de reducir el anclaje celular a proteínas de la matriz extracelular, lo que facilita la diseminación tumoral. Al igual la expresión de Bcl-2 correlaciona con el incremento de la independencencia andrógena, lo que sugiere que la sobreexpresión de esta proteína puede brindar progresión tumoral y resistencia a quimioterapéuticos (Raffo *et al.*, 1995).

Por otro lado, también se ha documentado que los andrógenos median la resistencia al tratamiento con Etopósido por el incremento de la expresión de Bcl-2 y de esta manera inhibe la apoptosis mediada por este fármaco (Berchem *et al.*, 1995). La

proteína p53 ha mostrado un papel importante en la modulación de la apoptosis, la cual regula la expresión de Bcl-2 y de Bax. Cuando p53 se encuentra normal, media la inducción de apoptosis por irradiación y por tratamiento con drogas citotóxicas. En próstata, la apoptosis inducida por ablación androgénica no parece involucrar a p53, sugiriendo de esta manera que p53 no es esencial para que la respuesta apoptótica acontezca (Berges *et al.*, 1993). Otros proto-oncogenes tales como **ras**, **c-myc** y **c-jun** han mostrado incremento de su expresión en células PC3 que son resistentes a drogas terapéuticas que inducen apoptosis (Mackay *et al.*, 1994). Estas investigaciones indican que varios y distintos mecanismos moleculares pueden ser inducidos o suprimidos, para lograr la muerte celular programada en células de CaP. Tales mecanismos pueden estar involucrados en la eliminación de cánceres dependientes de andrógeno por ablación hormonal, prevención de la transición de éstas últimas a ser andrógeno independiente por bloqueo de la expresión Bcl-2 y la erradicación de células de cáncer metastásicas independientes de andrógeno con nuevos inductores de apoptosis (Foster *et al.*, 1999).

Factores de crecimiento: En CaP, los niveles de ARNm de TGF- β 1 están incrementados; mientras que los niveles de TGF- β 3 se encuentran recíprocamente reducidos. Las células de CaP desarrollan poca sensibilidad a los efectos antiproliferativos/inhibitorios de TGF- β 1 y de ésta manera la progresión tumoral continúa. Los niveles de ARNm de TGF- β 1 no siempre correlacionan con los correspondientes niveles de su proteína. Las células de CaP pierden susceptibilidad inhibitoria a TGF- β 1 y TGF- β 2. Los efectos de la sobreproducción de TGF- β 1 benefician la malignidad por medio de la supresión de la inmunidad humoral y celular, promoviendo la angiogénesis, estimulando la formación de la matriz estromal, modulando la expresión dependiente de factores de crecimiento por células estromales y así potenciando la motilidad celular y metástasis de las células de CaP (Foster *et al.*, 1999).

Mensajeros Intracelulares: La familia de las proteínas cinasa C (PKC) de al menos 12 distintas serina/treonina cinasas ocupan un papel importante en el control de la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. PKC es el mayor mediador intracelular de los efectos de muchos factores de crecimiento, operando por medio de segundos mensajeros a través del sistema fosfatidilinositol. La activación de PKC por ésteres de forbol ha mostrado una inhibición dosis dependiente de la proliferación celular y de la inducción de la apoptosis. PKCs α y δ parece que son cruciales para la diferenciación celular, mientras que PKC β está involucrado en la proliferación y

apoptosis. Se ha sugerido que PKC ϵ actúa como un oncogén e incrementa la proliferación, mientras que PKC ζ parece perderse cuando los tumores se van haciendo más agresivos (Powell *et al.*, 1994). Se ha comprobado que PKC β se encuentra disminuido en etapas tempranas de CaP, de igual manera los niveles de PKC ϵ se encuentran recíprocamente aumentados, de tal manera que se ha propuesto que el desbalance de los niveles de PKC ayuda a explicar el crecimiento maligno del epitelio prostático. Recientemente se ha comprobado que la inhibición total de PKC previene la proliferación de células de CaP *in vitro* (Sosnowski *et al.*, 1997).

Genes implicados en metástasis e invasión: La migración celular es un proceso complejo que involucra un desprendimiento de la matriz extracelular y re-adhesión a la misma, los cuales están mediados por receptores heterodiméricos transmembranales, o integrinas los cuales forman complejos con la matriz extracelular. Las integrinas median la adhesión e inician una cascada de señalización que tiene como resultado la fosforilación de una cinasa de adhesión focal (FAK) lo cual crea un sitio de unión de alta afinidad con proteínas de la familia de las cinasas Src. Al formarse el complejo FAK/Src se regula la fosforilación de múltiples proteínas efectoras, que al final intervendrán en la regulación de la adhesión y la migración. Las líneas de CaP que exhiben agresividad, comportamiento invasivo, como lo son PC3 y DU-145, tienen altos niveles de expresión de FAK que tienden a incrementar la tumorigenicidad, migración y habilidad metastásica. Otras proteínas implicadas son la E-caderina, la cual es una glicoproteína transmembranal que regula la adhesión célula-célula por medio de la interacción homotípica con otras E-caderina en otra superficie celular opuesta y β -catenina, la cual ayuda a formar un complejo con la E-caderina para unirse intracelularmente a la actina y de esta manera ayudar a estabilizar el complejo entero junto con el citoesqueleto. La reducción o ausencia de la expresión de E-caderina ha sido asociada con alto grado de malignidad de tumores de CaP al igual que en células de metástasis a hueso de CaP, lo cual sugiere que la pérdida de ésta, se encuentra involucrada en el desarrollo de CaP, quizás promoviendo un fenotipo más invasivo, sin embargo el mecanismo por el cual ésta proteína promueve la progresión del CaP no está esclarecido por completo (Yu *et al.*, 2005).

1.3.6 HORMONO INDEPENDENCIA

El tratamiento más comúnmente utilizado para el cáncer de próstata avanzado es la terapia de ablación androgénica, la cual eficazmente resulta en la regresión de la masa tumoral causada por el efecto apoptótico a corto plazo en células de adenocarcinoma andrógeno dependiente (Chuu *et al.*, 2011). Sin embargo en la mayoría de los casos, tal tratamiento da como resultado que las células de CaP se vuelvan altamente agresivas y metastásicas, estado que se ha denominado Androgeno-Independiente (AI). Esta transición al estado AI ocurre probablemente a través del crecimiento de ciertas células de estado AI que ya coexisten dentro de la población celular andrógeno-dependiente, esto antes de la deprivación androgénica (Isaacs y Coffey, 1981; Gingrinch *et al.*, 1997). Por tales implicaciones, muchos investigadores han enfocado su atención en el entendimiento del por qué las células de CaP son capaces de escapar de su estado inicial de andrógeno dependencia, así como el estado en el cual el receptor de andrógeno (RA) es encontrado. Al principio se creía que el crecimiento tumoral por AI era causado por la pérdida de la expresión de ARNm del RA y a su vez de la proteína en sí, debido a que el RA no es expresado en líneas celulares de humanos y roedores altamente agresivas y/o metastásicas (Tilley *et al.*, 1990; Culig *et al.*, 1998). Contrario a las expectativas, subsecuentemente se demostró que la proteína era altamente expresada de manera homogénea en tumores primarios, tumores locales recurrentes y aún en metastáticos. Estas observaciones implicaban que la necesidad de andrógenos en las células cancerosas no era importante y que no estaba involucrada en la bajo regulación de la expresión de RA. Parecía ser que varios posibles mecanismos para la adquisición de este estado eran debidos a alteraciones en la actividad, función y/o especificidad del RA. Una posibilidad es que el RA se vuelve altamente sensible a niveles residuales bajos de andrógenos. En efecto, RA se encuentra frecuentemente mutado dentro de los dominios de unión del andrógeno en líneas celulares así como en tumores primarios, dando paso a que los RA tengan la capacidad de unirse a otras hormonas esteroides, dejando de ser específicas para andrógenos (Abate y Sheen, 2000). Sin embargo las mutaciones no solo son encontradas en los dominios de unión al andrógeno, si no también a lo largo de toda la región codificadora tanto en tumores primarios como en las células hormono independientes. Se ha sugerido también que en los casos donde los andrógenos están limitados (tal como ocurre en la terapia de ablación androgénica), los requerimientos hormonales pueden ser omitidos a través de actividades sinérgicas del

receptor de andrógenos con factores de crecimiento tales como IGF, FGF y/o EGF. (Culig *et al.*, 1994).

1.3.7 ESTADIOS

En el cáncer de próstata se describen los siguientes estadios:

- **Estadio I:** Cáncer restringido únicamente a próstata. También se denomina estadio A1.

- **Estadio II:** El cáncer está más avanzado que en el estadio I, pero aún no se ha extendido fuera de la próstata. El cáncer de próstata en este estadio también se denomina estadio A2, B1 o estadio B2.

- **Estadio III:** El cáncer se ha extendido más allá de la capa externa de la próstata hasta los tejidos vecinos, afecta a vesículas seminales. Es también llamado estadio C.

- **Estadio IV:** El tumor se ha extendido a ganglios linfáticos cerca o lejos de la próstata o a otras partes del cuerpo como recto, vejiga, pulmón o hueso (metástasis). También se denomina D1 o D2 (Jiménez *et al.*, 2011).

1.3.8 GRADO GLEASON

El sistema de puntuación histológico de Gleason gradúa a los tumores de 1 a 5 basado en el grado de diferenciación glandular y la arquitectura estructural. El grado 1 representa el aspecto más diferenciado y el grado 5 el más pobremente diferenciado. Una puntuación primaria y una puntuación secundaria son reportadas, según los 2 patrones más comunes encontrados. El cáncer más diferenciado tiene una puntuación de “1+1” o 2; y el más indiferenciado una puntuación de “5+5” o 10. La puntuación combinada (puntuación primaria y secundaria) de 2, 3, ó 4 usualmente representa cánceres bien diferenciados; puntuación de 5, 6, o 7 representa cánceres moderadamente diferenciados; y puntuación de 8, 9, o 10 representa cánceres pobremente diferenciados. El pronóstico está directamente relacionado a esta puntuación (Abate-Shen y Shen, 2000).

Sistema de graduación:

1. Glándulas únicas redondeadas, en masas redondeadas muy juntas con bordes bien definidos.

2. Glándulas únicas redondeadas, algo separadas, masas redondeadas con bordes menos definidos.

3A. Glándulas únicas de mediano tamaño con forma irregular y espacio irregular con bordes infiltrantes indefinidos.

3B. Muy similar a 3A, pero glándulas pequeñas a muy pequeñas que no forman cadenas o cordones.

3C. Epitelio papilar y cribiforme, rodeado de cilindros y masas; no necrosis.

4A. Glándulas grandes, medianas o pequeñas combinadas en cordones, cadenas, o masas infiltrantes.

4B. Muy similar a 4A, pero principalmente con células grandes claras, algunas veces se asemejan al "hipernefroma"

5A. No diferenciación glandular, cordones, células únicas, o nidos sólidos de tumor con necrosis central.

5B. Adenocarcinoma anaplásico.

1.3.9 TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Es importante conocer el estadio de la enfermedad para planificar el tratamiento (Jiménez *et al.*, 2011). Por lo tanto, el pronóstico y las opciones de tratamiento dependen de:

- ▶ El estadio del cáncer
- ▶ La edad y el estado general del paciente
- ▶ De la puntuación de Gleason
- ▶ Si el cáncer esta recién diagnosticado o ha recaído

El CaP de manera localizada es manejado primeramente a través de la cirugía o radioterapia. Sin embargo, en pacientes en los cuales el cáncer persiste después de un tratamiento definitivo o aquellos que presentan un estado avanzado o metastásico, el primer tratamiento que se les administra es la terapia de ablación androgénica, típicamente con un agonista de la hormona liberadora de la hormona leutinizante. Sin embargo, este efecto es temporal y después de 18 a 24 meses, hay una progresión de la enfermedad que implica un aumento de los niveles de antígeno específico de próstata, incremento en el tamaño del tumor, nuevos esparcimientos metastásicos y síntomas

característicos de la enfermedad. Esto representa el fenotipo letal de la enfermedad y se le denomina cáncer de próstata hormono independiente (Loneragan y Tindall, 2011).

Existen diferentes tipos de tratamiento para los pacientes diagnosticados con cáncer de próstata. Algunos tratamientos son estándar y otros están siendo evaluados en ensayos clínicos. El tratamiento se debe considerar cuidadosamente, teniendo en cuenta las ventajas e inconvenientes, según la edad, salud general y preferencias de cada paciente (Jiménez *et al.*, 2011).

Se distinguen cuatro tipos de tratamiento estándar:

- **Observación o conducta expectante:** Es la observación intensiva, sin administrar ningún tratamiento hasta que los síntomas se presenten o cambien. Suele emplearse en varones mayores y que presentan otros problemas de salud y con enfermedad tumoral en estadio bajo. El mantener una actitud expectante no significa que el paciente no va a recibir ningún seguimiento o cuidado médico. Se realizarán determinaciones de PSA en sangre y tacto rectal cada 6 meses y probablemente biopsia guiada por ecografía transrectal anualmente. Si aparece cualquier síntoma o el cáncer se extenderá, debería considerarse un tratamiento activo.

- **Cirugía: Prostatectomía radical.** Procedimiento quirúrgico para extirpar la próstata, el tejido circundante y las vesículas seminales. Existen dos tipos de Prostatectomía radical; **β Prostatectomía retropúbica** (La extirpación de la próstata se realiza a través de una incisión en la pared abdominal, se pueden extirpar también los ganglios linfáticos cercanos) **β Prostatectomía perineal** (Procedimiento quirúrgico en el que la próstata se extirpa a través de una incisión en periné (área entre el ano y el escroto)). *Resección transuretral de la próstata.* Se extirpa el tejido prostático mediante el uso de resectoscopio (tubo delgado iluminado, con un instrumento cortante que se introduce a través de la uretra). Se utiliza a veces para paliar síntomas causados por el tumor antes de seguir con otros tratamientos para el cáncer. La resección transuretral también se puede realizar en varones en los que no se puede practicar la Prostatectomía radical por su edad o enfermedades asociadas (Jiménez *et al.*, 2011).

Los posibles efectos secundarios de la cirugía son la incontinencia urinaria (incapacidad de contener la orina) y la impotencia (incapacidad de lograr la erección). Se están desarrollando nuevas opciones quirúrgicas para reducir los efectos secundarios de estos tratamientos; así, una opción es la **β Prostatectomía radical** con preservación de la inervación, es decir, respeta los nervios que controlan la erección, conservando así la función sexual. Sin embargo, en pacientes que tienen tumores de gran tamaño o que

por su localización se encuentren próximos a los nervios no son aptos para esta intervención (Jiménez *et al.*, 2011).

■ **Radioterapia:** Es un tratamiento en el que durante varias semanas se expone la zona afectada a pequeñas dosis de ondas de energía, que impiden que las células malignas se desarrollen y multipliquen. Existen dos tipos de radioterapia: **Radioterapia externa**, en las que la radiación parte desde una máquina situada fuera del cuerpo y es enviada hacia el área donde se encuentra el tumor y la **Braquiterapia o radioterapia interna**, en las que se utiliza una sustancia radiactiva sellada en agujas, semillas, alambres o catéteres que se sitúan directamente dentro o cerca del tumor, debido a que las semillas se encuentran muy cerca de las células cancerosas, éstas reciben más irradiación que el recto, vejiga, pene y otros tejidos circundantes, que reciben menos radiación.

La utilización de una u otra técnica va a depender del estadio en que se encuentre el tumor. El tratamiento con radioterapia es indoloro, pero algunos pacientes sufren de diarrea, síntomas urinarios, así como sequedad de piel del área tratada. Puede causar pérdida del vello en la pelvis, que puede ser temporal o permanente según la cantidad de radiación utilizada. Tanto la radioterapia externa como la interna pueden causar impotencia en algunos hombres. La tasa de impotencia es similar a la de los pacientes que son sometidos a prostatectomía con preservación de la inervación. Ambos tipos de radiación tienen un pequeño riesgo de problemas en vejiga o recto que de aparecer, lo hacen a largo plazo (Jiménez *et al.*, 2011).

■ **Hormonoterapia:** El objetivo de la terapia hormonal es disminuir los niveles de hormonas masculinas, los andrógenos. El principal andrógeno es la testosterona. Como se mencionó anteriormente, los andrógenos producidos sobre todo en los testículos, promueven el crecimiento de células CaP. Cuando los niveles de andrógenos son bajos, el CaP se reduce y crece más lentamente.

La hormonoterapia en el cáncer de próstata puede incluir: *Agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante*, que impiden que los testículos produzcan testosterona, por ejemplo leuprolide y goserelina. *Antiandrógenos para bloquear la acción de los andrógenos*, por ejemplo flutamida y bicalutamida. *Fármacos que impiden la producción de andrógenos* por parte de las glándulas suprarrenales, como ketoconazol y aminoglutetimida. Los *estrógenos* (hormonas que producen los caracteres sexuales femeninos) pueden impedir que los testículos produzcan testosterona. Sin embargo, rara vez se utilizan en el tratamiento del cáncer de próstata debido al riesgo de

efectos secundarios. La *Orquiectomía* es una técnica quirúrgica que extirpa uno o ambos testículos, que son la principal fuente de hormonas masculinas, con el fin de reducir la producción de estas hormonas. La hormonoterapia puede presentar efectos secundarios como rubor, pérdida del apetito sexual, debilidad de los huesos, deterioro de la función sexual, etc.

El tratamiento hormonal puede ser utilizado en varias situaciones como tratamiento inicial si el paciente no puede recibir cirugía o radioterapia o bien no puede recibir estos tratamientos porque el cáncer ha sobrepasado los límites de la próstata, después de cirugía o radioterapia si persiste enfermedad o hay recaída, junto con radioterapia como tratamiento inicial (terapia adyuvante) en pacientes con alto riesgo de recurrencia, si se están realizando ensayos de tratamiento hormonal previo a cirugía o radioterapia (tratamiento neoadyuvante) con el objetivo de reducir el cáncer y poder llevar a cabo un tratamiento más efectivo.

■ **Quimioterapia:** Se administran fármacos que por vía endovenosa o vía oral pasan al torrente sanguíneo y alcanzan todas las partes del cuerpo, haciendo que este tratamiento sea potencialmente eficaz en los tumores que han desarrollado metástasis (se han extendido a órganos distantes de la próstata, fundamentalmente hueso y pulmón). Por ello, el uso de quimioterapia queda reducido a cáncer de próstata extendido fuera de la glándula prostática y si el tratamiento hormonal no es efectivo (hormonorresistencia). Se utilizan fármacos como taxanos, etopósido, vinorelbina y adriamicina. El objetivo de todos ellos es eliminar todas las células cancerosas para reducir el crecimiento tumoral y paliar el dolor. Las respuestas objetivas con quimioterapia están entre un 10-40%. No está indicada en el tratamiento del cáncer de próstata precoz.

■ **Tratamiento paliativo:** Los tratamientos anteriores tienen como objetivo eliminar o destruir las células cancerígenas o detener su crecimiento. Pero otro objetivo muy importante es «la calidad de vida» del paciente, que consiste en eliminar el dolor y otros síntomas que pudieran aparecer; así pueden ser tratados con: *Analgésicos*, especialmente los opioides, que son muy efectivos para el control del dolor oncológico; los *bifosfonatos*, que pueden aliviar el dolor causado por metástasis óseas y pueden enlentecer su crecimiento. El más utilizado es el ácido zoledrónico (Zometa®), así como algunos *esteroides*; del cual algunos estudios sugieren que esteroides como prednisona y dexametasona pueden aliviar el dolor óseo en varones con cáncer de

próstata metastásica y la *radioterapia*, la cual puede contribuir al tratamiento del dolor óseo aplicándola en la zona donde se localiza la metástasis ósea (Jiménez *et al.*, 2011).

1.4 COMPUESTOS DE ORIGEN NATURAL Y SU VALOR COMO QUIMIOTERAPÉUTICOS

La quimioterapia es una clase de tratamiento médico que utiliza fármacos antineoplásicos para bloquear diversas funciones biológicas en una célula cancerosa, entre ellos disminuir o detener crecimiento celular, impedir su migración y posterior diseminación, eliminar células que pudieran haberse diseminado en otras partes del cuerpo y mitigar síntomas como el dolor o por bloqueos de funciones causadas por el cáncer. A la fecha, más de 50 fármacos anticancerígenos han sido descubiertos, los cuales son usados de múltiples formas: **Monoterapia**, que es el uso de un solo fármaco, **modalidad combinatoria**, en la cual la quimioterapia es usada con otro tratamiento como la cirugía y radioterapia, o **combinación quimioterapéutica** en donde un grupo de fármacos es usado para tener un efecto sinérgico. Los principales efectos secundarios de la quimioterapia son las náuseas y el vómito, pérdida de cabello, cambios en la médula ósea, problemas de fertilidad, efectos emocionales y en la memoria, entre otros (Sandeep *et al.*, 2012).

La función que desempeñan los productos naturales en el tratamiento del cáncer ha sido desde hace muchos años atrás, de gran importancia para el desarrollo de nuevos quimioterapéuticos, ya que estudios realizados a éstos indican que son capaces de suprimir la proliferación de células neoplásicas, pueden inhibir vías de señalización desreguladas, inducir muerte celular (apoptosis, autofagia, necroptosis), suprimir la expresión de proteínas antiapoptóticas, inhibir vías de activación de factores de transcripción como NF- κ B, AP-1 y JAK-STAT, inhibir la angiogénesis, entre otros tipos de modulaciones. Recientemente se ha descubierto que los productos naturales tienen la capacidad de revertir la quimioresistencia y radioresistencia en pacientes que se encuentran sometidos a estos tratamientos, es por ello que éstos tienen el potencial de ser usados como terapéuticos en la actualidad (Dorai y Aggarwal, 2004).

1.4.1 LOS PRODUCTOS NATURALES EN EL DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS

El uso de los Productos Naturales ha ganado un amplio reconocimiento como una estrategia terapéutica, desde hace ya varios años. El Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos ha reconocido la importancia de los Productos Naturales como una fuente de nuevas moléculas con potenciales anticancerígenos, que ha dado paso en todo el mundo a la búsqueda de éstos a través de múltiples recursos naturales (plantas, animales, organismos marinos, etc.).

Los principales agentes que actualmente son usados en la práctica quimioterapéutica incluyen al Taxol obtenido de la corteza del árbol *Taxus brevifolia*, así como los alcaloides Vincristina y Vinblastina, que se encuentran presentes en *Vinca rosea* (Balunas *et al.*, 2005).

Es claro entonces, que los Productos Naturales han sido el recurso de la mayoría de los principios activos de los medicamentos actuales, y esto ha sido ampliamente aceptado, ya que más del 80% de las sustancias activas provienen de Productos Naturales o inspirados por un Compuesto Natural (Sneader, 1996). Otro argumento para validar el uso de productos de origen natural son las múltiples investigaciones que se han publicado desde 1981 al 2007, donde se indica que casi la mitad de los fármacos que han sido aprobados están hechos a base de Productos Naturales (**Figura 5**) (Newman y Craigg, 2007).

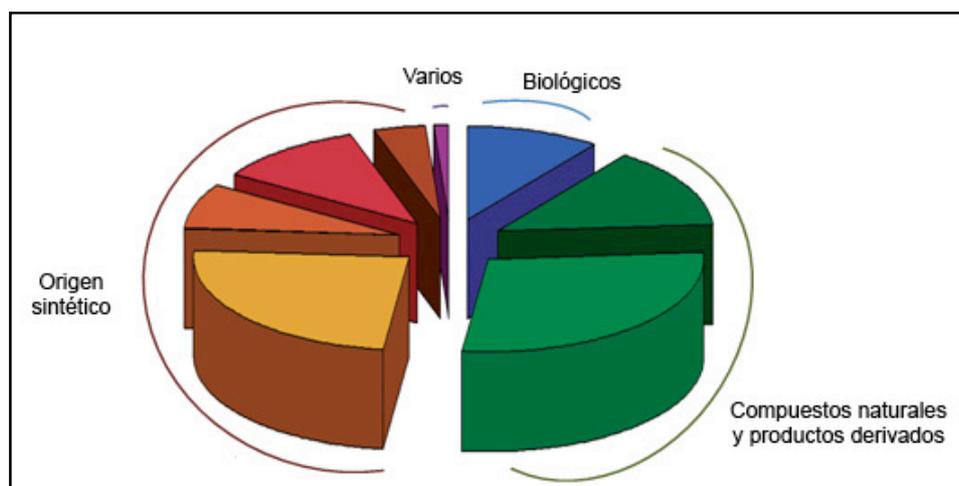


Figura 5. Porcentaje de fármacos derivados de Productos Naturales Newman y Craigg, 2007

1.4.2 ESTRATEGIA TERAPÉUTICA EN UN FÁRMACO ANTINEOPLÁSICO

La introducción de terapias basadas en el entendimiento de los eventos y mecanismos moleculares desregulados en las células neoplásicas, ha surgido como una

de las estrategias esenciales de las últimas tres décadas concomitante con el progreso en la investigación de los mecanismos de la patogénesis del cáncer.

El rápido crecimiento de esta estrategia terapéutica es categorizada con base a los respectivos efectos en una o varias de las características biológicas del cáncer; por ejemplo, si una de estas características biológicas del fenotipo neoplásico es considerado importante para la biología del tumor, entonces su inhibición causará un efecto en el crecimiento tumoral y a su vez en la progresión del mismo. Los fármacos anticancerígenos desarrollados a la fecha han sido deliberados directamente hacia blancos moleculares específicos que están involucrados de una u otra manera en desarrollar eventos particulares en las células neoplásicas, tal especificidad de acción ha sido considerada como satisfactoria, ya que puede presentar una actividad inhibitoria contra el blanco en específico, pero la realidad del fármaco es que posee pocos efectos en su blanco, lo que da paso a que los resultados clínicos sean generalmente transitorios, provocando así una recaída casi inevitable del paciente. Actualmente se sabe que muchas de las características del cáncer están reguladas por vías de señalización que están interconectadas de manera redundante; debido a ello, un agente terapéutico dirigido contra una de las vías claves de un tumor puede que no siempre contrarreste esa capacidad biológica, lo que da como resultado a que algunas células cancerosas sobrevivan con una función residual de éstas vías, hasta que ella misma o bien su progenie eventualmente se adapte a la presión selectiva impuesta por la terapia que ha sido aplicada. Tal adaptación, que puede estar acompañada de mutaciones, epigenética, reprogramación o remodelamiento del microambiente estromal donde se encuentre, puede reestablecer esta capacidad funcional, permitiendo la renovación del crecimiento tumoral y a su vez la falla clínica (Hanahan y Weinberg, 2011).

Por ejemplo, si se emplea un fármaco inductor de apoptosis puede llevar a las células cancerosas a hiperactivar señalizaciones mitogénicas para compensar el efecto producido por tal tratamiento. Por esa consideración, se propone que el desarrollo de fármacos y el diseño de protocolos de tratamientos esten realizados en función de incorporar los diferentes conceptos de estas características biológicas y de las múltiples vías involucradas en sostener cada una de ellas. Así, en particular, se puede establecer una idea de que un segundo blanco contra alguna de las características biológicas, resultará en una terapia más efectiva y durable para el tratamiento del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011).

2. ANTECEDENTES

2.1 FAMILIA *Crassulaceae*

Las crasuláceas son una familia de angiospermas del orden de las Saxifragales y se encuentran distribuidas en muchas partes de mundo. Se desarrollan satisfactoriamente en climas cálidos como México, Sudáfrica y el Suroeste de China. Estas plantas almacenan agua en sus hojas suculentas y existen alrededor de 1,400 especies en 33 géneros en todo el mundo.

2.1.1 GÉNERO *Kalanchoe*

Kalanchoe es un género de planta con alrededor de 125 especies de la familia Crassulaceae nativas de África y se distribuyen en varias partes del mundo, la mayoría son arbustos o herbáceas perennes, la más grande puede alcanzar los 6 m de altura, sin embargo la mayoría no superan 1 m. Tienen hojas carnosas, de color verde medio a oscuro con cubierta cerosa. Los miembros del género se caracterizan por abrir sus flores haciendo crecer nuevas células en la superficie interior de los pétalos para forzarlas a salir y en la parte exterior para cerrarlas. Surgen en tallos florales formando grandes umbelas de colores rosa, rojo, púrpuro, amarillo o blanco, según la especie o la variedad. Florece desde comienzos del invierno hasta la primavera.

Varias especies de *Kalanchoe* han sido introducidas en nuestro país y de la misma manera han sido incluidas dentro de la medicina tradicional mexicana para el uso de diversos padecimientos como el cáncer.

Algunas especies de *Kalanchoe* como *K. pinnata* (Lam.) Pers. (**Figura 6**) son popularmente usadas en la medicina tradicional de regiones templadas del mundo. En Guyana, las hojas son usadas como antiinflamatorio y antiséptico, para el tratamiento de la tos, úlceras y llagas. Otros estudios han reportado que esta especie presenta actividades antiulcerosas, antileishmaniales, hepatoprotectores, antidiabética y antinociceptiva (El Abdellaoui *et al.*, 2010).



Figura 6. *Kalanchoe pinnata*

2.1.2 ESTUDIOS RELACIONADOS CON EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER EN EL GÉNERO *Kalanchoe*

En 1988 y 1989 en China, Yamagishi y colaboradores, aislaron de la planta entera de *Kalanchoe pinnata*, tres glucósidos cardiotónicos denominados bufadienólidos, a partir de un extracto acuoso que presentaron un efecto citotóxico en un panel variado de líneas celulares tumorales KB (Cérvix), A-549 (Pulmón), HCT-8 (Colon), P-388 (Leucemia) y L-1210 (Leucemia linfocítica de ratón). A su vez, realizaron la elucidación estructural de estos compuestos mediante el uso de resonancia magnética nuclear en 1D y 2D (Yamagishi *et al.*, 1989).

En el 2001 en Japón, Supratman y colaboradores aislaron cinco bufadienólidos obtenidos de un extracto con metanol (MeOH) de hojas de *Kalanchoe pinnata* y *Kalanchoe daigremontiana x tubiflora* y se evaluó su potencial de inhibir la promoción tumoral mediante el modelo de activación del antígeno temprano del Virus de Epstein Barr (EBV-EA) en células Raji, inducido por el promotor tumoral 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol. Todos los compuestos mostraron una actividad inhibitoria por encima del 90% desde concentraciones de 0.16 a 100 μM , por lo cual éstos

bufadienólidos fueron considerados como nuevos agentes quimiopreventivos (Supratman *et al.*, 2001).

En el 2006 en China, Wu y colaboradores, aislaron tres nuevos bufadienólidos y cinco compuestos de la misma familia ya conocidos en trabajos previos, a partir de un extracto con MeOH de la parte aérea de *Kalanchoe gracilis* y determinaron sus estructuras químicas mediante métodos espectroscópicos. Además, evaluaron su actividad citotóxica en diferentes líneas celulares de cáncer y se analizó su efecto en la inhibición de la replicación del virus del VIH. Los 8 compuestos mostraron una citotoxicidad significativa a rangos nanomolares y solo uno de éstos compuestos, denominado Briofilina B mostró un efecto inhibitorio del virus del VIH en células H9 de linfocitos T (Wu *et al.*, 2006).

En el 2008 en China, Kuo y colaboradores purificaron fracciones obtenidas de un extracto con MeOH de *Kalanchoe hybrida*, mediante fraccionamiento bio-dirigido, de la cual obtuvieron tres bufadienólidos con una estructura base de anillo abierto α -pirona, así como otros cuatro compuestos diferentes de los cuales se evaluó su citotoxicidad con la técnica de MTS (5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4,5-dimetiltiazolil)-3-(4-sulfofenil)-tetrazolio), evaluando concentraciones de 4 y 20 $\mu\text{g/mL}$ por 72 h de exposición, usando como control negativo DMSO al 0.3% y como control positivo Actinomicina D a 10 μM , esto en las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7), pulmón (NCI-H460) y Glioblastoma (SF-268). Estos compuestos mostraron actividad citotóxica en las líneas MCF-7 y NCI-H460 y un efecto menor en la línea SF-268 (Kuo *et al.*, 2008).

2.1.3 ESTUDIOS REALIZADOS A *Kalanchoe flammea*

En experimentos previos en nuestro laboratorio, se realizaron diferentes ensayos con extractos obtenidos con tres tipos de disolventes de diferente polaridad (Etanol, Acetato de etilo, Hexano) con *Kalanchoe flammea* (No. de Reg. 42567 Herbario-Izta-UNAM) (**Figura 7**). La identificación de metabolitos por Cromatografía de Capa Fina a través de reacciones colorimétricas indicaron que el extracto contiene metabolitos secundarios de interés terapéutico, como son los terpenos y alcaloides; entre otros. En las pruebas *in vitro* empleadas para evaluar el potencial citotóxico de los diferentes extractos, se observó que éstos eran capaces de inducir un decremento en la viabilidad de células de cáncer de próstata de condición hormono-independiente (PC3). Los extractos obtenidos

con etanol y con acetato de etilo, ejercieron un efecto dosis respuesta a las 24 h de exposición, obteniendo valores de CI_{50} desde 5 hasta 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otro lado, el ensayo realizado en un cultivo primario de linfocitos (control de células sanas) se observó que ninguno de los extractos fue citotóxico (selectividad de los extractos hacia células neoplásicas).

También se realizó un estudio genotóxico para determinar la seguridad del uso de los extractos en un futuro y para ello, se realizó la prueba de Ames utilizando el método de incorporación con diferentes cepas de *S. typhimurium* (TA98, TA100 y TA102) que detectan diferentes mecanismos de mutagenicidad; se comprobó que los extractos podrían ser usados de manera segura ya que los datos obtenidos nos indicaron que los extractos con etanol y acetato de etilo de *K. flammaea* resultaron negativos a inducción de mutaciones en las diferentes cepas de *S. typhimurium* a concentraciones de 50 a 200 μg por placa.

Además se encontró que la inducción de la apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular evaluado en los Productos Naturales, esto a través de la translocación de la fosfatidilserina del citosol hacia el lado externo de la membrana citoplasmática de las células a las 24 h de exposición con el extracto con acetato de etilo de *K. flammaea*, descartando un proceso de muerte celular por necrosis (Arias-González, 2011).



Figura 7. *Kalanchoe flammea*

3. JUSTIFICACIÓN

Estadísticamente, el cáncer de próstata (CaP), es una de las neoplasias más comunes en la población masculina, aproximadamente 40 000 hombres mueren por este padecimiento cada año. Se considera que una de las causas es el envejecimiento poblacional. Considerando esto, el CaP es un problema clínico importante con el cual se seguirá enfrentando la medicina de manera ascendente en los próximos años.

Dentro de los recursos terapéuticos donde el CaP se encuentra confinado a la glándula prostática, existen terapias radicales disponibles dirigidas a erradicar las células malignas, dando como resultado una cura; sin embargo, si la enfermedad se ha diseminado en órganos adyacentes o distantes, no existe a la fecha, una intervención médica curativa para este estado. Desde hace ya varias décadas, la deprivación androgénica ha sido uno de los principales tratamientos para lograr controlar los neoplasmas de próstata, pero desafortunadamente esto es paliativo ya que la progresión del tumor es inevitable, debido al crecimiento de ciertas células cancerígenas que no responden a las terapias hormonales, convirtiéndose así, en hormono-independientes. Más allá de esto, las células cancerosas tienen una fuerte tendencia a diseminarse al hueso, un sitio donde la metástasis causa una gran morbilidad que últimamente lleva a una muerte dolorosa.

Con lo anterior, es evidente que a la fecha se ha realizado muy poco progreso en el tratamiento del cáncer de próstata en estadios avanzados, donde la eficacia de los medicamentos quimioterapéuticos han tomado desventaja tanto por la resistencia que presentan las células tumorales a éstos, así como por la eficacia decepcionante que tienen y por el poco tiempo de sobrevivencia que ofrecen al paciente. Es por ello que nuevos medicamentos terapéuticos necesitan ser identificados para entonces cambiar el curso del panorama de esta enfermedad.

En los últimos años, la perspectiva en el desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer ha cambiado, de manera que el enfoque ha sido desplazado de buscar quimioterapias citotóxicas hacia la investigación de fármacos que se dirigen contra diversas alteraciones en los tumores. Se propone entonces que para que un fármaco nuevo sea eficaz e innovador, éste pueda tener un efecto inhibitorio contra más de uno de los eventos biológicos del cáncer ya ampliamente descritos en la actualidad y que de

esta manera pueda ser utilizado en varias de las etapas o estadios en el cáncer de próstata e inclusive como quimiopreventivo.

Finalmente, otra de las principales barreras a superar en la búsqueda de nuevas terapias, es la resistencia del fármaco antineoplásico, ya que es frecuentemente la causa del fracaso al tratamiento, además los fármacos actuales carecen de una especificidad contra las células tumorales, provocando que las células normales sean afectadas, causando múltiples efectos secundarios.

Es deseable entonces, que las nuevas estrategias como el aprovechamiento de los metabolitos secundarios encontrados en las plantas resuelvan estos problemas que podrían ser de gran beneficio al mejorar la calidad de vida de los pacientes con cáncer.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de un extracto con acetato de etilo de *Kalanchoe flammula* (KfAcOEt) en los principales eventos biológicos desarrollados por una célula próstata neoplásica, así como la caracterización fitoquímica del extracto.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A. Evaluación de la citotoxicidad del extracto/compuestos mayoritarios en una línea celular de cáncer de próstata (PC3) y en una línea celular normal de epitelio prostático (PrEC)

B. Evaluación del extracto con acetato de etilo de *Kalanchoe flammula* en los eventos neoplásicos del cáncer de próstata

In vitro

B.1 Resistencia a la muerte celular por apoptosis

B.2 Progresión del ciclo celular

In vivo

B.3 Efecto antitumoral en un modelo murino

C. Caracterización fitoquímica de un extracto con acetato de etilo de *Kalanchoe flammula*

A.1 Fraccionamiento del extracto

A.2 Purificación y elucidación de compuestos mayoritarios

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El presente proyecto se desarrolló en tres etapas (**Figura 8**), la primera etapa consistió de la evaluación del efecto biológico del extracto con acetato de etilo de *Kalanchoe flammula* (KfAcOEt) en la línea celular PC3 (Adenocarcinoma Prostático Hormono-independiente), así como el estudio de algunos eventos biológicos asociados a cáncer como: La resistencia a muerte celular, ciclo celular (*In vitro*), y el efecto antitumoral del extracto en un modelo murino (*In vivo*).

La etapa dos del proyecto incluyó el fraccionamiento bio-dirigido del extracto para obtener fracciones con efecto citotóxico selectivo en células de Cáncer de Próstata.

En la tercera etapa, la fracción y/o fracciones seleccionadas, se sometieron a un nuevo fraccionamiento y se procedió a evaluar su actividad citotóxica, para la posterior identificación de él ó los compuestos responsables de la actividad por diferentes métodos espectroscópicos.

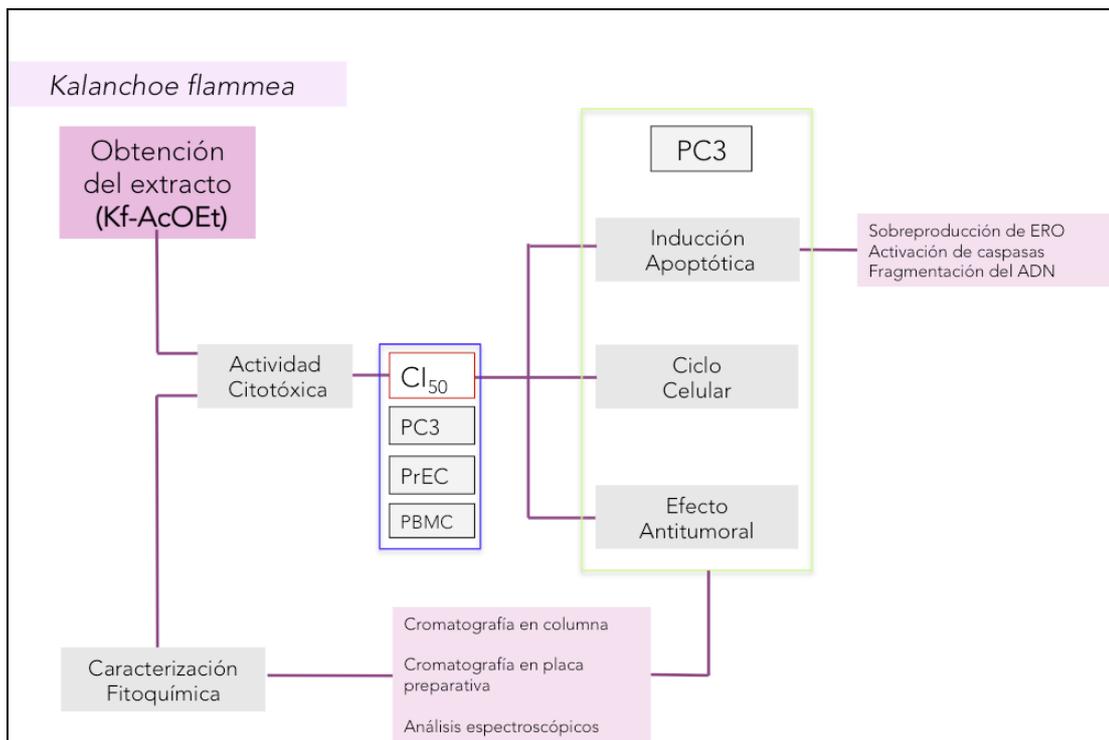


Figura 8. Estrategia experimental

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Evaluación de la citotoxicidad del extracto y sus fracciones en una línea celular de cáncer de próstata (PC3) y en una línea celular normal de epitelio prostático (PrEC).

6.1.1 Cultivo celular

Las líneas celulares que se utilizaron en esta investigación fueron PC3, las cuales son células de Adenocarcinoma de Próstata Grado IV proveniente de una metástasis lumbar y que son insensibles a los Andrógenos, negativo para α -Reductasa, tienen una mutación de delección de p53 y no expresan α -catenina (ATCC). Éstas células fueron cultivadas en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, y se mantuvieron en medio de cultivo RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Sigma), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco), 1 % de antibiótico – antimicótico (Gibco) a 37 °C en incubadora de CO₂ al 5% con 95% de humedad. La línea celular de epitelio prostático normal PrEC, son células consideradas como “normales” por su perfil genético de células prostáticas no cancerígenas, las cuales expresan p63, CK-8 y CK-18, que son características de células luminales y basales, así como son negativas a Receptores de Andrógeno y PSA y sin expresión de NKX3.1, éstas células se mantuvieron en medio basal para epitelio prostático (Lonza PrEBM), con suero fetal bovino (15%) y factores de crecimiento como PBE, hidrocortizona, hEGF, epinefrina, insulina, triiodotironina, transferrina, gentamicina/anfotericina-B y ácido retinoico (Lonza PrEGM) a 37 °C en incubadora de CO₂ al 5% con 95% de humedad.

6.1.2 Almacenamiento y congelamiento

Las líneas celulares fueron guardadas en medio de congelación (suero fetal bovino y DMSO (Dimetil Sulfoxido, Sigma) al 10%) a -80 °C en crioviales de congelación. Para descongelar las células, se colocó el criovial en Baño María a 37 °C y una vez descongelado, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min con medio de cultivo suplementado con suero en relación 1:1.

6.1.3 Evaluación de la citotoxicidad

Este procedimiento se realizó usando la técnica de MTT, la cual es una técnica colorimétrica clásica para la determinación de viabilidad celular, esta se realizó de la siguiente manera:

6.1.3.1 Técnica de MTT

El fundamento de esta técnica, se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizado por enzimas mitocondriales como la succinato-deshidrogenasa, metabolizándolo en su forma insoluble de color púrpura denominado formazán, permitiendo de esta manera; comprobar la funcionalidad mitocondrial de células expuestas a un agente (Mossmann, 1983). El producto de la reacción es retenido en las células y puede ser liberado al solubilizarlo con DMSO. De esta forma es posible cuantificar la cantidad de MTT metabolizado al detectar un cambio colorimétrico que es producido como consecuencia (cambio de coloración de amarillo al violeta). La reproducibilidad y sencillez del método lo convierte en una técnica ampliamente utilizada para la evaluación de la supervivencia celular frente a la exposición a un compuesto que se evalúa (extracto, fármaco, etc.), de tal manera que la cantidad de células vivas será proporcional a la cantidad de formazán producido (Eisenbrand *et al.*, 2002).

6.1.3.2 Procedimiento

El procedimiento fue realizado en placas de 96 pozos, donde, de cultivos confluentes se cosecharon las células con tripsina al 0.1%, se re-suspendieron y fueron centrifugadas a 1500 rpm por 5 min, y así determinar mediante un conteo celular con cámara de Neubauer, el número de células requeridas a sembrar por pozo. Realizado este procedimiento, se sembraron 8000 células en un volumen final de 100 μ L de medio dependiendo de la línea celular utilizada. Después de sembrar en las placas, se permitió su adherencia al incubar por 24 h en condiciones de 37 °C y 5% de CO₂.

En todos los ensayos que involucren el uso del extracto con acetato de etilo de *Kalanchoe flammula*, este será denominado extracto KfAcOEt para un fácil entendimiento.

Entonces, las diluciones del extracto KfAcOEt fueron preparadas previo a cada ensayo realizado. Éstas fueron disueltas en DMSO a una concentración final de 0.1 % (concentración no tóxica para las células) en medio correspondiente con suero fetal bovino y finalmente fueron agregadas en los pozos con células de tal manera que al añadir 100 µL de la muestra problema ésta contuvo las concentraciones desde 200 µg/mL hasta 3.125 µg/mL En pozos control negativo se utilizó el vehículo donde se disolvió el extracto (DMSO 0.1%) y como control positivo se utilizaron pozos con Docetaxel (fármaco de referencia).

Posteriormente las placas fueron incubadas nuevamente a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂ durante 24 h. Al término de este tiempo, el tratamiento fue retirado y los pozos fueron lavados con PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) para eliminar cualquier residuo y se les adicionó 100 µL de MTT (1X = 5 mg/mL disuelto en medio correspondiente, sin suero) a cada pozo. Se incubaron las placas por 4 h a 37 °C en la incubadora, para permitir la metabolización y formación de cristales de formazán en condiciones de oscuridad. Finalmente el sobrenadante fue eliminado de cada pozo por succión, se agregó 100 µL de DMSO al 99.6% a cada pozo para solubilizar los cristales de formazán y se homogenizó con movimientos giratorios suaves. Se obtuvieron los datos de absorbancias de cada uno de los tratamiento mediante el uso de un espectrofotómetro Epoch, BioTek a una longitud de onda de 570 nm.

6.1.3.3 *Análisis de los resultados*

Las pruebas fueron realizadas en tres repeticiones independientes por triplicado. Con los valores de absorbancias obtenidos se calculó el porcentaje de viabilidad celular con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{D. O. Células tratadas}}{\text{D. O. Células control}} \times 100$$

Donde la densidad óptica (D. O.) de las células tratadas corresponde a cada tratamiento (extracto KfAcOEt, Docetaxel, etc.) y la densidad óptica de las células control corresponde al vehículo utilizado (DMSO 0.1%). A partir de los datos

calculados del porcentaje de viabilidad correspondiente a cada concentración del extracto, se calculó el valor de la CI_{50} (Concentración Inhibitoria a la cual la muestra problema reduce la viabilidad celular en un 50% de la población total) mediante el uso del programa GrapPad Prism Versión 5.0 haciendo un análisis de regresión no lineal (porcentaje de viabilidad contra el logaritmo de la concentración) (Denizot *et al.*, 1986).

6.2 Efecto del extracto con acetato de etilo de *Kalanchoe flammula* contra algunas características de una célula neoplásica de próstata

6.2.1 Análisis del efecto en la progresión del ciclo celular

Esta evaluación se realizó utilizando el kit comercial Cell Cycle Analysis Kit (Biovision), el cual está diseñado para el análisis del ciclo celular. El principio de esta técnica se basa en el ciclo celular, el contenido de ADN de las células varía durante las diferentes etapas del ciclo. Usando colorantes para teñir el ADN y obtener las señales usando citometría de flujo, se puede calcular el porcentaje de células en las fases G₀/G₁, S, y G₂/M. En el caso de las células apoptóticas, el ADN es degradado por nucleasas endógenas y se difunde fuera de las células; esto da como resultado una señal o sub-pico cercano a donde se encuentra la señal de la fase G₁. Este kit incluye una solución de RNasa que ayuda a degradar el ARN presente en las células, para que de este modo, el colorante usado para teñir, se usa exclusivamente al ADN del núcleo.

6.2.1.1 Procedimiento

Se sembraron las células tumorales en cajas Petri de 60 mm a una densidad de 1.5×10^6 células, después de 24 h de permitir su adherencia, se trataron con el extracto KfAcOEt por tiempos de 6, 12 y 24 h. Al final de cada tratamiento, se recolectaron las células tanto adheridas como no adheridas en tubos para centrifuga de 15 mL y se lavaron con PBS 1X y posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min. Al término se resuspendieron las células en un mínimo contenido de PBS 1X, se fijaron agregando Etanol al 80% e incubaron a 4° C toda la noche. Después de la incubación, las células fueron centrifugadas a 1500 rpm por 5 min y se descartó el Etanol, se le adicionó PBS 1X, se resuspendieron para lavarlas y se centrifugó nuevamente a 1500 rpm por 5 min descartando el sobrenadante. Al botón de células formado, se le

agregaron 100 μL de RNAsa A y se resuspendieron para colocar la suspensión celular en tubos de citometría e incubando a 37° C por 30 min. Posteriormente se les añadió 400 μL de Ioduro de Propidio y se incubaron las muestras a 4° C por 30 min, protegidas de la luz. Finalmente éstas fueron analizadas en un Citómetro de Flujo FACS Calibur (Becton Dickinson) a una longitud de onda de 488 nm de excitación. Se obtuvieron los datos de 30,000 células por cada condición experimental para su posterior análisis.

6.2.1.2 *Análisis de datos*

Los datos fueron analizados con el programa ModFitLT (Verily Software House) para obtener los histogramas de la distribución celular en las diferentes fases del ciclo celular.

6.2.2 *Evaluación del efecto del extracto KfAcOEt en la resistencia a la muerte celular por apoptosis*

6.2.2.1 *Determinación de la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno*

El compuesto denominado 2',7',-Diclorofluorescein diacetato (DCF-DA) es usado como un detector de especies reactivas de oxígeno. El fundamento de esta técnica se basa en que de acuerdo a su estructura química, este compuesto no emite fluorescencia, pero cuando es químicamente reducido por el peróxido de hidrógeno dentro de la célula por un proceso de oxidación celular se vuelve fluorescente y puede ser detectado por citometría de flujo. Una modificación comercial de la estructura del compuesto hacia un derivado clorometil (CM-H₂DCFDA) lo hace altamente eficiente para internalizarse en la célula mediante difusión pasiva y éste exhibe una mejor retención dentro de la célula viva ya que al momento en que ingresa a la célula, sus grupos acetatos son escindidos por estereasas intracelulares y su grupo clorometilo-tiol reactivo reacciona con el glutatión intracelular y otros tioles.

6.2.2.1.1 Procedimiento

Para este método, se sembraron las células PC3 en placas de 6 pozos a una densidad de 3×10^5 células en medio RPMI suplementado. 24 h después de permitir su adherencia, éstas se trataron con el extracto KfAcOEt a la CI_{50} por 3, 6 y 12 h y 24 h. Al término de este tratamiento, las células fueron lavadas con PBS 1X, despegadas con tripsina al 0.1% y posteriormente centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. Se lavaron con PBS 1X nuevamente y se resuspendieron en 500 μ L de RPMI sin suero con 5 μ M de CM-H₂-DCFDA (Invitrogen) previamente disuelto en este medio, y se incubaron las células por 30 min a 37°C en oscuridad. Al término de este periodo de incubación, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante para posteriormente resuspender la pastilla celular en 500 μ L de amortiguador de flujo (0.05% BSA, 2 mM EDTA en PBS 1X, pH 7.2). Finalmente cada condición experimental se depositó en tubos de citometría para obtener los datos de las muestras en un Citómetro de Flujo FACScan (BD Biosciences) (Ex=488 nm, Em=530 nm).

6.2.2.1.2 Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa CellQuest (BD Sciences) para obtener los histogramas, así como el promedio de la intensidad de la fluorescencia relativa para posteriormente graficarlos.

6.2.2.2 Evaluación de proteínas activadoras de la apoptosis

Para definir como ocurren algunos eventos claves del proceso de apoptosis en la línea celular de PC3 expuesta al extracto con acetato de etilo de *Kalanchoe flammula* (KfAcOEt), se determinaron los niveles de expresión de algunas proteínas que se encuentran implicadas en este proceso, mediante una cinética de tiempo y por Western Blot. En un trabajo previo, ya se habían evaluado algunas proteínas como Caspasa-10,-8, XIAP y PKC ϵ (Arias, 2011). Por lo tanto las que se detectaron en esta investigación fueron:

Pro-apoptóticas: Citocromo C

Caspasa efectora: Caspasa-3

Inhibidoras de apoptosis: Bcl-2

6.2.2.2.1 Procedimiento

Se realizó el seguimiento de la expresión, localización y activación de estas proteínas a los tiempos de 3, 6, 12, 24 y 48 h de exposición con la CI_{50} del extracto KfAcOEt con la técnica de Western Blot en las células PC3. Para ello, primero se sembraron las células a una densidad de 8×10^6 en cajas de Petri (100 x 20 mm) y después de 24 h de permitir su adherencia se agregó el extracto. Transcurrido cada uno de los tiempos de tratamientos, tanto las células adheridas, como no adheridas fueron colectadas y centrifugadas en un tubo para centrífuga de 15 mL. Una vez obtenido el botón celular, se procedió a lisar las células de cada condición, para la obtención de proteínas totales usando 200 μ L de un amortiguador de lisis frío (4° C) (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF (AMRESCO) y 1x de Inhibidor de proteasas (Complete Mini, EDTA free, Roche) para cada uno y se incubó en hielo por 10 min. Al término de la incubación, el lisado celular fue colectado y colocado en un microtubo de 1.5 mL y el lisado se hizo pasar diez veces a través de una jeringa con aguja de calibre 21 para romper los agregados celulares y así obtener un mejor lisado. Para separar las proteínas de los agregados, se centrifugaron los lisados a 14 000 rpm por 20 min en una microcentrífuga refrigerada a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y las proteínas fueron almacenadas a -80° C hasta su uso.

Para la detección del Citocromo C, se hizo una extracción diferencial de proteínas para obtener exclusivamente proteínas citoplásmicas, esto se realizó mediante el uso del compuesto Digitonina (Sigma), un detergente no iónico capaz de disolver el colesterol de las membranas celulares, dejando intactas las membranas mitocondriales y nucleares. Para tal efecto, se sembraron células PC3 a una densidad de 1.5×10^6 , después de permitir su adherencia, fueron tratadas durante 3, 6, 12, 24 y 48 h con la CI_{50} del extracto KfAcOEt (). Al finalizar cada tratamiento, se lavaron las células con PBS 1X y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min. El botón celular fue resuspendido en un amortiguador CFS (10 mM HEPES NaOH pH 7.4, 220 mM Manitol, 68 mM Sacarosa, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM NaCl, 2.5 mM H_2KPO_4 , 0.5 mM EGTA, 0.5 mM Piruvato de Sodio y 0.5 mM L-glutamina) conteniendo 0.02% de Digitonina (Sigma), se incubó un minuto en hielo y posteriormente se centrifugó a 20800 g a 4°C. El sobrenadante fue colocado en un microtubo nuevo (fracción citosólica) y el botón formado (mitocondrias y nucleos celulares) fue sometido a una lisis total, como al principio se describió y esta fue considerada como la fracción mitocondrial (Krysko *et al.*, 2008).

La concentración de proteínas de las muestras fue determinada por el método del ácido bicinonínico, usando el kit comercial Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Una cuantificación de proteínas se realiza al comparar muestras desconocidas con una curva estándar de concentración conocida. Para ello se realizó una curva estándar con Albúmina Sérica Bovina (BSA) a concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 y 2 mg/mL, las muestras de las proteínas fueron diluidas (1/10) y puestas en placas de 96 pozos por triplicado, junto con los reactivos de acuerdo a las instrucciones del kit y se incubaron por 30 min, al final se obtuvieron los valores de absorbancias, al leer las muestras a una longitud de onda de 570 nm en un espectrofotómetro. Los valores de la concentraciones proteicas fueron calculadas al interpolar los valores de las muestras en la curva estándar de BSA mediante una regresión lineal y con los datos de la ecuación correspondiente.

Una vez realizada la cuantificación, a los extractos proteicos obtenidos en el procedimiento anterior se les agregó un amortiguador de carga 4X (12% SDS, 25% Glicerol, 150 mM Tris-HCl pH 7.0, 0.05% Azul de bromofenol, 6% β -Mercaptoetanol), en una proporción 3:1 y fueron incubadas a 100°C por 5 min en Baño María para su desnaturalización. Las proteínas fueron separadas por el método SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis), el porcentaje del gel separador usado varió del 10 al 15 % y el gel concentrador al 4%. Para un gel al 12% se usaron los siguientes reactivos: 4.3 mL de H₂O bidestilada, 2.5 mL de Tris HCl 1.5 M pH 8.8, 100 μ L de SDS 10%, 3 mL de Acrilamida/Bis acrilamida al 40%, 100 μ L de APS, 10% y 10 μ L de TEMED. Para un gel al 4% se utilizaron las siguientes cantidades de reactivos: 3.2 mL de H₂O bidestilada, 1.25 mL de Tris 0.5 M pH 6.8, 50 μ L de SDS 10%, 500 μ L de Acrilamida/Bis acrilamida al 40%, 50 μ L de APS 10%, 5 μ L de TEMED. Para evitar deformaciones en la polimerización del gel separador se le añadió un frente de 0.5 mL de etanol, al polimerizar se retiró el etanol, se añadió el gel concentrador y antes de que este polimerizara se le colocó un peine que ayudó a formar los carriles. Los geles se polimerizaron en el sistema de electroforesis MiniPROTEAN 3 (Bio-Rad).

Se cargó de 50 a 80 μ g de proteína (dependiendo de la proteína a detectar) en cada carril y siempre en el primer carril se colocó un marcador de peso molecular de amplio espectro 10 – 250 kDa (Dual Color, Bio-Rad) para que en los carriles posteriores se colocaran las diferentes condiciones de tratamientos. Las proteínas fueron separadas con un amortiguador de corrimiento electroforético (Tris-HCl 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS 1% y H₂O bidestilada), aplicando una intensidad de 120 V durante 90 min para

permitir la separación adecuada de las proteínas de acuerdo a sus diferentes pesos moleculares (adicionalmente se hizo un corrimiento electroforético para teñir el gel con azul de Coomassie y observar la integridad de las proteínas). Posterior a ello, las proteínas en el gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 μm (Bio-Rad) la cual fue cortada en medidas de 6 x 8.5 cm e hidratada previamente en un amortiguador de transferencia a 4°C (Tris-HCl 0.025 M, Glicina 0.192 M, 20% de metanol y H₂O bidestilada) el cual fue también usado para realizar la transferencia en un sistema húmedo, aplicando una intensidad de 300 mA por 90 min a 4°C. Previo a la transferencia, la membrana de nitrocelulosa y el gel que contiene las proteínas fueron acomodadas de tal manera que junto con papeles filtro y esponjas de 0.75 cm de grosor se formará un “sandwich”, el acomodo es realizado para que las proteínas del gel migren del ánodo hacia el cátodo. La transferencia húmeda fue realizada en el sistema Mini-Trans Blot Cell System (Bio-Rad). Al término de la transferencia, se colocó la membrana en Rojo Ponceau, un colorante con afinidad a teñir las proteínas, para verificar la eficiencia de la transferencia, dejándose algunos segundos y posteriormente se lavó la membrana con H₂O bidestilada hasta eliminar por completo el colorante. A continuación, la membrana fue bloqueada durante 1 h en solución bloqueadora (TBS – Tween 0.05%, 5% leche reducida en grasa) a temperatura ambiente. Al término de la incubación, se retiró esta solución por completo y se hicieron tres lavados con TBS– Tween 0.05% de 10 min cada uno a temperatura ambiente. Al final de los lavados se realizó la incubación con el anticuerpo primario diluído en TBS-Tween 0.05% y 5% de Albúmina Serica Bovina (Roche) a 4°C durante toda la noche en constante agitación (Zhi-Gang *et al.*, 2008). Las diluciones de los anticuerpos primarios fueron los siguientes:

Anticuerpo (Proteína de interés)	No. Cat. Sta. Cruz Biotechnology	Dilución
β -Actina policlonal	SC-1615	1:1500
α -Tubulina monoclonal	SC- 55552	1:1000
Caspasa-3 policlonal	SC- 56053	1:800
Citocromo C	SC-13560	1:1000
Bcl-2	SC-65392	1:500

Posterior a la incubación con el anticuerpo primario, se hicieron tres lavados con TBS–Tween 0.05% de 10 min cada uno a temperatura ambiente. A continuación, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario correspondiente por 1 h a temperatura ambiente en constante agitación. Al término de la incubación, se hicieron nuevamente tres lavados con TBS–Tween 0.05% de 10 min cada uno a temperatura ambiente.

El sistema de detección utilizado fue por quimioluminiscencia (ECL), con el kit SuperSignal West Pico (Thermo Scientific), el cual consta de Luminol y Peróxido, éstos son mezclados en relación 1:1 y reaccionan con los anticuerpos secundarios conjugados con Peroxidasa de Rábano (HRP). Finalmente se usaron placas autorradiográficas (Kodak) para la impresión de la señal.

6.2.2.3 Determinación de fragmentación oligonucleomal

Existen diversos métodos para detectar la degradación del ADN asociada a la apoptosis. Entre los métodos más usados se encuentran el ensayo de escalera del ADN y TUNEL. Se realizaron ambos ensayos para confirmar dicho evento.

6.2.2.3.1 Ensayo de la escalera del ADN

Se sembraron 6.5×10^6 células PC3 en cajas de Petri (100 mm). Después de 24 h de adaptación celular, se colocó el tratamiento con el extracto KfAcOEt a la CI_{50} , durante 12, 24 y 48 h, se lavaron las células con PBS 1X y fueron recolectadas por tripsinización para finalmente ser centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. Las células fueron lisadas con 100 μ L de DMSO, el cual fue agregado directamente al botón celular y agitado con un vortex. Posteriormente 100 μ L de SDS (2%) fue agregado junto con TE (Tris-EDTA, pH 7.4), sin dejar de vortexear. El lisado fue centrifugado a 13 000 rpm a 4° C y el sobrenadante fue colocado en un nuevo tubo.

6.2.2.3.1.2 Electroforesis

La finalidad de la electroforesis es separar los fragmentos de ácidos nucleicos, para detectarlos con bromuro de etidio y posteriormente visualizarlos con luz UV. El proceso de separación es facilitado por la corriente eléctrica y con base en el tamaño molecular y

la carga. El medio más comunmente usado en la electroforesis horizontal es la agarosa. Se preparó el gel de agarosa al 2 % con el bromuro de etidio (0.8 – 2%) y se cargaron 25 µL de muestra + 2 µL de amortiguador de carga (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25% glicerol, 5 mM EDTA, 0.2% Azul de bromofenol, 0.2% Xileno cianol FF) (Bio Rad), incluyendo un marcador de peso molecular (Axygen), se corrieron las muestras en el gel a 100 V por 1 h, con la ayuda de un amortiguador TAE 1X. Al término del corrimiento el gel fue visualizado en un transiluminador con luz UV.

6.2.2.3.2 Ensayo de TUNEL

Para detectar fragmentación oligonucleosomal con el ensayo de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl tranferase dUTP nick end labeling), el cual es un ensayo con mayor sensibilidad que el ensayo de escalera, se utilizó el kit (In situ cell death detection kit, fluorescein, Roche), de acuerdo a las instrucciones de éste como se describe a continuación.

6.2.2.3.2.1 Procedimiento

Las células fueron sembradas en portaobjetos de cuatro pozos (Chamber slide system, Thermo Scientific) a una densidad de 1×10^4 células y se permitió su adherencia por 24 h. Posteriormente las células fueron tratadas durante 12 y 24 h con el extracto KfAcOEt con la CI_{50} . Al finalizar el tratamiento, las células fueron fijadas con Paraformaldehído en PBS 1X al 4% por 1 h a 37°C, se lavaron dos veces con PBS 1X y posteriormente fueron permeabilizadas con Triton X-100 en Citrato de Sodio 0.1% por 2 min en hielo. Después, las células fueron lavadas con PBS 1X e incubadas con la reacción de TUNEL que consta de los nucleótidos dUTP's y TdT (Terminal deoxynucleotydil transferase) a 37° C por 1 h. Posteriormente, se desmontaron los pozos para quedar exclusivamente los portaobjetos. Las células se lavaron dos veces con PBS 1X y fueron colocadas en medio de montaje VECTASHIELD (Vector Labs) con DAPI, con la finalidad de co-localizar los núcleos celulares; se les colocó el cubreobjetos y finalmente las muestras fueron selladas con esmalte transparente (González-Sánchez *et al.*, 2011).

6.2.2.3.2.2 Análisis de datos

Las muestras fueron observadas en un Microscopio de Fluorescencia (Nikon Eclipse 80i), con un objetivo de 40 x, a longitudes de onda de excitación para Fluoresceína (595 nm) y DAPI (365 nm).

6.3 Evaluación del efecto antitumoral en un modelo murino

Los modelos experimentales animales son una herramienta esencial en pruebas que ensayan nuevas terapias *in vivo*. Para esta evaluación, se utilizaron ratones NIH machos de la cepa nu/nu. Como característica biológica, no tienen timo y de esta manera, son incapaces de producir células T (inmunodeficiente); pero si tienen la capacidad de producir células B y NK (Natural Killer).

6.3.1 Procedimiento

Para este apartado se obtuvieron ratones nu/nu de 4 a 6 semanas de edad y estos roedores fueron adaptados en el Bioterio del INCan bajo las Normas Internacionales de Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (NOM 062-200-1999) con las condiciones óptimas de asepsia requeridas, en ambiente climatizado y con ciclos de luz (12 h luz – 12 h oscuridad). Los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar de laboratorio para roedores esterilizada con radiación gamma LabDiet® y tuvieron libre acceso al consumo de agua esterilizada. Posterior al acondicionamiento, se les inocularon células PC3 a una densidad de 1×10^6 . Para ello las células fueron resuspendidas en RPMI sin suero e inyectadas en el espacio interescapular de los ratones en una cantidad de 100 μ L de suspensión. Se esperó una semana para que las células se adaptaran y para que empezaran a proliferar para aumentar progresivamente su masa celular, al término de este tiempo se realizó un cuadro de tratamiento, en donde se formaron varios grupos experimentales de la siguiente manera: a) Testigo= Sin células /Sin tratamiento, b) Control del tamaño del tumor= Con células y sin tratamiento, c) Control positivo= Con células y tratamiento con Docetaxel, d) Experimental= Con células y tratamiento con el extracto KfAcOEt. Se realizó un cuadro de análisis del peso del animal y tamaño del crecimiento tumoral. La vía de administración del extracto KfAcOEt fue intraperitoneal y las dosis fueron

administradas cada tercer día hasta completar siete dosis. El extracto fue disuelto en DMSO 4% y administrado en un volumen final de 100 μ L. Se sacrificaron los ratones, el día posterior de la última dosis, se extrajeron los tumores para ser pesados y medidos. Después las muestras de los tumores fueron depositados en RNA later (Sigma-Aldrich) y los órganos (Hígado, Bazo y Riñón) en una solución de Formaldehído en PBS 1X al 10% para su posterior análisis histopatológico.

6.3.2. Tinción con Hematoxilina-Eosina (H&E) de cortes histológicos de órganos de ratones de los diferentes grupos experimentales

Las muestras fueron embebidas en parafina, para realizar los cortes (4 μ m) con un Microtomo. Posterior a ello se desparafinaron los cortes a 65°C por 15 min con dos cambios de xilol por 3 min, se rehidrataron los tejidos en baños decrecientes de etanol (absoluto, 95 y 70%) por 3 min cada uno y se enjuagaron con dos baños de agua común por 5 min cada uno. Los tejidos se colorearon con una solución de hematoxilina alumínica de Harris durante 10 min y se realizaron dos lavados con agua destilada por 1 min cada uno. Para eliminar el exceso de colorante, se utilizó una solución de alcohol ácido y se realizó un último enjuague de 2 min con agua corriente. Para virar la hematoxilina a un color azul, se utilizó una solución de bicarbonato de sodio al 2% durante 5 min, se lavó con agua corriente por 5 min y finalmente con dos baños de agua destilada.

La coloración con una solución alcohólica de eosina se realizó durante 5 min y se enjuagó el exceso con 2 lavados con agua destilada por 1 min cada uno y se realizó un último enjuague de 2 min con agua corriente. Se realizó una deshidratación rápida sumergiendo las laminillas con los tejidos en alcohol etílico de diferentes grados (50, 70, 90 y 100%) durante 1 min cada uno y se aclararon con 2 baños de Xilol, de 1 y 2 min, respectivamente. Concluido el proceso, se realizó el montaje de las laminillas con medio de montaje Tissue-Tek[®] Glas 6419 colocando 200 μ l del medio de montaje y cubriendo con cubreobjetos limpios y libres de polvo, cuidando que no queden burbujas de aire entre el tejido y el cubreobjetos. Las laminillas con medio de montaje se dejaron secar durante 24 h para posteriormente visualizarlas al microscopio óptico (Lee, 1968).

6.4 Ensayo de Genotoxicidad in vivo: Micronúcleos

Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas y/o cromosomas completos que se forman de manera espontánea o por causa de agentes que los fragmentan. Después de la telofase, los cromosomas normales y fragmentos que posean telómeros originan los núcleos de las células hijas, sin embargo, los elementos rezagados por acción de mutágenos, sean fragmentos o cromosomas completos, quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas y una proporción de ellos se transforma en uno o varios núcleos secundarios más pequeños que el núcleo principal y de esto se deriva el nombre de Micronúcleos.

6.4.1 Procedimiento

Para llevar a cabo este ensayo, se utilizaron ratones de la cepa BALB/c machos (22 ± 2 g), los cuales fueron mantenidos en el Bioterio de la ENMyH. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y los animales estuvieron bajo condiciones ambientales con fotoperiodos de 12 horas de luz-oscuridad y mantenidos a libre acceso de alimento (LabDiet®).

El extracto KfAcOEt se disolvió en propilenglicol ajustando la concentración a 1000 ó 100 mg/kg con un volumen de administración de 0.1 mL por ratón, por vía oral (v. o.); previamente a la administración, los animales se mantuvieron en ayuno de 8 h. El ayuno continuó durante 2 h posteriores al tratamiento y después de 48 h se tomaron muestras sanguíneas para la determinación de los micronúcleos. Cada grupo (n=5) se evaluó por triplicado y se utilizó como control de vehículo propilenglicol (0.1 mL/ratón), agua como control negativo (0.1 mL/ratón) y Ciclofosfamida como control positivo (50 mg/kg por vía intraperitoneal (I. P.)). Para la determinación de micronúcleos se utilizó el Kit MicroFlow (Litron Laboratories) el cual contiene anticuerpos anti-CD71, anti-plaquetas, RNAsa, yoduro de propidio y estándares biológicos (Control positivo, negativo, CD71 negativo y muestras infectadas con malaria). Las muestras de sangre periférica de los ratones tratados, se obtuvieron por corte de una pequeña sección de la cola de los ratones. Aproximadamente 120 μ L de sangre se colocaron en un tubo con 350 μ L de solución de heparina y se mantuvieron a temperatura ambiente durante no más de 3 h. Para la fijación de las muestras se colocaron 180 μ L de la sangre

heparinizada dentro de un tubo de polipropileno que contenía 2 mL de metanol pre enfriado a -80°C, las muestras se agitaron con ayuda de un vortex y posteriormente fueron almacenadas a -80°C. Después de una semana las muestras se retiraron del ultracongelador y se lavaron con 12 mL de solución amortiguadora (4°C) incluida en el kit. Posteriormente, las células se recuperaron centrifugando los tubos a 600 x g por 5 min y se conservaron a 4°C, luego se resuspendieron con ayuda de un vortex. Se tomaron alícuotas de 20 µL de células fijadas y se incubaron en 80 µL de solución de RNasa, anti-CD71 y anti-plaquetas a 4°C por 30 min y posteriormente a temperatura ambiente por 30 min para asegurar la degradación del ARN. Finalmente, estas muestras se diluyeron con 2 mL de solución de yoduro de propidio, se analizó la presencia de reticulocitos micronucleados (MN-RETs) y micronúcleos en la población de eritrocitos normocromáticos maduros (MN-NCE) en muestras de sangre periférica. Las células de interés (RET y NCE) fueron marcadas con un anticuerpo conjugado FITC dirigido contra un antígeno de superficie celular (receptor de transferrina CD71). Las células micronucleadas fueron detectadas con respecto a la fluorescencia producida después de la tinción con yoduro de propidio, todos estos parámetros fueron analizados utilizando un Citómetro de Flujo FACS Calibur (BD Biosciences).

6.4.2 Análisis de datos

Se calculó el promedio y el error estándar de:

$$\% \text{ RET} = (\% \text{MN-RET} + \% \text{RET}) / (\% \text{MN-RET} + \% \text{RET} + \% \text{MN-NCE} + \% \text{NCE}) * 100$$

$$\% \text{ MN-RET} = (\% \text{MN-RET}) / (\% \text{MN-RET} + \% \text{RET}) * 100$$

$$\% \text{ MN-NCE} = (\% \text{MN-NCE}) / (\% \text{MN-NCE} + \% \text{NCE}) * 100$$

donde, RET= Reticulocito; NCE= Eritrocito normocromático maduro y MN= micronúcleo para cada tratamiento.

Los resultados del Ensayo de Micronúcleos se reportan de acuerdo al siguiente criterio: Un extracto, fracción o compuesto es clasificado como genotóxico si induce un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de micronúcleos, respecto al nivel del grupo control no tratado. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPadPrism5.0 (GraphPad Software, Inc.) por medio de un análisis de

varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba *post hoc* de Newman-Keuls, valores de $*p \leq 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos (Cammerer *et al.*, 2007).

6.5 Ensayo de Toxicidad aguda: Prueba TG 423 o Dosis letal (DL)

Esta técnica está basada en un procedimiento por etapas en las que se utiliza el número mínimo de animales que permite obtener información suficiente sobre la toxicidad aguda de una sustancia para permitir su clasificación. La sustancia se administra por vía intragástrica (v.i.g.) a un grupo de tres animales en una de las dosis definidas. La ausencia o presencia de mortalidad en los animales tratados determinará el siguiente paso. Por lo que no se requieren más pruebas, únicamente la administración de otros tres animales en el nivel de dosis inmediatamente superior o inferior, de ser necesario. Este método permite emitir un juicio con respecto a la clasificación de la sustancia de ensayo, colocándolo en uno de los grupos de toxicidad definidos por valores de dosis letal (DL) preestablecidos.

6.5.1 Procedimiento

Este experimento se realizó de acuerdo al procedimiento TG 423 de la OECD como se describe a continuación. Los ratones de la cepa CD-1 machos de 18 ± 2 g adquiridos en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores campus Iztacala de la UNAM, fueron llevados al Bioterio de la ENMyH y tratados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y también de acuerdo a la Norma para su Sacrificio Humanitario (NOM-033-ZOO-1995). Éstos fueron mantenidos bajo condiciones ambientales con libre acceso a alimento (Rodent Diet™) y agua, con fotoperiodos de 12 h de luz por 12 de oscuridad. El extracto KfAcOEt fue disuelto en DMSO (Sigma Aldrich) ajustando la concentración a un volumen de administración de 0.1 mL por ratón por vía intra-gástrica. Antes de la administración, los animales se encontraron en ayuno de 8 h y este continuó durante 2 h posteriores al tratamiento.

Los grupos de 3 animales machos fueron administrados con una sola dosis del extracto KfAcOEt, comenzando a 2000 mg/kg y disminuyendo gradualmente a 300, 50 y 5 mg/kg en caso de presentarse muerte de 2 o más animales en cada dosis. El estado

de salud general de los animales fue observado después de 1, 2, 4 y 6 h y una vez diariamente por 14 días. Los animales fueron también observados después del tratamiento para detectar cualquier signo de toxicidad o incluso la muerte. Al final del periodo de observación, los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO₂.

6.5.2 Análisis de datos

Los órganos principales como el pulmón, riñones, corazón, estómago, intestinos, bazo e hígado fueron extraídos y observados macroscópicamente en busca de lesiones celulares macroscópicas y patológicas. El valor de DL fue determinado de acuerdo al Globally Harmonised Classification System (GHS) (OECD, 2014).

6.6 Caracterización fitoquímica de un extracto con acetato de etilo de *Kalanchoe flammula*

El proceso para la búsqueda de compuestos de origen natural comienza desde la extracción del producto del recurso natural, su posterior concentración y haciendo uso de técnicas de separación como el fraccionamiento en columna, obtener finalmente la purificación de una o varias moléculas biológicamente activas. En la actualidad, las técnicas de elucidación permiten la identificación de compuestos ya conocidos; el uso de sistemas de HPLC acoplado a espectrometría de masas (LC-MS) y las bases de datos de productos naturales, ayudan a la identificación de éstas moléculas.

La determinación *De Novo* de estructuras de compuestos que no han sido descritos, se ha visto revolucionado por los avances en el mejoramiento de las técnicas espectroscópicas, particularmente en alta resolución de tecnologías como la Resonancia Magnética Nuclear. La determinación de estructuras complejas, es un punto que está cambiando técnicamente y ya no es una limitante en el proceso del descubrimiento de nuevos fármacos. Una ventaja actual, es que en aquellos casos en los cuales el perfil de actividad biológica de un compuesto cumple con los criterios de potencia y selectividad, estudios preliminares de relación estructura-actividad (SAR) pueden ser realizados para un posterior proceso de purificación y escalamiento y así establecer su actividad biológica (Saklani y Kutty, 2008).

6.6.1 Separación de compuestos obtenidos de fracciones biológicamente activas

La Cromatografía en Placa Preparativa, es una técnica cromatográfica líquida que es utilizada con el objetivo de aislar compuestos, en cantidades de 10 a 1000 mg, con la finalidad de posteriormente elucidar su estructura química por métodos espectroscópicos (Espectrometría de masas, Resonancia Magnética Nuclear, Infrarojo, Ultravioleta, etc.), o ya sea para otros propósitos analíticos, al igual que la determinación de su actividad biológica. En la cromatografía en placa preparativa que se realiza de manera clásica, la fase móvil migra por acción de capilaridad, de tal manera que el flujo forzado es usado y la migración de la fase móvil también es promovida por la aplicación de una presión externa. La eficiencia es obtenida por el uso de una fase móvil óptima es independiente del grosor de la placa y el tipo de fuerza aplicada. Una de las variables experimentales más importantes en la cromatografía en placa preparativa es el espacio de vapor, debido a que el proceso de separación ocurre en un sistema trifásico de fases estacionaria, móvil y fases de vapor, las cuales interactúan hasta que un equilibrio es alcanzado. Aunque hay placas disponibles que se encuentran cubiertas de alúmina, celulosa, C2 y C18 de fase reversa, la sílica ha sido la más empleada. Los materiales de sílica comúnmente usados para este tipo de cromatografía contienen partículas de un promedio de $\sim 2.5 \mu\text{m}$ y una distribución con un rango de entre 5 y $40 \mu\text{m}$ que es considerado como amplio. Las placas preparativas pre-cubiertas, de 20 cm x 20 cm o de 20 cm x 40 cm con un grosor de 0.5, 1.0, 1.5, y 2 mm tienen la ventaja de ser altamente reproducibles aunque es generalmente aceptado que las placas preparativas de menor grosor (0.5 – 1.0 mm) tienen una mayor resolución que las placas de mayor capacidad de carga (1.5 – 2 mm), lo cual es muy importante considerar ya que la capacidad de carga de una placa de 0.5 mm es aproximadamente la mitad de lo que tiene una de 2 mm (Nyireddy, 2000).

6.6.1.1 Procedimiento

Es importante mencionar que para este procedimiento, previamente en nuestro laboratorio el extracto KfAcOEt ya había sido fraccionado; las fracciones fueron también evaluadas en las línea celulares neoplásicas PC3 y en células no cancerosas (PrEC, Linfocitos) (Angles, 2014). Con base a los resultados obtenidos, fueron seleccionadas las fracciones 4 y 8 para su separación por cromatografía en placa

preparativa, para ello se utilizaron placas de vidrio PLC Silica gel 60 F₂₅₄ 20 x 20 cm, de 2 mm de grosor (Merck, Millipore), se marcaron los límites de la placa (2 cm, inferior y superior), considerando como punto de aplicación la línea inferior marcada. Se realizó la aplicación de cierta cantidad (el máximo permitido por absorción del mismo en la placa) de la fracción a separar de forma horizontal y continua a lo ancho de la placa. Posterior a la aplicación, se introdujo la placa preparativa en una cámara cromatográfica de vidrio de fondo plano con tapa de acero inoxidable (20 x 20 cm) de configuración N (CAMAG), donde previamente se colocaron 50 mL de la fase móvil (100% Acetato de Etilo). Cuando el frente del solvente alcanzó el límite superior, la placa fue retirada de la cámara y se dejó secar a temperatura ambiente; después fueron observados los metabolitos mediante un detector de luz UV a longitudes de onda corta (254 nm) y larga (365 nm). Las bandas que mostraron un patrón definido de separación fueron extraídas de la placa mediante un raspado cuidadoso de la sílica. Cada banda recuperada fue colocada en un matraz de 250 mL y se le agregaron 100 mL de Acetato de Etilo, este fue colocado en agitación constante por 15 min. Al final de este paso, se pasó a través de un filtro para eliminar los residuos de sílica y finalmente llevarlo a sequedad total con un rotavapor para eliminar el disolvente. Cada uno de los compuestos mayoritarios obtenidos fue almacenado a temperatura ambiente para la posterior evaluación de su actividad citotóxica.

De acuerdo al criterio de selección de los ensayos biológicos anteriores, el compuesto con actividad citotóxica, denominado KF8-3, fue elegido para la identificación de sus componentes, del cual se realizó una separación por un sistema de HPLC usando un cromatógrafo Agilent 1220 Infinity LC, equipado con un detector de arreglo de diodos y un sistema de bomba cuaternario. KF8-3, fue disuelto en metanol a una concentración de 2 mg/mL y filtrado con un filtro nylon de 0.45 µm; posteriormente este fue inyectado en el cromatógrafo. La separación de la muestra fue realizada usando una columna de sílica de fase normal ZORBAX Rx-SIL (250 x 4.6 mm; 5 µm) a 25° C con una elución de 100% de Metanol por 7 min; la fase móvil fue movida a una velocidad de flujo de 1 mL/min, y la curva-respuesta fue detectada a 220 nm mediante una lámpara de luz UV. Se obtuvieron tres compuestos observables en el cromatograma, los cuales fueron colectados en matraces de 250 mL para posteriormente llevarlos a sequedad y eliminar el disolvente con un rotavapor.

Una vez obtenida la cantidad suficiente de cada compuesto, éstas muestras fueron enviadas a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, donde fueron analizadas

espectroscópicamente en un equipo de Resonancia Magnética Nuclear de Protones, para la posible elucidación estructural del compuesto mediante una búsqueda bibliográfica de compuestos.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto del extracto KfAcOEt y compuestos mayoritarios en la viabilidad de células neoplásicas y no neoplásicas de cáncer de próstata

Uno de los primeros ensayos biológicos que se realizaron con el extracto KfAcOEt, fue evaluar su actividad citotóxica en dos líneas celulares de epitelio prostático: PC3 (Células de adenocarcinoma prostático hormono-independientes) y PrEC (Células de epitelio prostático no neoplásico). Adicionalmente, se realizó el ensayo en un cultivo primario de células mononucleares de sangre periférica enriquecido con linfocitos humanos (PBMC) como control. Los valores de tres experimentos independientes por triplicado obtenidos con la técnica de MTT son mostrados en las Tablas 1-3 (Promedio±D. Estándar). Las células tratadas con el vehículo (DMSO 0.1%), fueron consideradas como células control (100% viabilidad) para el cálculo del porcentaje de viabilidad y como control positivo (Docetaxel, fármaco de referencia en el tratamiento del Cáncer de Próstata y el Cisplatino para los linfocitos de sangre periférica, ya que el Docetaxel actúa a través del impedimento de la división celular y los linfocitos son células que no se encuentran en este estado de división celular, a menos de que se les estimule con fármacos o citocinas).

Los datos se muestran en las Figuras 9-11, donde se puede observar que las células PC3 tratadas con el extracto KfAcOEt a las 24 h de exposición muestran un efecto dosis-respuesta en la viabilidad (**Figura 9**). El análisis de varianza de una vía con una prueba de Bonferroni *post hoc* para una comparación múltiple, nos indicó que todas las concentraciones evaluadas muestran valores estadísticamente significativos comparándolos con las células control (DMSO 0.1%), sin embargo, al comparar sólo las concentraciones, no se encontraron diferencias significativas a partir de 12.5 µg/mL y hasta los 200 µg/mL (**Figura 9B**). Por otro lado, en células de epitelio prostático PrEC, aún cuando se mantiene este efecto dosis respuesta ejercido por el extracto KfAcOEt, en este tipo de células el efecto citotóxico es menor (**Figura 10**), a diferencia; el Docetaxel causa un daño mayor en este tipo de células, ya que su mecanismo de acción está basado en afectar células en estado proliferativo continuo. Con esto podemos considerar que el extracto es capaz de ejercer un efecto con cierto índice de selectividad de 93.35 (valor obtenido de dividir la CI_{50} de las células sanas entre el valor CI_{50} de las células

neoplásicas) hacia las células neoplásicas sobre células sanas, del cual si el valor es >1 indica que la sustancia es más citotóxica para las células neoplásicas que para las células sanas, y si es <1 , resulta lo contrario (Muller y Milton, 2012). Las concentraciones estadísticamente significativas con respecto a células control (DMSO 0.1%) fueron a partir de 25 - 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figura 10B**). El efecto de selectividad hacia las células neoplásicas se mostró más evidente cuando en linfocitos extraídos de sangre periférica expuestos al extracto KfAcOEt por el mismo tiempo de 24 h, de acuerdo a los datos del porcentaje de viabilidad calculados (**Figura 11A**), ninguna de las concentraciones evaluadas mostró un efecto citotóxico estadísticamente significativo con respecto a células control (DMSO 0.1%) (**Figura 11B**).

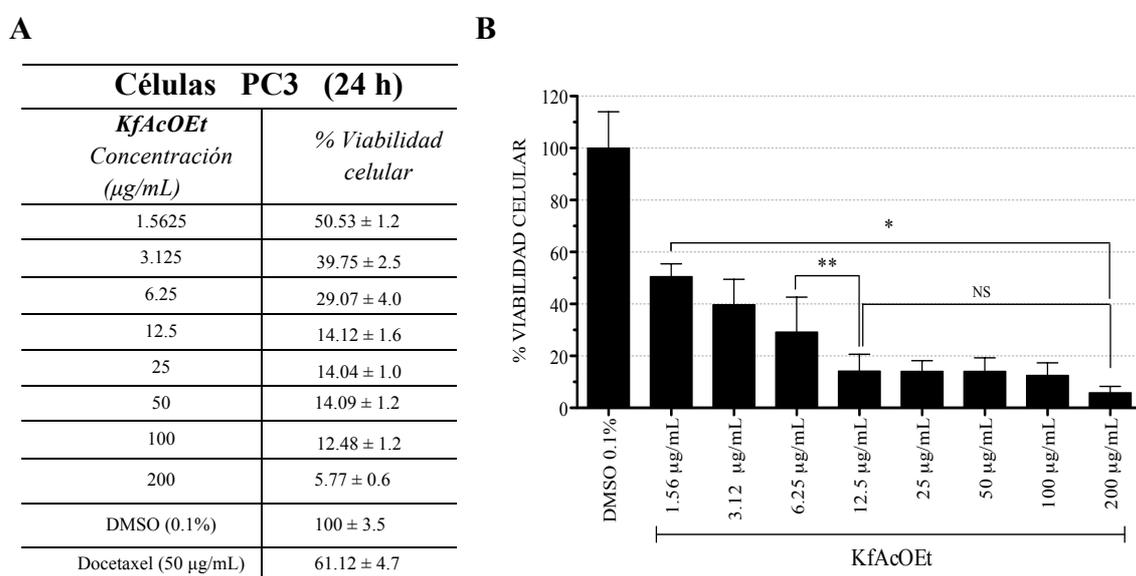


Figura 9. Efecto del extracto KfAcOEt en la viabilidad de células de cáncer de próstata (PC3) determinado con la prueba de MTT a 24 h de exposición en concentraciones crecientes. A) Porcentajes de viabilidad expresados como el Promedio \pm Desviación estándar. B) Porcentaje de viabilidad (Dosis-respuesta). * $p<0.05$ vs Control Negativo (DMSO 0.1%); ** $p<0.05$ vs concentración 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, NS: No significativo.

La capacidad de medir con precisión la concentración de una sustancia que se requiere para inhibir una función bioquímica ó biológica al 50% es de importancia en la clasificación de los compuestos; por ello, los valores de esta concentración fueron determinados realizando una gráfica de curva dosis respuesta con los valores de la inhibición de la viabilidad ejercida por el extracto KfAcOEt y determinados mediante la ecuación de una sigmoidea (pendiente variable) (**Tabla 1**), los valores de las

concentraciones entre las células neoplásicas y las células no neoplásicas nuevamente confirman el efecto selectivo del extracto KfAcOEt hacia las células PC3.

A

Células PrEC (24 h)	
<i>KfAcOEt</i> Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% Viabilidad celular
1.5625	87.80 \pm 3.7
3.125	78.51 \pm 2.2
6.25	70.38 \pm 1.8
12.5	67.32 \pm 2.3
25	64.93 \pm 2.3
50	63.50 \pm 2.1
100	51.45 \pm 2.1
200	32.72 \pm 1.6
DMSO (0.1%)	100 \pm 2.8
Docetaxel (50 $\mu\text{g/mL}$)	17.14 \pm 1.8

B

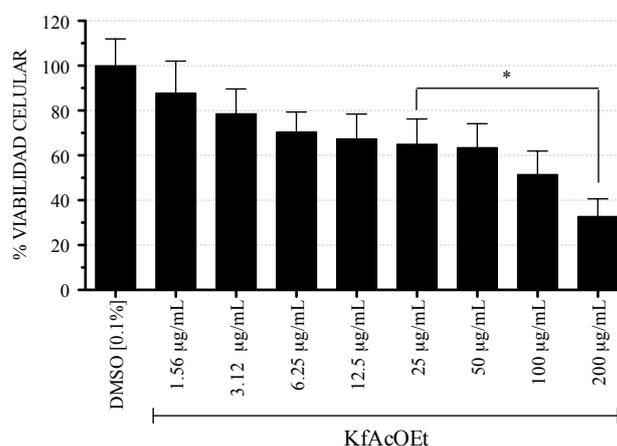


Figura 10. Efecto del extracto KfAcOEt en la viabilidad de células de epitelio sano de próstata (PrEC) determinado con la prueba de MTT a 24 h de exposición en concentraciones crecientes. A) Porcentajes de viabilidad expresados como el Promedio \pm Desviación estándar. B) Porcentaje de viabilidad (Dosis-respuesta). * $p < 0.05$ vs Control Negativo (DMSO 0.1%).

A

Células PBMC (24 h)	
<i>KfAcOEt</i> Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	% Viabilidad celular
1.562	96.43 \pm 12.5
3.125	90.28 \pm 1.6
6.25	88.26 \pm 2.4
12.5	88.01 \pm 10.6
25	85.62 \pm 9.2
50	85.51 \pm 1.2
100	85.00 \pm 3.4
200	83.92 \pm 5.4
DMSO (0.1%)	100 \pm 1.0
Cisplatino (500 $\mu\text{g/mL}$)	36.29 \pm 7.6

B

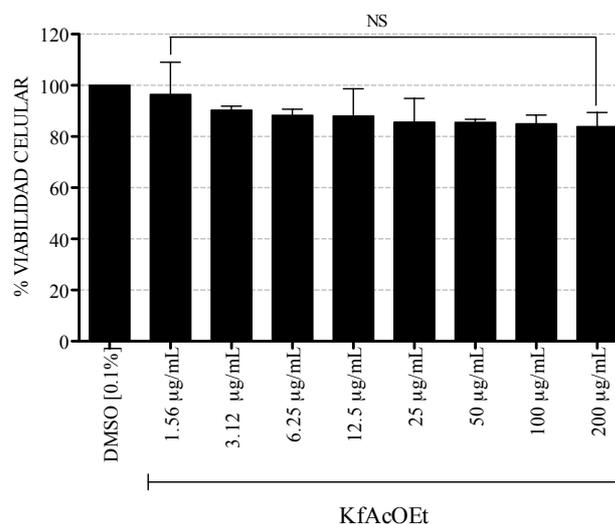


Figura 11. Efecto del extracto KfAcOEt en la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) determinado con la prueba de MTT a 24 h de exposición en concentraciones crecientes. A) Porcentajes de viabilidad expresados como el Promedio \pm Desviación estándar. B) Porcentaje de viabilidad (Dosis-respuesta). * $p < 0.05$ vs Control Negativo (DMSO 0.1%), NS: No significativo.

Tabla 1. Valores de concentración inhibitoria al 50% (CI₅₀) del extracto KfAcOEt en diferentes tipos de líneas celulares y células no neoplásicas.

CI ₅₀ (µg/mL)			
	PC3	PrEC	PMBC
KfAcOEt	1.361 ± 1.14	127.0 ± 1.19	NC

PC3: Células de Cáncer de Próstata Hormono-Independiente, **PrEC:** Células Epiteliales de Próstata, **PMBC:** Células Mononucleares de Sangre Periférica; **NC=** No Citotóxico.

En nuestro laboratorio de Biología Celular y Productos Naturales, el extracto KfAcOEt fue fraccionado por cromatografía en columna y se obtuvieron diferentes fracciones primarias numeradas de la 1 a la 8; el fraccionamiento biodirigido con pruebas de citotoxicidad en células PC3 nos indicó que las fracciones citotóxicamente activas fueron la 4, 6 y 8. El ensayo en células sanas nos hizo elegir las fracciones 4 y 8 para los ensayos posteriores, debido a que la fracción 6 mostró citotoxicidad en éstas células (Angles-Falconi, 2014). Las fracciones secundarias obtenidas de las fracciones primarias fueron enumeradas como KF4-1,-2 y-3, así como KF8-2,-3,-5, y se evaluaron con la prueba de MTT, se analizaron concentraciones en escala logarítmicas y crecientes desde 0.03 a 9 µg/mL con 24 h de exposición. En la **Figura 12**, se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad del Promedio±Desviación estándar (n=2), realizados a cada una de las fracciones secundarias obtenidas de la Fracción 4 en células PC3 y en células PrEC. El vehículo (DMSO 0.1%) fue considerado como células control negativo, y el Docetaxel (Docetaxel 50 µg/mL) como control positivo. La fracción KF4-1 mostró una disminución de la viabilidad celular de células PrEC (sanas), misma que fue estadísticamente significativa desde concentraciones de 0.1 a 9 µg/mL, este efecto no fue observado en las células PC3 (Neoplásicas) hasta la concentración de 9 µg/mL. En el caso de KF4-2, se repitió el mismo efecto, siendo significativo hasta la concentración de 9 µg/mL y en células PC3, no se mostró un efecto citotóxico a ninguna de las concentraciones evaluadas. Los mismos resultados fueron obtenidos con la fracción KF4-3.

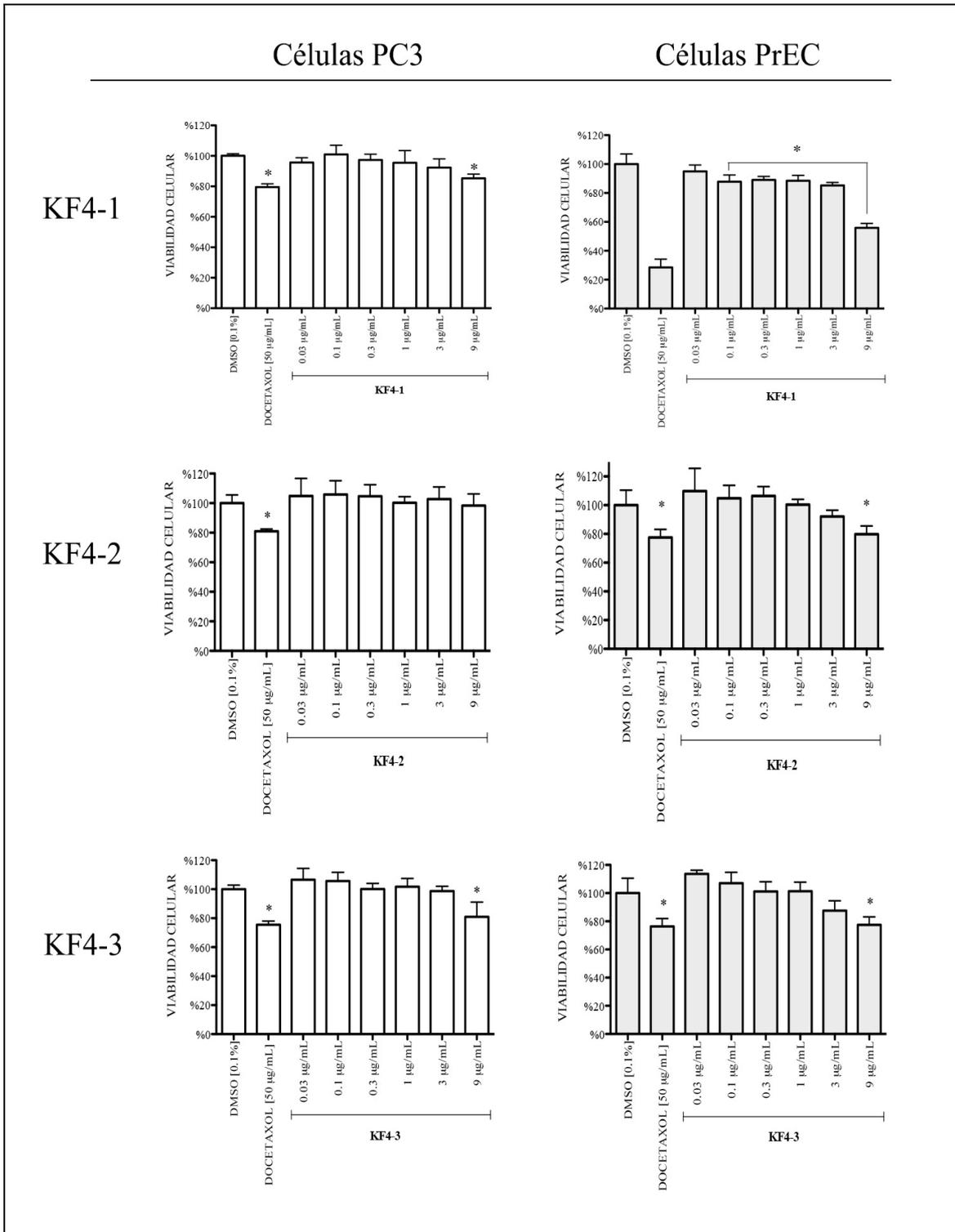


Figura 12. Efecto de las fracciones secundarias de la Fracción 4 en la viabilidad de células de Cáncer de Próstata (PC3) y células de epitelio prostático (PrEC), determinado con la prueba de MTT a 24 h de exposición en concentraciones crecientes. Porcentajes de viabilidad expresados como el Promedio±Desviación estándar (n=2),* p<0.05 vs Control Negativo (DMSO 0.1%).

En cuanto a la Fracción 8, tres fracciones secundarias fueron obtenidas (KF8-1,-3,-5) las cuales fueron utilizadas para realizar los ensayos citotóxicos con la técnica de MTT a 24 h de exposición tanto con las células PC3 y PrEC. En la **Figura 13**, se muestran los resultados en porcentaje de viabilidad obtenidos del Promedio \pm Desviación estándar (n=2); para cada línea celular se realizó un análisis de varianza de una vía con un *post hoc* de comparación múltiple Bonferroni, *P<0.05 vs el control negativo (DMSO 0.1%). Para la Fracción KF8-1, se observó que ninguna de las concentraciones evaluadas fueron estadísticamente significativas con respecto al control negativo. En cuanto a la fracción KF8-3, se observó un efecto dosis respuesta en las células PC3, disminuyendo considerablemente la viabilidad celular conforme el aumento de la concentración, este mismo efecto fue observado en las células PrEC (Sanas). Al comparar ambas líneas celulares, el efecto citotóxico fue menor a la concentración más alta en células sanas y ambas tuvieron concentraciones estadísticamente significativas a partir de 1 μ g/mL. Finalmente con la fracción KF8-5, no se observó efecto citotóxico en células PC3 (Neoplásicas), sin embargo en células PrEC (Sanas), la viabilidad celular disminuyó ligeramente a partir de 3 y 9 μ g/mL, siendo estas últimas concentraciones estadísticamente significativas con respecto al control negativo (DMSO 0.1%).

Por otro lado, se realizó también una gráfica de curva dosis respuesta con los valores de la inhibición de la viabilidad ejercida por la fracción KF8-3 y mediante la ecuación de una sigmoidea (pendiente variable), se calculó la CI₅₀. La línea punteada indica donde esta concentración calculada intercepta con el 50% de viabilidad celular en la curva (**Figura 14**). En el caso de las células PrEC, no se realizó el cálculo de la CI₅₀; ya que las concentraciones utilizadas no causan un decremento en la viabilidad celular por debajo del 50%.

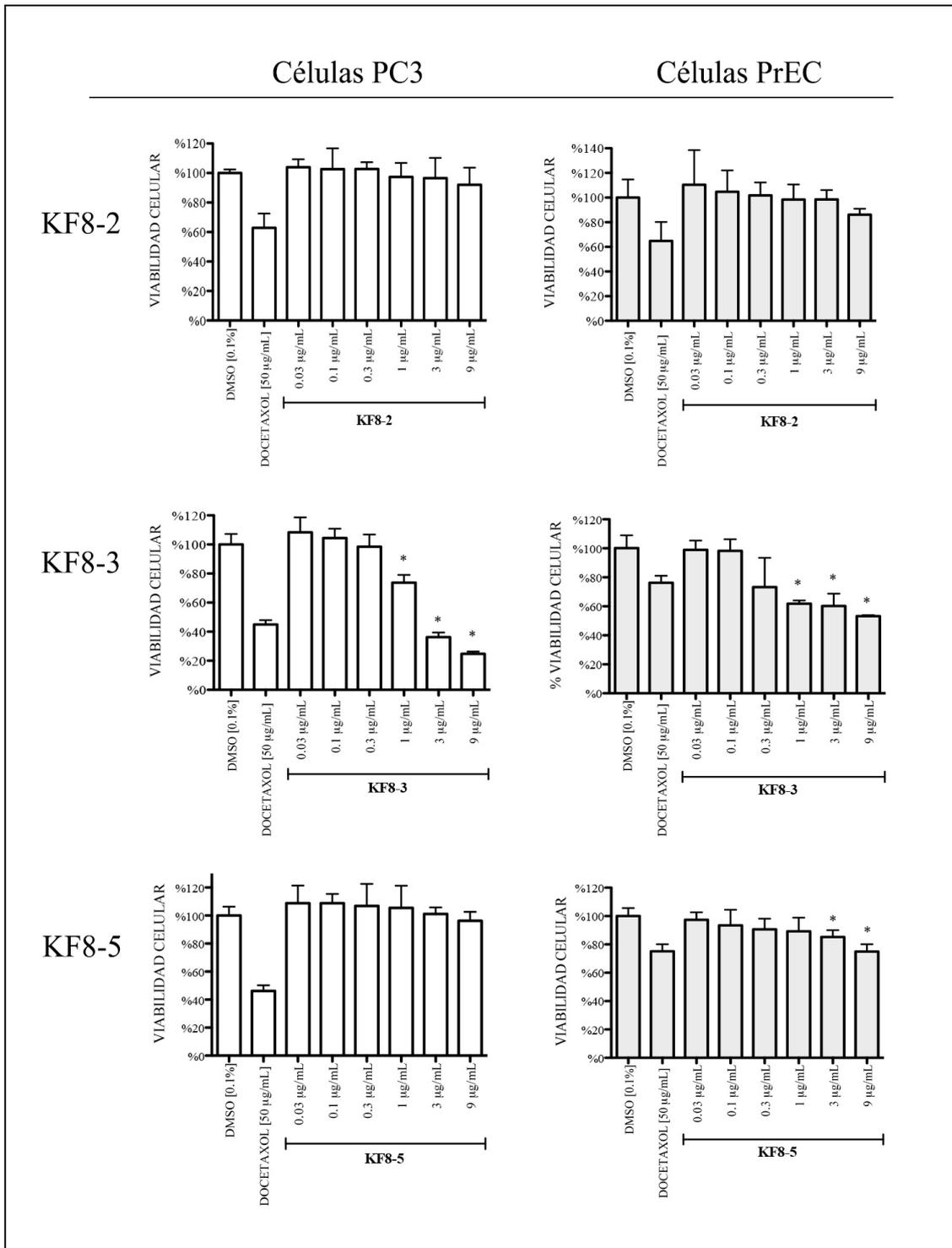


Figura 13. Efecto de las fracciones secundarias de la Fracción 8 en la viabilidad de células de Cáncer de Próstata (PC3) y células de epitelio prostático (PrEC), determinado con la prueba de MTT a 24 h de exposición en concentraciones crecientes. Porcentajes de viabilidad expresados como el promedio±desviación estándar (n=2), *p<0.05 vs control negativo (DMSO 0.1%).

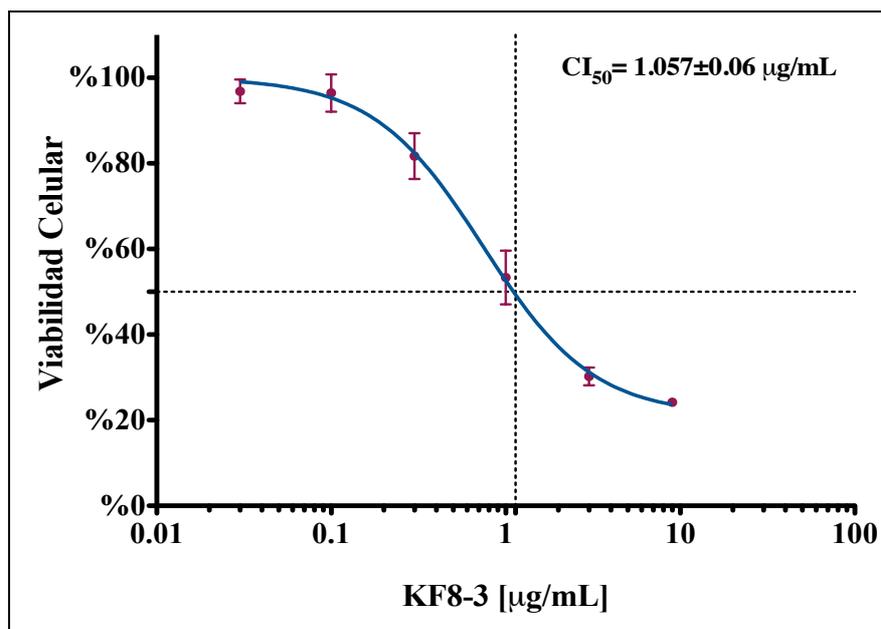


Figura 14. Concentración inhibitoria al 50% de una curva dosis (log) vs. respuesta de células tratadas con la fracción KF8-3. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar (n=2).

7.2 Efecto del extracto KfAcOEt y su fracción secundaria KF8-3 en la progresión del ciclo celular

Uno de los principales eventos que se ven afectados en una célula normal para su conversión en fenotipo neoplásico es la desregulación que conlleva a una alta tasa de proliferación, por ello, se investigaron los efectos que causan el extracto KfAcOEt y la fracción KF8-3 que resultó citotóxica, en el ciclo celular.

En este análisis se realizó una tinción del ADN con Ioduro de Propidio para medir la cantidad incorporada en las diferentes etapas del ciclo celular en cierta población de células tratadas en cinética de tiempo (6, 12, 24 h). Los datos obtenidos mediante citometría de flujo se analizaron con el programa ModFit LT y los resultados obtenidos se describen a continuación:

En la **Figura 15**, podemos observar los histogramas obtenidos de las células PC3 tratadas con el extracto KfAcOEt en el panel superior y con la fracción KF8-3 en el panel inferior; el programa nos distribuye las células (eventos) de acuerdo a la cantidad de Ioduro de Propidio incorporado y nos muestra un perfil del ciclo celular donde; de manera normal, la mayoría de las células en estado proliferativo, se encuentran en la fase G1. Las células control negativo, indican a aquellas tratadas con el vehículo DMSO

0.1%, así como los diferentes tiempos de exposición. Como se puede observar, a tiempo de 12 y 24 h con el extracto KfAcOEt, la cantidad de células que se encuentran en la Fase de Síntesis se ve aumentada con 58% y 35% respectivamente, disminuyendo la cantidad de células en la fase de G1, esto es un primer indicio de que posiblemente se esté llevando a cabo un arresto celular en esta fase del ciclo. Por otro lado, con la Fracción secundaria KF8-3, a las 24 h de exposición en las células PC3, se logra observar el mismo efecto, donde la población celular se encuentra mayormente en esta fase del ciclo celular (59.3%).

Estos eventos se pueden observar mejor en la **Tabla 2**, donde se muestran los valores de porcentaje del Promedio \pm Desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

7.3 Efecto del extracto KfAcOEt en la resistencia a la muerte celular por apoptosis

7.3.1 Efecto del extracto KfAcOEt en la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno

Como ya se mencionó en la metodología, la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) es un evento temprano en la apoptosis que puede o no desencadenar eventos bioquímicos posteriores que culminen en la muerte celular. Por lo tanto, es importante evidenciar la cantidad intracelular de ERO en las células PC3 al ser expuestas al extracto KfAcOEt a diferentes tiempos. Con este fin se empleó el compuesto no fluorescente CM-H2DCFDA, el cual se internaliza y se oxida para dar como resultado un compuesto fluorescente al reaccionar con las ERO, principalmente con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este proceso fue evidenciado por citometría de flujo. Los resultados obtenidos al tratar las células con la concentración inhibitoria al 50% se describen a continuación:

En la **Figura 15**, pueden observarse los histogramas obtenidos al analizar los datos por citometría con el programa BD CellQuest, donde se muestran los diferentes tiempos de tratamiento (3, 6, 12, 24 h) con el extracto KfAcOEt, en el eje de las “x” se muestra la intensidad de fluorescencia del DCF y en el eje de las “y” el conteo de la población celular.

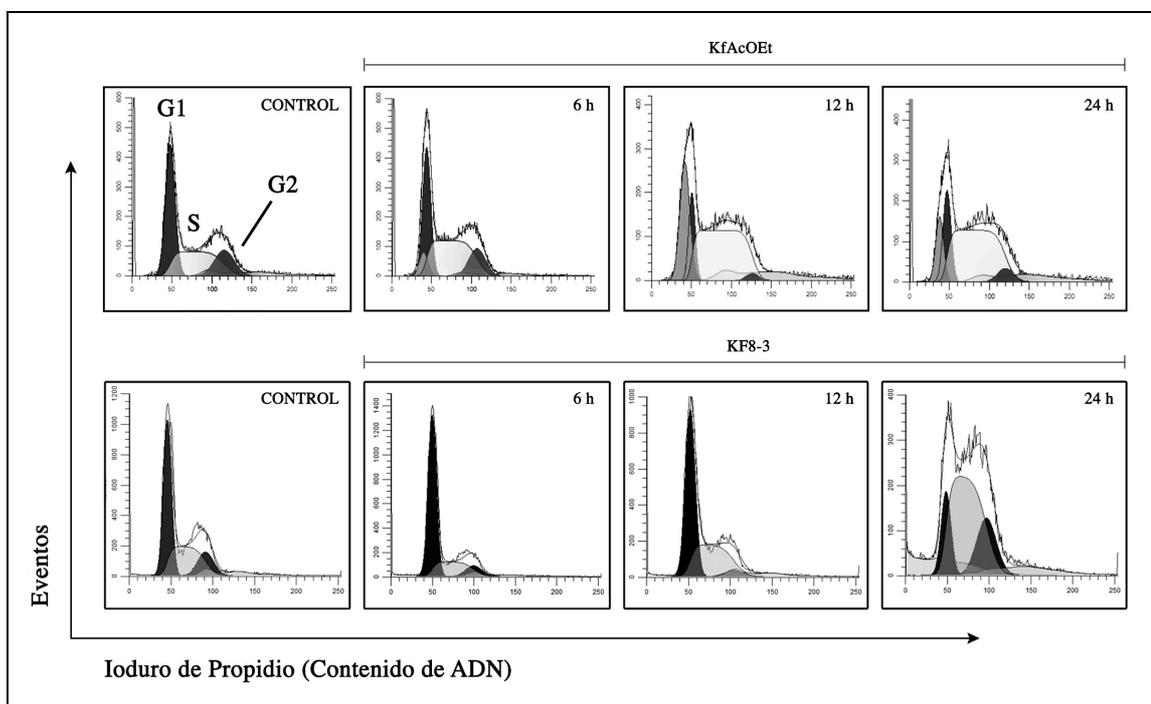


Figura 15. Ciclo celular de células PC3 tratadas con la CI_{50} del extracto KfAcOEt y la CI_{50} de la Fracción KF8-3 a diferentes tiempos. Control: DMSO 0.1%.

Tabla 2. Porcentajes de población celular en cada una de las Fases del Ciclo Celular de células PC3 tratadas con la CI_{50} del extracto KfAcOEt y la CI_{50} de la Fracción KF8-3. Los datos son representados con el promedio \pm desviación estándar (n=3).

	CONTROL	KfAcOEt			
	24h	6h	12h	24h	
G0/G1	44.9 \pm 6.4	36.2 \pm 3.6	19.1 \pm 14.3	38.0 \pm 0.6	
S	30.5 \pm 1.4	37.5 \pm 7.5	58.3 \pm 17.7	35.2 \pm 6.8	
G2/M	24.5 \pm 5.3	26.6 \pm 4.1	22.5 \pm 3.4	26.6 \pm 6.2	
	CONTROL	KF83B			
	24h	6h	12h	24h	
G0/G1	48.5 \pm 3.7	57.6 \pm 13.2	47.8 \pm 13.0	19.9 \pm 4.9	
S	29.5 \pm 0.9	34.5 \pm 14.7	48.6 \pm 14.0	59.3 \pm 1.9	
G2/M	12.9 \pm 8.0	7.7 \pm 4.1	4.5 \pm 0.47	19.6 \pm 1.6	

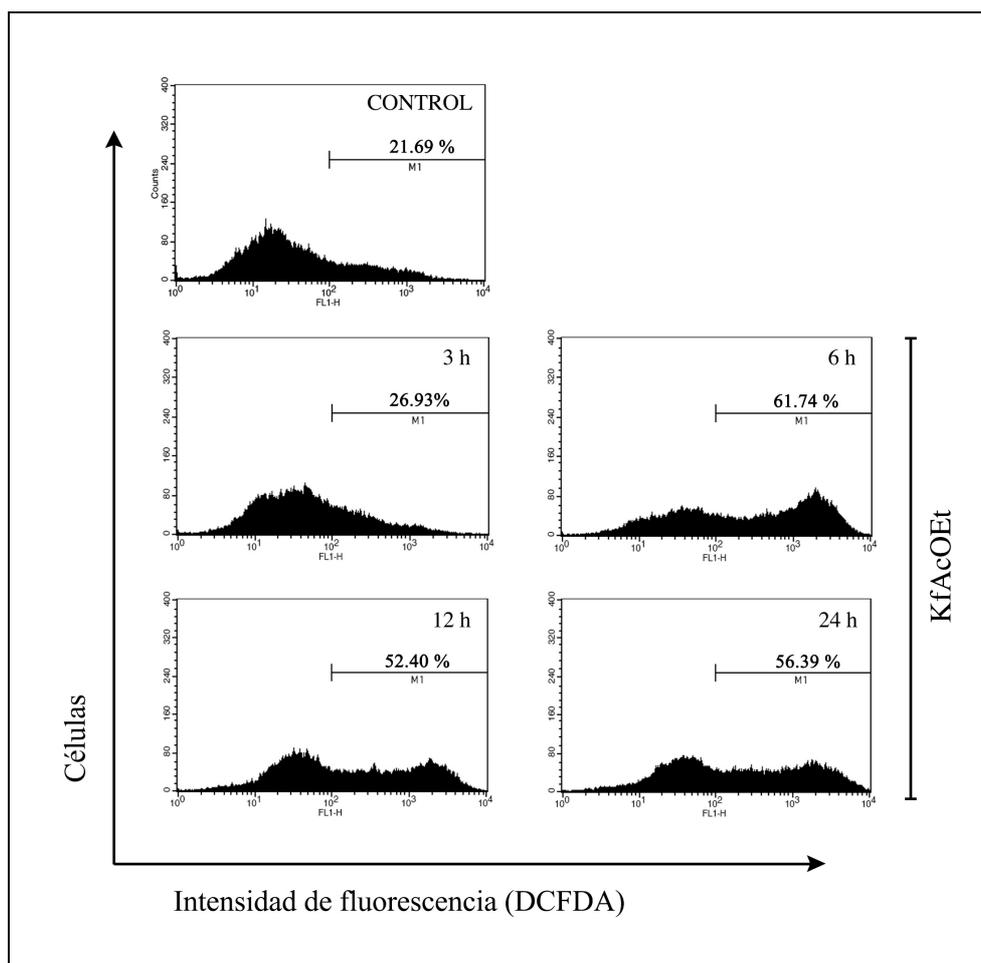


Figura 16. Sobreproducción de especies reactivas de oxígeno de células PC3 tratadas con el extracto KfAcOEt. Los histogramas representativos muestran la intensidad de fluorescencia relativa del DCFDA en la población celular a diferentes tiempos de exposición.

Dentro de la población celular, se muestra un bajo porcentaje de células (21.6%) del control negativo DMSO 0.1%, las cuales son positivas a un estrés celular causado por ERO; sin embargo, con los tratamientos se observa un mayor desplazamiento en la población celular positiva a un incremento de la intensidad de fluorescencia causada por la oxidación entre el DCFDA y H_2O_2 , esto a partir de las 6 h de tratamiento con el extracto KfAcOEt (61.74%) y aunque el porcentaje de la población positiva a esta sobreproducción varió con respecto a los diferentes tiempos de tratamiento, se mantuvo constante hasta las 24 h (56.39%).

En la **Figura 16**, se muestran el promedio \pm error estándar ($n=3$) de la intensidad de fluorescencia relativa del DCF proporcional a la sobreproducción de H_2O_2 intracelular

que se encuentra incrementada a partir de las 6 h de tratamiento, manteniéndose constante hasta las 24 h.

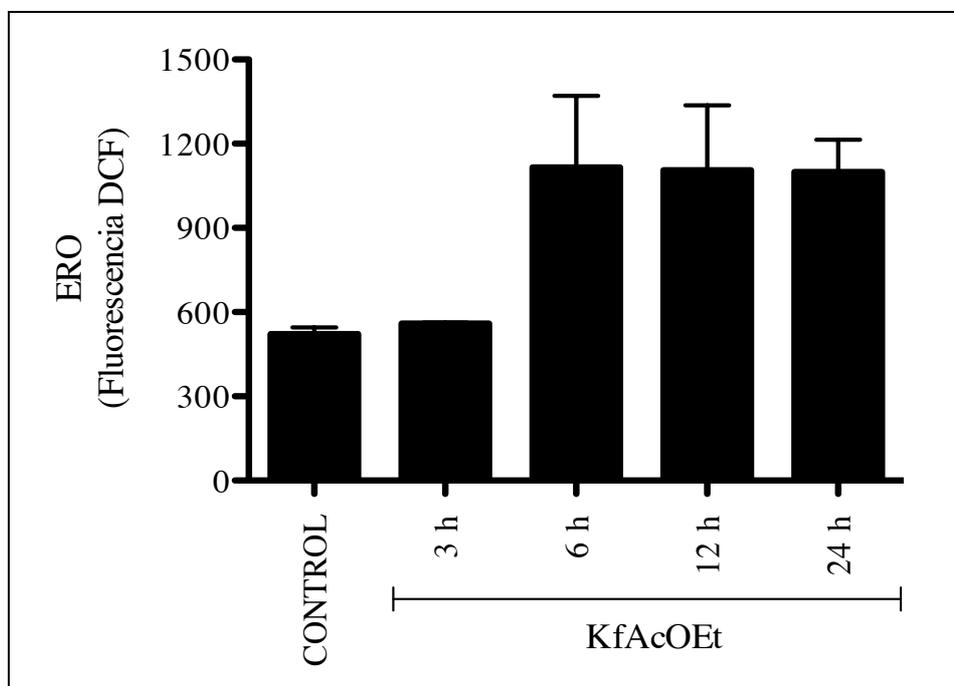


Figura 17. Intensidad media de fluorescencia del DCF en células PC3 tratadas con el extracto KfAcOEt a diferentes tiempos proporcional a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno. Los datos son mostrados como el Promedio±Error estándar (n=3), Control: DMSO 0.1%.

7.3.2 Efecto del extracto KfAcOEt en la activación de proteínas ejecutoras de la apoptosis

Un evento paralelo a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno es la liberación de factores pro-apoptóticos que potencian la señal apoptótica y en común este evento es provocado por la inestabilidad de las membranas mitocondriales. Para determinar si este evento estaba siendo provocado por el extracto KfAcOEt se determinó la liberación de Citocromo C, una proteína que se encuentra en el espacio citosólico celular cuando las membranas mitocondriales se encuentran comprometidas en su integridad. La detección de esta proteína en extractos proteicos citosólicos de células tratadas a diferentes tiempos con el extracto (3, 6, 12, 24 y 48 h) fue realizada por Western Blot. En los inmunoblots se puede observar a la proteína detectada a los tiempos de 12, 24 y 48 h, indicando su presencia en el citosol, misma que disminuyó su

presencia de manera inversamente proporcional en aquellas células sin tratamiento o tratadas con el vehículo (DMSO 0.1%) en el cual la proteína parece detectarse sólo en las mitocondrias (**Figura 18**).

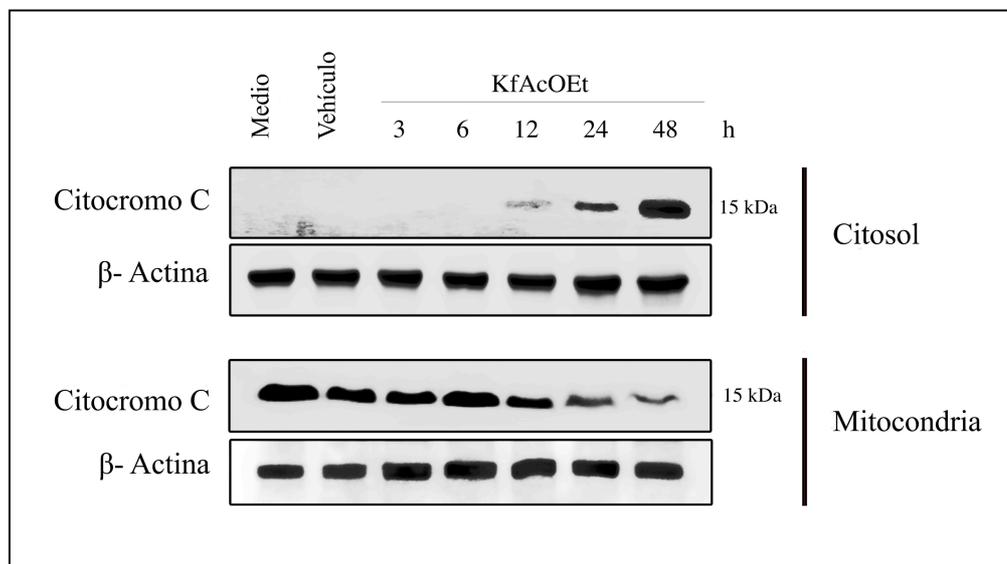


Figura 18. Efecto del extracto KfAcOEt en la liberación de Citocromo C de proteínas diferencialmente extraídas (citoplasma y mitocondrias) de células PC3 a diferentes tiempos de tratamiento. Se cargaron 50 µg de proteína y β-Actina fue usada como control de carga.

Las proteínas importantes en el proceso de ejecución de la apoptosis (Caspasas) desencadenan una cascada de señalización dentro del “punto de no retorno” de la célula hacia el proceso de muerte celular, estas proteínas se activan por proteólisis, dando como resultado fragmentos de menor peso molecular que pueden ser detectadas por varias técnicas incluyendo el Western Blot. En experimentos anteriores, se habían realizado inmunodetecciones para evidenciar la activación de Caspasas tanto iniciadoras como ejecutoras posiblemente inducidas por el extracto KfAcOEt, como la Caspasa-8, -9,-10, de las cuales sólo la Caspasa-9 mostró activación (Arias-González, 2011); sin embargo, no se había evidenciado la activación de una de las proteínas claves del proceso apoptótico, correspondiente a la Caspasa-3; es por ello que en esta investigación se trató de indentificarla. De las proteínas totales extraídas de células tratadas con el extracto KfAcOEt (3, 6, 12, 24 y 48 h) y de control negativo correspondiente a células sin ningún tratamiento y células tratadas con el vehículo (DMSO 0.1%), se realizó un Western Blot para detectar la activación de esta proteína. En la **Figura 19**, puede observarse el resultado de la inmunodetección de la proteína Caspasa-3, donde desde tiempos de exposición al extracto KfAcOEt de 12 h se observa

una banda correspondiente a la proteína activa (19 kDa) y a tiempos más largos de exposición (48 h) otra de las bandas correspondiente a otro de los fragmentos característicos de su activación para la formación de heterotetrámeros activos (17 kDa).

Es bien sabido que el proceso de apoptosis es controlado en múltiples pasos y que a su vez es influenciado por proteínas tanto pro-apoptóticas como anti-apoptóticas. Uno de los mecanismos mejor estudiados, es la sobreexpresión de la proteína Bcl-2, que funciona como antagonista de la muerte celular, favoreciendo la proliferación celular. Debido a esto nosotros quisimos evaluar el efecto del extracto KfAcOEt en los niveles de expresión de la proteína Bcl-2. En la **Figura 20** se muestra el inmunoblot realizado para la detección de Bcl-2, donde se puede observar como los niveles de la proteína no se ven alterados con respecto al tiempo de exposición de las células al extracto KfAcOEt, observándose similar a las células sin tratamiento y con el vehículo (DMSO 0.1%).

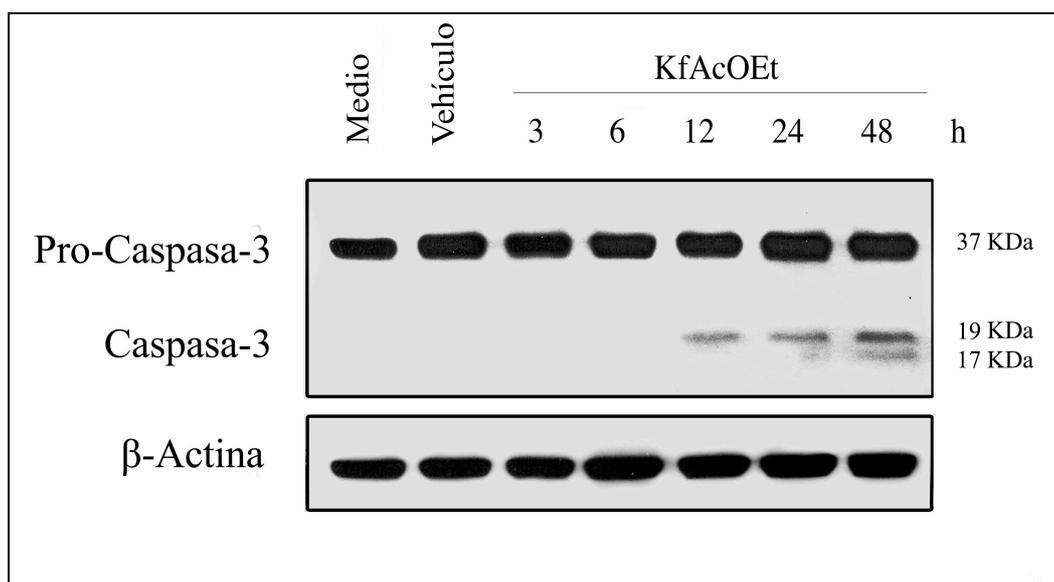


Figura 19. Efecto del extracto KfAcOEt en la activación de la Caspasa-3 de proteínas extraídas de células PC3 a diferentes tiempos de tratamiento. Se cargaron 80 µg de proteína y β-Actina fue usada como control de carga.

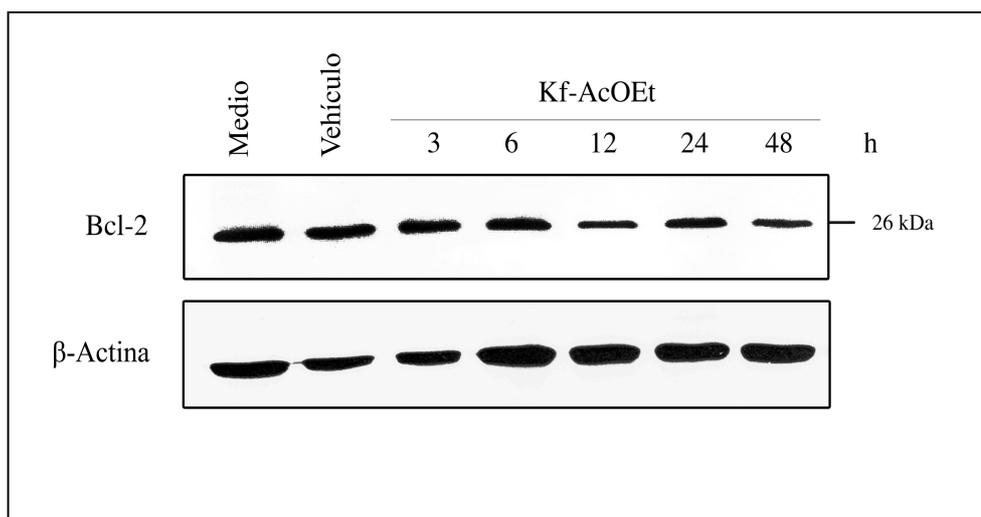


Figura 20. Efecto del extracto KfAcOEt en la expresión de Bcl-2 de proteínas extraídas de células PC3 a diferentes tiempos de tratamiento. Se cargaron 50 μ g de proteína y β -Actina fue usada como control de carga.

7.3.3 Efecto del extracto KfAcOEt en la fragmentación oligonucleosomal del ADN

La fragmentación del ADN es una de los eventos finales de la apoptosis donde se realiza el desmantelamiento celular. Después de la activación de la Caspasa-3, muchas otras proteínas son blanco de esta caspasa; entre éstas se encuentran DNAsas que realizan el proceso final de fragmentación. Este proceso bioquímico fue evaluado en células PC3 expuestas al extracto KfAcOEt por dos métodos diferentes, el primero se realizó mediante la resolución del ADN en un gel de agarosa (2%) a diferentes tiempos de tratamiento (12, 24 y 48 h) de células tratadas con el extracto KfAcOEt, en el caso de que el ADN se encuentre fragmentado, éste se observará como un corrimiento escalonado de diferentes bandas con diferentes pares de bases. El resultado de esta prueba se muestra en la **Figura 21**, donde a partir de las 12 h (mostrado en el carril 3) se empieza a observar el proceso de degradación del ADN, el cual se hace más evidente a las 48 h de exposición con el extracto, al observarse algunas bandas de bajo peso molecular de entre aproximadamente 300 y 500 pares de base, éste mismo patrón se observa en células tratadas con Resveratrol, el cual es un compuesto que se sabe que provoca degradación del ADN. Este efecto de degradación no se observa en los carriles 1 y 2 correspondientes a los controles negativos, donde las células no recibieron tratamiento o bien fueron tratadas con el vehículo (DMSO 0.1%), respectivamente.

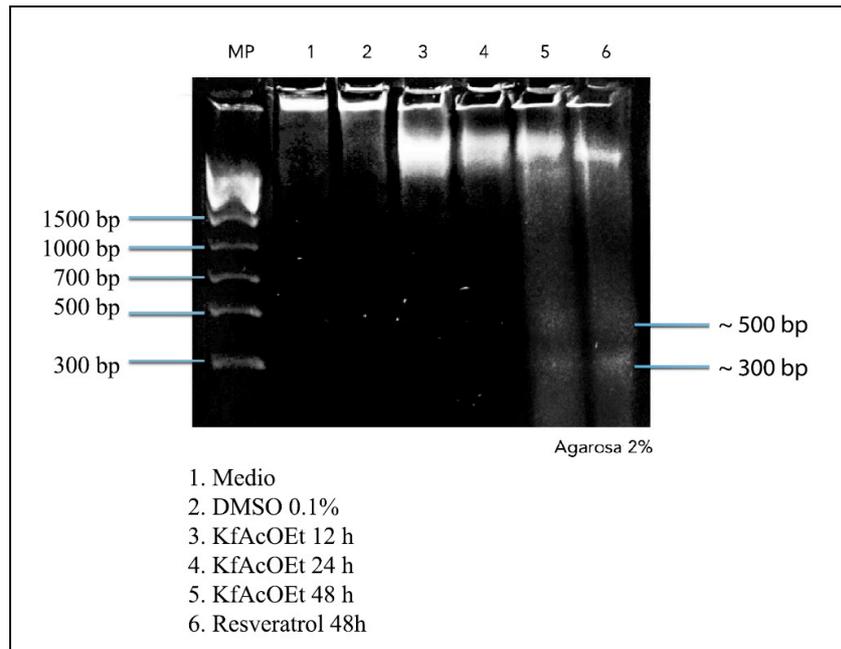


Figura 21. Efecto del extracto KfAcOEt en la Fragmentación del ADN. El ADN extraído a diferentes tiempos de tratamiento fue resuelto en un gel de agarosa al 2%, teñido con Bromuro de Etidio y visualizado en un transiluminador de luz UV a una longitud de onda de 254 nm.

Otro de los métodos utilizados para la detección de la fragmentación del ADN que se realizó fue la prueba de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), la cual es una prueba que ofrece mayor sensibilidad para la detección de la fragmentación por procesos de apoptosis. Mediante microscopía de fluorescencia se tomaron las fotografías de las células que fueron tratadas con el extracto KfAcOEt a tiempos de 12 y 24 h. Se analizaron fotografías en diferentes longitudes de onda, tanto para detectar la fluoresceína (FIT-C) de los nucleótidos incorporados en el ADN fragmentado, así como la señal emitidas del colorante DAPI, utilizado para colocalizar la señal del FIT-C con los núcleos de las células.

En la **Figura 22** se observan las fotografías representativas de los campos tomados para los distintos tratamientos, en las células tratadas con el extracto KfAcOEt tanto a 12 h como a 24 h. En ellas se puede apreciar a las mayoría de las células son positivas a la prueba de TUNEL (verde) y colocalizan con los núcleos (azul), a diferencia de las células sin tratamiento o tratada con el vehículo, las cuales no mostraron señal positiva a incorporación de nucleótidos marcados correspondientes a fragmentación del ADN.

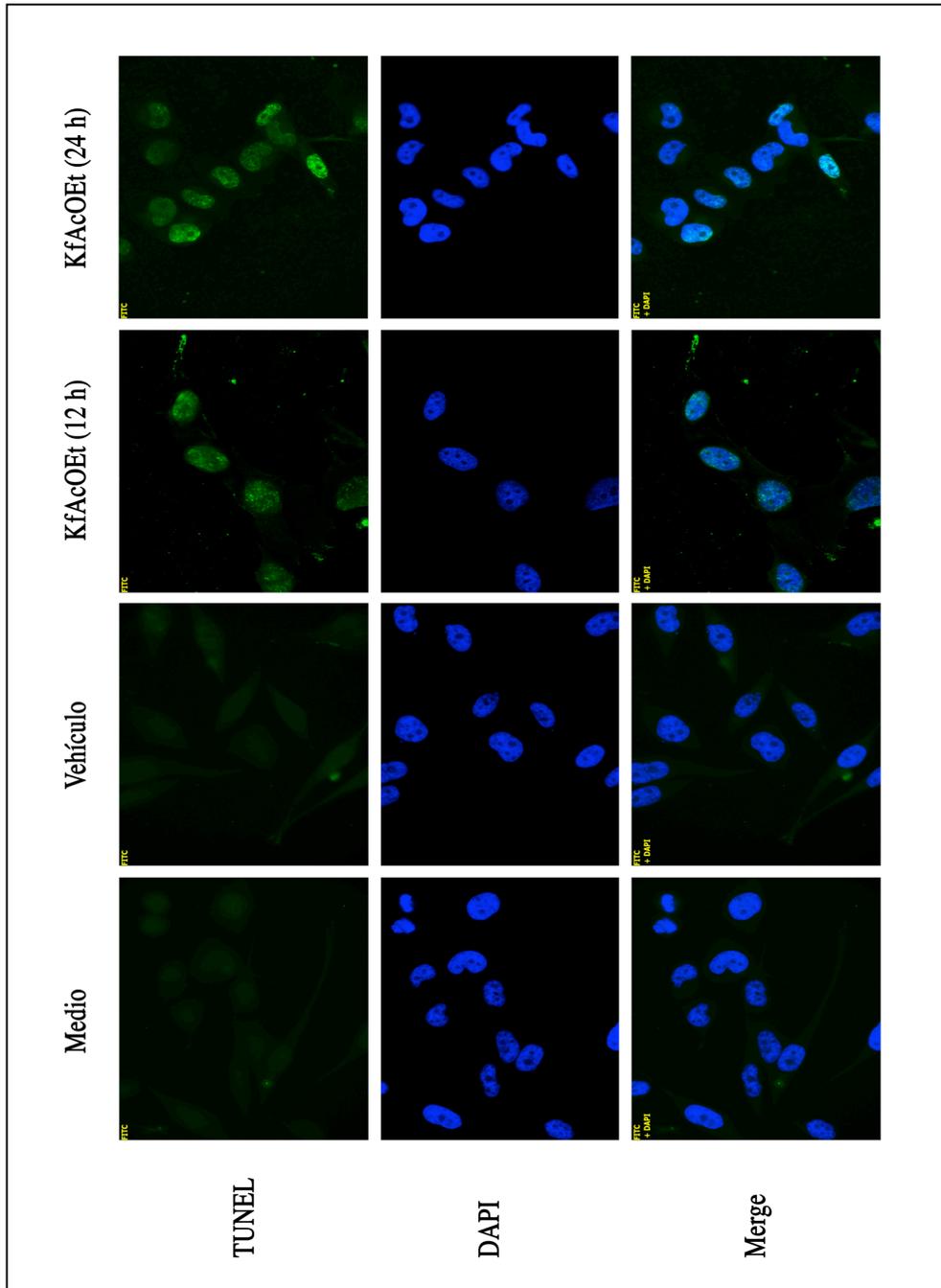


Figura 22. Efecto del extracto KfAcOEt en la Fragmentación del ADN en células PC3 a 12 y 24 h de exposición. Las células positivas al ensayo de TUNEL se muestran en verde y los núcleos teñidos con DAPI en azul. Aumentos 40X.

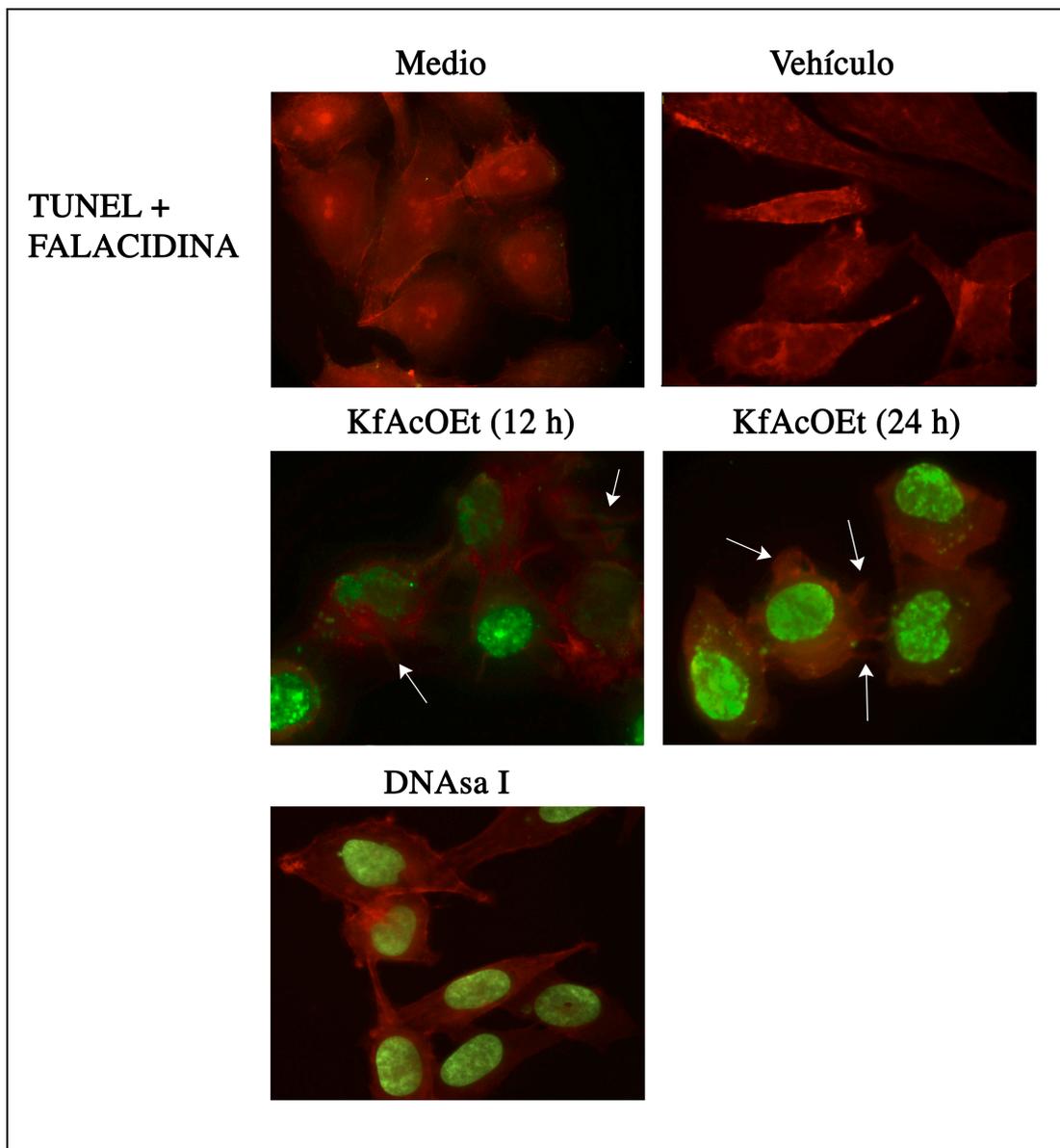


Figura 23. Efecto del extracto KfAcOEt en el Citoesqueleto y Fragmentación del ADN de células PC3 a 12 y 24 h de exposición. Las células fueron teñidas con Falacidina para observar los filamentos de actina (Rojo), células positivas a TUNEL se muestran en verde. Aumentos de 40X.

Adicionalmente, en los experimentos realizados, las células también fueron teñidas con Falacidina, un compuesto con afinidad de unión a los filamentos de actina, esto con la finalidad de observar la morfología de las células tratadas en comparación con las no tratadas. En la **Figura 23**, se pueden observar campos representativos de células tratadas y no tratadas con el extracto KfAcOEt, donde se logra observar que en aquellas células sin tratamiento (Medio) o tratadas con el vehículo, muestran la morfología normal de las células PC3, las cuales adoptan una morfología de difusión que es regularmente alargada y aplanada con fibras de adhesión celular, en comparación con

aquellas células tratadas con el extracto KfAcOEt (12 y 24 h), en ambos tiempos se observa que las células sufren de una contracción celular provocada por encogimiento del citoplasma, lo que provoca que las fibras de adhesión celular adopten formas parecidas a filopodios (Flechas), además la forma de los núcleos se vuelven irregulares en comparación con las células sin tratamientos y/o tratadas con el vehículo (DMSO 0.1%). Cabe destacar que como control interno y positivo a Fragmentación del ADN en la técnica, se usó DNAsa I, la cual es positiva a TUNEL al igual que los tratamientos con el extracto KfAcOEt, sin embargo, éstas células muestran la morfología normal de las células PC3.

Finalmente, como parte de este objetivo y como anteriormente se mencionó, otro de los eventos importantes que se encuentran relacionados al proceso de Fragmentación del ADN es el derivado de la cascada de señalización activada por la Caspasa-3, siendo otro de sus sustratos celulares la proteína PARP-1, la cual es una polimerasa encargada de reparar daños en el ADN mediante la adición de polímeros de ADP ribosa, en respuesta a una variedad de estrés celular. Cuando la Caspasa-3 es activada, provoca una proteólisis de la proteína en ciertos sitios específicos, provocando pérdidas de la función de dominios con actividad catalítica de esta proteína y de ésta manera provocar la disminución de su actividad en relación a la reparación de ADN. Este proceso de inactivación de la proteína PARP-1, fue analizada por Western Blot, mediante el reconocimiento de fragmentos específicos, producto de la proteólisis causada por la actividad de la Caspasa-3.

En la **Figura 24**, se muestra el inmunoblot realizado para la detección de PARP-1, de proteínas obtenidas de células PC3 tratadas con el extracto KfAcOEt a diferentes tiempos de exposición, donde a partir de las 6 h se observa un fragmento de 89 kDa característico de la escisión de la proteína por la Caspasa-3, con un aumento gradual hasta las 48 h. Aunque existe otro fragmento producido (24 kDa), el anticuerpo utilizado para tal efecto no reconoce este fragmento.

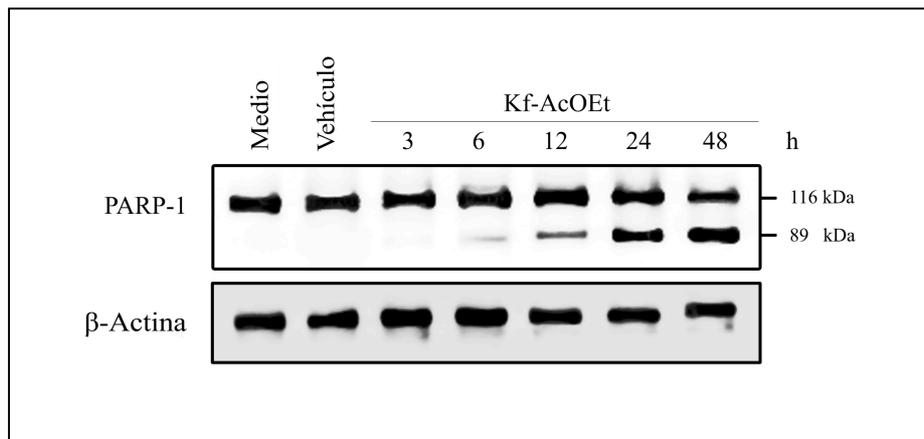


Figura 24. Efecto del extracto KfAcOEt en la inactivación de PARP-1 de proteínas extraídas de células PC3 a diferentes tiempos de tratamiento. Se cargaron 50 μ g de proteína y β -Actina fue usada como control de carga.

7.3.4 Efecto del extracto KfAcOEt en los cambios de la membrana plasmática y el encogimiento celular

En la secuencia usual de los cambios morfológicos que se observan durante la fase final de la apoptosis cuando se realizan ensayos *in vitro* con células adherentes se encuentran la pérdida de la adhesión celular, dando como resultado el redondeo celular, zeiosis (que puede durar pocas horas), encogimiento celular, donde el “blebbing” dinámico de la membrana plasmática puede cesar y en algunas ocasiones puede observarse protusiones elongadas denominadas “picos de equinodermos” en la superficie celular.

Los cambios en el tamaño así como en la granularidad celular, pueden ser detectados mediante citometría de flujo, al detectar variaciones en sus propiedades de dispersión de la luz. En la **Figura 25**, se muestran los citogramas obtenidos por citometría de flujo de las células tratadas con el extracto KfAcOEt desde 6, 12 y 24 h de exposición. A partir de la obtención de los datos de las células control (DMSO 0.1%) se ubicó a la mayoría de la población entre 200 y 400 de la señal de la dispersión de la luz frontal (FSC:Foward Scatter Cells), tomando esta referencia como el tamaño celular normal de las células PC3. Con base en esto, se tomaron las posteriores lecturas de las células tratadas con el extracto KfAcOEt, donde se puede observar una disminución en el tamaño de las células de la población total al desplazarse la señal hacia la izquierda conforme el incremento del tiempo de exposición, para localizar finalmente a la mayoría de la población entre 0 y 200 a las 24 h de tratamiento. El parámetro de la

dispersión lateral de la luz (SSC: Side Scatter) nos indica la complejidad o granularidad de las células, esta medida es dependiente de las estructuras intracelulares que cambian el índice refractivo de la luz. En este parámetro, la complejidad de las células se vió ligeramente modificada hacia una disminución de la granularidad consistente con procesos apoptóticos.

De los cambios morfológicos de la membrana celular que son más representativos y visuales de células en proceso de apoptosis son el redondeo celular, “blebbing” dinámico, picos de equinodermos, formación de ampollas y de cuerpos apoptóticos. Estos procesos fueron observados en un microscopio invertido de contraste de fases y las fotografías de los tiempos de exposición fueron tomadas. En la **Figura 26** se muestran las células tratadas con el vehículo (A), en donde las células se observan adheridas y manteniendo su morfología normal alargada, en el panel B, C y D se muestran diferentes células tratadas con el extracto KfAcOEt a 24 h, donde se pueden observar los diferentes cambios en la membrana debido a la acción de procesos apoptóticos causados por el extracto KfAcOEt, como lo son el “blebbing” dinámico (1), la formación de “blisters” (2), picos de equinodermos (3) y los cuerpos apoptóticos.

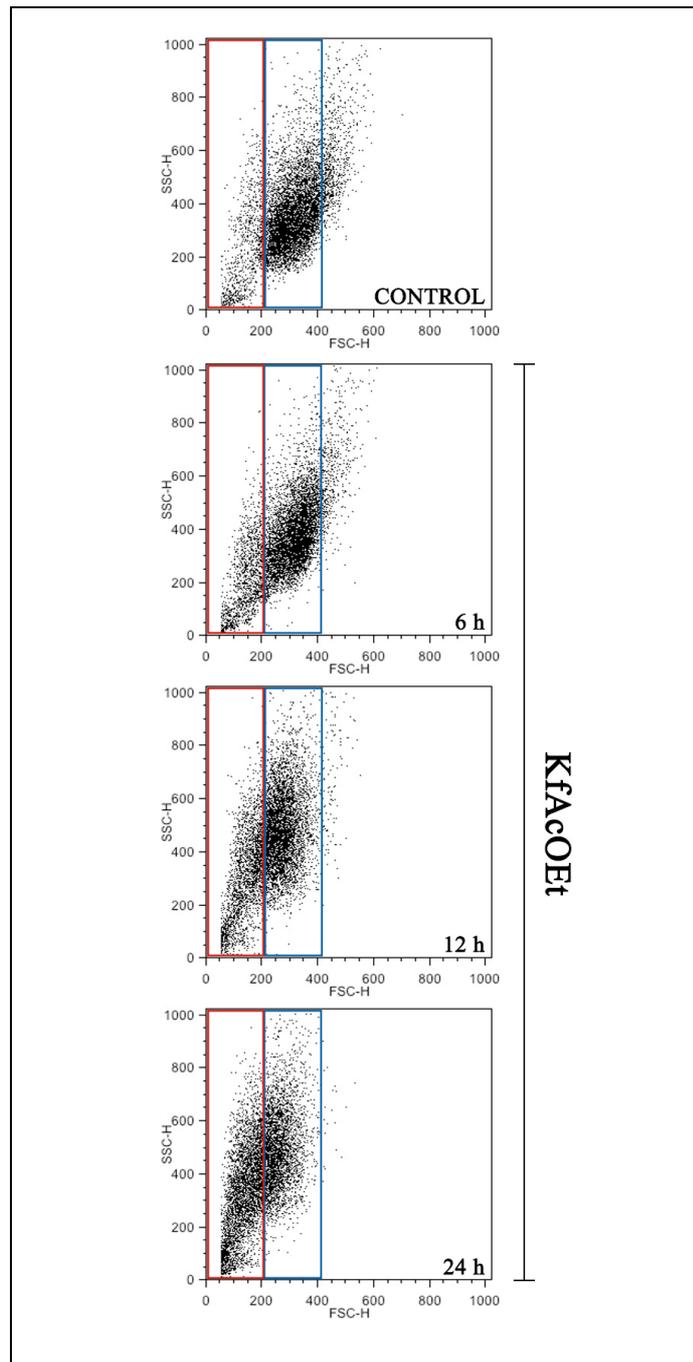


Figura 25. Efecto del extracto KfAcOEt en la reducción del tamaño celular analizados por citometría de flujo a diferentes tiempos de exposición. En los citogramas, el tamaño celular (FSC:Forward Scattering) y granularidad (SSC: Side Scattering) fueron analizados. Control: DMSO 0.1%.

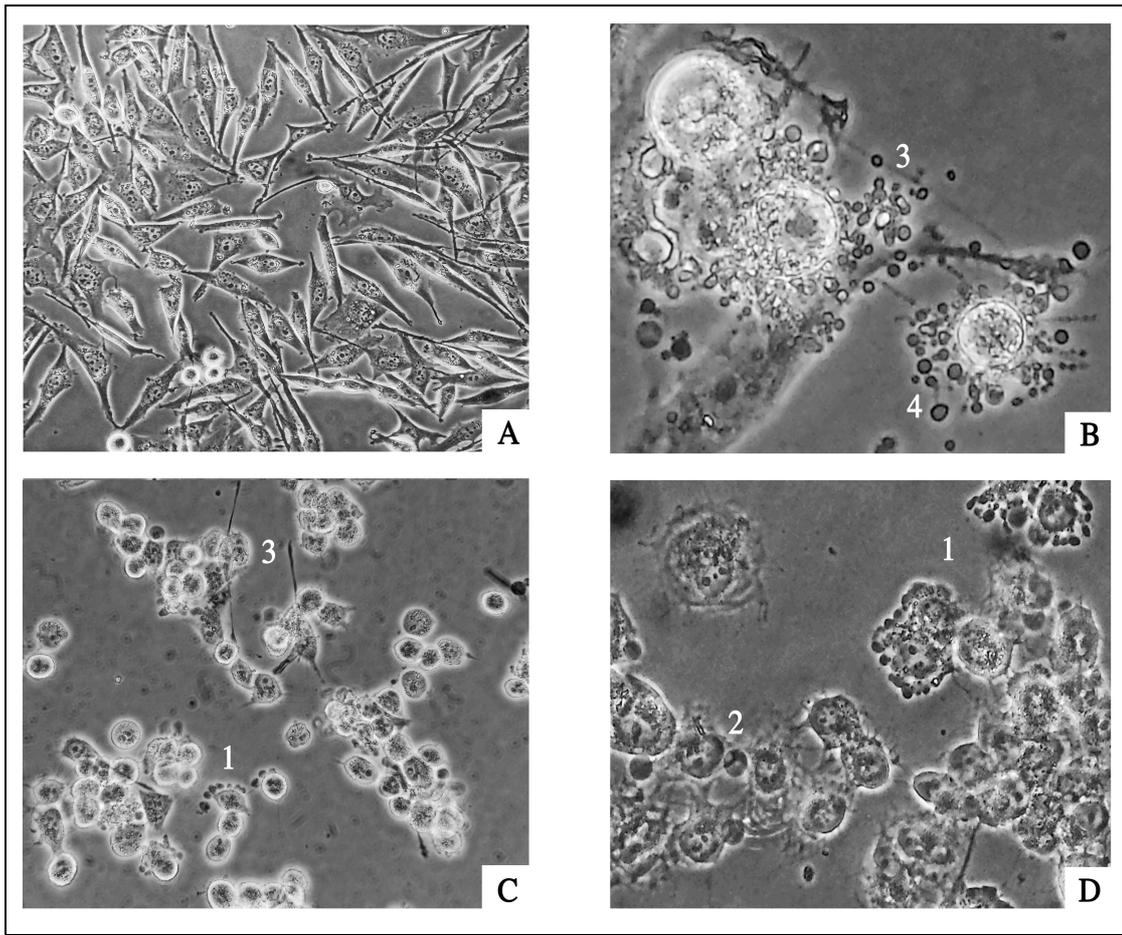


Figura 26. Morfología y dinámica de las membranas celulares de células tratadas con el extracto KfAcOEt a 24 h de exposición (B, C, D) y con DMSO 0.1% (Control, A), en números se resaltan el Blebbing (1), Blisters (2), Picos de equinodermos (3) y cuerpos apoptóticos (4). Fotografías fueron tomadas con un microscopio invertido de contraste de fases, 40X de aumento.

7.4 Actividad genotóxica del extracto KfAcOEt en sangre periférica de ratones CD1 (Ensayo de Micronúcleos)

Para evaluar la actividad genotóxica del extracto KfAcOEt en un sistema *in vivo*, se utilizó el Kit MicroFlow diseñado para analizar la presencia de micronúcleos mediante citometría de flujo. Se analizaron las muestras para detectar la cantidad de micronúcleos formados en reticulocitos (%MN-RET) y en eritrocitos normocromáticos (%MN-NCE). Los datos se muestran en las Figuras 26 a 29.

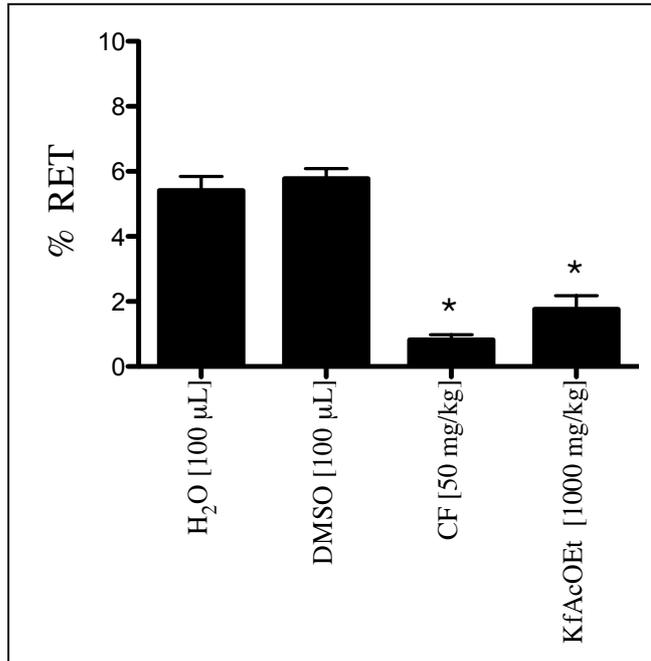


Figura 27. Porcentaje de Reticulocitos detectados en sangre periférica de ratones CD1 administrados oralmente con el extracto KfAcOEt. H₂O y DMSO: Controles negativos, Ciclofosfamida: (CF) Control positivo. Los datos son presentados como el Promedio±Desviación Estándar (n=5); *P<0.05 estadísticamente significativo comparado con el control negativo (DMSO 0.1%).

En la **Figura 27**, se muestra el porcentaje de reticulocitos obtenidos de los diferentes grupos experimentales, en los controles negativos (H₂O, DMSO), se muestra un valor similar de porcentaje, sin embargo aquellos administrados con Ciclofosfamida, el porcentaje de reticulocitos disminuyó significativamente, en cuanto a los ratones administrados con el extracto KfAcOEt, presentan al igual una disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de reticulocitos con respecto al control negativo (DMSO 0.1%).

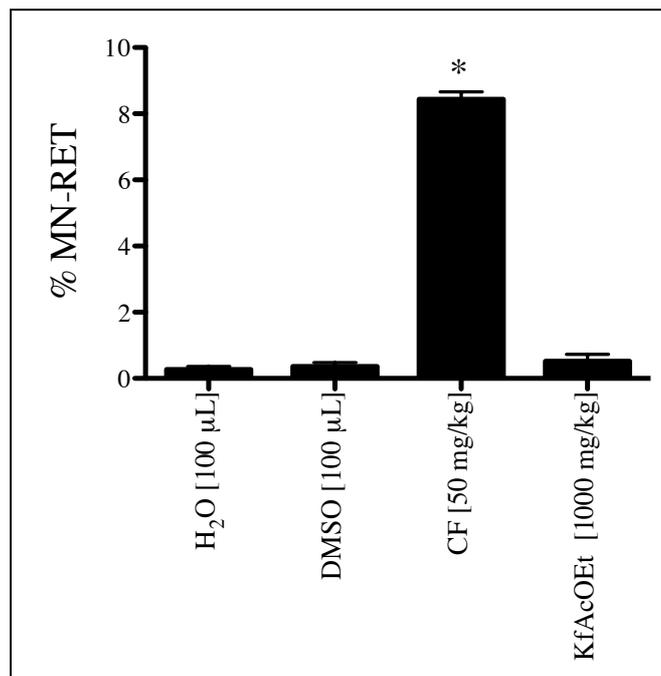


Figura 28. Porcentaje de reticulocitos micronucleados detectados en sangre periférica de ratones CD1 administrados oralmente con el extracto KfAcOEt. H₂O y DMSO: Controles negativos, Ciclofosfamida: (CF) Control positivo. Los datos son presentados como el Promedio±Desviación Estándar (n=5); *P<0.05 estadísticamente significativo comparado con el control negativo (DMSO 0.1%).

En la **Figura 28**, se muestran los valores en porcentaje de reticulocitos micronucleados de los diferentes grupos experimentales, en donde se puede observar que la Ciclofosfamida (mutágeno) es capaz de inducir un aumento en el porcentaje de micronúcleos en éstas células, el cual resultó estadísticamente significativo con respecto al DMSO, el extracto KfAcOEt, a la concentración administrada no mostró evidencia de un aumento significativo comparado con el control negativo (DMSO 0.1%).

En la **Figura 29**, se muestran los valores de los porcentajes de eritrocitos normocrómicos Micronucleados de los diferentes grupos experimentales, aquí se observa que la Ciclofosfamida induce un daño genético estadísticamente significativo que corresponde al aumento del porcentaje de micronúcleos en éstas células, sin embargo aquellas muestras de los ratones administrados con el extracto KfAcOEt, los porcentajes de micronucleos se mantuvieron en los niveles basales con respecto a los ratones administrados con H₂O y/o vehículo.

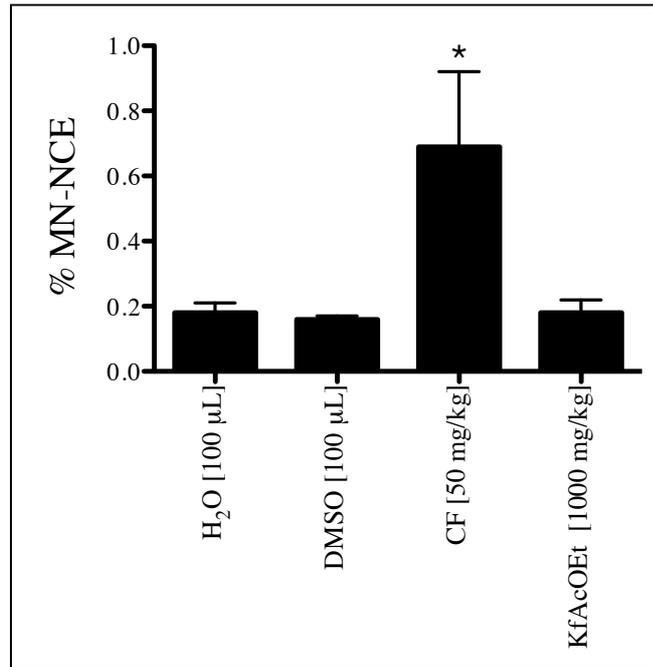


Figura 29. Porcentaje de eritrocitos normocrómicos micronucleados detectados en sangre periférica de ratones CD1 administrados oralmente con el extracto KfAcOEt. H₂O y DMSO: Controles negativos, Ciclofosfamida: (CF) Control positivo. Los datos son presentados como el Promedio±Desviación Estándar (n=5); *P<0.05 estadísticamente significativo comparado con el control negativo (DMSO 0.1%).

En la **Tabla 3** se resumen los datos obtenidos que han sido graficados para cada uno de los grupos experimentales de ratones administrados, donde se muestra la frecuencia del porcentaje de micronúcleos, así como el decremento de la frecuencia de reticulocitos.

Tabla 3. Porcentajes de RET, MN-RET y MN-CNE en sangre periférica de ratón tratado con el extracto KfAcOEt

Tratamiento	Dosis	%RET	%MN-RET	%MN-NCE
Extracto KfAcOEt	1000 mg/kg	1.76 ± 0.42*	0.52 ± 0.21	0.18 ± 0.04
H ₂ O	100 µL/ratón	5.41 ± 0.44	0.27 ± 0.09	0.18 ± 0.03
DMSO	100 µL/ratón	5.78 ± 0.31	0.36 ± 0.12	0.16 ± 0.01
Ciclofosfamida	50 mg/kg	0.81 ± 0.16 *	8.44 ± 0.22 *	0.69 ± 0.23 *

*p ≤ 0.05 vs control negativo, se realizó una ANOVA seguido de una prueba *post hoc* de Dunnet.

7.5 Toxicidad aguda del extracto KfAcOEt (Dosis letal (DL))

En los ratones tratados con el extracto KfAcOEt, no se encontraron signos o síntomas de toxicidad (como pilo-erección, irritación de mucosas o alteraciones en la actividad motora) o casos de muerte durante los 14 días posteriores a la administración del extracto (5000 mg/kg). Los pesos de los ratones tratados no presentaron variaciones estadísticamente significativas respecto a los animales sanos durante el periodo de tratamiento (**Tabla 4**). Los órganos (pulmones, riñones, corazón, estómago, intestinos, bazo e hígado) no mostraron ningún tipo de lesión morfológica macroscópica (Datos no mostrados).

Tabla 4. Peso de ratones CD-1 (g)

	Día 1		Día 14		Peso ganado al día 14	
	Control	<i>K. flammea</i>	Control	<i>K. flammea</i>	Control	<i>K. flammea</i>
Peso	22.3 ± 1.8	21.7 ± 1.8	35.7 ± 1.5	36.3 ± 0.3	13.3 ± 0.3	14.7 ± 1.9

Los valores se expresan como Promedio ± Error Estándar (n=3). ANOVA de una vía *post hoc* prueba Bonferroni fue realizada para determinar la significancia estadística. *P<0.05 vs Control (Animales administrados con DMSO).

7.6 Efecto del extracto KfAcOEt en el desarrollo de tumores de células PC3 en ratones atímicos

El tratamiento de los ratones atímicos con tumores inducidos inició en el día 7 después de la inoculación con células PC3 (día 0), tiempo en el que el promedio general del tamaño de los tumores fue de 0.05 cm^3 ; posterior a este tiempo, el crecimiento de los tumores es exponencial con respecto al paso de los días. En aquellos grupos experimentales a los cuales se les inocularon células y no recibieron tratamiento o sus tratamientos consistieron en la administración de DMSO (4%), el volumen tumoral se incrementó a 0.8 y 0.5 cm^3 respectivamente al final del esquema de tratamiento.

A diferencia de aquellos ratones a los cuales se les administraron las diferentes dosis del extracto KfAcOEt (**10X**: 9.2 mg/kg , **5X**: 4.6 mg/kg , **1X**: 0.9 mg/kg), el crecimiento tumoral se inhibió con respecto a los ratones administrados con el vehículo (DMSO 4%), el tamaño del tumor fue estadísticamente significativo a los 24 y 26 días de tratamiento, utilizando una ANOVA de dos vías con una prueba *post hoc* de Tukey. Un grupo de ratones fue tratado con Docetaxel, el cual fue considerado como control positivo, el crecimiento tumoral en este grupo de animales mostró una inhibición similar a los tratados con el extracto KfAcOEt (**Figura 30**).

En la **Figura 31**, se muestran ratones que han sido tratados con el extracto KfAcOEt, así como aquellos no tratados o con el vehículo DMSO 4%, donde se puede observar el crecimiento tumoral. En aquellos que no recibieron tratamiento o que fueron tratados con el vehículo, mostraron un aumento considerable del tamaño tumor; en ellos también se observó la vascularización o angiogénesis, dentro y en la periferia de los tumores, así como necrosis (**Figuras 31A y 31B**).

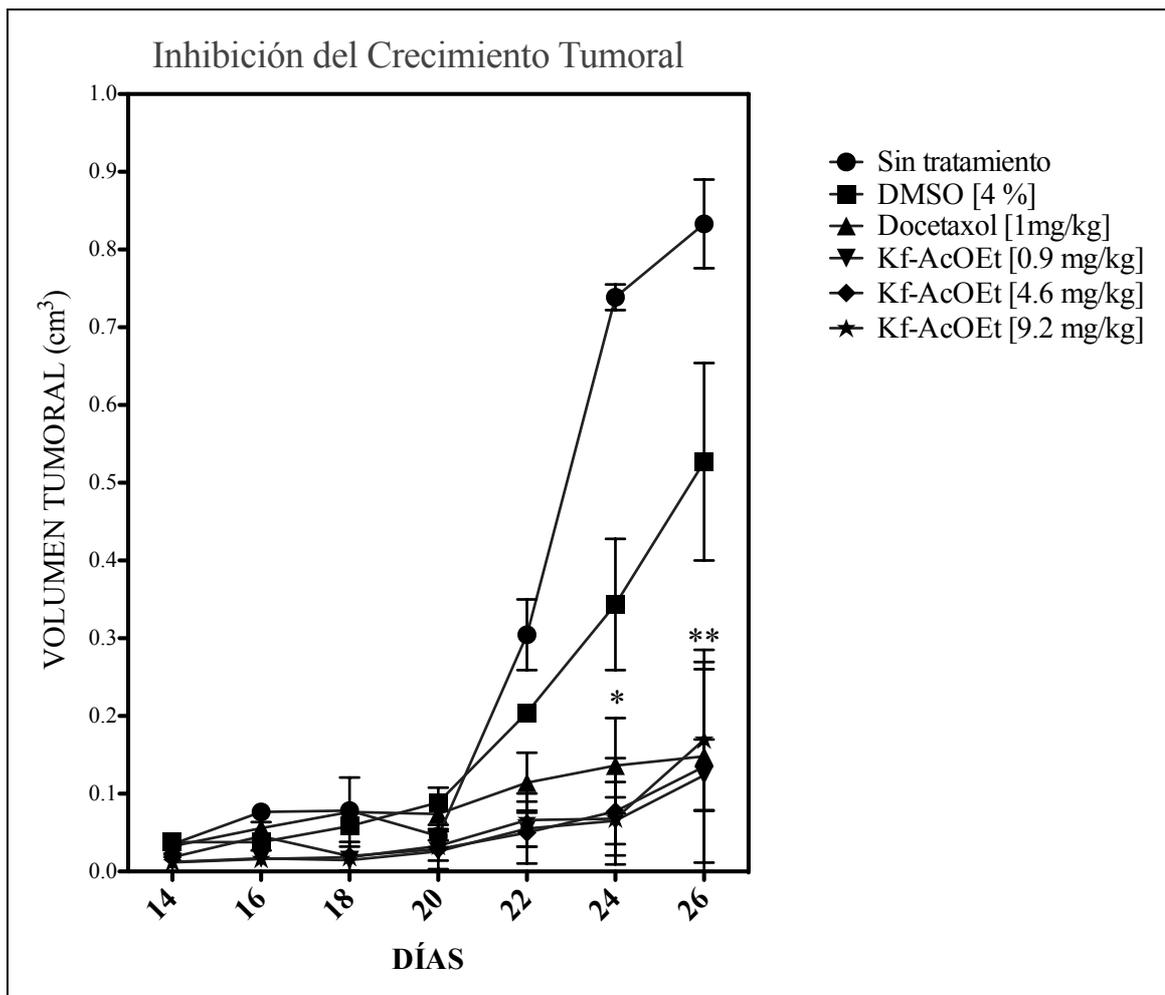


Figura 30. Efecto de la inhibición del crecimiento tumoral en ratones atímicos tratados con diferentes dosis del extracto KfAcOEt. Los diferentes grupos experimentales y sus datos son presentados como el Promedio±Error Estándar (n=5). *P<0.1, **P<0.01 vs el grupo control negativo (DMSO 4%).

Los ratones que fueron administrados con el extracto KfAcOEt, mostraron una masa tumoral reducida y no mostraron vascularización, angiogénesis o necrosis (Figuras 31C y 31D).

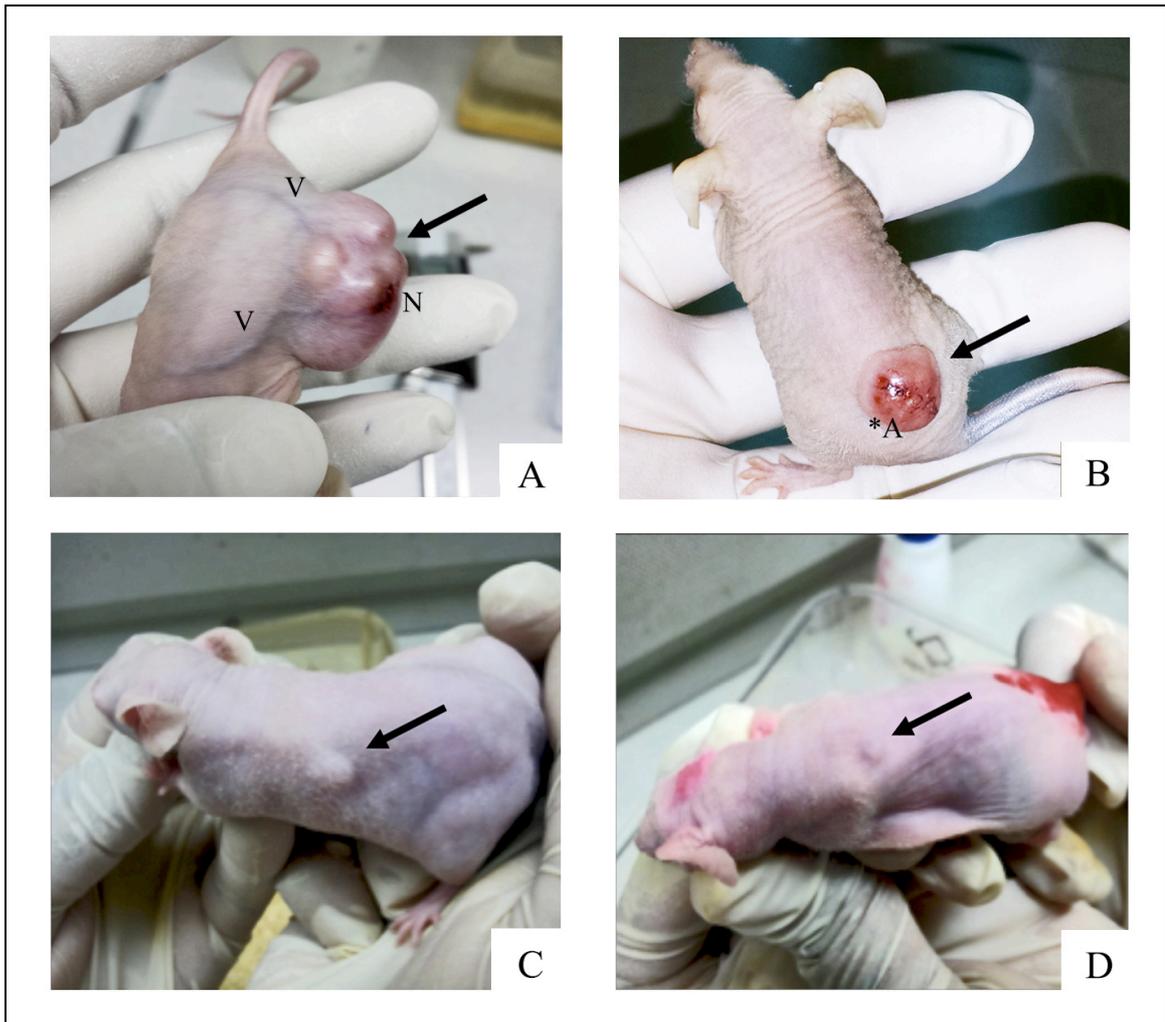


Figura 31. Efecto del extracto KfAcOEt en la inhibición del crecimiento tumoral de células PC3 en ratones atímicos. Ratones sin tratamiento (A), administrados con el vehículo (DMSO 4%) (B) y ratones administrados con el extracto KfAcOEt con la dosis de 4.6 mg/kg (C), 9.2 mg/kg (D). V: Vascularización, *A: Angiogénesis, N: Necrosis. Flechas indican la posición del tumor.

7.6.1. Análisis del peso de ratones atímicos con tumor inducido de células PC3 tratados con el extracto KfAcOEt

Es importante dar un seguimiento del peso de los animales utilizados en cualquier modelo experimental, sobre todo si éste implica la administración de un agente de prueba, ya que se considera que la pérdida de peso es un indicador de toxicidad. Durante el modelo de inducción de tumores donde se evaluó el efecto del extracto KfAcOEt en el crecimiento tumoral, se registraron los pesos de los animales durante los días de tratamiento. En la **Figura 32** se muestra el peso de cada uno de los grupos experimentales donde el promedio del peso de los ratones en el día en que se iniciaron

los tratamientos fueron de 24 g, mismo que fue incrementando en el transcurso de los días hasta alcanzar un promedio de 29 g. El único grupo que mostró una disminución significativa de peso con respecto a los ratones no tratados, fue el grupo de ratones administrados con Docetaxel, lo cual refleja la toxicidad del compuesto, aunque mostró ser eficaz en la inhibición del crecimiento tumoral, teniendo una efectividad similar a la del extracto KfAcOE. Finalmente el peso de los ratones tratados con el extracto KfAcOE ó con el vehículo DMSO 4%, no fue tan diferente al de los ratones sanos.

7.6.2. Análisis histopatológico de los órganos de ratones atímicos tratados con el extracto KfAcOE

Se hizo el análisis de los cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina de algunos órganos provenientes de ratones de los diferentes grupos experimentales. Los cortes representativos se muestran en la **Figura 33** donde observamos lo siguiente:

Los **cortes de hígado** muestran una arquitectura normal de hepatocitos de forma poligonal y lobulillos hepáticos normales de forma hexagonal con vena central y triada portal (arteria hepática, vena porta y conducto biliar). No se observaron lesiones hepáticas como degeneración de los hepatocitos o acumulaciones intracelulares ni procesos de inflamación, fibrosis, necrosis o apoptosis aparente.

Los cortes histológicos de **bazo** de los animales tratados con el extracto KfAcOE, muestran integridad de la cápsula, mientras que en el parénquima se observa una distribución equilibrada de la pulpa esplénica blanca y la pulpa esplénica roja. Se observaron linfocitos T, linfocitos B y arteriola central en la pulpa blanca y sinusoides esplénicos normales en la pulpa roja.

Las secciones de **riñón** de los animales tratados con el extracto KfAcOE muestran una corteza renal normal con arquitectura normal de glomérulos y túbulos proximales y distales, mientras que la médula muestra túbulos colectores, proximales y distales normales.

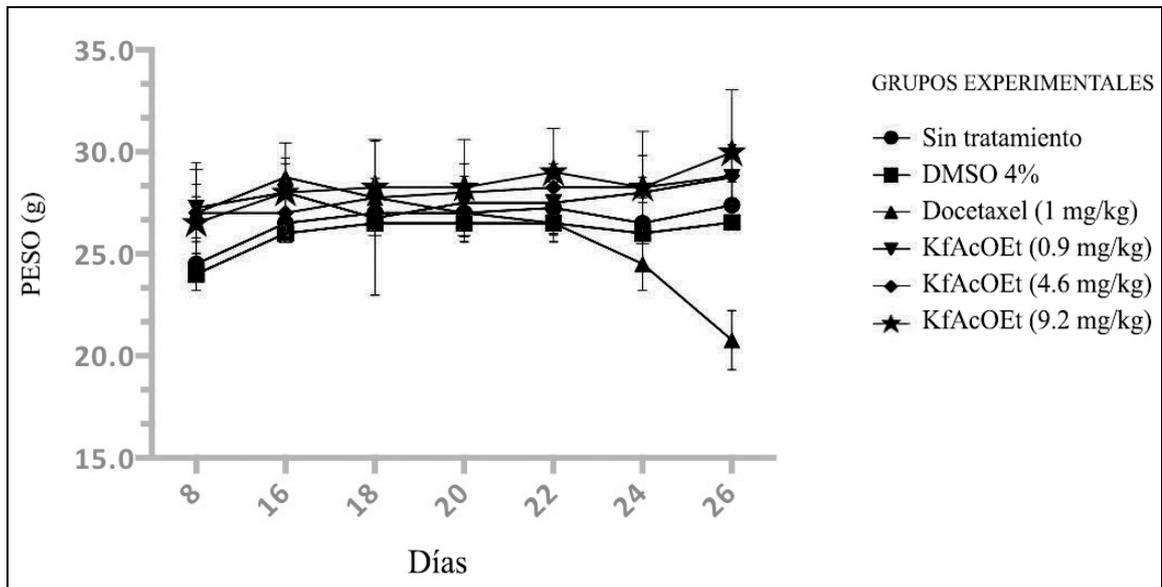


Figura 32. Efecto del extracto KfAcOEt en el aumento del peso relativo de ratones atómicos, alimentados con una dieta estándar. Los datos de cada grupo experimental son presentados como el Promedio \pm Desviación Estándar (n=5 por grupo).

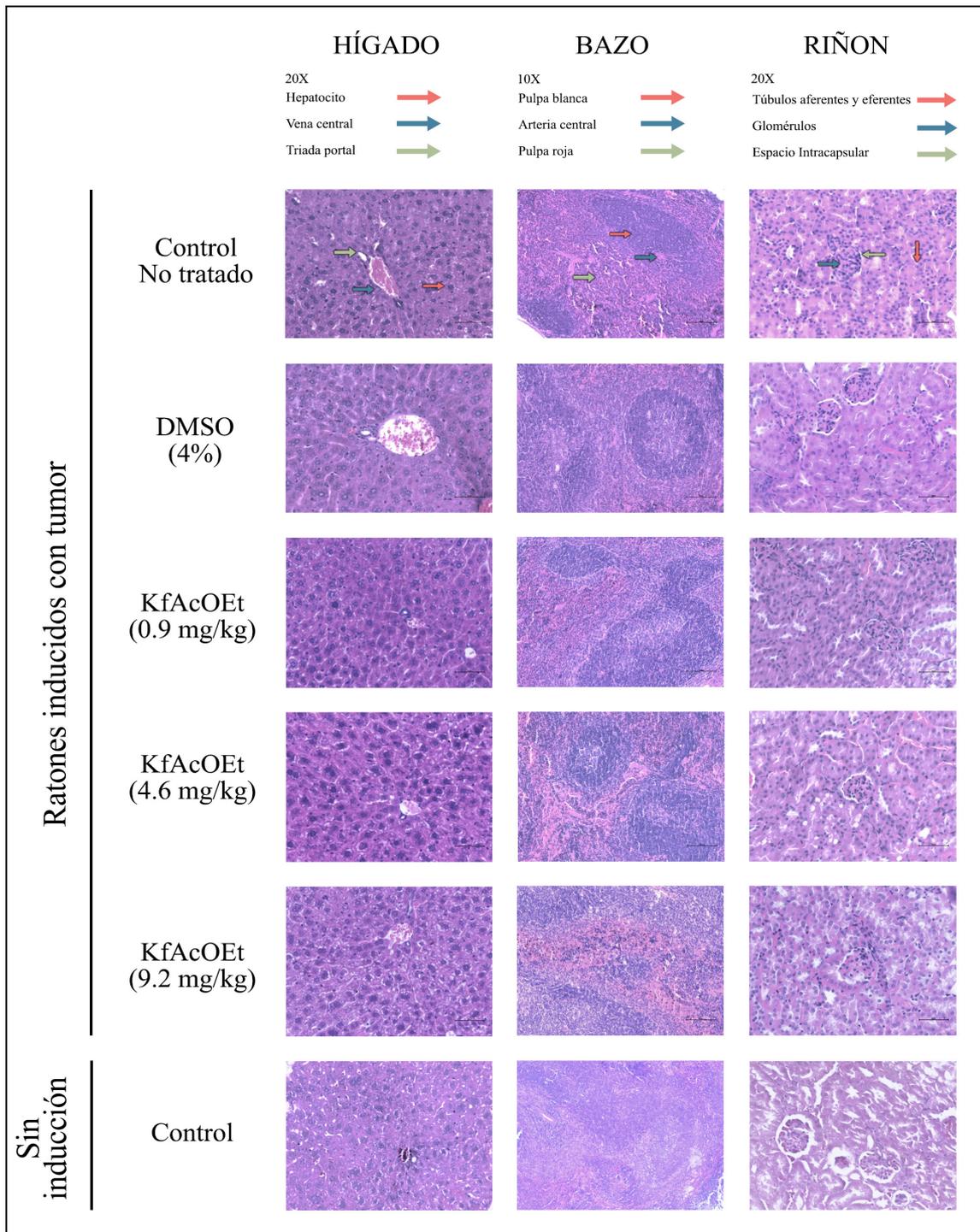


Figura 33. Análisis histopatológico de órganos extraídos de ratones atímicos de diferentes grupos experimentales de la evaluación del efecto antitumoral del extracto KfAcOEt. Tinción con Hematoxilina & Eosina de cortes del Hígado, Bazo y Riñón son mostrados, así como algunas estructuras características de cada órgano son mostradas con flechas. Aumentos 10x y 20x.

7.7 Caracterización fitoquímica del extracto KfAcOEt

La investigación de fitoquímicos basados en la etnofarmacología es considerado como un acercamiento efectivo en el descubrimiento de nuevas entidades químicas con potencial para desarrollar un fármaco; dentro de este proceso, la extracción es el primer paso, para ello se recurrió a metodologías tradicionales como la maceración, del cual por cada kilogramo de hojas y tallos de la planta (*Kalanchoe flammula*), se obtuvieron alrededor de 0.83 g de rendimiento del extracto, durante el proceso de maceración con acetato de etilo. A partir de la obtención del extracto KfAcOEt, se continuó a caracterizar algunos de sus componentes mayoritarios y activos; esto de acuerdo al diagrama de flujo mostrado en la **Figura 34**, en el cual se muestran las fracciones primarias (F1 – F9) obtenidas al someter el extracto KfAcOEt a una cromatografía en columna abierta (este procedimiento no fue parte del presente proyecto), sin embargo las fracciones que mostraron ser citotóxicamente activas y selectivas en células de Cáncer de Próstata (PC3) y no en células sanas (PrEC/Linfocitos), fueron retomadas para su evaluación biológica (Datos ya mostrados) y su caracterización fitoquímica.

7.7.1 Análisis de compuestos mayoritarios obtenidos por Cromatografía en Placa Preparativa de las Fracciones F4 y F8

Las fracciones activas F4 y F8, las cuales fueron sometidas a Cromatografía en Placa Preparativa, mostraron diferentes manchas correspondientes a diferentes componentes encontrados en la misma. Como se muestra en la **Figura 35**, cuando una placa es visualizada con luz UV a una longitud de onda larga de 365 nm, el fondo de la placa se observa de color negro y las sustancias que absorben en la región del espectro de esta luz, son excitados para emitir fluorescencia, los cuales son visibles como manchas blancas o de algunos colores contrastando con el fondo negro. La mayoría de los compuestos aromáticos y compuestos poli-cíclicos absorben alrededor de esta longitud de onda.

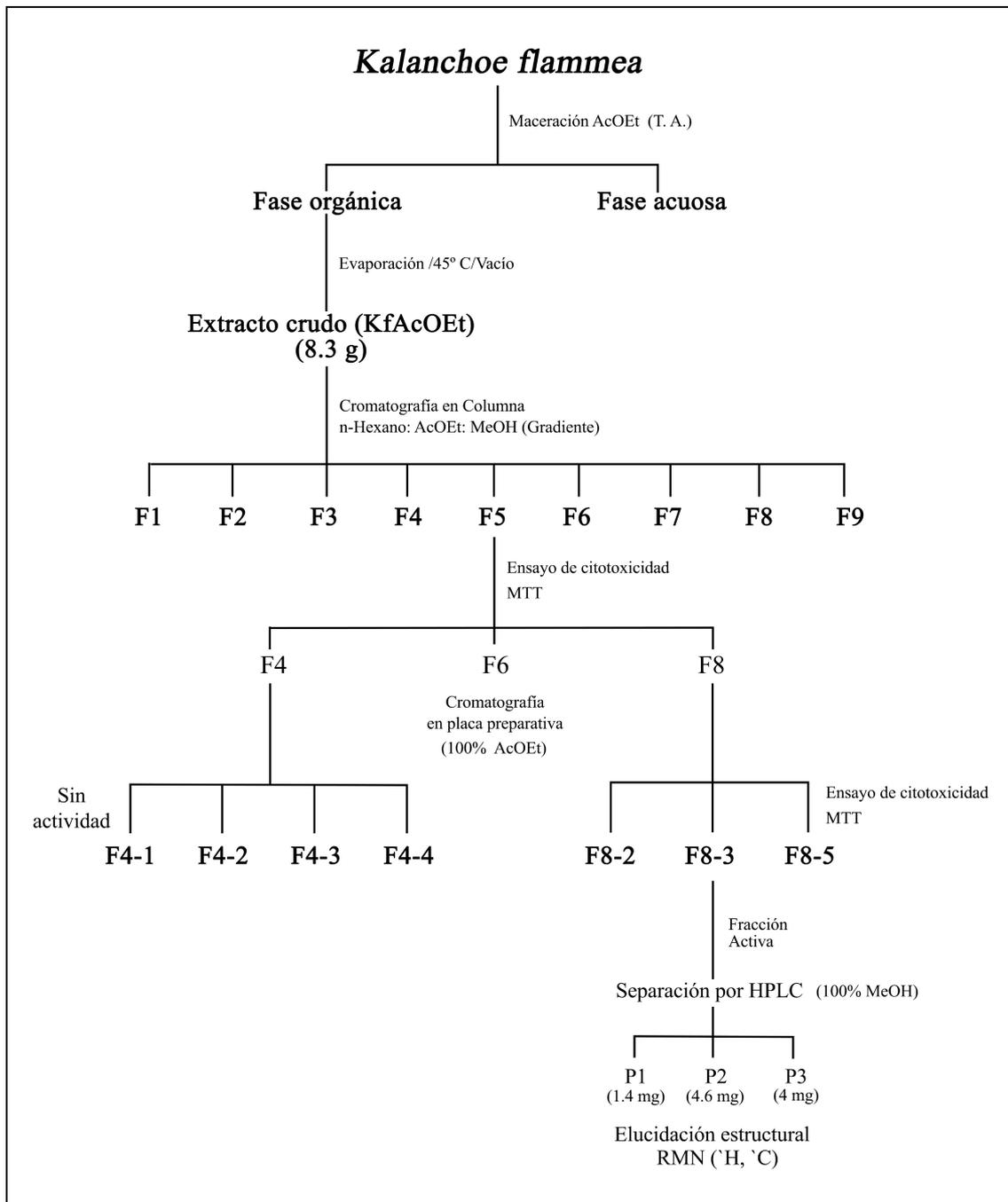


Figura 34. Diagrama de flujo del fraccionamiento bio-dirigido y separación de componentes del extracto KfAcOEt para la caracterización fitoquímica de compuestos mayoritarios y activos.

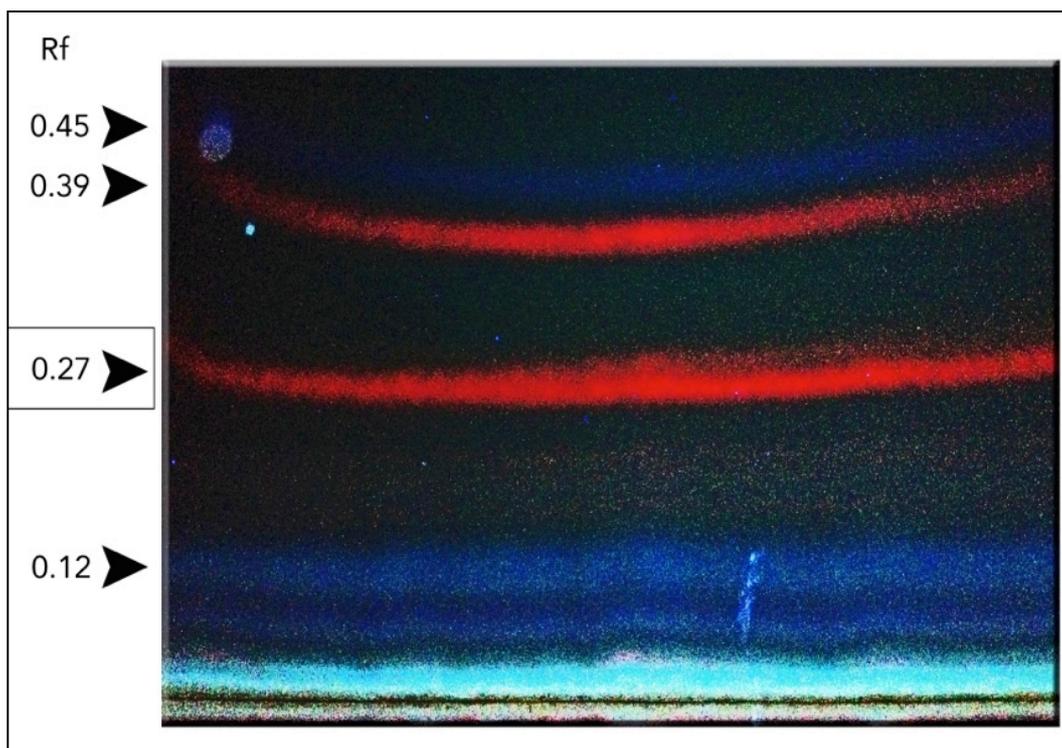


Figura 35. Perfil cromatográfico de la Fracción 4, separada en una placa preparativa de vidrio PLC Silica gel 60 F₂₅₄ revelada a una longitud de onda luz UV de 365 nm. Las flechas indican el RF de los componentes mayoritarios. Fase móvil: AcOEt 100%.

Esta visualización nos ayudó a detectar sus compuestos mayoritarios para realizar una identificación posterior de su posible naturaleza química. Al igual que en la Fracción 4, en la **Figura 36**, se muestra el perfil cromatográfico de la Fracción 8, visualizado mediante luz UV de una longitud de onda de 356 nm.

7.7.2 Análisis de compuestos mayoritarios de las Fracciones F4 y F8 por Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico

Los componentes mayoritarios y mejor definidos en cuanto a su separación (para la Fracción 4, RF=0.27. Fracción 8: RF=0.73 y 0.09) , fueron obtenidos y sometidos a un análisis por Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico. En la **Figura 37** se muestra el cromatograma obtenido para el compuesto con un RF de 0.27, el cual de acuerdo a la base de datos del equipo, el compuesto correlacionó con un **Alcaloide** con fórmula molecular $C_{11}H_{10}NO_4$ y con un peso molecular de 220 g/mol. El mismo procedimiento fue utilizado para los compuestos de la Fracción 8 y los cromatogramas son mostrados en las **Figuras 38 y 39**. El compuesto con un RF de 0.73, mostró un

patrón de fraccionamiento molecular correspondiente a un **Esterol** con fórmula molecular $C_{28}H_{45}O_5$ y un peso molecular de 461 g/mol, el compuesto con un RF de 0.09, correspondió a un Glucósido Cardiotónico, con una fórmula molecular de $C_{31}H_{51}O_8$ y un peso molecular de 551 g/mol.

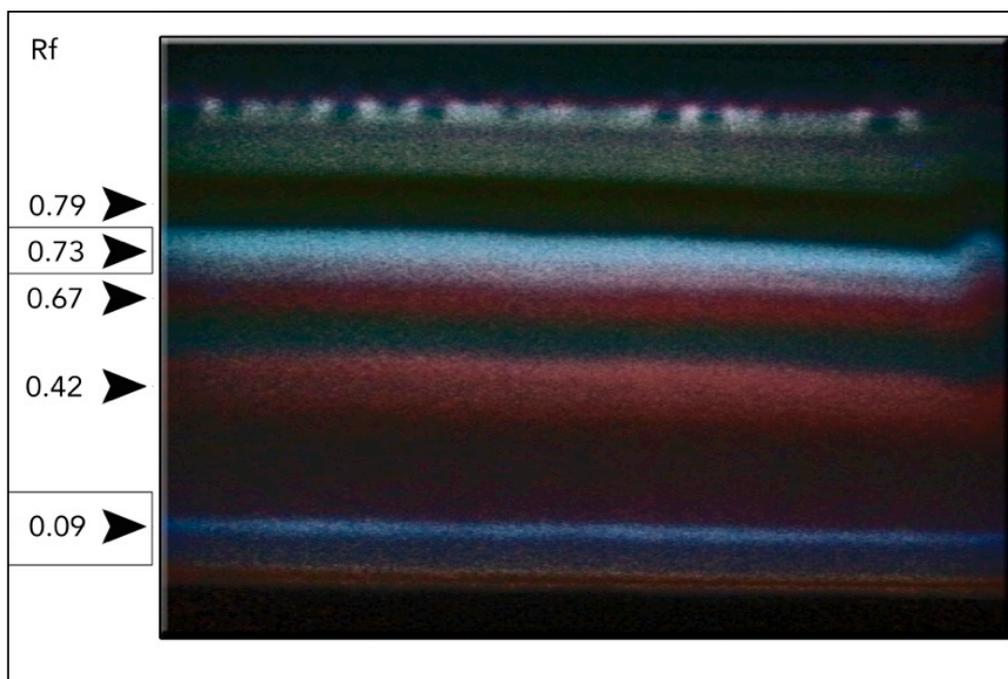


Figura 36. Perfil cromatográfico de la Fracción 8, separada en una placa preparativa de vidrio PLC Silica gel 60 F254 revelada a una longitud de onda luz UV de 365 nm. Las flechas indican el RF de los componentes mayoritarios. Fase móvil: AcOEt 100%.

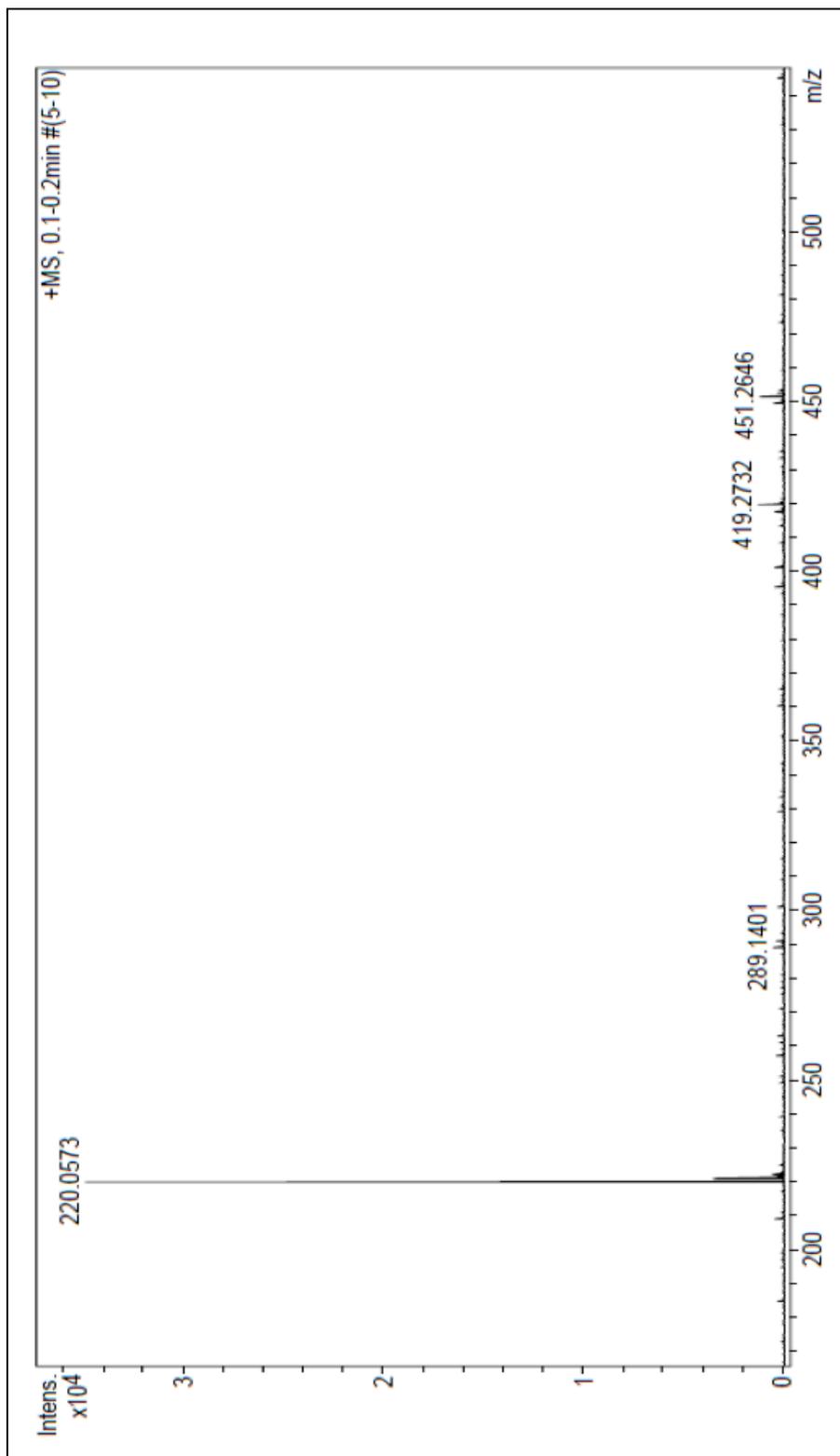


Figura 37. Cromatograma correspondiente a un Alcaloide obtenido de la Fracción 4 del extracto KfAcOEt, detectado por Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico. Pico base corresponde a la señal del compuesto con un peso molecular de 220.0573 g/mol.

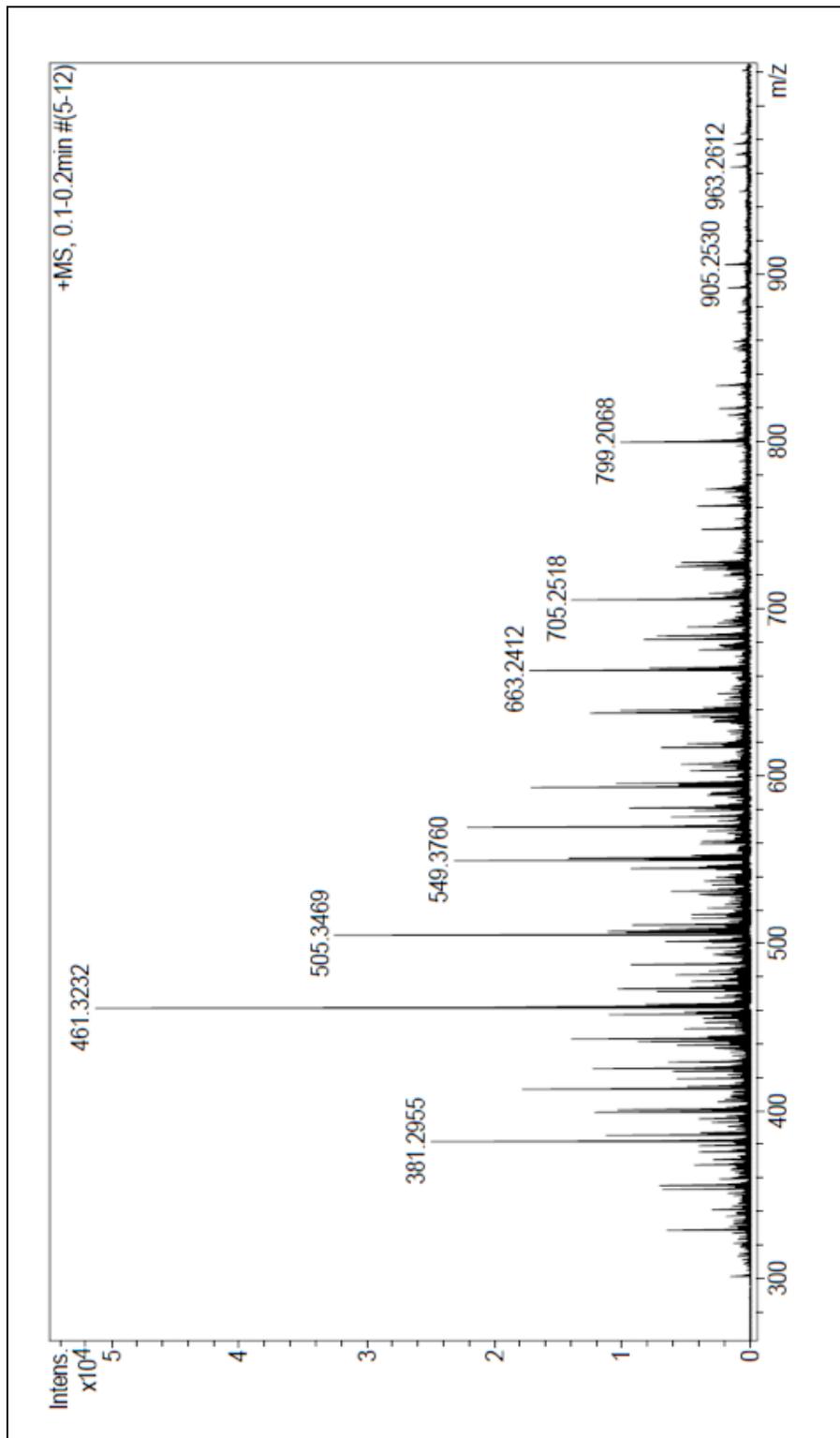


Figura 38 Cromatograma correspondiente a un Esterol obtenido de la Fracción 8 del extracto KfAcOEt, detectado por Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico. Pico base corresponde a la señal del compuesto con un peso molecular de 461.3232 g/mol.

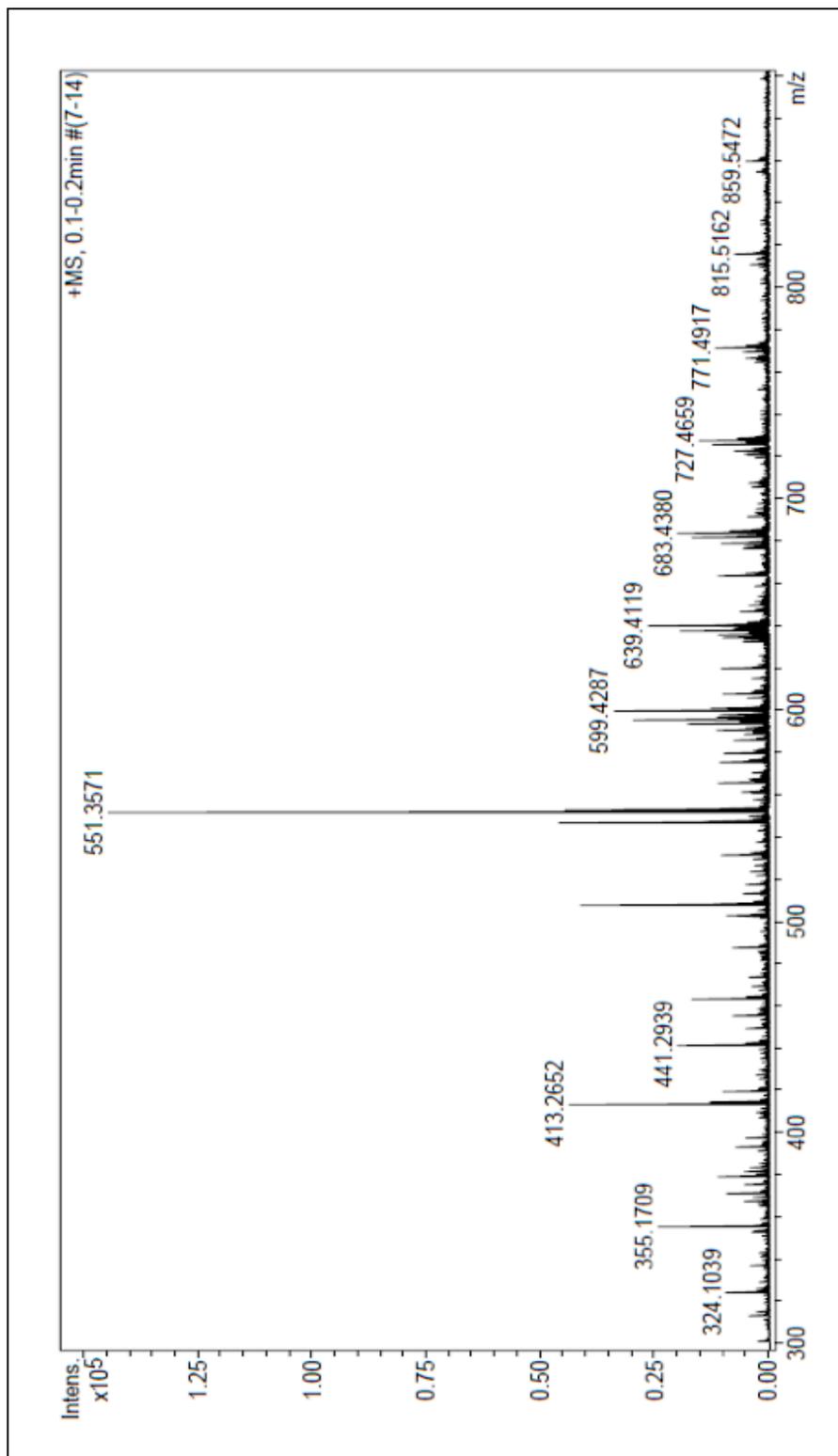


Figura 39. Cromatograma correspondiente a un Glucósido Cardiotónico obtenido de la Fracción 8 del extracto KfAcOEt, detectado por Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico. Pico base corresponde a la señal del compuesto con un peso molecular de 551.3571 g/mol.

7.7.3 Separación y análisis de F8-3 por HPLC y RMN H

De acuerdo a los datos presentados anteriormente, ninguna de las fracciones secundarias de la Fracción 4 resultaron ser citotóxicamente activas en las células PC3, sin embargo, dentro de la Fracción 8, se encontró una fracción secundaria (KF8-3) con una actividad citotóxica significativa, la cual en resultados previos se había mostrado su actividad biológica. Esta fue seleccionada para su identificación fitoquímica, por lo cual fue sometida a Resonancia Magnética Nuclear ^1H , en la cual se nos indicó que en sus componentes se encontraban varios compuestos, que no podían ser identificados por el momento debido a sobre-posiciones de las señales.

En la **Figura 40**, se muestra el cromatograma obtenido de dos de los compuestos encontrados en la Fracción 8-3, que corresponden a los dos picos que se encuentran a diferentes tiempos de retención al detectarse con una lámpara de luz UV de 220 nm y con un flujo constante de 1 mL/min, esto con la finalidad de poder obtener muestras con un grado de pureza mayor y poder identificar su naturaleza química.

Finalmente, éstos compuestos fueron sometidos a Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, los resultados de Espectros de Resonancia obtenidos para los compuestos de la fracción secundaria KF8-3, se muestran en las **Figuras 41 y 42**; para el pico con tiempo de retención de 2.368 min (P1) y para el pico con tiempo de retención de 3.018 (P2), los cuales han sido comparados con algunos de los compuestos previamente reportados en el género *Kalanchoe* y de los cuales aún nos encontramos en proceso de nombrar a la(s) estructura(s).

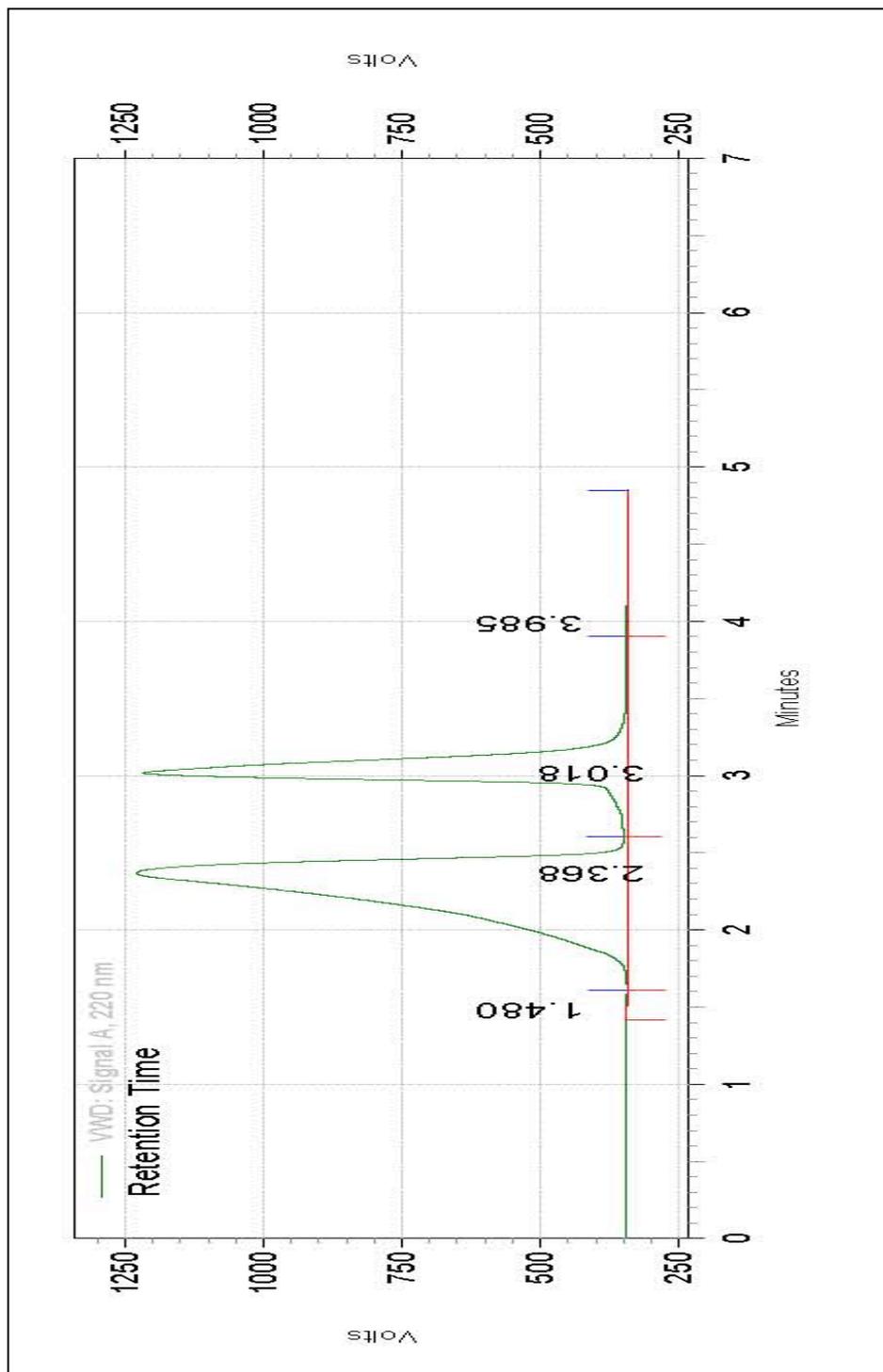


Figura 40. Cromatograma de la separación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de los componentes de la fracción secundaria KF8-3 del extracto KfAcOEt, detectado a 220 nm.

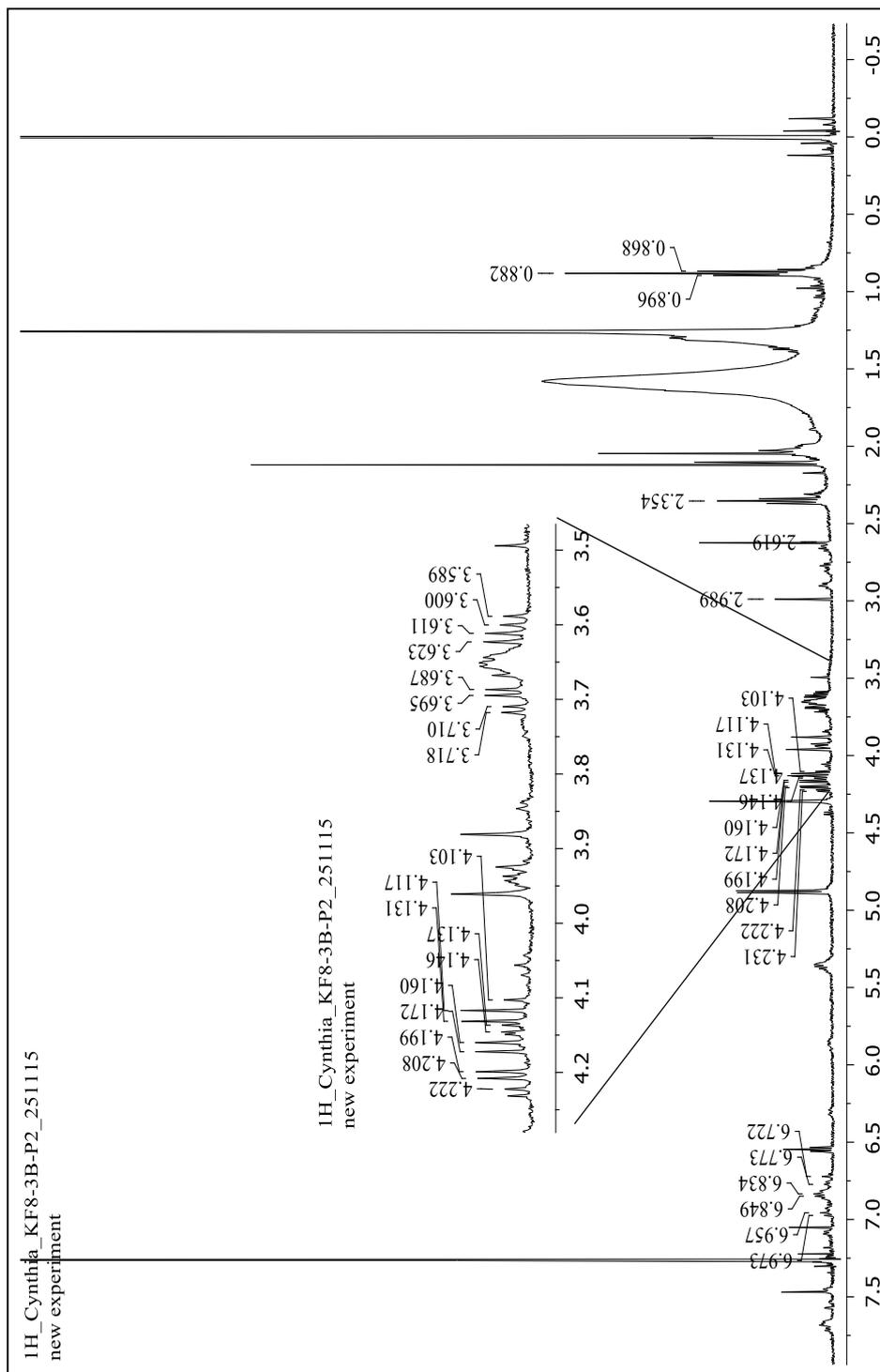


Figura 41. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno de PI

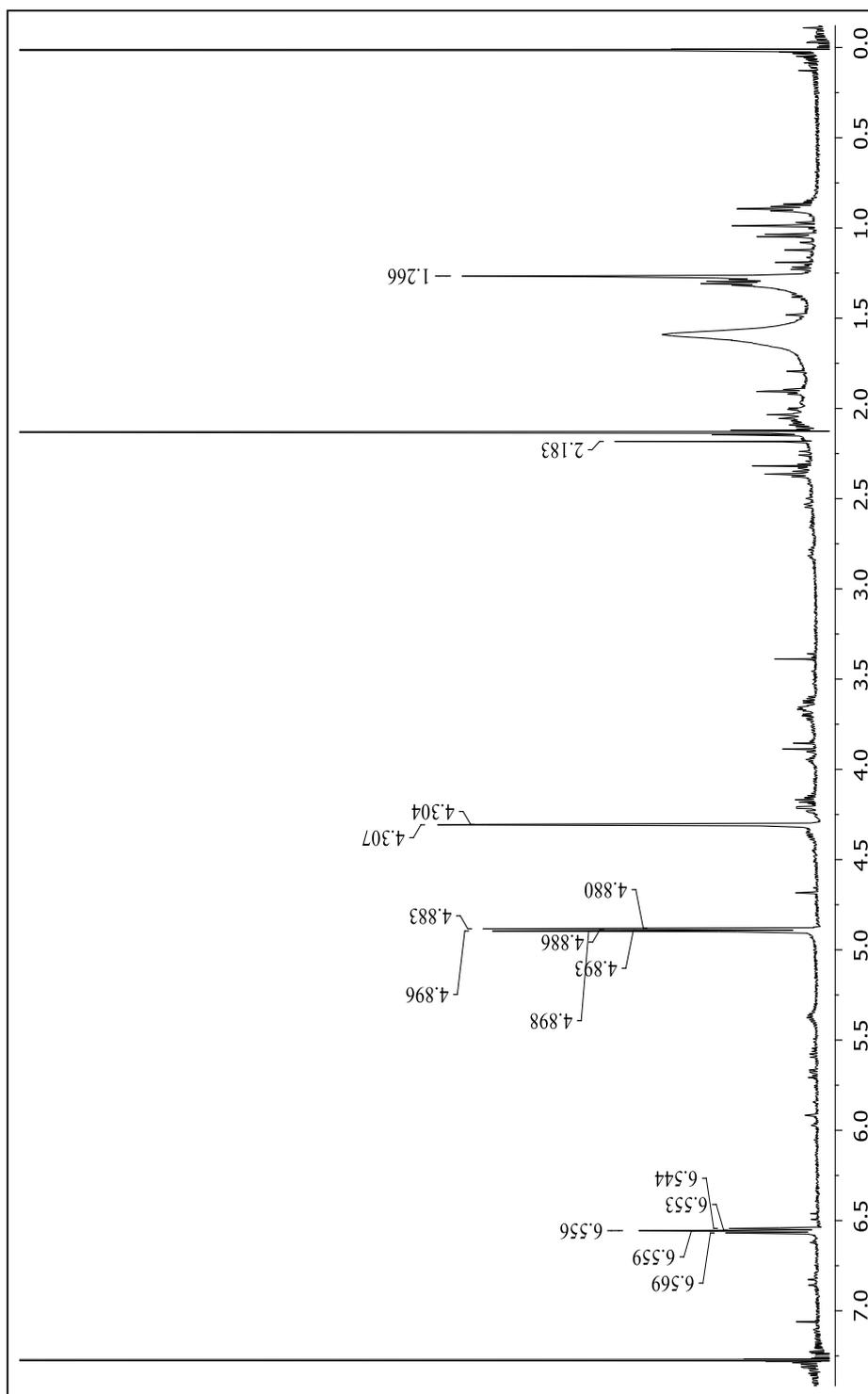


Figura 42. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno de P1

8. DISCUSIÓN

La historia del uso de las plantas por los seres humanos es casi tan antiguo como el comienzo de la misma. Inicialmente, la gente usaba las plantas con motivos nutricionales, pero después al descubrir sus propiedades medicinales, este recurso natural llegó a ser muy útil para la cura de las enfermedades y el mejoramiento de la salud. En el pasado, las personas no tenían idea acerca de las moléculas bioactivas pero el uso de estos compuestos fue suficientemente diverso en diferentes prospectos. Típicamente, los compuestos bioactivos de las plantas son producidos como metabolitos secundarios, la producción de estos a través de las diferentes especies, es principalmente seleccionado a través del curso de evaluación y necesidad particular de cada especie (Azmir *et al.*, 2013).

De esta manera, podemos definir a los compuestos bioactivos de las plantas como “metabolitos secundarios que pueden provocar un efecto farmacológico o toxicológico en los seres humanos y animales” (Bernhoft, 2010).

Los compuestos bioactivos que se encuentran disponibles en la naturaleza son de gran importancia, ya que éstos podrían dar las soluciones a problemáticas de salud mundial para tratar enfermedades como el Cáncer, el cual continúa siendo un problema de interés social, esto a causa de la alta incidencia y mortalidad alrededor del mundo, en particular el Cáncer de Próstata (CaP) ocupa el tercer lugar de mortalidad en cánceres en hombres (Torre *et al.*, 2015).

Estudios etnobotánicos en nuestro país, relacionan el uso de plantas del género *Kalanchoe* con el tratamiento del cáncer. Investigaciones relacionadas al género *Kalanchoe* han relevado que su actividad citotóxica en múltiples líneas celulares es debida a la presencia de metabolitos secundarios denominados **Bufadienólidos**, los cuales muestran actividad citotóxica a CI_{50} de 0.002 – 50 $\mu\text{g/mL}$ (Wu *et al.*, 2006, Kuo *et al.*, 2008, Mahata *et al.*, 2012, Hsieh *et al.*, 2012, Kaewpiboon *et al.*, 2014, Hsieh *et al.*, 2015). Si correlacionamos los datos citotoxicidad obtenidos en este trabajo, los valores de CI_{50} obtenidos con el extracto KfAcOEt se encuentran dentro de estos rangos reportados, sugiriendo que la actividad citotóxica de éste género es probable que se conserve entre las diferentes especies.

Por otro lado, podríamos asegurar que el género *Kalanchoe* muestra selectividad hacia células neoplásicas sobre células que no lo son, de acuerdo con lo que reportamos

en este trabajo, el extracto KfAcOEt mostró mayor selectividad citotóxica en células de Adenocarcinoma Prostático (PC3) y el efecto fue mucho menor en células de Epitelio Prostático de fenotipo no neoplásico (PrEC), esta selectividad fue reportada previamente en otro estudio, donde una fracción soluble en agua de *Kalanchoe tubiflora* fue selectiva en una línea celular de Carcinoma de Pulmón comparada con Células de Pulmón no neoplásicas (Hsieh *et al.*, 2015).

Para identificar los componentes bioactivos en el extracto KfAcOEt que ejercen una actividad biológica específica se realizó un fraccionamiento bio-dirigido. Los resultados obtenidos indicaron que el efecto citotóxico se fue perdiendo en algunas fracciones. Algunos autores indican que una combinación o mezcla de metabolitos, frecuentemente exhiben potentes actividades anti-proliferativas o actividades anti-cancerígenas, inclusive más que un solo compuesto purificado, esto sugiere que los componentes de un extracto crudo puede actuar en sinergia para mejorar el índice terapéutico (Lin *et al.*, 2007). Aún cuando sólo una de las fracciones (KF8-3) mostró un efecto citotóxico importante, sus valores de CI_{50} no fueron tan distintos a los mostrados con el extracto, aún cuando esta fracción contenga menos componentes a diferencia del extracto total.

En las pruebas *in vitro* realizadas, la caracterización de la muerte celular por apoptosis fue comprobada. Al evaluar la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO), la capacidad reductora o pro-oxidantes de agentes químicos es considerado como una cualidad interesante en la búsqueda de fármacos antineoplásicos (Chiu y Dawes, 2012); esta actividad pro-oxidante es uno de los eventos evidenciados en el extracto KfAcOEt al generar una excesiva producción de ERO. A su vez, el excesivo estrés oxidativo a causa de la sobreproducción de ERO que se produce en una célula, es descrito como uno de los detonantes en la fase de inicio de la inducción de la apoptosis (Ott *et al.*, 2007). Cabe mencionar, que las células cancerosas contienen niveles reducidos de enzimas antioxidantes, por lo cual su sistema de defensa contra agentes oxidantes es deficiente en comparación con células normales, de tal modo que cuando las ERO celulares exceden la capacidad amortiguadora de las funciones antioxidantes de una célula cancerosa, puede inducirse la muerte celular (Nishikawa, 2008). Este punto podría explicar en parte el efecto selectivo del extracto KfAcOEt por las células neoplásicas, ya que como inductor de especies reactivas de oxígeno, las defensas antioxidantes eficientes de las células no neoplásicas amortiguarían, mediante este sistema, el efecto del extracto KfAcOEt.

En el punto de “no retorno” de la célula a comprometerse a la muerte celular, se encuentra la fase de ejecución de la apoptosis, donde destaca la actividad proteolítica de las Caspasas. Algunos autores que han realizado estudios a diferentes especies de *Kalanchoe* han comprobado que tienen la capacidad de activación de la vía intrínseca de la apoptosis en células de Cáncer Cervico-Uterino, Pulmón y de Leucemia Promielocítica Aguda (Mahata *et al.*, 2012, Huang *et al.*, 2013, Kaewpiboon *et al.*, 2014). Mahata y colaboradores evidenciaron, mediante el uso de un extracto con cloroformo y una fracción aislada de *Kalanchoe pinnata*, que era capaz de inducir en células HeLa aumento en la expresión de la proteína proapoptótica Bax, así como la disminución de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, dando lugar a la activación de la Caspasa-3. Por otro lado, Kaewpiboon y colaboradores, reportan la activación de la apoptosis mediante la liberación de Citocromo C y activación de caspasas en células A549 resistentes al Etopósido, con un extracto proveniente de *Kalanchoe laetivirens*. Esta evidencia soporta los datos obtenidos en el presente trabajo, donde el mecanismo propuesto con respecto a la activación de la Caspasa-9,-3, estaría propiciando que el extracto KfAcOEt induzca la vía intrínseca de la apoptosis; sin embargo, es importante mencionar que dependiendo del estirpe celular, la respuesta obtenida puede variar, ya que existen mecanismos alternos que convergen en una misma vía de señalización.

Una de las características genotípicas por las cuales se desarrolla el Cáncer de Próstata, involucra la pérdida de la proteína p53, siendo éste uno de los mecanismos por los cuales las células cancerosas evaden la apoptosis. Normalmente esta proteína (p53) es clave para el mantenimiento de la integridad del genoma y también se encuentra relacionada en la regulación de reacciones de oxidación y reducción dentro de las células; entonces en un mecanismo de acción que involucre el daño por ERO al ADN, se induce la estabilización de p53 y posterior señalización que culmina en la apoptosis. El resultado final es el incremento en la actividad de esta proteína que provoca a su vez el aumento de la expresión de proteínas pro-apoptóticas como Bax y PUMA, las cuales forman poros en la membrana mitocondrial para la posterior liberación del Citocromo C y activación de efectores posteriores (Ott *et al.*, 2007). Entonces, en el caso de las células PC3, p53 se encuentra ausente debido a una mutación en el gen de la proteína (Moriatti *et al.*, 2014) por lo tanto este mecanismo no podría estar ocurriendo, a menos que el extracto KfAcOEt fuera capaz de inducir una restauración y reactivación de la función del gen de la proteína p53, estrategia terapéutica que ha sido prometedora con el uso de moléculas sintéticas, pero poco observada en productos naturales. El único caso

evidenciado es el presentado por el alcaloide Elipticina, aislado de algunas plantas de la familia Apocyanaceae; que se sabe ejerce un efecto apoptótico a través de la restauración de la función de mutantes de p53 *in vitro* (Peng *et al.*, 2005), no obstante, sería conveniente realizar estudios adicionales para comprobar esta propuesta. Una teoría más acertada, sobre el mecanismo de acción ejercido en éstas células mutantes a p53, sería debido a que existen dos mecanismos propuestos para la liberación de Citocromo C, de los cuales posiblemente el extracto KfAcOEt este induciendo este evento a través de la generación excesiva de ERO, produciendo una oxidación de los poros mitocondriales y por disrupción de la membrana mitocondrial sin la participación directa de Bcl-2, Bax y PUMA (Garrido *et al.*, 2006).

El final de los eventos de señalización de la ejecución de la apoptosis converge en la activación de la Caspasa-3, que es indicativo de que el proceso de fragmentación del ADN se estaba realizando, ya que dentro de sus blancos, se encuentran proteínas como CAD (Caspase-activated DNase), la cual provoca esta fragmentación (Nagata, 2000).

Este evento fue evaluado mediante el ensayo de escalera (DNA ladder), el cual aunque no es una prueba lo suficientemente sensible para la discriminación de fragmentación por eventos de apoptosis o necrosis, nos ofrece evidencia de manera práctica y sencilla para demostrar este proceso de fragmentación, el cual fue evidenciado parcialmente a tiempos largos de exposición. Dado los resultados obtenidos, se decidió realizar la prueba de TUNEL, la cual es una prueba citoquímica mucho más sensible para detectar rupturas en el ADN. Los resultados positivos a esta prueba nos indican un evento de la fase final de la apoptosis derivado de la exposición de las células al extracto KfAcOEt, dentro de los cuales la inactivación de la proteína PARP-1 fue evidenciada, así como cambios morfológicos y dinámicos de la membrana plasmática, de los cuales ciertas protusiones son frecuentemente observadas, así como un encogimiento celular (Willingham, 1999, Bottone *et al.*, 2013).

En este contexto, se sabe que muchos fármacos quimioterapéuticos han sido empleados para matar a las células con alto índice de proliferación, causando un daño extensivo en el ADN que culmine en el arresto celular y apoptosis. La eficacia de estos agentes terapéuticos se ve frecuentemente limitada debido a la habilidad de las células de reparar el ADN dañado (Yong *et al.*, 2014). Como estrategia a este evento, la inhibición de la actividad de PARP-1, es un evento importante en el incremento de la susceptibilidad de las células al daño del ADN causado por estos agentes. La potenciación de la radioterapia y de quimioterapéuticos con inhibidores de PARP-1 es

una estrategia promisoras que sigue explorándose en varias líneas celulares (Bouchard *et al.*, 2003).

A la fecha no hay reportes sobre la capacidad de inducción de la fragmentación del ADN causado por alguna especie del género *Kalanchoe*, sin embargo, Mahata y colaboradores en el 2012, hacen referencia a la inactivación de PARP-1 como uno de los eventos ocurridos en la activación de la apoptosis por parte de un glucósido cardiotónico que fue aislado y nombrado como Briofilina A, esto en células HeLa.

Como se mencionó antes, un extensivo daño al ADN puede causar arresto del ciclo celular. Hay muchos mecanismos y vías de señalización que convergen y por los cuales se puede dar una respuesta al arresto, estos mecanismos han sido ampliamente descritos, donde se ha especificado que altos niveles de ERO provoca la oxidación de varias moléculas que están involucradas en la activación de diferentes puntos de control del ciclo celular, esta respuesta a su vez, también depende del tipo y perfil genético de la célula (Bilodeau *et al.*, 2000; Chiu y Dawes, 2012).

Posiblemente el extracto KfAcOEt este promoviendo el arresto celular a través de la sobreproducción de ERO, ya que nuestros datos indican que el extracto KfAcOEt arresta a las células PC3 en la fase de Síntesis del ADN.

De acuerdo a la literatura, muchos compuestos de origen natural tienen la capacidad de arrestar el ciclo celular en la fase de Síntesis, como por ejemplo, la Simvastatina, que arresta el ciclo celular en esta fase a través de la activación de Chk1 y el decremento de la expresión de Cdc25A/Cdk2, o como la Campotecina, que induce la fosforilación de Chk1 y degradación de Cdc25A (Tu *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2003).

El mecanismo propuesto por el cual el extracto KfAcOEt está ejerciendo este efecto en las células PC3, podría estar relacionado con puntos de control mediados por Chk1, el cual tiene como blanco de proteólisis a la proteína Cdc25A, causando su inhibición y posible detención de la transición de la fase S a G2/M, al evitar la activación de los complejos de Ciclina A/CDK2. La proteína p21 es también una proteína clave reguladora, que es sobre-expresada en respuesta a un daño al ADN. Esta proteína contiene un sitio de unión carboxilo terminal para el antígeno celular nuclear de proliferación (PCNA) y a través de esta interacción p21 es capaz de bloquear la síntesis de ADN por la polimerasa δ . Retomando el estatus de mutación de la proteína p53 en células PC3, en este contexto se ha encontrado que en células T47D-H3 de Cáncer de Mama, las cuales contienen una mutación en el gen de p53. Se ha observado que la

inducción de hipoxia a través de la inhibición de la actividad de CDK2, resulta en el arresto del ciclo celular en la fase de Síntesis (Bilodeau *et al.*, 2000).

Resulta interesante mencionar que se ha reportado que Chk1 y Cdc25A son también sustratos de caspasas durante eventos de apoptosis y que existe la posibilidad de que la Caspasa-3 provoque un corte en un sitio específico en la proteína Chk1, dando como resultado un fragmento N-terminal, que posiblemente juegue un papel importante en reacciones de apoptosis al fosforilar varios sustratos debido a su alta actividad cinasa de esta proteína (Matsuura *et al.*, 2008).

Por otro lado, se ha sugerido también que durante la fragmentación por apoptosis, la proteína H2AX (Histona) es fosforilada por el fragmento N-terminal de Chk1, induciendo cambios en la morfología del núcleo celular, provocando condensación de la cromatina y a su vez potenciando la apoptosis de la célula (Matsuura *et al.*, 2008). Este último evento de condensación de la cromatina fue observado en las células PC3 tratadas con el extracto KfAcOEt. Posiblemente estas proteínas claves como Chk1, podrían ser evaluadas para evidenciar estos eventos moleculares causados por el extracto KfAcOEt, ya que algunas referencias indican que Chk1 podría ser un blanco atractivo para potenciar la eficacia del tratamiento de terapias anticancerígenas (Syljuåsen *et al.*, 2005).

En los ensayos *in vivo* realizados con el extracto KfAcOEt, se consideró interesante el hecho de que éste no haya mostrado toxicidad en los ratones utilizados a los cuales se les administraron diferentes dosis del extracto KfAcOEt, ya que no se observó ningún tipo de daño a nivel macroscópico o histológico o algún efecto adverso reflejado en la reducción del peso de los ratones. Importantemente se observó que no tuviera efectos en el hígado, dado que este juega un papel central en el metabolismo y excreción de fármacos.

MeKonnen y colaboradores en el 2012, evaluaron la Dosis Letal 50 de un extracto metanólico de *Kalanchoe petitiána*. Ellos observaron que este extracto no era capaz de inducir algún efecto toxicológico en ratones utilizando dosis de hasta 5000 mg/kg. Las pruebas realizadas para la determinación de la Dosis Letal 50 que se evaluaron con el extracto KfAcOEt (5000 mg/kg) coinciden con este reporte, asumiendo la bioseguridad de administrar el extracto KfAcOEt en posteriores evaluaciones clínicas en seres humanos y su potencial para su desarrollo como producto farmacológico.

En el ensayo de micronúcleos realizado a los ratones se demostró que el extracto no era capaz de inducir algún tipo de daño a nivel cromosomal, aún cuando el porcentaje

de Reticulocitos disminuyó significativamente, la dosis administrada es mucho mayor que la necesaria para alcanzar una respuesta citotóxica en células de Adenocarcinoma Prostático (PC3).

Recientemente, Hsieh *et al.* 2015, reportaron la actividad *in vivo* de la fracción soluble acuosa de *Kalanchoe tubiflora* administrada intraperitonealmente en ratones atímicos inducidos con células de Carcinoma de Pulmón (A549). Las dosis administradas (10 y 100 mg/kg) retardan el crecimiento tumoral. Estos datos correlacionan con los reportados en el presente trabajo, donde una dosis de 9.2 mg/kg del extracto KfAcOEt, muestra una inhibición del crecimiento celular de células PC3. Aún cuando posiblemente este proceso de inhibición este siendo resultado del efecto citotóxico del extracto KfAcOEt, este mecanismo de inhibición tumoral *in vivo*, necesitaría ser elucidado con otras investigaciones posteriores.

Por otro lado, del género *Kalanchoe*, algunos metabolitos han sido aislados y caracterizados estructuralmente mostrando actividad citotóxica en diferentes tipos de líneas celulares de cáncer. Dicha actividad se la han atribuido principalmente a metabolitos del grupo de los **Bufadienólidos** y **Cardenólidos** (Supratman *et al.*, 2000; Mahata *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013; Kaewpiboon *et al.*, 2014). En esta investigación nosotros hemos detectado cualitativamente la presencia de Glucósidos Cardiotónicos, Alcaloides y Esteroles, sin embargo, hace falta realizar más análisis espectroscópicos para elucidar sus estructuras, así como identificar los compuestos químicos separados de la fracción citotóxicamente activa (KF8-3). Los compuestos obtenidos de la separación de la fracción KF8-3 fueron sometidos a Resonancia Magnética de Hidrógeno, estos datos fueron comparados con las señales de resonancia de compuestos previamente identificados en el género *Kalanchoe*, encontrando que los obtenidos en KF8-3 no pertenecen a ninguna de las moléculas reportadas.

Finalmente, aún cuando la mayoría de los ensayos biológicos realizados en esta investigación están enfocados a la actividad biológica que presenta el extracto KfAcOEt y no de compuestos completamente puros, resulta interesante destacar que el sinergismo e interacción de múltiples componentes contenidos en un extracto total, tienden a ejercer mayor actividad que sus compuestos puros, lo cual en una terapia podría mejorar el índice terapéutico, además de reducir la resistencia farmacológica de las células tumorales al inducir múltiples efectos en éstas (Lin *et al.*, 2007).

En la actualidad, el uso de suplementos alimenticios, nutracéuticos y alimentos funcionales, está incrementando en producción industrial debido a la demanda de los

consumidores (Liu *et al.*, 2004). Por ello, es necesario encontrar una terapia racional y farmacológica superior en comparación a sus constituyentes aislados, ya que los efectos sinérgicos en los extractos, podrían estar afectando muchos blancos o interactuando entre ellos para mejorar algunas de sus propiedades como su solubilidad, valor de reabsorción, aumento de su biodisponibilidad, eliminación o neutralización de efectos adversos y así potenciar su actividad en el organismo. Aún cuando los mecanismos que a causa de efectos sinérgicos permanecen sin ser elucidados, muchos conceptos han ido surgiendo de este tipo de investigaciones. El concepto denominado “Multi-fármaco” ha sido actualmente reasignado a terapias anticancerígenas actuales como la “**Quimioterapia Metronómica**”, que implica la idea de combatir el cáncer a través de la acción de destruir los tumores por la supresión o activación de diferentes procesos que son esenciales para su sobrevivencia como: La angiogénesis, inhibición oncogénica, inducción de la apoptosis, activación del sistema inmune y combatir procesos inflamatorios (Wagner y Ulrich-Merzenich, 2009).

En este contexto, la investigación de los mecanismos sinérgicos de extractos de plantas, son de ayuda en la investigación para el descubrimiento de nuevos fitofármacos y combinaciones farmacéuticas, sin embargo la investigación de éstos mecanismos resultan necesarios en posteriores investigaciones clínicas. Dentro del gran éxito de estas investigaciones podemos destacar que frecuentemente algunos extractos son aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos para su evaluación preclínica en tratamientos del cáncer de Pulmón (Normile, 2003, Saklam y Kutty, 2007).

Resulta interesante entonces, la idea planteada en esta investigación sobre los efectos múltiples de los componentes del extracto con acetato de etilo de *Kalanchoe flammula* para lograr un efecto farmacológico en posteriores evaluaciones preclínicas, que puedan indicar su uso como coadyuvante en conjunto con quimioterapéuticos utilizados actualmente para el tratamiento del Cáncer de Próstata de condición Hormono Independiente, con la finalidad de mejorar la respuesta y aumentar sus índices de sobrevivencia.

9. CONCLUSIONES

El extracto KfAcOEt es capaz de causar un efecto citotóxico en células PC3 de Adenocarcinoma Prostático de manera dosis-dependiente. El extracto muestra selectividad hacia células con fenotipo neoplásico en una potencia de 92.5 veces más que en las células sanas.

El análisis de citotoxicidad en cuanto al curso de tiempo de exposición entre 24 y 48 h no muestran una diferencia estadística significativa, por lo cual el extracto KfAcOEt es capaz de ejercer su efecto desde las primeras 24 h de exposición en las células PC3.

El valor de la CI_{50} obtenido con el extracto KfAcOEt ($1.36 \pm 1.14 \mu\text{g/mL}$) se encuentra dentro del rango considerado como citotóxicamente activo de acuerdo al Instituto Nacional del Cáncer de los EUA, donde el límite máximo del valor de CI_{50} para extractos naturales se considera que deben ser menor de $20 \mu\text{g/mL}$.

El extracto KfAcOEt es capaz de inducir la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (H_2O_2) desde tiempos tempranos (6 h) de exposición con la CI_{50} en las células PC3, misma que se mantiene estable hasta las 24 h de exposición.

El extracto KfAcOEt es capaz de inducir la liberación de Citocromo C al citosol, desde las 12 h de exposición con la CI_{50} , misma que va en aumento hasta las 48 h de exposición, que es inversamente proporcional al Citocromo C detectado en las mitocondrias.

No se encontró una modificación significativa en los niveles de expresión de la proteína Bcl2, la cual es una proteína anti-apoptótica que de encontrarse disminuída, involucraría la acción de proteínas como p53, la cual se encuentra ausente en células PC3 de Cáncer de Próstata.

Se evidenció la activación de la Caspasa-3, desde las 12 h de exposición con la CI_{50} , misma que va en aumento hasta las 48 h de exposición, donde puede observarse los fragmentos característicos de 19 y 17 kDa de la proteína.

El extracto KfAcOEt es capaz de inducir la fragmentación del ADN de células PC3 como un indicativo de la fase final de la apoptosis, éstos fueron observados desde las 12 h de exposición.

Uno de los eventos importantes que se encuentran relacionados al proceso de fragmentación es la proteólisis de la proteína PARP-1, que es una proteína encargada de reparar daños en el ADN en respuesta a una variedad de estrés celular. Cuando la Caspasa-3 es activada, proteoliza a la proteína para provocar la disminución de su actividad de reparación de ADN. Este proceso de inactivación fue comprobado mediante el reconocimiento de un fragmento específico de 89 kDa, producto de la proteólisis causada por la actividad de esta caspasa.

Los efectos característicos morfológicos de la fase final de la apoptosis fueron observados al tratar las células PC3 con el extracto KfAcOEt, los cuales incluyen cambios en el tamaño celular, rearrreglos del citoesqueleto, cambios dinámicos de la membrana plasmática, que incluyen el “*blebbing*” dinámico, protusiones, picos de equinodermos y los denominados cuerpos apoptóticos.

Con lo anterior se puede concluir que se caracterizó la actividad apoptótica inducida por el extracto KfAcOEt en células de Cáncer de Próstata a través de la vía intrínseca. Todas las pruebas realizadas se hicieron con base en la propuesta de evaluación del Comité de Nomenclatura de Muerte Celular, en el cual hacen mención a las características bioquímicas más relevantes de las fases de inicio, ejecución y final de la apoptosis.

El extracto KfAcOEt es capaz de inducir el arresto celular de células PC3 en la fase de Síntesis del ADN del ciclo celular a las 12 y 24 h de exposición. A las 12 h de tratamiento, se induce un arresto estadísticamente significativo con respecto a las células tratadas con el vehículo (DMSO 0.1%).

Se comprobó que el extracto KfAcOEt no induce efectos mutagénicos a nivel cromosomal, ya que no hubo un incremento significativo en el porcentaje de

reticulocitos y eritrocitos normocrómicos micronucleados a la dosis administrada de 1000 mg/kg.

La evaluación de la Dosis Letal 50 nos indicó que el extracto KfAcOEt se encuentra dentro del rango de seguridad de la categoría 5 del Sistema Globalmente Armonizado (GHS), ya que los ratones no mostraron señales de toxicidad a la dosis de 5000 mg/kg.

Se evidenció que el extracto KfAcOEt es capaz de inhibir el crecimiento tumoral de células PC3 inducidas en ratones atímicos a las diferentes dosis administradas, el fármaco de referencia Docetaxel utilizado en la clínica, causa el mismo efecto que el extracto, con la diferencia de que ejerce un efecto tóxico en los ratones (disminución del peso).

El análisis histopatológico realizado a partir de los órganos extraídos de los diferentes grupos experimentales, muestran una arquitectura normal de las células, sin evidencia de necrosis celular que pudieran ser causadas por un efecto tóxico de la administración del extracto KfAcOEt.

Se logró la identificación de 3 compuestos a partir de 2 fracciones primarias activas del extracto KfAcOEt, los cuales, de acuerdo a la librería de datos, correspondieron a un alcaloide (220 g/mol), esterol (461 g/mol) y glucósido cardiotónico (551 g/mol).

Solo una de las fracciones secundarias (KF8-3) de la fracción primaria F8, mostró un efecto citotóxico preferente en células PC3, sobre las células de fenotipo sano (PrEC). A su vez, la concentración inhibitoria al 50% obtenida no varió significativamente con respecto a la mostrada por el extracto total.

La fracción secundaria KF8-3, mantuvo la propiedad de inducir un arresto celular en la fase de S del ciclo celular a partir de las 12 h de exposición, correlacionando con el efecto obtenido con el extracto total.

Se obtuvieron dos compuestos mayoritarios de la separación por HPLC de la fracción KF8-3, denominados P1 y P2, los cuales se encuentran en proceso de elucidación

10. PERSPECTIVAS

Identificar las moléculas encontradas en la fracción KF8-3, así como investigar un mecanismo de síntesis para la obtención de un mayor rendimiento de éstos.

Elucidar el mecanismo de acción relacionado al arresto celular en la fase de Síntesis producido por el extracto y/o los compuestos.

Evaluar la actividad biológica de los compuestos puros de KF8-3; enfocado a encontrar un posible mecanismo de acción en células de Cáncer de Próstata.

Analizar el posible efecto sinérgico e interacción del extracto y/o compuestos puros con fármacos como el Docetaxel; utilizados en el tratamiento del Cáncer de Próstata, con la finalidad de mejorar la respuesta de los pacientes a la quimioterapia.

Realizar ensayos clínicos en pacientes con Cáncer de Próstata.

Elaboración de una posible presentación farmacéutica (cápsulas) del extracto KfAcOEt.

11. REFERENCIAS

- Abate-Shen, C., & Shen, M. M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & development*, 14(19), 2410-2434.
- Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324-1337.
- Arcila, J. F. U. (2005). Cáncer de Próstata Parte I¿ Por qué se produce el cáncer de próstata? Aproximación a un modelo genético y molecular. *Revista Urología Colombiana*, 14(1), 19-32.
- Arias-González, Iván (2011). *Evaluación de la actividad antitumoral de diferentes extractos de varias especies de Kalanchoe en una línea celular de Cáncer de Próstata* (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, México. D. F.
- Angles-Falconi, Sergio Iván (2014). *Evaluación citotóxica, mutagénica y apoptótica de algunas fracciones obtenidas del extracto con acetato de etilo de K. flammea* (Tesis De Maestría). Instituto Politécnico Nacional, México. D. F.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.
- Balunas, M. J., & Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life sciences*, 78(5), 431-441.
- Berchem G. J., Bosseler M., Sugars L. Y. (1995) Androgens induce resistance to Bcl-2 mediated apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res.* 55: 735–8.
- Berges R. R., Furuya Y., Remington L., (1993). Cell proliferation, DNA repair and p53 function are not required for programmed death of prostatic glandular cells induced by androgen ablation. *Proc Nat Acad Sci*; 90:910–4.

- Bernhoft, A., 2010. A brief review on bioactive compounds in plants. In: Proceedings from a symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, Norway.
- Berx, G., & Van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(6), a003129.
- Bilodeau, J. F., Faure, R., Piedboeuf, B., & Mirault, M. E. (2000). Hyperoxia Induces S-Phase Cell-Cycle Arrest and p21 Cip1/Waf1-Independent Cdk2 Inhibition in Human Carcinoma T47D-H3 Cells. *Experimental cell research*, 256(2), 347-357.
- Bottone, M. G., Santin, G., Aredia, F., Bernocchi, G., Pellicciari, C., & Scovassi, A. I. (2013). Morphological features of organelles during apoptosis: an overview. *Cells*, 2(2), 294-305.
- Bouchard, V. J., Rouleau, M., & Poirier, G. G. (2003). PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Experimental hematology*, 31(6), 446-454.
- Cammerer, Z., Elhajouji, A., & Suter, W. (2007). In vivo micronucleus test with flow cytometry after acute and chronic exposures of rats to chemicals. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 626(1), 26-33.
- Carson, C., & Rittmaster, R. (2003). The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology*, 61(4), 2-7.
- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., & Moses, H. L. (2008). Transforming growth factor- β signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Molecular Cancer Research*, 6(10), 1521-1533.
- Chiu, J., & Dawes, I. W. (2012). Redox control of cell proliferation. *Trends in cell biology*, 22(11), 592-601.

- Chuu CP, Kokontis JM, Hiipakka RA, Fukuchi J, Lin HP, Lin CY, Huo C, and Su LC (2011). Androgens as therapy for androgen receptor-positive castration resistant prostate cancer. *J Biomed Sci* 18, 63.
- Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M. V., Radmayr, C., Trapman, J., Hittmair, A., & Klocker, H. (1994). Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer research*, 54(20), 5474-5478.
- Culig, Z., Hobisch, A., Hittmair, A., Peterziel, H., Cato, A. C., Bartsch, G., & Klocker, H. (1998). Expression, structure, and function of androgen receptor in advanced prostatic carcinoma. *The Prostate*, 35(1), 63-70.
- Davies P. & Eaton C. L. 1991 Regulation of prostate growth. *Journal of Endocrinology* 131 5-17.
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*, 89(2), 271-277.
- Dorai T, Aggarwal BB. (2004) Role of chemopreventive agants in cancer therapy. *Cancer Lett*, 215, 129–140.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.C., Pieters, R., Kleiner, J., (2002). Methods of *in vitro* toxicology. *Food Chem Toxicol* 40 (193-236).
- El Abdellaoui S., Destandau E., Toribio A., Elfakir C., Lafosse M., Renimel I., André P., Cancellieri P., Landemarre L. (2010) Bioactive molecules in *Kalanchoe pinnata* leaves: extraction, purification, and identification, *Anal Bioanal Chem.* 398(1329–1338).
- Finn, G. (2001). *Histología* (pp. 555-577). Panamericana.

- Foster C. S., Cornford P., Forsyth L., Djamgoz M. B., Ke Y. (1999) The cellular and molecular basis of prostate cancer. *BJU Int* , 83:171-94.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., ... & Gottlieb, E. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation*, 19(1), 107-120.
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., & Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, 13(9), 1423-1433.
- Gingrich, J. R., Barrios, R. J., Kattan, M. W., Nahm, H. S., Finegold, M. J., & Greenberg, N. M. (1997). Androgen-independent prostate cancer progression in the TRAMP model. *Cancer research*, 57(21), 4687-4691.
- González-Sánchez, I., Solano, J. D., Loza-Mejía, M. A., Olvera-Vázquez, S., Rodríguez-Sotres, R., Morán, J., ... & Cerbón, M. A. (2011). Antineoplastic activity of the thiazolo [5, 4-b] quinoline derivative D3CLP in K-562 cells is mediated through effector caspases activation. *European journal of medicinal chemistry*, 46(6), 2102-2108.
- Hanahan D., Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 86(353–364).
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Hardee, M. E., Dewhirst, M. W., Agarwal, N., & Sorg, B. S. (2009). Novel imaging provides new insights into mechanisms of oxygen transport in tumors. *Current molecular medicine*, 9(4), 435.

- Hsieh, Y. J., Huang, H. S., Leu, Y. L., Peng, K. C., Chang, C. J., & Chang, M. Y. (2015). Anticancer activity of *Kalanchoe tubiflora* extract against human lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Environmental toxicology*.
- Hsieh, Y. J., Yang, M. Y., Leu, Y. L., Chen, C., Wan, C. F., Chang, M. Y., & Chang, C. J. (2012). *Kalanchoe tubiflora* extract inhibits cell proliferation by affecting the mitotic apparatus. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), 149.
- Huang HC, Lin MK, Yang HL, Hseu YC, Liaw CC, Tseng YH, Tsuzuki M, Kuo YH.(2013), Cardenolides and bufadienolide glycosides from *Kalanchoe tubiflora* and evaluation of cytotoxicity, *Planta Medica*, 79, 1362-1369.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), [En línea], Lyon, Francia, (Fecha de consulta: 5 Diciembre 2015). <http://www-dep.iarc.fr/WHODb/WHODb.htm>
- Isaacs, J. T., & Coffey, D. S. (1981). Adaptation versus selection as the mechanism responsible for the relapse of prostatic cancer to androgen ablation therapy as studied in the Dunning R-3327-H adenocarcinoma. *Cancer research*, 41(12 Part 1), 5070-5074.
- Jiménez Ríos, MA, Solares Sánchez, M, Martínez Cervera, P, Aguilar Ponce, JL, Martínez Cedillo, J, Hinojosa Gómez, J, Rivera Rubí, L, Zamora Moreno, J, (2011) Oncogüía: Cáncer de Próstata. *Cancerología* 6: 13 – 18.
- Kaewpiboon, C., Srisuttee, R., Malilas, W., Moon, J., Kaowinn, S., Cho, I. R., ... & Chung, Y. H. (2014). Extract of *Bryophyllum laetivirens* reverses etoposide resistance in human lung A549 cancer cells by downregulation of NF- κ B. *Oncology reports*, 31(1), 161-168.
- Kennedy K.M., Dewhirst M.W. (2010) Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncol.* 6 (127–148).
- Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z., (2010). Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment, *Cell*. 141 (52–67).

- Krysko, D. V., Berghe, T. V., D'Herde, K., & Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44(3), 205-221.
- Kumar, S., Choudhary, S., Singh, N., & Setty, M. (2012). Combination of natural drugs: an emerging trend in cancer chemotherapy. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2(3).
- Kuo P. C., Kuo T. H., Su C. R., Liou M. J., Wu T. S. (2008) Cytotoxic principles and a-pyrone ring- opening derivatives of bufadienolides from *Kalanchoe hybrida*, *Tetrahedron*. 64 (3392-3396).
- Lin, F. M., Chen, L. R., Lin, E. H., Ke, F. C., Chen, H. Y., Tsai, M. J., & Hsiao, P. W. (2007). Compounds from *Wedelia chinensis* synergistically suppress androgen activity and growth in prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 28(12), 2521-2529.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of nutrition*, 134(12), 3479S-3485S.
- Lonergan P. E., Tindall D. J. (2011) Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *Journal of carcinogenesis* (10:20).
- Luna, G. Lee. Editor. 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd Edition. McGraw-Hill Book Company, NY.
- Mackay C. R., Terpe H. J., Stauder R., Marston W. L., Stark H., Gunthert U. (1994) Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol*; 124: 71-82.
- Mahata, S., Maru, S., Shukla, S., Pandey, A., Muges, G., Das, B. C., & Bharti, A. C. (2012). Anticancer property of *Bryophyllum pinnata* (Lam.) Oken. leaf on human cervical cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), 15.

- Matsubara A, Yasumoto H & Usui T (1999) Hormone refractory prostate cancer and fibroblast growth factor receptor. *Breast Cancer* 6 320–324.
- Matsuura, K., Wakasugi, M., Yamashita, K., & Matsunaga, T. (2008). Cleavage-mediated activation of Chk1 during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(37), 25485-25491.
- Mekonnen, A., Sidamo, T., Asres, K., & Engidawork, E. (2013). In vivo wound healing activity and phytochemical screening of the crude extract and various fractions of *Kalanchoe petitiانا* A. Rich (Crassulaceae) leaves in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 145(2), 638-646.
- Moretti, R. M., Marelli, M. M., Taylor, D. M., Martini, P. G., Marzagalli, M., & Limonta, P. (2014). Gonadotropin-releasing hormone agonists sensitize, and resensitize, prostate cancer cells to docetaxel in a p53-dependent manner. *PloS one*, 9(4), e93713.
- Mougiakakos D., Choudhury A., Lladser A., Kiessling R., Johansson C.C. (2010) Regulatory T cells in cancer. *Adv. Cancer Res.* 107(57–117).
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental cell research*, 256(1), 12-18.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.*, 70, 461–477.
- Nishikawa, M. (2008). Reactive oxygen species in tumor metastasis. *Cancer letters*, 266(1), 53-59.
- NOM-033-ZOO-1995, Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995: Sacrificio humanitario de los animales silvestres y domésticos. Diario Oficial De La Federación México, 1995.

NOM-062-ZOO-1999, Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial De La Federación México, 1999.

Normile D. The new face of traditional Chinese medicine. 2003; 299:188–90.

Nyiredy, S. (2000). Essential guides to method development in thin-layer (planar) chromatography. *Encyclopedia of Separation Science*, ed. ID Wilson, ER Adland, M. Corke and CF Poole, Academic Press, London, 10, 4652-4666.

OECD, 2014. Guidelines for the testing of chemicals, Section 4, Health Effects.

Ott, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(3), 1259-1263.

Powell C. T., Fair W. R., Heston W. D. (1994) Differential expression of protein kinase C isoenzymes messenger RNAs in Dunning R-3327 rat prostatic tumours. *Cell Growth Diff* 5(143–9).

Qian B. Z., Pollard J. W. (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* . 141(39–51).

Raffo A. J., Perlman H., Chen M. W., Day M. L., Streitman J. S., Buttyan R. (1995) Overexpression of Bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion *in vivo*. *Cancer Res.* 55: 4438–45.

Ramirez-Balderrama, L., López-Briones, S., Daza-Benitez, L., Macías, M. H., Lopez-Gaytan, T., & Pérez-Vázquez, V. (2012). [Neuroendocrine differentiation in prostateadenocarcinoma]. *Gaceta medica de Mexico*, 149(6), 639-645.

Saklani, A., & Kutty, S. K. (2008). Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug discovery today*, 13(3), 161-171.

- Saklani, A. and Kutty, S.K. (2008) Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discov. Today*, 13, 161–171.
- Secretaría de Salud (SSA), [En línea], Ciudad de México, México, (Fecha de Consulta: Noviembre 2015). <http://www.spps.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>
- Selivanova G. (2001) Mutant p53: The loaded gun. *Curr Opin Investig Drugs*. 2(1136-1141).
- Sneader, W. (1996) *Drug Prototypes and Their Exploitation*. Wiley, UK
- Sosnowski J., Stetter-Neel C., Cole D., Durham J. P., Mawhinney M. G. (1997) Protein kinase C mediated anti proliferative glucocorticoid-sphinganine synergism in cultured Pollard III prostate tumour cells. *J Urol*. 158: 269–74.
- Story, M. T. (1995). Regulation of prostate growth by fibroblast growth factors. *World journal of urology*, 13(5), 297-305.
- Supratman U., Fujita T., Akiyama K., (2001). Antitumor promoting activity of bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana x tubiflora*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 65 (4):947-949, 121.
- Syljuåsen, R. G., Sørensen, C. S., Hansen, L. T., Fugger, K., Lundin, C., Johansson, F., & Bartek, J. (2005). Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Molecular and cellular biology*, 25(9), 3553-3562.
- Talmadge J. E., Fidler I. J. (2010) AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective, *Cancer Res*. 70(5649–5669).
- Tilley, W. D., Wilson, C. M., Marcelli, M., & McPhaul, M. J. (1990). Androgen receptor gene expression in human prostate carcinoma cell lines. *Cancer Research*, 50(17), 5382-5386.

- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87-108.
- Tu, Y. S., Kang, X. L., Zhou, J. G., Lv, X. F., Tang, Y. B., & Guan, Y. Y. (2011). Involvement of Chk1–Cdc25A-cyclin A/CDk2 pathway in simvastatin induced S-phase cell cycle arrest and apoptosis in multiple myeloma cells. *European journal of pharmacology*, 670(2), 356-364.
- Wagner, H., & Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16(2), 97-110.
- Willingham, M. C. (1999). Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47(9), 1101-1109.
- Wu P., Hsu Y., Wu T., Bastow K., Lee K. (2006) Kalanchosides A-C, new cytotoxic bufadienolides from the aerial parts of *Kalanchoe gracilis*. *Org Lett.* 8(23):5207-5210.
- Xiao, Z., Chen, Z., Gunasekera, A. H., Sowin, T. J., Rosenberg, S. H., Fesik, S., & Zhang, H. (2003). Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *Journal of Biological Chemistry*, 278(24), 21767-21773.
- Yamagishi, T., Haruna, M., Yan, X. Z., Chang, J. J., & Lee, K. H. (1989). Antitumor agents, 110, Bryophyllin B, a novel potent cytotoxic bufadienolide from *Bryophyllum pinnatum*. *Journal of Natural Products*, 52(5), 1071-1079.
- Yang L., Pang Y., Moses H.L. (2010) TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* 31(220–227).

Yang, Y., Zhang, Z., Li, S., Ye, X., Li, X., & He, K. (2014). Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia*, 92, 133-147.

Yu E. Y., Hahn W. C. (2005) Genetic alterations in prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 3(220-229).

Zhuang, Z. G., Fei, F., Chen, Y., and Jin, W. (2008). Suberoyl bis-hydroxamic acid induces p53-dependent apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 29, 1459–1466.

ANEXO I

SOLUCIONES PARA WESTERN BLOT

Persulfato de amonio (APS) 10 %

Para 10 mL de solución, disolver 1 g de Persulfato de Amonio en 8 mL de agua desionizada. Aforar a 10 mL. Alicuotar y almacenar a -20° C.

SDS 10%

SDS	10 g
Agua bidestilada	100 mL

Disolver en 70 mL de agua bi-destilada y aforar a 100 mL, almacenar a temperatura ambiente protegido de la luz.

Tris-glicina 10 X

Tris base	30 g
Glicina	144 g

Disolver en 500 mL de agua bi-destilada, y aforar a 1 L.

Amortiguador de corrimiento electroforético

Tris-glicina 10 X	100 mL
SDS 10 %	10 mL

Disolver y aforar a 1 L con H₂O bidestilada. Almacenar protegido de la luz a temperatura ambiente.

Amortiguador de transferencia

Tris-Glicina 10 X	100 mL
Metanol al 99.8%	200 mL
H ₂ O bidestilada	700 mL

Mezclar y almacenar protegido de la luz a temperatura ambiente. Utilizar a 4 °C

Rojo Ponceau 0.1 %

Rojo ponceau	100 mg/mL
Acido acético (5%)	1 mL

Aforar a 100 mL con Agua bidestilada.

TBS 1X-Tween 0.05%

50 µL de Tween 20 en 100 mL de TBS 1X

Solución de bloqueo

2.5 g de leche libre de grasa en 100 mL de TBS 1X

TBS 10X

Tris base	24 g
NaCl	88 g

Disolver en 900 mL de agua bi-destilada y ajustar el pH a 7.6 con HCl. Aforar con agua bi-destilada a un volumen final de 1 L.

ANEXO II

PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN



Solicitud de Patente
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad

Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál:
 Modelo Industrial Dibujo Industrial

Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI

Sello

Folio de entrada

Fecha y hora de recepción

Solicitud: MX/a/2014/015323
Expediente: 15/DIC/2014 Hora: 11:51:20
Folio: MX/E/2014/089852 827813



Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)

El solicitante es el inventor El solicitante es el causahabiente

1) Nombre (s): INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

2) Nacionalidad (es): MEXICANA

3) Domicilio: calle, número, colonia y código postal: EDIFICIO DE LA DIRECCIÓN GENERAL, AV. LUIS ENRIQUE ERRO S/N, UNIDAD PROFESIONAL "ADOLFO LÓPEZ MATEOS", COLONIA ZACATENCO, C.P. 07738

Población, Estado y País: DELEGACIÓN GUSTAVO A. MADERO, DISTRITO FEDERAL, MÉXICO

4) Teléfono (clave): 55 57296000 EXT. 51971 Y 51975 5) Fax (clave): 55 51193245

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)

6) Nombre (s): CYNTHIA ORDAZ PICHARDO E IVÁN ARIAS GONZÁLEZ

7) Nacionalidad (es): MEXICANAS

8) Domicilio: calle, número, colonia y código postal: TOLTECAS, NO. EXT. 57, COLONIA UNIDAD HABITACIONAL EL ROSARIO, C.P. 02100

Población, Estado y País: AZCAPOTZALCO, DISTRITO FEDERAL, MÉXICO

9) Teléfono (clave): 55 57296000 EXT. 55535 Y 55551 10) Fax (clave):

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)

11) Nombre (s): LIC. CLAUDIA ALEJANDRA BLANCO SALAZAR 12) R.G.P.: 08592

13) Domicilio: calle, número, colonia y código postal: EDIFICIO DE LA DIRECCIÓN GENERAL, AV. LUIS ENRIQUE ERRO S/N, UNIDAD PROFESIONAL "ADOLFO LÓPEZ MATEOS", COLONIA ZACATENCO, C.P. 07738

Población, Estado y País: DELEGACIÓN GUSTAVO A. MADERO, D.F., MÉXICO 14) Teléfono (clave): 55 57296000 EXT. 51971 Y 51975 15) Fax (clave): 55 51193245

16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones:
CARLOTA MARTÍNEZ MARTIN

17) Denominación o Título de la Invención:
Un extracto de *Kalanchoe flammula* con acetato de etilo, sus fracciones y sus compuestos mayoritarios para el tratamiento del cáncer de próstata

13) Fecha de divulgación previa

Día	Mes	Año
-----	-----	-----

19) Clasificación Internacional uso exclusivo del IMPI

20) Divisional de la solicitud

Número	Figura jurídica	Día	Mes	Año
--------	-----------------	-----	-----	-----

21) Fecha de presentación

22) Prioridad Reclamada:

País	Fecha de presentación			No. de serie
	Día	Mes	Año	

Lista de verificación (uso interno)

No. Hojas		No. Hojas	
X	1	X	2
X	69		
X	19		
X	1		
X	1		
TOTAL DE HOJAS			

Observaciones:
HOJA DEL 50% DE DESCUENTO (1)

Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

LIC. CLAUDIA ALEJANDRA BLANCO SALAZAR MEXICO, D.F., A 09 DE DICIEMBRE DE 2014

IMPI
INSTITUTO MEXICANO
DE LA PROPIEDAD
INDUSTRIAL



Certificado de acuse
de recibo registro(s):
MX/2015/050752

DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE PROCESAMIENTO ADMINISTRATIVO DE
PATENTES
COORDINACION DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FORMA
Expediente de Patente de Invención Normal MX/a/2014/015323

Asunto: Resultado del Examen de Forma.

México, D.F., a 26 de agosto de 2015

Claudia Alejandra BLANCO SALAZAR
Apoderado de
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Edificio de la Dirección General, Av. Luis Enrique Erro S/N,
Unidad Profesional Adolfo López Mateos
Zacatenco
07738, GUSTAVO A. MADERO, Distrito Federal, México

No. de Folio: 71417

RECIBI ORIGINAL
Nombre:
Fecha:
Firma:

REF: Se da acuse de recibo a su(s) escrito(s) presentado(s): 15/07/2015.

Se tiene por satisfecho el examen de forma señalado por la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento.

Cabe señalar que de conformidad con los artículos 52 de la Ley de la Propiedad Industrial; 39 y 40 del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial vigentes, una vez concluido el examen de forma y, después del vencimiento del plazo de 18 meses, contado a partir de la fecha de presentación de la solicitud de patente, o en su caso, de prioridad reconocida, toda solicitud de patente será publicada en la Gaceta, conteniendo los datos bibliográficos comprendidos en la solicitud presentada, el resumen de la invención y, en su caso, el dibujo más ilustrativo de la misma o la fórmula química que mejor la caracterice.

No obstante, la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento también prevén que, a petición del solicitante mediante escrito, la solicitud de patente podrá ser publicada de manera anticipada, siempre que la misma haya aprobado el examen de forma y el solicitante entere al Instituto el pago de la tarifa correspondiente (artículo 1d).

Así, una vez publicada la solicitud, de conformidad al artículo 52 BIS de la Ley de la Propiedad Industrial, cualquier persona podrá dentro de un plazo de seis meses posteriores a aquella, presentar ante el Instituto, información concerniente a los requisitos de patentabilidad y sus excepciones (artículos 16 y 19 de la Ley de la Propiedad Industrial), por lo que el Instituto dará inicio al examen de fondo hasta haber transcurrido los plazos especificados.

El suscrito firma el presente oficio con fundamento en los artículos 6º fracciones III y XI y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 2º, 3º fracción V, inciso a), sub inciso i), segundo guión, 4º, 5º y 12º fracciones I, II, III, IV y VI del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 07/09/2007); artículos 1º, 2º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a)





sub inciso i), segundo guión, 16 fracciones I, II, III, IV y VI y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); artículos 1º, 3º y 5º inciso e) e i) y penúltimo párrafo del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

ATENTAMENTE
COORDINADOR DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FORMA


OMAR SANTIAGO GALVEZ CASTILLO.

OSGE/MEG/2015

Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences



An International Peer Review E-3 Journal of Sciences

Available online at www.jcbps.org

Section C: Medical and Pharmaceutical Biotechnology

CODEN (USA): JCBPAT

Research Abstract

Phytochemical Characterization of *K. flammula* and Its Effect On The Biological Neoplastic Events In Prostate Cancer

Iván Arias-González¹; Cynthia Ordaz-Pichardo¹

¹Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía,
Mexico City, C. P. 7320.

Abstract: Despite decades of research, the treatment and management of malignant tumors still remain a formidable challenge for public health. Medicinal plant drug discovery continues to provide new and important leads against various pharmacological targets including cancer. *Kalanchoe flammula* is a native plant of Mexico that has shown anticancer activity against prostate cancer. *In vitro* treatment of androgen-insensitive (PC-3) prostate cancer cells with an ethyl acetate extract of *K. flammula* (Kf-AcOEt) reduced cell viability and no significant effect shown in non-neoplastic human prostate epithelial cells (PrEC) under identical conditions. Also, Kf-AcOEt induced cell death in a time-dependent manner and shown different biochemical hallmarks of apoptosis like activation of caspase-9, -3 and release of cytochrome C from mitochondria into the cytosol, proteolysis of PARP-1, downregulation of antiapoptotic protein Bcl-2, ROS production and DNA fragmentation. Moreover, Kf-AcOEt causes cell cycle arrest in the S phase. *In vivo* studies indicate that Kf-AcOEt inhibit growth of prostate tumors in mouse xenograft model. These data suggest that Kf-AcOEt may contain metabolites that may serve as lead compounds for targeting so far incurable androgen-insensitive prostate cancers, which could have potential as a future chemotherapeutic agents.

Keywords: *Kalanchoe*, Prostate Cancer, Apoptosis, Mouse Xenograft model

Corresponding author: Cynthia Ordaz-Pichardo
dra_cynthia@hotmail.com

FA-107 ESTUDIO DEL EFECTO DE UN EXTRACTO DE *K. flammula* IN VITRO E IN VIVO EN CÁNCER DE PRÓSTATA

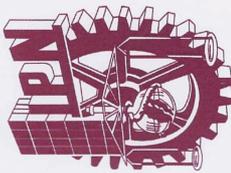
Iván Arias González,¹ Cynthia Ordaz Pichardo^{1*}

1. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Guillermo Massieu Helguera #239. Col. La Escalera. Del. Gustavo A. Madero. C. P. 07320. Tel. 57 29 6000 Ext. 55535/ 55551
Correo-E: dra_cynthia@hotmail.com

Los productos naturales poseen metabolitos que han sido usados en la síntesis de principios activos en los fármacos actuales (Harvey, A., 2007). Por las estadísticas actuales de cáncer de próstata (CaP), es relevante la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de esta neoplasia. *Kalanchoe* es un género de plantas utilizado en la medicina tradicional para diferentes enfermedades incluyendo el cáncer (Abdellaoui *et al.*, 2010). México cuenta con diversas especies de este género, como *K. flammula*. El objetivo de esta investigación fue evaluar las propiedades biológicas (*in vitro* e *in vivo*) de *K. flammula* en células de CaP, se evaluó su efecto en la viabilidad de células PC3 de CaP y en células no cancerosas de epitelio prostático PrEC, se obtuvo un efecto citotóxico significativo en PC3 ($CI_{50} = 3.816 \mu\text{g/mL}$) mucho menor, al obtenido en PrEC ($CI_{50}=19.47 \mu\text{g/mL}$). Uno de los efectos más deseados en un fármaco para destruir células tumorales es la apoptosis, previamente se evaluaron características de este proceso inducidas por el extracto, activando caspasas e induciendo translocación de fosfatidilserina. Para asegurar esto, se evaluó la fragmentación de ADN por inactivación de PARP-1 y su degradación fue observada en geles de agarosa y sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, siendo éstas inducidas por el extracto como parte del proceso apoptótico. En el estudio *in vivo*, el extracto fue administrado en ratones atímicos (nu/nu) vía IP a diferentes dosis, observando inhibición del crecimiento tumoral significativo con respecto al grupo control. Con los datos obtenidos hasta el momento se considera que *K. flammula* posee metabolitos que podrían ser útiles en el tratamiento del CaP.

Abdellaoui *et al.* Bioactive molecules in *K. pinnata* leaves: extraction, purification and identification. Anal Bioanal Chem. 2010. 398:1329–1338.

Harvey, Alan L. Natural products as a screening resource. Current Opinion in Chemical Biology 2007, 11:480–484.



del Instituto Politécnico Nacional



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL

otorga la presente

CONSTANCIA



Iván Arias González

por su participación en la

3ª JORNADA CIENTÍFICA DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA
CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE *Kalanchoe flammula* Y SU EFECTO EN LOS EVENTOS
BIOLÓGICOS NEOPLÁSICOS DEL CÁNCER DE PRÓSTATA (PROTÓCOLO)

Durango, Dgo., México a 18 de Mayo de 2012.

"La Técnica al Servicio de la Patria"

Director CIIDIR-IPN Unidad Durango
Dr. José Antonio Avila Reyes

Coordinadora del Doctorado en Ciencias en Biotecnología
Dra. María Eugenia Jaramillo Flores

Coordinador de Nodo Durango
Dr. J. Natividad Gurrola Reyes

Otorgan la presente

CONSTANCIA

Al: **C. Iván Arias González**

Por su asistencia a las: "V JORNADAS ACADÉMICAS DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL", en Guasave, Sinaloa, los días 13 y 14 de Mayo de 2013.

Dr. Hervey Rodríguez González
Subdirector Académico y de Investigación



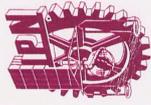
CIIDIR-IPN
UNIDAD SINALOENSE DE INVESTIGACIÓN ACADÉMICA Y DE INVESTIGACIÓN

Dr. Cipriano García Gutiérrez
Coordinador de Nodo de Doctorado
CIIDIR-Sinaloa

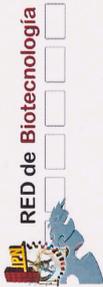


Dr. Jorge Montiel Montoya
Director de CIIDIR-Sinaloa
CIIDIR-IPN
UNIDAD SINALOENSE DE INVESTIGACIÓN ACADÉMICA Y DE INVESTIGACIÓN





Instituto Politécnico Nacional
"La técnica al servicio de la patria"



Instituto Politécnico Nacional Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Otorga el presente reconocimiento a:

Iván Arias González

VIII

por su participación como ponente en las

JORNADAS ACADÉMICAS DEL
DOCTORADO EN CIENCIAS
EN BIOTECNOLOGÍA

Celebradas el 14 de octubre de 2014 dentro del marco del

1st Biotechnology World Symposium & 9° Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN

Atlixuetzia, Tlaxcala, Mexico.

Dra. Diana Verónica Cortés Espinosa
Coordinadora de nodo CIBA
del Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara
Director interino del CIBA-Tlaxcala

Dr. Miguel Ángel Reyes López
Coordinador general del
Doctorado en Ciencias en Biotecnología CIBG-Revivosa



Sva.
REUNIÓN
INTERNACIONAL DE
INVESTIGACIÓN EN
PRODUCTOS
NATURALES
DR. ALFREDO ORTEGA HERNÁNDEZ

“50 años de la Resonancia Magnética Nuclear en México”



La Universidad del Mar y
La Universidad del Istmo
otorgan la presente

Constancia

a

Iván Arias González, Cynthia Ordaz-Pichardo

por la presentación del trabajo titulado:

CITOTOXICIDAD DE *Kalanchoe flammea* MEDIADA POR LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA

8va. Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales

“Dr. Alfredo Ortega Hernández”

23 al 25 de mayo de 2012

Universidad del Mar, campus Huatulco



Dra. Mayra Guadalupe Hernández Linares
Presidente del Comité Organizador



 **Instituto Politécnico Nacional**
 Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada Tlaxcala



AWARDS THIS
CERTIFICATE OF PRESENTATION

Cynthia Ordaz Pichardo and Iván Arias González

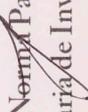
for presenting the contribution entitled:

PHYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF K. flammula AND ITS EFFECT ON THE BIOLOGICAL NEOPLASTIC EVENTS IN PROSTATE CANCER

1ST BIOTECHNOLOGY & 9^º ENCUENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA DEL IPN

Atlihuetzia Tlaxcala, México, October 13 to 16, 2014.


 Dra. Myrna Solis Oba
 Presidente del comité organizador


 Dra. Norma Patricia Muñoz Sevilla
 Secretaríade Investigación y Posgrado


 Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara
 Director CIBA Tlaxcala

ANEXO III

DIFUSIÓN



SELECCIÓN
Faceta
POLITÉCNICA

**Analizan efecto de la
Kalanchoe Pinnea en tratamiento
de cáncer de próstata**

*Premio Nacional de Protección Civil 2013
a investigador del Centro de
Investigación en Computación*

**Entrega Politécnico Programa
de Riesgo Sísmico para el
Distrito Federal**

NÚMERO 61 31 DE ENERO DE 2014 AÑO V VOL. 5

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  "La Técnica al Servicio de la Patria"

ESTUDIAN PLANTA ENDÉMICA DE TABASCO PARA TRATAR EL CÁNCER DE PRÓSTATA

En la ENMH, Iván Arias González hizo la caracterización citoclínica de la planta y comprobó su efecto

Iván Arias González, ingeniero en bioquímica y graduado del doctorado de Ciencias en Biotecnología de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía (ENMH), estudia una planta endémica de Tabasco conocida como *Kalanchoe Flammea*, cuyas propiedades podrían ser utilizadas para el tratamiento de cáncer de próstata.

La planta es una especie nativa de Asia, donde el arbusto original *Kalanchoe Pinna* ha sido pulverizado y usado en cápsulas para tratar algunos tipos de neoplasias. El científico politécnico analizó y desarrolló, como parte de su tesis doctoral, la caracterización citoclínica de la planta y su efecto en el tratamiento de cáncer de próstata.

En su investigación llevó a cabo un estudio fitoquímico de la *Kalanchoe* para identificar grupos químicos funcionales de metabolitos presentes en diferentes extractos; los resultados indicaron la existencia de metabolitos secundarios conocidos como terpenos y alcaloides. De los estudios de citotoxicidad, encontró que ninguno resultó nocivo para las células sanas.

Iván Arias González refirió que existen diversos tratamientos para el cáncer de próstata (CaP), pero sus costos son elevados y poco efectivos porque generalmente surge resistencia que provoca condiciones de dependencia.

En el caso de quimioterapia, dijo, se administran fármacos antineoplásicos, los cuales dañan a las células que se dividen rápidamente (nocivas) pero también a las saludables, lo que conlleva a la debilidad física del paciente. Por tal motivo basó su investigación en afirmaciones hechas por Douglas Hanahan.

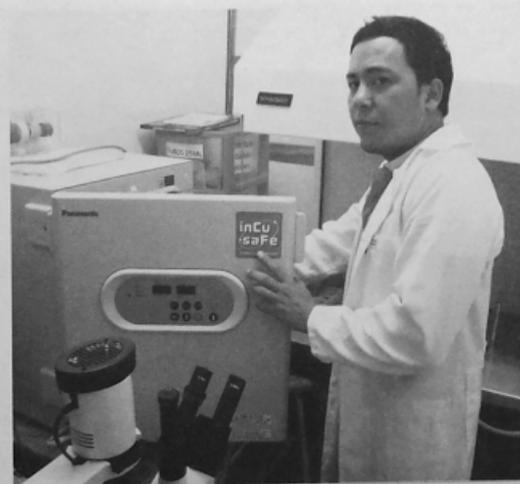
El biólogo estadounidense confirmó que las células cancerosas estimulan su propio crecimiento, se resisten a la propia muerte celular programada (apoptosis); lo hacen a través de estimular el desarrollo de los vasos sanguíneos para suministrar nutrientes a los tumores (angiogénesis), para invadir tejido local y diseminarse a sitios distantes (metástasis).

El investigador politécnico realizó tres tipos de extractos ordenados de menor a mayor polaridad. Obtuvo que el extracto

con etanol y acetato de etilo no inducen mutaciones en las diferentes cepas, por lo tanto pueden ser usados de manera segura. Posteriormente logró evidenciar que el proceso de muerte celular inducido por el extracto con mejor efecto citotóxico, no generó daño a las células sanas.

Al respecto, la jefa del Laboratorio de Biología Celular y Productos Naturales de la ENMH y asesora de tesis, Cynthia Ordaz Pichardo, expresó que “los resultados son de gran importancia, pues indican que el proceso apoptótico en células nocivas es posible al mediar la activación de la vía mitocondrial y se comprobó gracias a la aparición de caspasas (grupo de proteínas mediadoras de los procesos de apoptosis)”.

“Se ha demostrado que los productos naturales modulan la estimulación de la apoptosis al lograr suprimir la proliferación de células dañadas, además de inhibir el proceso de angiogénesis”, afirmó.



Debido al difícil acceso para obtener la planta en una zona peligrosa de Tabasco fue necesario reproducir la sustancia y metabolitos de manera “artificial”, indicó el ingeniero Iván Arias González



Usted está aquí: [Portada](#) / [Ciencias](#) / [Estudian en IPN planta de Tabasco para tratar cáncer de próstata](#)

Estudian en IPN planta de Tabasco para tratar cáncer de próstata

Por Emir Olivares Alonso

dom, 02 feb 2014 16:10



México, DF. Investigadores del Instituto Politécnico Nacional (IPN) estudian una planta endémica del estado de Tabasco, conocida como *Kalanchoe flammea*, cuyas propiedades podrían ser utilizadas para el tratamiento de cáncer de próstata.

La planta es una especie nativa de Asia, donde el arbusto original *Kalanchoe pinnea* ha sido pulverizado y usado en cápsulas para tratar algunos tipos de cáncer. En México, Iván Arias González, ingeniero en bioquímica y graduado del doctorado de Ciencias en Biotecnología de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía (ENMH) del IPN, analizó y desarrolló como parte de su tesis doctoral la caracterización citoclínica de la planta y su efecto en el tratamiento de cáncer de próstata.

En su investigación llevó a cabo un estudio fitoquímico de la *Kalanchoe* para identificar grupos químicos funcionales de metabolitos presentes en diferentes extractos. Los resultados indicaron la existencia de metabolitos secundarios, conocidos como terpenos y alcaloides; de los estudios de citotoxicidad encontró que ninguno resultó nocivo para las células sanas.

Refirió que existen diversos tratamientos para el cáncer de próstata, pero sus costos son elevados y poco efectivos porque generalmente surge resistencia que provoca condiciones de dependencia hacia otros fármacos, además de los especificados para esta enfermedad. En este caso, el paciente se convierte en hormonodependiente; "se refiere al estado en que las células prostáticas evaden la muerte celular natural conocida como apoptosis", explicó.



CIENCIAS

- Científicos de la UNAM desarrollan invernaderos inteligentes
- Hallan en Inglaterra restos de asentamiento Edad del Bronce
- Frenan icebergs antárticos el calentamiento
- Pierden esperanzas de que 'Philae' despierte
- Las emociones disminuyen la inteligencia: e



azteca noticias AZTECA • DEPORTES • ESPECTÁCULOS

Hoy Tv en vivo Secciones Programas Infografías Coberturas Videos Personas extraviadas

Belladona podría combatir el cáncer de próstata

Fuente **Mariano Riva Palacio**
14 de febrero de 2014
09:16 hrs

Share 25 Tweet



Científicos del IPN estudian la planta "Kalanchoe flammula" conocida también como "belladona", cuyas propiedades podrían ser usadas para tratamientos contra el cáncer.

Comentarios



DIVIÉRTETE DE NUEVO CON TODAS LAS OCURRENCIAS. EXCLUSIVO ONLINE

VIDEOS RELACIONADOS
de Salud

- Video: Reimplante de manos tras traumático...**
Hace casi un año, Alberto...
- Video: Su discapacidad no le impide aprender...**
La institución Industria de...
- Video: Ortodoncia lingual hace invisibles los...**
Esta nueva técnica, que...
- Video: Crece cifra de sordos en la Ciudad de...**
La Secretaría de Salud del...

Televisión Deportes Noticieros Espectáculos Esmas Estilo de Vida Niños

NOTICIEROS Televisa **Noticieros** D.F. 15° Min 13° C Max 26° C

México DF Estados Mundo Secciones

FOROtv

¿CALOR? ¿FRÍO? ¿LLUVIA? ¿VIENTO? **REVISAR EL ESTADO DEL TIEMPO EN NOTICIEROSTELEvisa.COM**

LA TRADICIÓN BOX DONDE LOS MEJORES HACEN HISTORIA

Coberturas Especiales Por el Planeta Infografías Lo que debes saber sobre el ébola Ébola



Tratamientos contra el cáncer

Investigadora del IPN analiza productos naturales y compuestos químicos para el tratamiento contra el cáncer; usan las propiedades de la bella dona

Duración: 00:02:11
Fecha: 21. Oct. 2014

Temas Relacionados
Reactor Ftv

Más Recientes

- Tratamientos contra el cáncer
- Tratamientos contra el cáncer
- Reactor Ftv del 17 de octubre
- La importancia del cemento en la construcción

[Ver Todos](#)

