

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

Mecanismos moleculares de triterpenos de *Ibervillea sonorae*
asociados a la muerte celular por apoptosis *in vitro* e *in vivo*



TESIS

Que para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias

(Químico Biológicas y de la Salud)

Presenta:

Heriberto Torres Moreno

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON




**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**




Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMATO DE APROBACIÓN


Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de tesis de **Heriberto Torres Moreno**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



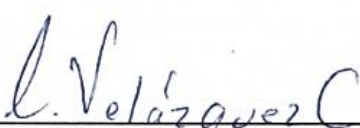
Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda
Director Académico



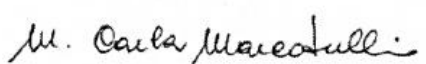
Dra. Adriana Garibay Escobar
Secretario



Dra. Olivia Valenzuela Antelo
Sinodal



Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras
Sinodal



Dra. Maria Carla Marcotullio
Sinodal

AGRADECIMIENTO A CONACYT

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado a través del proyecto: “Identificación y caracterización química y biológica de compuestos con actividad anticancerígena de plantas de la etnofarmacopea sonorense” (Clave Conacyt 83462).

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Ramón E. Robles Zepeda por darme la oportunidad de ser parte de este proyecto, por todo el apoyo brindado y por impulsar mi desarrollo académico y profesional. “Un gran líder no es solo aquel que hace grandes cosas, sino que también logra que otras personas las hagan”. Estaré por siempre agradecido.

Agradezco enormemente a la Dra. Maria Carla Marcotullio del Departamento de Química y Tecnología del Fármaco de la Universidad de Perugia por sus grandes aportaciones en nuestro estudio y por brindarme la oportunidad de realizar por segunda ocasión una estancia de investigación en su laboratorio. ¡Grazie di cuore!

Agradezco el apoyo brindado a los miembros del equipo del Laboratorio de Química y Tecnología del Fármaco de la UNIPG, a los Profesores Dr. Ornelio Rosati y Andrea Temperini, gracias por sus valiosas aportaciones y por su amistad. A la Dra. Federica Messina por sus enseñanzas dentro del laboratorio y por su gran amistad. A Iris di Leo, Esteban Vargas y Chiara Morozzi por su amistad y por hacer grata mi estadía en Perugia. Al Dr. Eder Leonardao por su gran amistad, sus consejos y por las buenas tardes de fútbol. ¡Grazie a tutti voi!

Al Dr. Salomón Hernández Gutiérrez de la Universidad Panamericana de la Ciudad de México y a su equipo de trabajo por su gran apoyo, solidaridad y calidez durante la estancia realizada. A la Dra. María Lilia Loreda Mendoza por sus grandes aportaciones, ha sido un honor poder trabajar con usted. Al Dr. Gerardo Arreguín Rosas por su gran contribución en los ensayos *in vivo*. A Diego, Victor, Karla por su compañerismo y por los buenos momentos en el laboratorio.

Agradezco también a la Dra. Aracely Angulo Molina, quien fue pieza fundamental para poder desarrollar los ensayos *in vivo*.

Al Cuerpo Académico de Biología y Bioquímica (CABB), especialmente, al Dr. Carlos A. Velázquez Contreras, a la Dra. Adriana Garibay Escobar y a la Dra. Olivia Valenzuela Antelo por sus valiosas contribuciones y por sus enseñanzas. A todos mis compañeros de los laboratorios de la Universidad de Sonora.

A Francisco Olivas, Max Vidal, Wenceslao Coronado, Damián López y Raúl Díaz, por los momentos inolvidables que pasamos dentro y fuera de la Universidad.

Un agradecimiento especial a la Dra. Edna Delia Molina Romo, quien fuera mi profesora en la licenciatura y que hoy en día es mi colega y gran amiga. Gracias por sus consejos y su gran amistad.

A la Universidad de Sonora y al Posgrado en Ciencias de la Salud por brindarme el espacio donde he podido desarrollarme profesionalmente.

DEDICATORIAS

Con inmenso amor a mi esposa Karen Lillian Rodríguez Martínez, gracias por tu apoyo incondicional y comprensión.

A mis padres Heriberto Torres Mendivil y Mirna Leticia Moreno Quijada, les dedico esta tesis con mucho amor.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
OBJETIVOS	xiii
General.....	xiii
Particulares.....	xiii
RESUMEN	xiv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
Características Biológicas y Epidemiológicas del Cáncer.....	2
Estadísticas Mundiales del Cáncer.....	2
Características Biológicas del Cáncer.....	3
¿Qué es el Cáncer?.....	3
Aspectos Moleculares del Cáncer.....	3
El Control del Ciclo Celular.....	3
El Papel de las CDKs en el Control del Ciclo Celular.....	5
Las CDKs Actúan Como Interruptores Moleculares.....	5
Las Ciclinas Regulan la Actividad de las CDKs.....	5
Mecanismos Moleculares de la Apoptosis.....	9
Vías de Activación de la Apoptosis Celular.....	11
Activación y Regulación de la vía Extrínseca e Intrínseca.....	11
El Papel de las Bcl-2 en la Apoptosis.....	13
La vía Común de las Caspasas.....	14
Vías de Señalización Celular Asociadas a la Terapia Molecular	
Contra el Cáncer.....	15
Vía de la JAK/STAT.....	15
Vía del PI3K/AKT/mTOR.....	19
Vía RAS/RAF/MEK/ERK.....	19
Los Triterpenoides.....	20

Los Triterpenoides un Importante Recurso Para la Generación de Nuevos Antineoplásicos.....	20
Biosíntesis y Clasificación de los Triterpenoides.....	21
Las Cucurbitacinas.....	23
Distribución.....	23
Características Físicas y Químicas.....	25
Propiedades Anticancerígenas.....	26
<i>Ibervillea sonora</i>	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Especímenes de <i>Ibervillea sonora</i> y Generación de los Extractos Metanólicos.....	28
Partición del Extracto Metanólico.....	28
Purificación y Determinación Estructural.....	29
Procedimientos Experimentales Generales.....	29
Purificación de los Compuestos Bioactivos.....	29
Cultivo Celular.....	30
Evaluación de la Actividad Antiproliferativa.....	30
Análisis de los Mecanismo de Muerte Celular Asociados a la Apoptosis.....	31
Evaluación de la Muerte Celular por Apoptosis.....	31
Análisis del Potencial de Membrana Mitocondrial.....	32
Análisis de la Actividad de las Caspasas.....	33
Análisis del Ciclo Celular.....	34
Evaluación del Efecto Antitumoral <i>in Vivo</i>	35
Animales de Experimentación.....	35
Evaluación del Efecto Antitumoral.....	36
Análisis Estadístico.....	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
Material Vegetal.....	37

Generación de Extractos y Evaluación de su Actividad	
Antiproliferativa.....	37
Generación de las Fracciones Cromatográficas y Evaluación su Actividad Antiproliferativa.....	39
Aislamiento de los Principios Bioactivos.....	39
Inhibición de la Proliferación de Células Cancerosas <i>in Vitro</i>	42
Inducción de Muerte Celular por Apoptosis.....	57
Efecto Sobre el Potencial de Membrana Mitocondrial.....	60
Activación de las Caspasas.....	62
Efecto Sobre el Ciclo Celular.....	71
Efecto Antitumoral <i>in Vivo</i>	75
CONCLUSIONES	84
BIBLIOGRAFÍA	85

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Evaluación de la actividad antiproliferativa del extracto metanólico y sus fracciones.....	38
II	Actividad antiproliferativa de las fracciones cromatográficas	40
III	Datos de RMN de cucurbitacina Iib (23,24-dihidrocucurbitacina F).....	46
IV	Datos de RMN de kinoína A.....	48
V	Actividad antiproliferativa de triterpenos de <i>Ibervillea sonora</i>	51
VI	Índice de selectividad de triterpenos de <i>Ibervillea sonora</i> ...	52
VII	Inducción de apoptosis de 1 y 2 en HeLa.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Vías de activación de las caspasas.....	12
2	Vías de señalización implicadas en el cáncer.....	16
3	Principales grupos de triterpenoides.....	24
4	Purificación de los triterpenoides bioactivos de <i>Ibervillea sonorae</i>	41
5	Espectro de ¹ H-RMN (400 MHz, CD ₃ OD) de cucurbitacina I Ib o 23, 24-dihidrocucurbitacina F.....	43
6	Espectro de ¹³ C-RMN (400 MHz, CD ₃ OD) de cucurbitacina I Ib o 23,24-dihidrocucurbitacina F.....	44
7	Espectro de COSY (400 MHz, CD ₃ OD) de cucurbitacina I Ib o 23,24-dihidrocucurbitacina F.....	45
8	Cucurbitacina I Ib (1) y kinoína A (2).....	47
9	Efecto de cucurbitacina I Ib sobre la proliferación celular de diversas líneas celulares.....	49
10	Posible mecanismo efector de cucurbitacina I Ib y kinoína A en HeLa.....	54
11	El compuesto 1 induce cambios morfológicos típicos de apoptosis en la línea celular HeLa.....	56
12	Capacidad inductora de apoptosis de 1 y 2 en HeLa.....	58
13	Porcentaje de células viables, células muertas y apoptosis total después del tratamiento con 1 y 2.....	61
14	Efecto de 1 y 2 sobre el potencial de membrana mitocondrial...	63
15	Despolarización de la membrana mitocondrial inducida por 1 y 2.....	64
16	Efecto de 1 y 2 sobre la actividad de caspasa-3.....	66
17	Efecto de 1 y 2 sobre la actividad de caspasa-8.....	67

18	Efecto de 1 y 2 sobre la actividad de caspasa-9.....	68
19	Actividad de las caspasas -3, -8 y -9 en células HeLa tratadas con 1 y 2.....	70
20	Arresto del ciclo celular inducido por 1 y 2.....	72
21	Efecto de 1 y 2 sobre las fases del ciclo celular de HeLa.....	74
22	Efecto antitumoral de 1 y 2 en xenoinjertos de HeLa.....	77
23	Efecto de 1 y 2 sobre el desarrollo tumoral <i>in vivo</i>	78
24	Efecto de 1 y 2 sobre el peso tumoral.....	80
25	Estado físico de los ratones después del tratamiento.....	81

OBJETIVOS

General

Establecer los mecanismos moleculares asociados al efecto antiproliferativo, pro-apoptótico y antitumoral de triterpenos de *Ibervillea sonora* *in vitro* e *in vivo*.

Particulares

- a) Aislar y caracterizar químicamente los triterpenos responsables de la actividad antiproliferativa.
- b) Evaluar la capacidad inductora de apoptosis de los triterpenos sobre la línea celular HeLa.
- c) Determinar los mecanismos moleculares de los triterpenos asociados a la muerte celular por apoptosis en la línea celular HeLa.
- d) Evaluar el efecto antitumoral de los triterpenos en un modelo murino de cáncer inducido.

RESUMEN

Miles de personas mueren anualmente por cáncer en el mundo. Después de las enfermedades cardiovasculares, el cáncer es la segunda enfermedad con mayor índice de mortalidad. Empleando técnicas cromatográficas y espectroscópicas, dos cucurbitacinas-tipo triterpenoides, fueron aisladas y caracterizadas a partir de la raíz de *Ibervillea sonorae*. A través de la técnica de MTT, se demostró que cucurbitacina IIB y kinoína A suprimen fuertemente el crecimiento de las células tumorales HeLa, A549, LS180, RAW 264.7 y SiHa de manera dosis-respuesta. HeLa fue la más susceptible al tratamiento con **1** y **2**, mientras que la línea celular control L929 presentó mayor resistencia a estos compuestos. El estudio de los mecanismos de acción sobre HeLa, reveló que ambas **1** y **2**, son capaces de inducir muerte celular por apoptosis, disrupción del potencial de membrana mitocondrial (PMM) y activación de las caspasas -3, -8 y -9, como resultado de la activación de la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Adicionalmente, se demostró que **1** y **2**, inducen arresto del ciclo celular en las fases S y G2/M. De manera consistente a lo observado *in vitro*, el compuesto **1**, mostró mayor capacidad de inhibir el desarrollo tumoral en comparación con **2**. Al día 15 post-tratamiento, **1** (10 mg/kg), fue capaz de inhibir el 88.2% del desarrollo tumoral ($p < 0.05$ vs control), mientras que, este mismo compuesto, a la concentración de 1 mg/kg, redujo en un 88.3% el desarrollo de los tumores con respecto al control sin tratamiento ($p < 0.05$ vs control). **2** por su parte, disminuyó en un 69.5% y 62.5% el desarrollo tumoral en comparación con el control a las concentraciones de 10 y 1 mg/kg ($p < 0.05$), respectivamente. De forma análoga al efecto observado sobre el desarrollo tumoral, **1** y **2** fueron capaces de reducir de manera significativa el peso de los tumores al finalizar el tratamiento. En este estudio se demostró que cucurbitacina IIB y kinoína A, inhiben la proliferación celular *in vitro* a través de la inducción de apoptosis y arresto del ciclo celular. Asimismo, se estableció que estos compuestos, inhiben el desarrollo de tumores subcutáneos de células HeLa sin signos de toxicidad aparente sobre los ratones.

INTRODUCCIÓN

Los fármacos antineoplásicos utilizados en la quimioterapia, habitualmente inhiben el desarrollo de las células cancerosas a través de mecanismos que involucran el bloqueo de la síntesis del ADN y de enzimas relacionadas con este proceso. Estos tipos de fármacos generalmente carecen de selectividad sobre las células tumorales y causan citotoxicidad sobre células sanas que crecen y se dividen rápidamente. Por otro lado, el fenómeno de quimioresistencia que desarrollan las células neoplásicas, complica aún más el pronóstico de la enfermedad. Es por ello que resulta necesario la búsqueda de nuevos compuestos antineoplásicos con mayor selectividad para inducir la muerte de las células tumorales (Housman y col., 2014).

Las cucurbitacinas (Cus) son una clase de compuestos del tipo triterpenoides que se encuentran de forma natural en plantas pertenecientes a la familia Cucurbitaceae. Estos compuestos son reconocidos por poseer efecto antitumoral frente a diversas líneas celulares cancerosas *in vitro* e *in vivo* (Marostica y col., 2015). Diversos autores han reportado que las Cus inhiben el crecimiento celular a través de mecanismos relacionados con la inducción de apoptosis y el arresto del ciclo celular. Además, estos compuestos han sido identificados como inhibidores universales de la vía de las JAK/STAT (Siveen y col., 2014; Zhang y col., 2014).

Ibervillea sonorae (wareke) es un miembro popular de la familia Cucurbitaceae. Es utilizada en la medicina tradicional mexicana por las tribus indígenas Mayo, Ópata, Seri y Yaqui para tratar de forma empírica padecimientos como la diabetes, el reumatismo, la artritis, enfermedades inflamatorias y el cáncer (Figueroa-Hernández y col., 2014). Estudios realizados por el Cuerpo Académico de Biología y Bioquímica de la Universidad de Sonora (CABB, UNISON) han demostrado que *I. sonorae* posee compuestos del tipo Cus; sin embargo, el estudio de sus propiedades farmacológicas ha sido limitado. El objetivo de la presente investigación fue determinar los mecanismos moleculares de triterpenos del tipo Cus de *I. sonorae* asociados al efecto inductor de apoptosis *in vitro* e *in vivo*.

ANTECEDENTES

Características Biológicas y Epidemiológicas del Cáncer

Estadísticas Mundiales del Cáncer

Decenas de miles de personas mueren anualmente por cáncer en el mundo. Después de las enfermedades cardiovasculares, el cáncer es la segunda enfermedad con mayor índice de mortalidad. Tan solo en Estados Unidos, se espera que, durante el 2017, alrededor de 1, 600, 000 nuevos casos de cáncer sean detectados. Asimismo, se prevé que, en este mismo año, ocurrirán alrededor de 600, 920 muertes a causa de cáncer (Siegel y col., 2017).

La carga global de cáncer sigue aumentando debido al crecimiento y envejecimiento de la población mundial, así como al incremento de factores de riesgo relacionados con la urbanización y el desarrollo económico. Se ha estimado que el consumo de tabaco, consumo de alcohol, la obesidad, una alimentación no saludable, la inactividad física y el estrés, han contribuido al desarrollo del 90 al 95% del total de cánceres en el mundo (Deepa, 2016; Siegel y col., 2017). La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha establecido que los tipos de cáncer de mayor incidencia a nivel mundial son el pulmonar, hepático y colorrectal (OMS, 2017).

En México, durante el 2014 el cáncer de órganos hematopoyéticos fue considerado el de mayor prevalencia en hombres (59.2 %) y en mujeres menores de 20 años de edad (61.1 %). En este mismo año, la tasa más alta de letalidad hospitalaria en población menor de 20 años, se presentó en el grupo de 15 a 19 años de edad, donde 5 de cada 100 varones y 4 de cada 100 mujeres que ingresaron al hospital por un tumor maligno, fallecieron. En la población mayor a 20 años de edad, los tumores malignos en órganos digestivos fueron los de mayor prevalencia en varones, mientras que, en las mujeres, el cáncer de mama fue el más prevalente, llegando a afectar a 3 de cada 10 mujeres con cáncer (INEGI, 2017).

Características Biológicas del Cáncer

¿Qué es el Cáncer?

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por la presencia de células que se dividen descontroladamente y se propagan de forma anormal. La generación del cáncer, está vinculada a la exposición a factores externos (como el uso del tabaco, infecciones causadas por microorganismos, el exceso de peso, entre otros), así como a la presencia de factores internos no modificables como las mutaciones genéticas asociadas con la herencia y condiciones hormonales e inmunológicas. Todos estos factores de riesgo pueden actuar simultáneamente o en secuencia para iniciar y/o promover el crecimiento celular (ACS, 2017).

El desarrollo de las enfermedades neoplásicas puede considerarse un proceso evolutivo que involucra una serie de cambios en el fenotipo celular y que se origina por la acumulación de mutaciones genéticas en las células somáticas. Durante su desarrollo, las células tumorales, adquieren una serie de rasgos que son evidentes. Se vuelven incapaces de responder a los controles habituales de proliferación, adquieren la capacidad de evadir la muerte celular y de replicarse más allá de los límites normales; estimulan la formación de vasos sanguíneos para asegurar su suministro constante de oxígeno y nutrientes y con ello desarrollar invasión y metástasis. Además, las células cancerosas, se someten a un proceso de selección que hace que el sistema inmune sea ineficaz al momento de eliminarlas (IAC, 2011).

Aspectos Moleculares del Cáncer

El Control del Ciclo Celular

El ciclo celular comprende un conjunto de eventos finamente orquestados y regulados a través de los cuales una propia célula da lugar a dos células hijas. Es un proceso celular que demanda el consumo de gran cantidad de energía y garantiza una correcta duplicación y segregación del genoma.

Gracias a que la célula regula y coordina de forma adecuada su replicación y segregación cromosómica, la información hereditaria puede ser transmitida fielmente de una generación a otra salvaguardándose la integridad de los cromosomas. La división celular es orquestada por una compleja red de interacción entre proteínas, metabolismo y el microambiente celular. Este último, incluye varias vías de señalización celular y mecanismos de control que permiten que las células proliferen solo en respuesta a estímulos específicos y bajo condiciones adecuadas (Diaz-Moralli y col., 2013; Araujo y col., 2016).

En las células eucariotas el ciclo celular se divide en cuatro fases secuenciales: fase G1 (G1), fase de síntesis (S), fase G2 (G2) y fase M o mitosis (M). La duplicación del material genético y su segregación en dos células hijas genéticamente idénticas, comprenden las dos fases mayores del ciclo celular. En una célula de mamífero típica, el ácido desoxirribonucleico (DNA) es duplicado durante la fase S, que dura aproximadamente entre 10-12 h y ocupa la mitad del ciclo celular (Graña y col., 1995).

Una vez que los cromosomas han sido duplicados, estos son segregados durante la fase M. La envoltura nuclear se rompe y los cromosomas ya replicados se unen a través de su huso mitótico a los microtúbulos. A medida que la mitosis avanza, los cromosomas migran hasta alinearse en el ecuador del huso. A continuación, las cromátidas hermanas son separadas de forma súbita durante la anafase y son desplazadas hacia polos opuestos del huso, donde se descondensan y reforma núcleos intactos. Finalmente, ocurre la división del citoplasma o citocinesis completando así la división celular (Graña y col., 1995).

La fase S y M están separadas por dos fases denominadas “Gap” (G1 y G2), en las que las células crecen e incrementa su masa de organelos y proteínas. En una célula de humano típica proliferante, la interfase (G1, S y G2) ocupa la mayor parte del ciclo celular con 23 h, mientras que la fase M, se desarrolla solamente en 1h (Graña y col., 1995).

El Papel de las CDKs en el Control del Ciclo Celular

Las CDKs Actúan Como Interruptores Moleculares

Las Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDKs) actúan como interruptores moleculares en diferentes puntos de control del ciclo celular, llevando a la célula desde un estado de reposo (G0) hasta la división celular o fase M. La actividad de las CDKs en el ciclo celular es un proceso altamente controlada a diferentes niveles; además de requerir subunidades activadoras (ciclinas), también se unen a reguladores negativos o inhibidores de CDKs (CKI) y adicionalmente están sujetas a regulación por fosforilación y desfosforilación de la subunidad catalítica (Lim y Kaldi, 2013).

En las células de los mamíferos, distintos complejos ciclinas/CDKs están involucrados en la regulación de diferentes transiciones del ciclo celular: la progresión de G1 es controlada por ciclina-D-CDK4/6, la transición G1-S por ciclina-E-CDK2, la progresión de la fase S por ciclina-A-CDK2 y la entrada a la fase M por el complejo ciclina-A/B-CDK1. Las diferentes ciclinas específicas para cada fase del ciclo celular, se acumulan y activan a las CDKs en un tiempo apropiado y después se degradan. Igualmente, los niveles de algunas CKI que inhiben ciertos complejos ciclina/CDK oscilan durante el ciclo celular provocando fluctuaciones en la actividad de las CDKs. La pérdida en el balance de estos ciclos de activación/inhibición promueven el crecimiento celular descontrolado y contribuye a la formación de los tumores (Sánchez y col., 2005).

Las Ciclinas Regulan la Actividad de las CDKs

Las señales mitogénicas que son recibidas por las células a través de sus receptores de superficie convergen en la activación de la proteína Ras, la cual señala con la maquinaria nuclear del ciclo celular induciendo la división de las células a través de varias cascadas citoplasmáticas de señalización como la del fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K), Raf y Rho. Estas proteínas conectan con la maquinaria nuclear del ciclo celular para mediar la salida desde G0 a G1 y la fase S- (Morris y col., 2000).

El paso de G0 a G1 sucede tras la activación de Ras en respuesta a factores de crecimiento como el EGF (factor de crecimiento epidérmico). La proteína Ras activada,

induce la transcripción de la ciclina-D en la fase temprana de G1 a través de la interacción con elementos de respuesta Ras localizados en el promotor del gen de la ciclina-D1, posteriormente la ciclina-D se asocia con CDK4 y CDK6 formando los complejos ciclina-D/CDK4 (o 6). Estos complejos son responsables de la primera fosforilación del gen supresor de tumores Rb en G1 y de la subsecuente síntesis de la ciclina-E (Morris y col., 2000).

Por su parte, ciclina-E es encargada de regular el segundo punto de control del ciclo celular. Cuando ésta es abundante, interacciona con CDK2 y la activa. El complejo ciclina-E-CDK2 coloca un segundo grupo fosfato en Rb y lo libera de E2F. Posteriormente, E2F actúa como factor de transcripción de los genes que son requeridos para la fase S. CDK2 también actúa como factor de transcripción de la propia ciclina-E dando lugar a un ciclo de retroalimentación positivo a medida que ciclina-E se acumula. Cuando la célula está en estado latente, la actividad transcripcional E2F permanece bloqueada debido a que la proteína se encuentra sin fosforilar y formando un complejo con Rb (Morris y col., 2000).

La replicación del DNA comienza en sitios que están dispersos en los cromosomas conocidos como orígenes de replicación. Estas regiones, son reconocidas por el complejo de reconocimiento de origen (ORC) y sirven como sitio de anclaje para otras proteínas reguladoras adicionales como la Cdc6 y las Mcm, las cuales facilitan la formación del complejo pre-replicativo o pre-RC (Fisher, 2011).

Una vez que el pre-RC se ha formado, la activación de ciclina-A-CDK2 a finales de G1 inicia la replicación. Adicionalmente, el complejo ciclina-A-CDK2 causa la disociación de Cdc6 del ORC e impide que la replicación se repita en el mismo origen. La actividad de ciclina-A-CDK2 se mantiene alta durante la fase S y en etapas tempranas de M (Fisher, 2011).

Al finalizar G2 la célula ha duplicado su material genético y cuenta con dos copias idénticas del genoma completo. A continuación, la célula pasa a la fase M y es ahí donde los cromosomas duplicados y otros componentes celulares se distribuyen de forma homogénea en dos células progenitoras. Los eventos mitóticos son desencadenados por la

activación del complejo ciclina-B-CDK1. La tasa transcripcional y con ello la síntesis de ciclina-B se incrementan durante la fase G2 y M, de modo que el complejo ciclina-B-CDK1 se acumula gradualmente a medida que la célula se aproxima a la fase M (Wuarin y col., 2002).

Durante las primeras etapas de la mitosis, la célula sufre una serie de reordenamientos estructurales que la preparan para la segregación cromosómica. Tras fosforilar una serie de proteínas estructurales y/o regulatorias, el complejo ciclina-B-CDK1 es capaz de inducir el ordenamiento del huso mitótico y asegurar que los cromosomas previamente replicados queden anclados al huso. Adicionalmente, ciclina B-CDK1 promueve la condensación de los cromosomas, el rompimiento de la membrana nuclear, rearrreglos a nivel del citoesqueleto de actina y reorganización del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico (Wuarin y col., 2002).

La fase M culmina con la separación de las cromátidas hermanas en la transición metafase-anafase. La separación de las cromátidas hermanas se da gracias a las fuerzas de tracción generadas por la unión de las cromátidas hermanas a polos del huso con distinta polaridad. En etapas tempranas de la mitosis, la segregación de los cromosomas se ve interrumpida debido a que éstos se mantienen unidos a través de sus centrómeros y a lo largo de sus brazos por proteínas de la familia de las cohesinas. La anafase es iniciada cuando el complejo promotor de la anafase (APC) es activado. El APC, es una ubiquitin ligasa que induce la proteólisis de securina, ésta última, es una proteína inhibidora de separasa. Cuando el APC induce la proteólisis de securina, la proteína separasa es activada y se encarga de romper los enlaces creados por las cohesinas, iniciándose así la separación de las cromátidas hermanas (Alberts y col., 2002).

Después de haberse segregado los cromosomas, la célula reestablece los cambios que fueron generados durante la mitosis temprana, principalmente a través de la inactivación de ciclina-B-CDK1 y la desfosforilación de proteínas que fueron blanco de ciclina-B-CDK1 al iniciarse la mitosis. La inhibición de ciclina-B-CDK1 ocurre principalmente por proteólisis dependiente de ubiquitinas de ciclina-B. El complejo

Cdc20-APC es el responsable de desencadenar la ubiquitinación de ciclina-B y promover la destrucción de securina en la transición metafase-anafase (Alberts y col., 2002).

La mayoría de las células cuentan con varios mecanismos para prevenir la reactivación de las CDKs después de finalizada la mitosis. Uno de los mecanismos utiliza otra proteína activadora de APC llamada Hct. A diferencia de Cdc20-APC que es activado por ciclina-B-CDK1, APC-Hct es inhibido por la fosforilación de ciclina-B-CDK1. Por tal motivo, la actividad de APC-Hct se incrementa durante las fases tardías de la mitosis. Otro de los mecanismos utilizados se encuentra relacionado con el incremento de la actividad de las CKIs, tal es el caso de *Sic 1* que inhibe la actividad ciclina-B-CDK1 en la mitosis tardía y en G1. En resumen, la activación de APC-Hct, acumulación de CKIs y la disminución de la producción de las ciclinas inhiben totalmente la actividad de las ciclinas en G1 (Alberts y col., 2002).

El escape de G1 es promovido por señales extracelulares de proliferación celular que incrementan la síntesis de ciclina-D y la posterior acumulación de ciclina-D-CDK4/6. La acumulación de ciclina-D-CDK4/6 se ve favorecida debido a que no es blanco de acción de APC-Hct, ni es inhibida por *Sic 1*. Ciclina-D-CDK4/6 activa la síntesis de ciclina-E y la acumulación de ciclina-E-CDK2 (que también es resistente a APC-Hct y *Sic 1*). Mientras que ciclina-E-CDK2 estimula la síntesis de ciclina-A y la formación del complejo ciclina-A-CDK1, a su vez, ciclina-A-CDK1 es inhibido por *Sic 1*, pero ciclina-E-CDK2 fosforila e inactiva a *Sic 1*. Por su parte, ciclina-E-CDK1 y ciclina-A-CDK1 poseen la capacidad de inhibir a APC-Hct. Estos circuitos de retroalimentación que desencadenan la inactivación rápida de ciclina-B-CDK1 en la mitosis tardía, trabajan en sentido inverso en fases finales de G1 para asegurar la activación rápida y completa de ciclina-A-CDK2 (Alberts y col., 2002).

Mecanismos Moleculares de la Apoptosis

El término apoptosis deriva de las palabras griegas “apo” y “ptosis” que se refieren a la caída de las hojas de los árboles durante el otoño. La apoptosis o muerte celular programada genéticamente, comprende una serie de pasos ordenados y finamente orquestados que ocurren bajo condiciones fisiológicas y patológicas. Los fenómenos de apoptosis fueron descritos por primera vez por el científico alemán Carl Vogt en el año de 1842, pero el término fue utilizado hasta 1972 por el grupo de John Foxton Ross Kerr. Inicialmente, la apoptosis fue descrita como la muerte de las células en los tejidos, lo que marcó el inicio del estudio de este fenómeno. Posteriormente, la apoptosis comenzó a estudiarse desde un punto de vista morfológico y bioquímico, lográndose a la fecha identificar los cambios arquitectónicos y bioquímicos que sufre una célula cuando muere a través de este tipo de muerte celular (Hongmei, 2012).

Naturalmente, la apoptosis juega un rol esencial en el desarrollo embrionario y la homeostasis de los tejidos de un organismo adulto, sin embargo, algunas condiciones patológicas se desarrollan debido a fallas en la regulación de la misma, ya sea por incremento o disminución en la apoptosis celular. Las enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, se producen debido a un incremento en el índice de apoptosis, mientras que, en otras enfermedades, la apoptosis se ve reducida a causa de una transformación maligna como sucede en el cáncer. Es por ello, que la comprensión de las bases moleculares de la apoptosis durante la enfermedad nos ayuda a conocer la patogénesis de la misma, pero también nos da pistas sobre como la enfermedad puede ser tratada (Elmore, 2007).

Los eventos morfológicos que acompañan a una célula que muere por apoptosis son la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear, que van seguidas del redondeo de la célula, la reducción de su volumen y la retracción de sus pseudópodos. La condensación de la cromatina se inicia en la periferia de la membrana nuclear hasta que el DNA se fragmenta, a lo largo de este proceso la membrana celular sigue intacta. Posteriormente, la célula sufre modificaciones morfológicas que incluyen la formación de protuberancias de membrana (“blebs de membrana), cuerpos apoptóticos, contracción, desprendimiento celular y pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática.

Algunos de estos eventos como el desprendimiento celular, la formación de protuberancias de membrana y la condensación nuclear pueden observarse al microscopio (Wong, 2011).

De manera general, tres tipos principales de cambios bioquímicos pueden ser observados en la apoptosis: 1) activación de las caspasas, 2) degradación de DNA y proteínas y 3) cambios en la simetría de la membrana plasmática. Durante las etapas tempranas de la apoptosis, fosfatidilserina (PS) es translocada desde la cara interna de la membrana citoplasmática hacia la cara externa. Esto es seguido por la ruptura del DNA en fragmentos de 50 a 300 kb. Posteriormente, el DNA es escindido en oligonucleótidos con una longitud de 180 a 200 pb, los cuales pueden observarse como un patrón característico de escalera en una electroforesis en gel de agarosa. La apoptosis también es caracterizada por la activación de una familia de proteínas conocidas como caspasas (cisteinil-aspartato proteasas), que son las responsables de la mayoría de los eventos morfológicos y bioquímicos que se presentan en este tipo de muerte celular (Henry y col., 2013).

Bajo condiciones normales, las células que mueren por apoptosis son reconocidas y removidas por las células fagocíticas. Este mecanismo especializado previene la liberación del contenido intracelular al espacio extracelular, lo que evita la activación de una respuesta inflamatoria y subsecuente daño a tejidos y células circundantes (Henson y col, 2013). En contraste con la apoptosis, la necrosis es típicamente no controlada e implica la pérdida repentina de la integridad de la membrana plasmática, lo que ocasiona la liberación del contenido celular y la activación de la respuesta inmune (Portt y col., 2011).

Vías de Activación de la Apoptosis Celular

El proceso de apoptosis se controla mediante señales de diversidad que participan en la regulación de la supervivencia o muerte de las células. Los factores de muerte desencadenantes de la apoptosis pueden ser extrínsecos o intrínsecos y son reconocidos a través de múltiples vías de señales. En las células de los mamíferos, la apoptosis es activada a través de dos vías bien caracterizadas: la vía intrínseca con implicaciones directas en mitocondria y la vía extrínseca, ambas convergen en la activación de diversas caspasas, siendo estas últimas responsables de las fases de iniciación y efectora de la apoptosis (Hongmei, 2012).

Las caspasas regulan la homeostasis de un organismo a través del control de la muerte celular e inflamación. Las caspasas se producen como zimógenos inactivos que ganan actividad catalítica tras ser estimuladas por eventos de señalización que promueven su agregación en dímeros o complejos macromoleculares. Tras su activación, las caspasas apoptóticas modifican la función de algunos componentes celulares como resultado de la activación o inactivación de sus sustratos (McIlwain y col., 2013; Fiandalo y Kyprianou, 2012).

Activación y Regulación de la vía Extrínseca e Intrínseca

Distintas señales extracelulares estimulan la muerte celular programada a través de su reconocimiento por proteínas transmembranales que actúan como receptores de muerte (Figura 1). Aunque distintos receptores de muerte han sido identificados, el receptor de TNF de tipo 1 (TNFR1) y el receptor de Fas (CD95) son los más conocidos. Estas moléculas de superficie poseen afinidad por el factor de necrosis tumoral (TNF) y el ligando de Fas (FasL), respectivamente. Tras el acoplamiento del receptor de muerte a su ligando, una serie de moléculas adaptadoras son reclutadas al dominio de muerte asociado al receptor de TNF (TRADD) o al dominio de muerte asociado a Fas (FADD), según sea el caso (Millimouno y col., 2014; Fulda y Debatin, 2006).

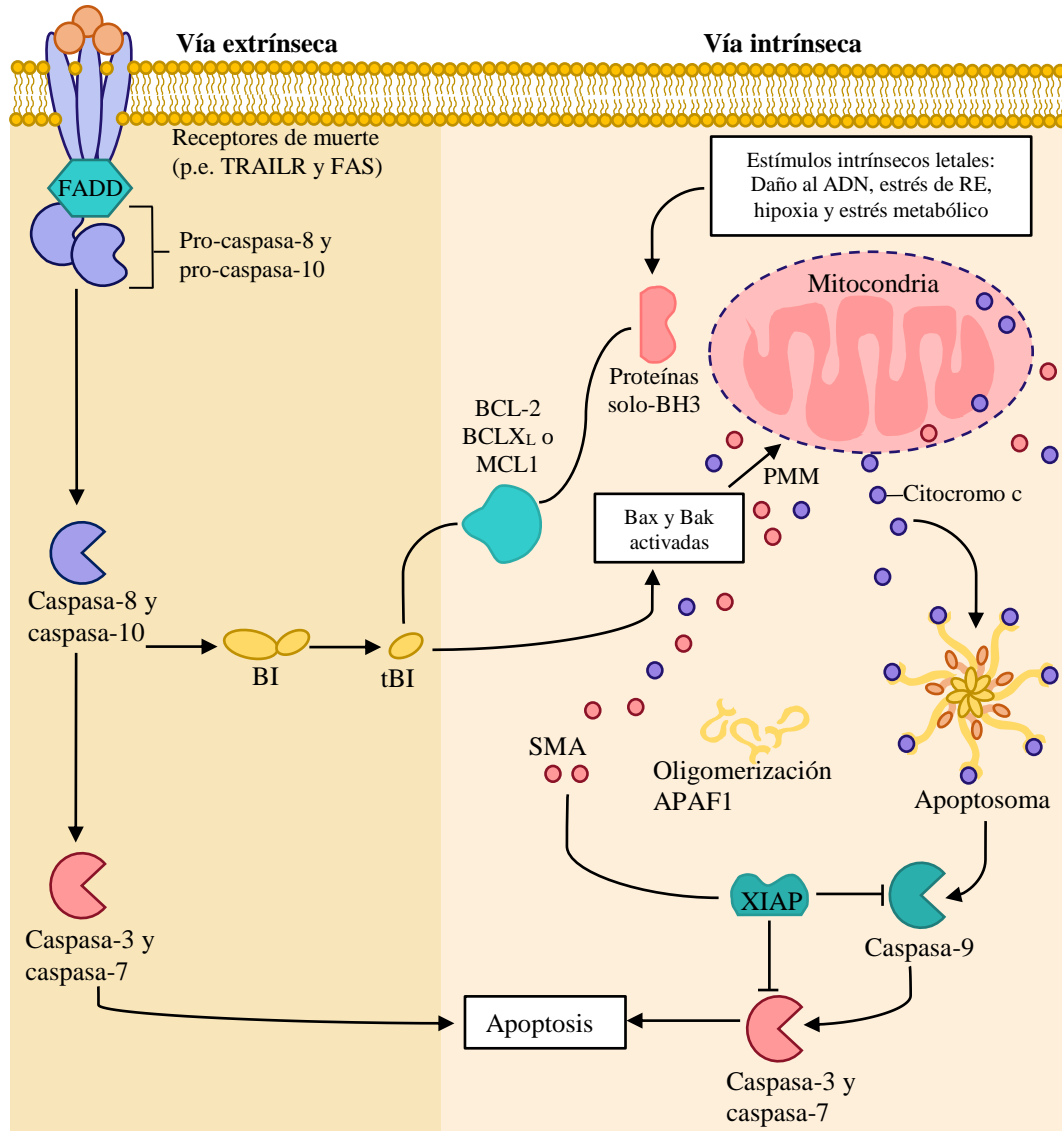


Figura 1. Vías de activación de las caspasas. La apoptosis es activada principalmente a través de la vía intrínseca o la vía extrínseca. Tras el acoplamiento del receptor de muerte a su ligando, una serie de moléculas adaptadoras son reclutadas al dominio de muerte dando inicio a la activación de las caspasas-8 y -10. Por otro lado, estímulos intrínsecos letales son capaces de desencadenar la vía intrínseca de la apoptosis. Esta vía tiene como resultado el incremento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la posterior liberación del citocromo c al citoplasma el cual activa secuencialmente a caspasa-9 y -3. Las proteínas de la familia de las Bcl-2 son las responsables de regular el destino de la célula a través del control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

La interacción ligando-receptor-adaptador forma el complejo de señalización activador de muerte (DISC), siendo este último el responsable de dar inicio con la apoptosis a través de la activación corriente abajo de la caspasa-8. Por otro lado, estímulos internos como el daño genético irreparable, altas concentraciones citosólicas de Ca^{+2} y el estrés oxidativo severo, son algunos de los agentes desencadenantes de la vía intrínseca de la apoptosis. Independientemente de los estímulos, esta vía tiene como resultado el incremento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la posterior liberación del citocromo c al citoplasma (Millimouno y col., 2014; Fulda y Debatin, 2006).

El Papel de las Bcl-2 en la Apoptosis

Las proteínas de la familia de las Bcl-2 son las responsables de regular el destino de la célula a través del control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Existen dos grandes grupos en la familia de las Bcl-2, las proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim y Hrk) y las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1). Estas proteínas comparten uno o más sitios de homología Bcl-2 (BH) que son importantes en las interacciones heterodiméricas entre miembros de la familia. La mayoría de las proteínas anti-apoptóticas contienen de 1 a 4 dominios BH, mientras que las proteínas pro-apoptóticas se pueden dividir en dos grupos según la función y el número de dominios BH. Las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak contienen de 1 a 3 dominios BH, estos dominios también se conocen como multidominio pro-apoptótico o proteínas efectoras. El resto del grupo de las proteínas activadoras de la apoptosis, contienen solo el tercer dominio BH y se conocen como proteínas solo-BH3. Estas proteínas se encargan de supervisar si existe daño y desorden celular. El balance en la actividad entre las proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas determina si una célula entra en apoptosis o no, ya sea inhibiendo o activando la liberación del citocromo c (Brunelle y Letai, 2009).

En respuesta al estrés o daño celular, las proteínas solo-BH3 son activadas y éstas a su vez causan activación de las proteínas Bax y Bak. Acto seguido, las proteínas Bax y Bak se homo-oligomerizan y forman poros en la membrana mitocondrial externa. Estos poros permiten el escape de una serie de moléculas activadoras de la apoptosis (citocromo

c, factor inductor de apoptosis (AIF), segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria (Smac), proteína de unión directa a IAP con bajo punto isoeléctrico (DIABLO) y Omi/proteína A de requerimiento de alta temperatura (HtrA2), desde el espacio intermembrana mitocondrial hacia el citoplasma (Brunelle y Letai, 2009). En presencia de dATP o ATP, el factor activador de la proteasa apoptótica-1 (Apaf-1) y el citocromo c se ensamblan para formar un complejo multimérico de ~ 1,4 MDa denominado apoptosoma. Apaf-1 a través de sus dominios de activación y reclutamiento de caspasas (CARD) interactúa con el dominio CARD del zimógeno pro-caspasa-9 y promueve su activación autocatalítica (Zhou y col., 2015; Chai, 2014). Posteriormente, la caspasa-9 unida al apoptosoma activa a las caspasas efectoras 3 y 7 que son las responsables de los cambios morfológicos característicos de la apoptosis (Shiozaki y col., 2002).

Por otro lado, Smac/DIABLO o Omi/HtrA2 promueven la activación de la apoptosis a través del bloqueo de la interacción de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) con las caspasa-3 y la caspasa-9 (Shiozaki y col., 2002).

La vía Común de las Caspasas

Ambas vías extrínseca e intrínseca a través de sus caspasas iniciadoras-8 y -9, convergen en la activación de las caspasas efectoras -3 y -7. Como resultado, las caspasas efectoras activan la proteólisis del DNA a través de la inhibición de la proteína inhibidora de desoxirribonucleasa activada por caspasas. Adicionalmente, la actividad de proteínas quinasas, proteínas reparadoras del ADN y subunidades reguladoras de la familia de endonucleasas se ve modificada. Afectándose así, la dinámica del citoesqueleto, el ciclo celular y vías de señalización que en conjunto contribuyen a los cambios morfológicos y bioquímicos observados en la apoptosis (Wong, 2011).

Vías de Señalización Celular Asociadas a la Terapia Molecular Contra el Cáncer

Las células que componen un tumor son diversas y heterogéneas, pero todas ellas comparten la capacidad de proliferar más allá de las restricciones que limitan su crecimiento cuando forman parte de un tejido normal. Aberraciones en la regulación de vías claves que controlan la proliferación y la supervivencia celular son obligatorias para el establecimiento de los tumores. Existen diversos mecanismos a través de los cuales las células tumorales adquieren resistencia a la apoptosis y capacidad de proliferar de forma descontrolada (Fischer y Schulze-Osthoﬀ, 200; Lee y col., 2014).

Alteración de vías de señalización celular (PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK, JAK/STAT3, NF- κ B) (Figura 2), defectos en p53, reducción de la actividad de las caspasas, incremento en la expresión de las IAP, desequilibrio en la función de las proteínas Bcl-2 y alteración en reguladores del ciclo celular, son algunas de las aberraciones moleculares que constituyen la plataforma sobre la cual se produce la generación y la evolución de toda célula neoplásica (Fischer y Schulze-Osthoﬀ, 200).

Por lo anterior, la identificación de objetivos moleculares que se expresan principalmente en células tumorales ha permitido la generación de nuevas drogas con capacidad de modular la actividad de vías involucradas en el control de la apoptosis y la proliferación celular (Fischer y Schulze-Osthoﬀ, 200).

Vía de la JAK/STAT

La vía de la Cinasa Janus – Transductores de Señales y Activadoras de la Transcripción (JAK/STAT) son un conjunto de cascadas de señalización pleiotrópicas implicadas en la transducción de una multitud de señales relacionadas con el desarrollo y la homeostasis. Estas vías fueron descubiertas a través del estudio de la activación transcripcional en respuesta a interferones (IFNs) (Horvath, 2000).

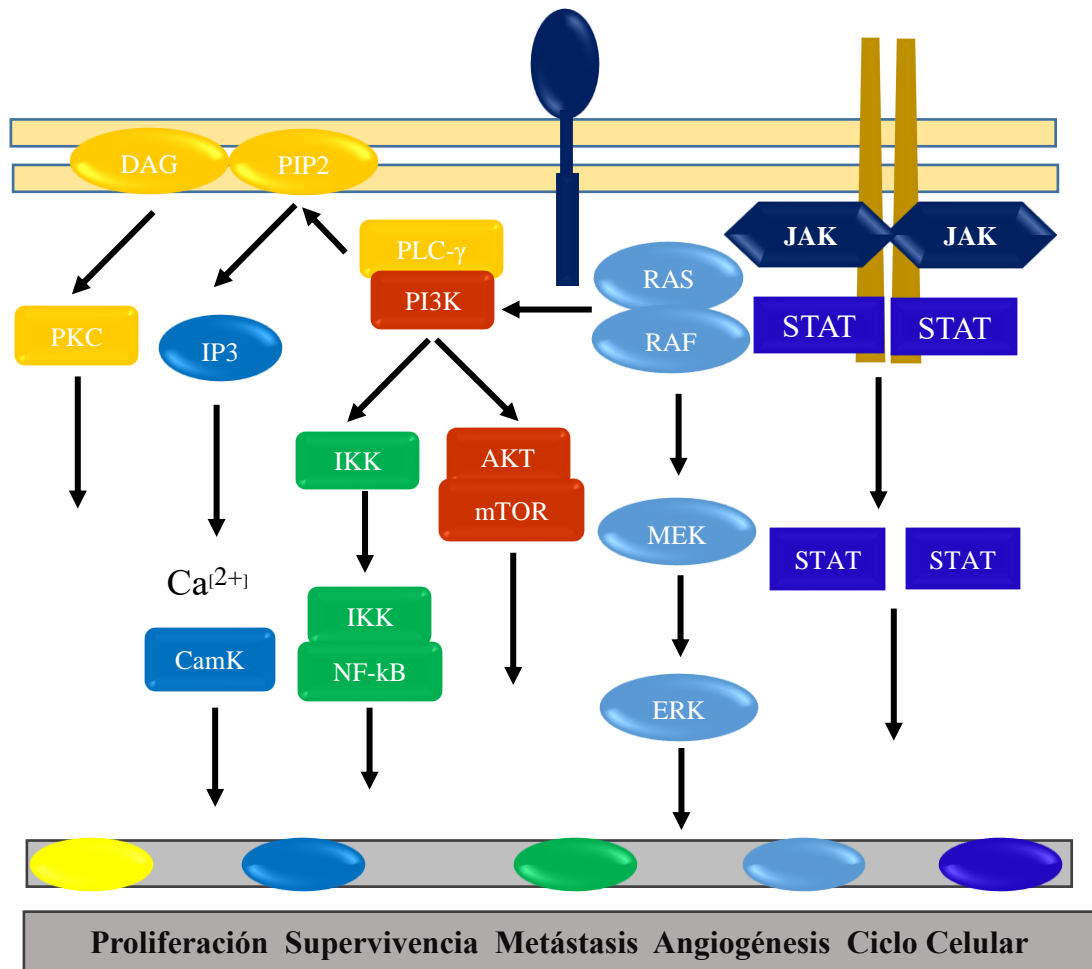


Figura 2. Vías de señalización implicadas en el cáncer. Aberraciones en la regulación de vías claves que controlan la proliferación y la supervivencia celular son obligatorias para el establecimiento de los tumores. La señal a través vía de la Cinasa Janus y Transductores de Señales y Activadoras de la Transcripción (JAK/STAT) se propagan cuando los receptores reconocen a sus ligandos específicos. JAK fosforila al propio receptor, el cual sirve como sitio de anclaje para las STAT. STAT se dimeriza y migra al núcleo donde actúan como factor de transcripción. La vía del PI3K/AKT/mTOR es activada a través de receptores transmembranales del tipo tirosina cinasa en respuesta a estímulos externos. La activación de ERK es mediada por la reacción en cascada de Ras/Raf/MEK/ERK, a través de receptores de superficie celular.

En mamíferos, las JAK/STAT son el principal mecanismo de señalización de una gran variedad de citosinas y factores de crecimiento. La activación de esta vía de transducción de señales, está implicada en la programación génica de eventos biológicos tan diversos como el desarrollo embrionario, la muerte celular programada, la organogénesis, la inmunidad innata, inmunidad adaptativa, la regulación del crecimiento en órganos, la proliferación celular, la supervivencia celular, entre otros. Mutaciones que afectan la actividad de las JAK/STAT (reduciéndola o incrementándola) se relacionan con la generación de enfermedades inflamatorias, eritrocitosis, gigantismo, leucemias y cáncer (Horvath, 2000).

Distintas citocinas y factores de crecimiento son las responsables de activar esta vía. Ligandos como la eritropoyetina y la hormona del crecimiento son reconocidos por receptores en forma de homodímeros, mientras que, otras moléculas como los interferones e interleucinas son reconocidos por receptores unidos como heteromultímeros. Los dominios citoplasmáticos de estos receptores se encuentran asociados a proteínas JAK. En los mamíferos, la familia JAK está constituida por cuatro miembros: JAK1, JAK2, JAK3 y la tirosina cinasa 2 (TYK2). Todas ellas, poseen un dominio de tirosina cinasa conservado y otro dominio de cinasa relacionado, pero catalíticamente inactivo (McBride y col., 2002; Shuai y Liu 2003).

Las señales a través de las JAK/STAT se propagan cuando sus receptores en forma de homodímeros o heteromultímeros reconocen a sus ligandos específicos, esto pone en estrecha proximidad a dos proteínas JAK que posteriormente se trans-fosforilan. La activación de las JAK conduce a la fosforilación propia del receptor en residuos de tirosina específicos que sirven como sitio de anclaje para las STAT. Posteriormente, las STAT que normalmente residen en el citoplasma de forma inactiva, son fosforiladas por las JAK en un residuo de tirosina conservado cerca del extremo C-terminal, lo que provoca su dimerización y posterior migración al núcleo donde actúan como factores de transcripción uniéndose a elementos de DNA específicos conocidos como secuencias activadoras de gammaglobulinas o elementos GAS promoviendo la expresión de genes (McBride y col., 2002; Shuai y Liu 2003).

En los seres humanos, los genes STAT codifican para proteínas que presentan longitudes que van desde los 750 a los 850 aminoácidos y que mantienen una homología de secuencia del 52 hasta >95%. Estructuralmente, las STAT están organizadas por un dominio N-terminal, un fragmento central (CF) constituido a su vez por un dominio de bobina en espiral (CCD), un dominio de unión al ADN (DBD), un dominio enlazador (LD), un dominio de homología SRC2 (SH2) y una cola de fosfotirosina (p-Tail). Adicionalmente, presentan un extremo C-terminal que es llamado dominio de transactivación (TAD). La disposición global de los dominios y sus funciones son conservadas dentro la familia de las STAT (Al Zaid y Turkson, 2008).

Funcionalmente, el dominio N-terminal media la disposición tetramérica de los dímeros STAT unidos a sitios adyacentes en el DNA, el dominio CCD está involucrado en la importación/exportación de las STAT al núcleo, DBD controla la especificidad del reconocimiento de las STAT sobre DNA, LD asegura que el motivo de unión al DNA presente una estructura adecuada y regula la exportación nuclear de STAT en las células en reposo, el dominio SH2 actúa promoviendo la formación de dímeros y actúa como un conmutador dependiente de fosforilación que controla el reconocimiento recíproco de monómeros STAT y también actúa como modulador de la transcripción cuando se organiza en dímeros no fosforilados, la p-Tail promueve la dimerización tras su fosforilación por activadores que actúan corriente arriba, por su parte el dominio C-terminal contribuye al reclutamiento de proteínas de transcripción a través de residuos de serina específicos que pueden encontrarse fosforilados o no. A pesar de la homología estructural de las STAT, diferencias sutiles en su estructura median su acción fisiológica distinta (Langenfeld y col., 2015).

La activación constitutiva de algunos miembros de la familia de STAT3 ha sido observada en diversos tumores primarios y un gran número de carcinomas como el de mama, próstata, pulmón, ovario, cabeza, cuello, leucemias, linfomas y cáncer de cérvix. Normalmente, STAT3 es un factor de transcripción latente con un rol indispensable en eventos celulares como la diferenciación, proliferación, supervivencia y apoptosis celular.

Específicamente, STAT3 es activado por el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y citocinas inflamatorias como IL-6. La fosforilación de STAT3 en el residuo de tirosina 705 provoca su dimerización y posterior translocación al núcleo donde regula actividad transcripcional de genes como el de ciclina-D1, c-myc, survivina, Bcl-xL, Bcl-2, y Fas. La activación de STAT3 también incrementa la invasión y metástasis vía inducción de metaloproteasas y activación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor inducible por hipoxia-1a (HIF-1a). Es por ello, que el control de la activación de STAT3 representa un blanco terapéutico importante en el control del cáncer (Shukla y col., 2010; Mitchell y John, 2005).

Vía del PI3K/AKT/mTOR

La vía del PI3K/AKT/mTOR está involucrada en la regulación del metabolismo celular, desarrollo tumoral, proliferación, metástasis y la reorganización del citoesqueleto. Esta vía es activada a través de receptores transmembranales del tipo tirosina cinasa, como el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) y el receptor del factor de crecimiento análogo a la insulina tipo-1 (IGF-1R). En respuesta a los estímulos, la proteína G acoplada al receptor activa a la proteína Ras que ésta a su vez activa a la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), posteriormente PI3K convierte el 4,5,-biosfato (PIP2) en fosfatidilinositol 3,4,5,-trifosfato (PIP3), acto seguido PIP3 activa a AKT que es capaz de propagar la señal a diversos sustratos incluyendo mTOR1 y mTOR2. La activación de mTOR1 incrementa la supervivencia celular, proliferación y transcripción de proteínas, mientras que, mTOR2 funciona como factor de supervivencia regulando la expresión de proteínas anti-apoptóticas (LoPiccolo y col., 2008; Polivka y Janku, 2014).

Vía RAS/RAF/MEK/ERK

La vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), comprende varios componentes clave de señalización y fosforilación que juegan un papel vital en la regulación de procesos celulares asociados a la tumorigénesis. Actualmente, cuatro grupos

de MAPKs han sido reportadas: a) ERK; b) cinasa c-Jun N-terminal (JNK); c) ERK5 y d) p38 MAPK (p38) (Li y col., 2016; Santarpia y col., 2012).

La activación de ERK es mediada por la reacción en cascada de Ras/Raf/MEK/ERK, a través de receptores de superficie celular tales como, el receptor de tirosina (TRK) y receptores acoplados a proteínas G. Mediante la transmisión de señales recibidas por el receptor, la reacción en cascada de Ras/Raf/MEK/ERK activa diferentes factores de transcripción que regulan la expresión de genes asociados el crecimiento celular, la diferenciación, proliferación, apoptosis y la migración celular (Li y col., 2016; Santarpia y col., 2012).

Mecanísticamente, el proceso implica la activación de Ras que es mediada por el receptor, Ras posteriormente recluta y activa a la proteína Raf. A su vez, la proteína Raf (serina/treonina cinasa) promueve la activación de la proteína cinasa activada por mitógenos (MEK1/2). Ésta última, es encargada de activar a ERK1 y 2, que regulan la expresión de genes a través de la fosforilación de varios sustratos. Alteraciones en esta vía de señalización ha sido frecuentemente reportada en distintos cánceres humanos (Li y col., 2016; Santarpia y col., 2012).

Los Triterpenoides

Los Triterpenoides un Importante Recurso para la Generación de Nuevos Antineoplásicos

Muchos de los compuestos de uso clínico utilizados actualmente han sido aislados y caracterizados a partir de plantas medicinales. El conocimiento de los principios activos de las plantas, ha contribuido al desarrollo de potentes fármacos contra el cáncer; tal es el caso de los alcaloides de la vinca, el taxol, la camptoteticina y los etopósidos (Pan y col., 2014; Ji y col., 2009; Gurib-Fakim, 2006). Los fármacos derivados de plantas contribuyen a la generación de grandes ganancias anuales en el mercado mundial de medicamentos. Tan solo en la última década, aproximadamente 30.69 billones de dólares se registraron como ganancia de la venta de fármacos provenientes de plantas medicinales (Dzubak, 2006).

Los triterpenoides son un grupo de moléculas de 30 C formados a partir de la unión de 6 unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno). Estos metabolitos, representan el grupo más abundante de compuestos bioactivos derivados de plantas y son reconocidos por poseer una amplia gama de propiedades biológicas (Fu y col., 2015; Nguyen y col., 2015). En la naturaleza, pueden encontrarse en frutas, hortalizas, cereales, hongos, helechos, plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, animales y organismos marinos. Sin embargo, las plantas superiores son la principal fuente de triterpenoides con actividades farmacológicas. Los diversos usos de los triterpenoides en la industria farmacéutica, los han distinguido como sustancias económicamente importantes que generan ventas anuales de 12.4 billones de dólares (Dzubak, 2006; Nazaruk, 2015).

Biosíntesis y Clasificación de los Triterpenoides

Los triterpenos son moléculas estructuralmente complejas y diversas, lo cual dificulta su síntesis química. Los triterpenos simples, en su mayor parte, se encuentran en membranas especializadas y actúan como señalizadores, mientras que los triterpenoides complejos o glicosilados proporcionan protección contra plagas o patógenos (Buchanan y col., 2015).

En las plantas, la biosíntesis de los triterpenoides ocurre a nivel citosólico y del retículo endoplásmico a través de vía del acetato/mevalonato. Los triterpenos se forman en un proceso que puede ser dividido en cuatro etapas. La primera se desarrolla a nivel citosólico e implica la formación del difosfato de isopentenilo (IPP) y el difosfato de dimetilalilo (DMAPP), ambas moléculas son de vital importancia debido a que son utilizadas en fases posteriores como unidades básicas para la construcción de los triterpenoides. La formación de estos bloques de construcción (IPP y DMAPP) involucra la condensación de tres moléculas de acetil-CoA. Esta reacción se desarrolla en dos etapas y es catalizada por las enzimas tiolasa y la hidroximetilglutaril-CoA sintasa. El producto resultante, el 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) es reducido posteriormente por la HMG-CoA reductasa para formar el ácido mevalónico. Dos fosforilaciones secuenciales dependientes de ATP del ácido mevalónico y una subsecuente fosforilación/descarboxilación asistida por eliminación, generan como producto final el

IPP, el cual a su vez puede ser isomerizado por la IPP isomerasa para generar el isómero alílico DMAPP (Buchanan y col., 2015).

En la segunda etapa, el DMAPP se condensa con dos moléculas de IPP de manera cabeza-cola para producir el difosfato de farnesilo (C_{15} , FPP), reacción que es catalizada por una enzima preniltransferasas de cadena corta llamada farnesil difosfato sintasa (FDS). A continuación, dos moléculas de FPP se condensan de modo 1-1' cabeza-cabeza para formar el escualeno mediante la reducción dependiente de NADPH del pre-escualeno difosfato (Pandreka y col., 2015).

A través de una reacción de epoxidación, el escualeno es transformado a 2,3-epoxiescualeno. En la tercera etapa de la biosíntesis, el 2,3-epoxiescualeno se somete a una reacción de ciclación que es catalizada por la enzima oxidoescualeno sintasa (OCS) para producir fitoesteroles o triterpenoides. La ciclación del 2,3-epoxiescualeno puede dar origen a la formación de diferentes esqueletos parentales gracias a su capacidad de adoptar diferentes conformaciones. A pesar de que no se conoce en forma precisa el mecanismo de la ciclación, se han sugerido algunos hechos generales que se desarrollan durante el proceso: 1) protonación del 2,3-epoxiescualeno, 2) adición en cascada de polienos que conduce a la formación de una ciclación específica, 3) desplazamientos de grupos hidruro y/o metilos y 4) desprotonación (Zheng y col., 2015).

En la etapa final de la biosíntesis, los ciclos formados inicialmente pueden sufrir modificaciones en sus grupos funcionales, re-arreglos en su esqueleto parental y migración de hidruros y/o metilos, lo que genera la formación de más de 80 tipos distintos de triterpenoides que representan a más de 20, 000 miembros conocidos (Yan y col., 2014). De acuerdo a sus características estructurales básicas, los triterpenoides pueden dividirse en triterpenoides acíclicos, mono-, bi, tri, tetra y pentacíclicos. Los principales grupos de triterpenoides están representados por los derivados tetracíclicos del protostano, dammarano, apotirucallano, tirucallano, eufano, lanostano, cicloartán, y compuestos del tipo cucurbitano (Hill y col., 2005). Diversos estudios, han demostrado que las familias Rhamnaceae, Ganodermatacea, Apocynaceae y Cucurbitaceae producen una amplia variedad de triterpenoides tetracíclicos (Tian y col., 2005; Ko y col., 2008; Liang y col.,

2010; Liu y col., 2010; Ramalhete y col., 2011; Ramírez-Espinosa y col., 2011; Fu y col., 2015; Nguyen y col., 2015).

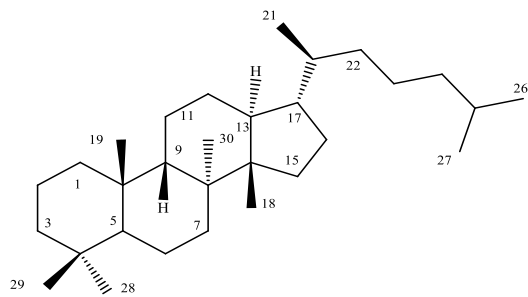
La biosíntesis de los triterpenoides tetracíclicos se produce a partir del 2,3-epoxidoescualeno, el cual posteriormente sufre una reacción de ciclación que genera los estereoisómeros protostano y dammarano. El dammarano se convierte en apotirucallano por migración del grupo metilo desde C-14 a C-13. Del mismo modo, apotirucallano se transforma en tirucallano, por un cambio de posición del grupo metilo desde C-8 a C-14. Por su parte, el dammarano se convierte en lanostano a través de un reordenamiento de grupos metilo. En este caso, el grupo metilo unido a C-14 se desplaza a C-13 y el grupo metilo unido a C-8 se desplaza a C-14. El cicloartano deriva del lanostano, pero adicionalmente posee un anillo del tipo ciclopropano que se forma de la conexión entre C-9 y C-19. Los cucurbitanos por su parte, carecen del anillo ciclopropano presente en el cicloartano (Figura 3).

Las Cucurbitacinas

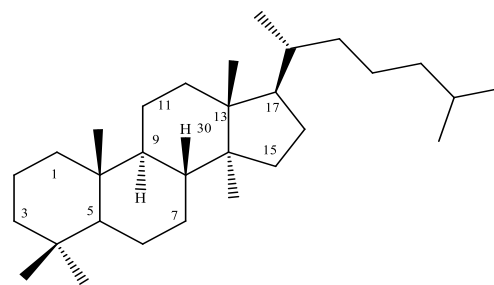
Distribución

Las cucurbitacinas (Cus) son una clase de compuestos del tipo triterpenoides distribuidos principalmente en plantas pertenecientes a la familia Cucurbitaceae. La gran mayoría de estos compuestos han sido identificados en especies de plantas utilizadas tradicionalmente contra trastornos neoplásicos (Kaushik y col., 2015).

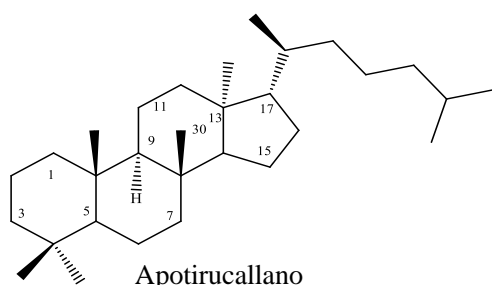
La presencia de las Cus también está asociada al sabor amargo que presentan algunas especies de plantas como el pepino, el melón, la sandía y la calabaza. También se ha reportado que las Cus actúan como feromonas químicas heterólogas que protegen a las plantas de agentes biológicos externos. El nivel de Cus entre los tejidos de una planta es variable, pero suelen encontrarse en mayor concentración en frutos y raíces de plantas maduras. Las semillas por su parte, generalmente contienen concentraciones muy bajas de estos compuestos (Liang y col., 2010).



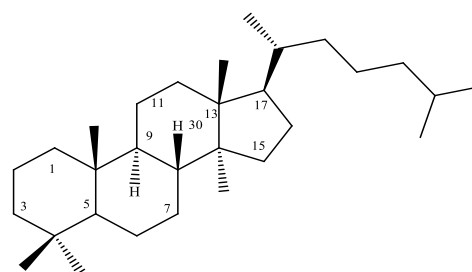
Protano



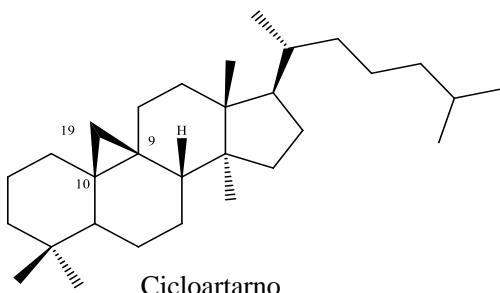
Dammarano



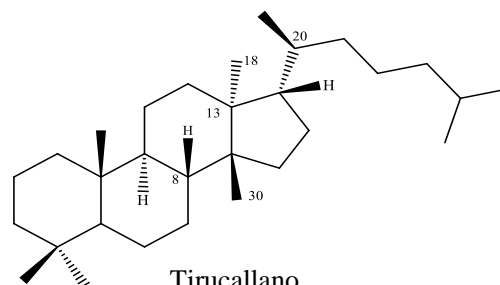
Apotirucallano



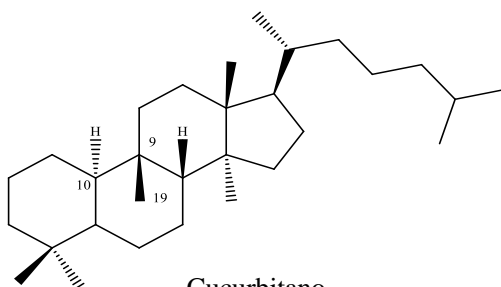
Lanostano



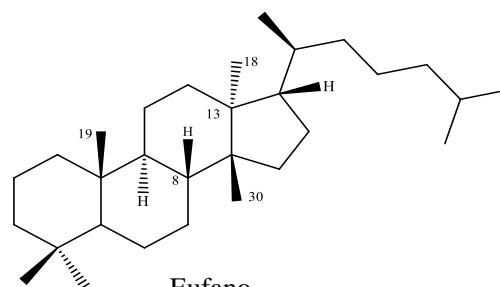
Cicloartano



Tirucallano



Cucurbitano



Eufano

Figura 3. Principales grupos de triterpenoides. Los principales grupos de triterpenoides están representados por los derivados tetracíclicos del protostano, dammarano, apotirucallano, tirucallano, eufano, lanostano, cicloartano, y compuestos del tipo cucurbitano.

La primera cucurbitacina se aisló en 1831 como una sustancia cristalina y se le dio el nombre de α -elaterina. Los primeros intentos por caracterizarla químicamente fueron emprendidos a principios del siglo veinte, pero fue hasta 1960 cuando se logró determinar su estructura química. Este acontecimiento desencadenó la identificación de un gran número de compuestos de esta naturaleza. Las diversas propiedades biológicas y farmacológicas de las Cus, y particularmente sus propiedades citotóxicas, estimularon el interés por su estudio desde una perspectiva de desarrollo de drogas contra el cáncer (Lavie y Glotter, 1971).

Características Físicas y Químicas

Estructuralmente las Cus se caracterizan por poseer un esqueleto básico de anillo cucurbitano (19(10-9 β)-abeo-5-lanostano) que es construido a base de seis unidades de isopreno. Los miembros de este grupo también se distinguen por la presencia de un doble enlace entre el C-5 y C-6. La mayoría de las Cus son tetracíclicas, sin embargo, algunos de estos compuestos poseen un anillo extra que es producto de la ciclación entre el C-16 y el C-24. Existen también los derivados glucósidos de las Cus, los cuales normalmente poseen un sacárido enlazado al C-2 (Chen y col., 2012; Chen y col., 2005).

Las diferencias estructurales entre las Cus y los núcleos esteroidales, radica en el hecho que las Cus presentan un grupo metilo asociado a C-9 y no a C-10 como los núcleos esteroidales. Las Cus también difieren de otros compuestos del tipo tetracíclicos esteroidales debido a que son altamente insaturados y contienen numerosos grupos ceto-, hidroxilo- y acetoxi- (Chen y col., 2012; Chen y col., 2005).

Químicamente, las Cus se clasifican de acuerdo a los grupos funcionales presentes en los anillos A y C, la diversidad en sus cadenas laterales y la estereoquímica. Existen doce diferentes categorías que se designan como: 1) A, 2) B, 3) C, 4) D, 5) E, 6) F, 7) G y H, 8) I, 9) J y K, 10) O, P y Q, 11) R, S y T, 12) varias (Chen y col., 2012; Chen y col., 2005). Las Cus generalmente son cristalinas a temperatura ambiente. La mayoría de estas sustancias son solubles en éter de petróleo, cloroformo, benceno, acetato de etilo, metanol

y etanol y ligeramente solubles en agua. Usualmente tienen un máximo de absorción en el ultravioleta entre 228 y 234 nm (Jorn e Inge, 2006).

Propiedades Anticancerígenas

Las Cus son reconocidas por poseer un gran espectro de propiedades farmacológicas, no obstante, la mayoría de los estudios de estas moléculas han estado dirigidos a evaluar su efecto antiproliferativo y antitumoral. Diversos autores señalan que las Cus inhiben dramáticamente el crecimiento y la proliferación de un gran número de células tumorales *in vitro* e *in vivo* a través de mecanismos relacionados con la inducción de muerte celular por apoptosis. Acumuladas evidencias también señalan que las Cus inducen arresto del ciclo celular en diferentes líneas celulares. El control de la metástasis y la angiogénesis son otros de los mecanismos asociados al efecto de las Cus sobre las células tumorales (Siveen y col., 2014; Zhang y col., 2014; Marostica y col., 2015).

Las Cus tienen como objetivos moleculares varias vías de señalización oncogénicas. Todas estas moléculas son consideradas inhibidores universales de la vía de las JAK/STAT, sin embargo, también ha sido reportado que las Cus inducen apoptosis y arresto del ciclo celular a través de la modulación de las MAPK, activación de caspasa-3, disminución en los niveles de p-STAT3 y JAK3, así como inhibición de la actividad de varios de los objetivos de STAT3 que se encuentran corriente abajo, por ejemplo: Bcl-2, Bcl-xL y ciclina D3 (todos ellos implicados en el control de la apoptosis y el ciclo celular). El control del EGFR y sus proteínas efectoras (PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPK y STAT3) también se ha asociado a la inducción de apoptosis y al arresto del ciclo celular por parte de las Cus (Silva y col., 2015).

Por otro lado, se ha demostrado que las Cus son capaces de modificar el potencial de membrana mitocondrial e inducir apoptosis gracias a su capacidad para activar o inhibir proteínas pro- o anti-apoptóticas (Alghasham, 2013). Adicionalmente, se ha observado que las Cus inhiben de manera significativa el crecimiento celular al interferir con la dinámica del citoesqueleto (Coleman y col., 2001; Sörensen y col., 2012).

Ibervillea sonora

Ibervillea sonora (S. Watson) Greene conocida comúnmente como “wareke” es una Cucurbitaceae nativa del desierto de Sonora con amplio uso en la medicina tradicional mexicana. Las tribus Mayo, Ópata, Seri y Yaqui del noroeste de México han utilizado la raíz de esta planta durante varios siglos para el tratamiento empírico de infecciones menores de la piel, diabetes, reumatismo, artritis, enfermedades inflamatorias y el cáncer (Alarcon-Aguilar y col., 2005; Andrade-Cetto y col., 2011).

Diversos estudios apoyan la evidencia de que la raíz de *I. sonora* posee capacidad hipoglucémica, anti-diabética, anti-inflamatoria y anti-proliferativa. Sin embargo, el conocimiento de las propiedades antiproliferativas y antitumorales de *I. sonora* es escaso (Alarcon-Aguilar y col., 2005; Hernández-Galicia y col., 2007; Andrade-Cetto y col., 2011, Zapata-Bustos y col., 2014).

Estudios fitoquímicos han revelado que *I. sonora* produce compuestos del tipo Cus. Compuestos como kinoína A, B, C, y sus glucósidos han sido aislados y caracterizados a partir de su raíz (Achenbach y col., 1993). En nuestro grupo de investigación, demostramos que kinoína A es una cucurbitacina presente en el extracto metanólico de *I. sonora* con gran actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares HeLa, M12.C3F6, RAW 264.7 y A549, donde se registraron IC₅₀ de 18, 31.4, 40 y 61.5 μ M respectivamente. Adicionalmente, esta molécula mostró actividad del tipo selectiva debido a que la IC₅₀ en la línea celular no cancerosa L929 no fue posible calcularla a la máxima concentración probada de 100 μ M (Torres-Moreno y col., 2015).

Los mecanismos de acción relacionados con el efecto antiproliferativo y antitumoral *in vivo* de kinoína A aún no se desconocen. Asimismo, aún no está claro, si *I. sonora* posee otras moléculas con capacidad de inhibir el crecimiento de las células tumorales. Es por ello que se considera importante continuar con el estudio de *I. sonora* en busca de compuestos del tipo Cus con actividad antiproliferativa y antitumoral. Igualmente, estudiar los mecanismos moleculares asociados a dicho efecto con la finalidad de identificar nuevos recursos que puedan ser perfilados como nuevas drogas para el tratamiento del cáncer.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especímenes de *Ibervillea sonorae* y Generación de los Extractos Metanólicos

Las raíces de *I. sonorae* fueron colectados en el estado de Sonora, carretera internacional México 15, tramo Hermosillo-Guaymas (27°36' 19.1'' N-110° 04' 40.3'' W). Los extractos metanólicos fueron preparados siguiendo la metodología descrita por Torres-Moreno y cols. 2015. Las raíces (2 kg) fueron secadas al aire y posteriormente se trituraron con la ayuda de un molino Wiley (malla 200) hasta obtener un polvo fino.

Acto seguido, el polvo fue extraído con metanol (MeOH) en una proporción 1:10 (peso/volumen) durante un período de 10 días, a temperatura ambiente y con breve agitación manual. A continuación, el sobrenadante se filtró y se concentró en un evaporador rotatorio (Yamato RE300) a 40 °C bajo presión reducida. El extracto metanólico (EM) se resguardó a 4 °C hasta su uso (Torres-Moreno y col., 2015).

Partición del Extracto Metanólico

Una cantidad del extracto metanólico (EM, 152 g) fue secuencialmente particionada a través de la administración continua de solventes orgánicas en orden de polaridad creciente. Inicialmente, el EM solubilizó con 30 mL de MeOH y se mezcló con la misma cantidad de Hex. La mezcla se colocó dentro de un embudo de separación y se agitó tres veces. La fase soluble en Hex se retiró, se filtró con papel Whatman no. 1, y se concentró en un evaporador rotatorio bajo la metodología previamente descrita para generar así la fracción de hexano (FH). El cambio de solvente se realizó de manera continua hasta que la parte soluble en Hex tomó un aspecto claro o incoloro.

Posteriormente, la fracción del EM que resultó insoluble en Hex, se mezcló con acetato de etilo (EtOAc) y se siguió la metodología descrita para generar la fracción de acetato de etilo (FAE). A la fracción del extracto insoluble en EtOAc se le denominó fracción residual (FR) (Torres-Moreno y col., 2015).

Purificación y Determinación Estructural

Procedimientos Experimentales Generales

La purificación y la determinación estructural de los compuestos bioactivos se realizó en el Dipartimento di Scienze Scienze Farmaceutiche de la Università Degli Studi di Perugia, bajo la supervisión de la Dra. Maria Carla Marcotullio.

Los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear en sus variantes de protón y de carbono (^1H y ^{13}C -RMN) fueron adquiridos en un espectrómetro de la marca Bruker Avance-DRX (utilizando secuencias de pulsos JMODXH 400) a frecuencias de 400 MHz (^1H) y 100 MHz (^{13}C). Los espectros fueron medidos en CD_3OD . Los desplazamientos químicos (δ) de ^1H y ^{13}C de RMN se expresaron en partes por millón (ppm) con referencia a la señal de disolvente [CD_3OD : δ_{H} 3.31 and δ_{C} 49.0]. Las constantes de acoplamiento fueron dadas en Hertz (Hz).

Las cromatografías en columna se realizaron utilizando sílica gel 60 (SiO_2 60) de Merck (70-230 mesh ASTM). Las fracciones se monitorearon por cromatografía en capa fina (TLC) (gel de sílice 60 F254, Merck), utilizando cromatofolios de 8 cm de altura por 5 cm de diámetro. Para eluir los cromatofolios se emplearon fases móviles de polaridad mayor en relación al eluyente manejado para extraer dichas fracciones de la columna. Los patrones de bandas en los TLC se visualizaron bajo la luz UV a longitudes de onda de 254 y 365 nm y después de ser teñidas con p-anisaldehído- H_2SO_4 -EtOH (1:1:98) seguido de calentamiento a 110 °C. La cromatografía en columna de fase inversa de media presión, se realizó usando sílica gel de fase reversa Fluka C_{18} y un Stepdos O3S a un flujo de 12 mL/min (Torres-Moreno y col., 2015).

Purificación de los Compuestos Bioactivos

Una alícuota de FEA (70 mg) fue separada por cromatografía en columna (CC), en una columna de vidrio de 30 cm de alto por 1 cm de diámetro. La columna fue eluida con DCM, DCM-EtOAc, seguido por EtOAc-acetona (Me_2CO). Se recolectaron fracciones de 10 mL y se evaluaron por TLC. Aquellas fracciones que presentaron patrones de bandas similares en el TLC fueron agrupadas.

Posteriormente, FEA-5 (18 mg) fue purificada por cromatografía en columna de fase inversa (sílica gel C₁₈), utilizando una columna de 10 cm de altura por 1 cm de diámetro. FEA-5 fue separada usando un gradiente de H₂O-MeOH a un flujo de 12 mL/min. Las fracciones cromatográficas fueron colectadas en volúmenes de 10 mL y analizadas por TLC.

Otra alicuota del EM (2.5 g) fue purificada en una columna de 30 cm de alto por 2.5 de ancho. Distintas mezclas de DMC-MeOH fueron utilizadas como eluyentes. Fracciones cromatográficas de 10 mL fueron colectadas y analizadas por TLC (Torres-Moreno col., 2015).

Cultivo Celular

Las líneas celulares fueron cultivadas en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado por calor (D5F) y (100 U/mL) de penicilina. Las células fueron mantenidas en cajas de cultivo de 25 cm², en una incubadora Isoterm (Fischer Scientific, USA) bajo las condiciones estándar (5% de CO₂ a 37 °C y 95% de humedad relativa).

Las células HeLa (adenocarcinoma cervical humano), A549 (cáncer de pulmón de células no pequeñas), LS180 (adenocarcinoma colorrectal), SiHa (carcinoma escamoso de cérvix grado II) y L929 (células de tejido conectivo subcutáneo no canceroso) fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Por otro lado, la línea celular RAW 264.7 (macrófagos transformados por el virus de la leucemia de Abelson) fue gentilmente proporcionados por el Dr. Emil A. Unanue (Department of Pathology and Immunology, Washington University, St. Louis, MO, USA) (Olivas-Aguirre y col., 2017).

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa

La actividad antiproliferativa de los extractos y/o moléculas, se evaluó a través del método de MTT bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol. A partir de un cultivo celular con una confluencia $\geq 95\%$, se preparó una suspensión celular con una densidad de

2×10^5 cel/mL. Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer utilizando azul de tripano como colorante de exclusión.

Seguido, 50 μ L de la suspensión celular se colocaron en una placa de cultivo celular de 96 pozos (Costar, Corning, N.Y. USA) y se incubaron por 24 h bajo las condiciones estándar de temperatura, humedad y % de CO₂. A continuación, las células se trataron con una alícuota de medio (50 μ L) que contenía a los extractos en un rango de concentraciones iban desde 1.5 μ g/mL hasta los 200 μ g/mL. Los compuestos por su parte, se evaluaron desde 1.5 a 100 μ M. Previamente, los compuestos y/o extractos se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) y se re-suspendieron en DMEM para generar una concentración final de DMSO de 0.25%, la cual no mostró interferencia con el crecimiento de las líneas celulares.

A continuación, las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con 90 μ L de D5F fresco y 10 μ L de una solución de MTT (5 mg/mL) por 4 h. Finalmente, los cristales de formazán fueron re-suspendidos con isopropanol ácido y se registraron absorbancias a 570 y 630 nm en un lector de microplacas (iMark microplate absorbance reader, Bio-Rad, Laboratories, D.F., Mexico). La actividad antiproliferativa se expresó como valores de IC₅₀ (concentración media máxima para la cual existe un 50% de inhibición en la proliferación celular). Los valores IC₅₀ se determinaron utilizando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). El éster fenílico del ácido cafeico (CAPE) fue utilizado como control positivo (Messina y col., 2015).

Análisis de los Mecanismos de Muerte Celular Asociados a la Apoptosis

Evaluación de la Muerte Celular por Apoptosis

Con el objetivo de determinar si el efecto antiproliferativo de cucurbitacina IIb (**1**) y kinoína A (**2**) sobre la línea celular HeLa es mediado a través de la inducción de la muerte celular por apoptosis, se realizó un doble marcaje con anexina V (AN) y yoduro de propidio (PI). Brevemente, 2×10^5 cel/mL fueron colocadas en una placa de cultivo celular de 12 pozos (Costar, Corning, N.Y. USA) y se incubaron por 24 h. Acto seguido, las células fueron tratadas con **1** (18 μ M) ó **2** (8 μ M) por 24 h. Después del tratamiento, los

sobrenadantes fueron retirados y las células se lavaron gentilmente con PBS 1X. Las células adheridas se desprendieron agregando 200 μ L de tripsina a cada uno de los pozos por 1 min.

Una vez que las células se observaban redondas y refringentes bajo el microscopio, se adicionaron 500 μ L de D5F a cada uno de los pozos con la finalidad de inactivar la tripsina. Inmediatamente después, las células se transfirieron a tubos FACS, se centrifugaron a 500 g por 7 min a 4 °C y se lavaron dos veces con PBS 1X (500 g por 7 min a 4 °C). El botón celular se re-suspendió en una solución de tinción que contenía AN (1 μ g/mL) y PI (10 μ g/mL) y se incubó por diez minutos en la oscuridad. Finalmente, 1×10^5 células fueron analizadas utilizando la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) en un citómetro de flujo (Canto II FACS, Becton Dickinson, CA, USA).

Los resultados fueron analizados en el software FACS DIVA 6.0 (BD Systems, San José, CA, EE.UU.). Se introdujo un gráfico de puntos (dot plot) para identificar las células viables, células necróticas, células en apoptosis temprana y células en apoptosis tardía. Las células viables fueron reconocidas por ser doblemente negativas para AN y PI (AN⁻/PI⁻), las células necróticas fueron negativas para AN y positivas para PI (AN⁻/PI⁺), las células en apoptosis temprana se identificaron como AN positivas y PI negativas (AN⁺/PI⁻), mientras que las células en apoptosis tardía se reconocieron por ser doblemente positivas para AN y PI (AN⁺/PI⁺). Las células de cada cuadrante, se expresaron como un porcentaje del total de las células teñidas que fueron contadas (Torres-Moreno y col., 2015).

Análisis del Potencial de Membrana Mitocondrial

La evaluación del efecto de **1** y **2** sobre el potencial de membrana mitocondrial de células HeLa, se desarrolló a través de una tinción con el colorante JC-1 (ioduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbencimidazolcarbocianina). Debido a su naturaleza lipofílica-catiónica, JC-1 puede entrar selectivamente en las mitocondrias y cambiar de forma

reversible el color de su fluorescencia (verde a roja) a medida que aumenta el potencial de membrana mitocondrial.

En células sanas, JC-1 es encontrado preferentemente en forma de agregados (JC-1 agregados). La formación de estos agregados que presentan intensa fluorescencia roja a ~ 590 nm es dependiente de la concentración de JC-1 y se correlaciona positivamente con un alto potencial de membrana mitocondrial. Por otro lado, en células apoptóticas o necróticas donde el potencial de membrana mitocondrial es bajo, JC-1 permanece en su forma monomérica la cual emite fluorescencia verde a ~ 525 nm.

Para el análisis, 2×10^5 cel/mL fueron colocadas en una placa de cultivo celular de 12 pozos (Costar, Corning, N.Y. USA) y se incubaron por 24 h. Las células fueron tratadas con los compuestos **1** ó **2** durante 24 h a las concentraciones de 8 y 18 μ M, respectivamente. Posterior al tratamiento, los sobrenadantes de cada uno de los tratamientos fueron retirados y las células se lavaron gentilmente con PBS 1X. Las células que se conservaron adheridas a los pozos de la placa fueron cosechadas utilizando 200 μ L de tripsina y posteriormente se lavaron dos veces con PBS 1X (500 g por 7 min a 4 °C).

Acto seguido, las células se incubaron por 30 min en una solución de JC-1 (5 mg/mL en DMEM) a 37 °C en la oscuridad. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS 1X (500 g por 7 min a 4 °C), se re-suspendieron nuevamente en DMEM fresco y se analizaron por citometría de flujo. La relación de la intensidad fluorescencia roja/verde se utilizó como indicador del potencial de membrana mitocondrial (Rascón y col., 2016).

Análisis de la Actividad de las Caspasas

Con el objetivo de conocer si la inducción de apoptosis por **1** y **2** en HeLa es mediada vía activación de caspasas, se evaluó la expresión de caspasas-3, caspasa-8 y caspasa-9 utilizando los kits comerciales de la compañía abcam Fluorescein Active Caspase 3, Fluorescein Active Caspase 8 y Fluorescein Active Caspase 9, respectivamente. 2×10^5 cel/mL fueron tratadas con **1** (8 μ M) ó **2** (18 μ M) durante 24 h.

Una vez finalizado el tratamiento, las células fueron cosechadas con 200 μ L de tripsina y posteriormente se lavaron dos veces con PBS 1X (500 g por 7 min a 4 °C). Acto seguido, las células se re-suspendieron y se incubaron durante 1 h a 37 ° C en la oscuridad en una solución constituida por 299 μ L de D5F y 1 μ L del inhibidor de caspasa acoplado a FITC (FITC-DEVD-FMK). A continuación, las células se lavaron dos veces y se re-suspendieron en una solución tampón de lavado. Finalmente, las células se analizaron en un citómetro de flujo FACS, Canto II. Los resultados fueron expresados como el cambio en la actividad de la caspasa-3, -8 -9 en comparación con las células tratadas con DMSO (Rascón y col., 2016).

Análisis del Ciclo Celular

A fin de determinar si los compuestos **1** y **2** inducen efecto antiproliferativo vía arresto del ciclo celular, por análisis FACS se investigó la distribución de las fases del ciclo celular de células HeLa después del tratamiento con estos compuestos. Inicialmente, con el objetivo de sincronizar las células en la fase G2/M del ciclo celular, 5×10^5 cel/mL se colocaron en una caja de cultivo de 25 cm² de superficie (Corning® cell culture flasks) donde fueron tratadas con nocodazol (400 ng/mL) por 14 h. Las células se cosecharon utilizando tripsina y se lavaron 2 veces con PBS 1X (500 g por 7 min a 4 °C). Inmediatamente después, 2×10^5 cel/mL se colocaron en una placa de cultivo celular de 6 pozos (Costar, Corning, N.Y. USA) y se incubaron por 24 h.

Acto seguido, las células fueron tratadas con **1** (36 μ M) ó **2** (8 μ M) durante 24 h. Al finalizar el tratamiento, los sobrenadantes fueron retirados y las células se lavaron gentilmente con PBS 1X. Las células adheridas fueron disociadas agregando 500 μ L de tripsina a cada uno de los pozos por 1 min. A continuación, las células se transfirieron a tubos FACS y se lavaron dos veces con PBS 1X (500 g por 7 min a 4 °C). Posteriormente, 4×10^5 células de cada tratamiento fueron fijadas en etanol al 66%. Para ello, el botón celular se re-suspendió suavemente en 400 μ L de PBS 1X frío y seguido se agregaron lentamente 800 μ L de etanol absoluto (frío).

Las células previamente fijadas a 4 °C se transfirieron a la temperatura ambiente para ser equilibradas. Seguido, se re-suspendieron suavemente con la ayuda de una micropipeta y se lavaron dos veces con PBS 1X (500 g por 7 min a 4 °C). El sobrenadante se eliminó cuidadosamente y el botón celular se re-suspendió suavemente en 200 µL de una solución de tinción que estaba constituida por RNAasa (550 U/mL) y PI (50 µg/mL) y se incubaron por treinta min a temperatura ambiente.

Las células ya teñidas se colocaron en hielo, se re-suspendieron suavemente con la ayuda de una micropipeta y se filtraron para eliminar los agregados celulares. Finalmente, 50×10^3 células se analizaron por FACS en un citómetro de flujo (Canto II FACS, Becton Dickinson, CA, USA). El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se determinó con el uso del software CellQuest Pro software (BD) (Tiwari y col., 2014).

Evaluación del Efecto Antitumoral *in Vivo*

Animales de Experimentación

La evaluación del efecto antitumoral *in vivo* de **1** y **2** se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Medicina en la Universidad Panamericana, bajo la supervisión del Dr. Salomón Hernández Gutiérrez.

Ratones atímicos machos y hembras de la cepa (nu/nu) fueron proporcionados amablemente por el Dr. Gerardo Arellín Rosas (Jefe del Bioterio de la Escuela de Medicina de la Universidad Panamericana, Ciudad de México). Los animales se mantuvieron alojados en cajas ventiladas, en un ambiente libre de patógenos y bajo las condiciones ambientales estándares de temperatura controlada (24 ± 2 °C), humedad relativa (60 %) y ciclos de 12:12 h de luz-oscuridad. Agua y comida estériles fueron proporcionadas *ad libitum*. Todos los experimentos fueron realizados acorde a las Normas Oficiales Mexicanas en Materia de Cuidado y Manejo de Animales.

Evaluación del Efecto Antitumoral

La evaluación de la actividad antitumoral de **1** y **2** se realizó en ratones de 4 semanas de edad que contaban con un peso aproximado de entre los 12 y 14 g. Brevemente, 1×10^6 células HeLa contenidas en 200 μ L de DMEM fueron trasplantadas de manera subcutánea en los flancos de los ratones. Los tumores que se generaron en los sitios de las inyecciones se midieron a intervalos de tiempo regulares hasta que alcanzaron dimensiones de aproximadamente 100 cm^3 .

Acto seguido, los ratones se agruparon en 6 grupos (cada grupo constituido por 6 individuos) y se inició el tratamiento. Grupo 1: DMSO; grupo 2: doxorrubicina 1 (mg/kg); grupo 3: cucurbitacina Iib 1 (mg/kg); grupo 4: cucurbitacina Iib 10 (mg/kg); grupo 5: kinoína A 1 (mg/kg); grupo 6: kinoína A 10 (mg/kg). Los tratamientos se administraron por vía peri vascular. Se aplicó una dosis diaria, cada tres días, durante quince días.

El crecimiento de los tumores fue monitoreado con la ayuda de un vernier. Los volúmenes de los tumores se calcularon a partir de la medición del largo (l) y ancho (a) de cada tumor, con la fórmula $V = l \times a^2/2$.

Los pesos de los ratones se registraron al inicio y al final de cada experimento. Al finalizar el tratamiento, los tumores fueron disecados y se registraron los pesos de cada tumor (Hanh and Akporiaye, 2011).

Análisis Estadístico

La IC_{50} se determinó como la cantidad de sustancia necesaria para reducir el 50% de la proliferación celular y se calculó a partir de una curva de respuesta de concentración mediante el software GraphPad (Inc., CA, USA). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se representan como la media \pm desviación estándar (SD). La comparación estadística entre el control y los diferentes tratamientos se realizó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido del test de Tukey (IBM SPSS Statistics software). La significancia se consideró en $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Material Vegetal

Los especímenes de *I. sonorae* fueron colectados en el estado de Sonora, carretera internacional México 15, tramo Hermosillo-Guaymas (27°36' 19.1'' N-110° 04' 40.3'' W). Las plantas fueron autenticadas taxonómicamente por el Ing. Jesús Sánchez Escalante. Un espécimen fue depositado en el Herbario de la Universidad de Sonora con número de voucher USON-22024.

Generación de Extractos y Evaluación de su Actividad Antiproliferativa

A partir de 2 kg de la raíz se generó el extracto metanólico (EM) con un rendimiento del 9.35% (187 g). Posteriormente, 152 g del EM se separaron por partición dando origen a las siguientes fracciones: fracción de hexano (FH, 1.52 g), fracción de acetato de etilo (FEA, 15 g) y fracción residual (FR, 120 g). Estas fracciones se obtuvieron con un rendimiento del 1%, 9.86% y 78.94% con relación al EM, respectivamente.

La actividad antiproliferativa del EM y sus fracciones se evaluó sobre las líneas celulares HeLa y RAW 264.7 (Tabla I). EM fue capaz de inhibir el crecimiento de ambas líneas celulares con valores de IC_{50} de 134.6 ± 5 y 153 ± 3 $\mu\text{g/mL}$. Así mismo, FH mostró fuerte actividad antiproliferativa principalmente frente a la línea celular HeLa donde el valor de IC_{50} fue de 36 ± 3 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, FAE redujo el crecimiento de HeLa y RAW 264.7 con valores de IC_{50} de 42 ± 3 y 22 ± 2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Por su parte, FR no mostró actividad antiproliferativa a la máxima concentración probada de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla I. Evaluación de la actividad antiproliferativa del extracto metanólico y sus fracciones.

Extracto y/o fracciones	Líneas Celulares *IC ₅₀ (µg/mL)	
	HeLa	RAW 264.7
EM	153 ± 3	134.6 ± 5
FH	36 ± 3	55 ± 0.8
FAE	55 ± 0.8	22 ± 2
FR	>100	>100

*IC₅₀: Concentración media máxima que inhibe en un 50% la proliferación celular.

EM: Extracto metanólico.

FH: Fracción de hexano.

FAE: Fracción de acetato de etilo.

FR: Fracción Residual.

Generación de las Fracciones Cromatográficas y Evaluación su Actividad Antiproliferativa

Desde su descubrimiento, las Cus atrajeron la atención debido a sus múltiples propiedades biológicas. La gran capacidad de estas moléculas de inhibir la proliferación de células tumorales ha llevado a numerosas investigaciones a estudiar su uso potencial en la terapia anticancerígena (Gabrielsen y col., 2013). Se ha descrito que la raíz de *I. sonorae* contiene compuestos del tipo Cus, sin embargo, el estudio de sus propiedades farmacológicas ha sido limitado. Con el objetivo de obtener nuevos metabolitos del tipo Cus con capacidad antiproliferativa e inductora de apoptosis, se procedió a analizar FAE a través de CC. Quince fracciones finales se obtuvieron tras la separación cromatográfica de FAE (FEA-1 a FEA-15).

El efecto antiproliferativo de las fracciones cromatográficas se probó en las líneas celulares tumorales HeLa y A549 (Tabla II). FAE-3, FAE-4, FAE-5 y FAE-6 redujeron significativamente el crecimiento celular de HeLa con IC_{50} de 10.4 ± 0.17 , 11.1 ± 0.2 , 12.2 ± 2.4 , 49.7 ± 3.4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Asimismo, estas fracciones inhibieron fuertemente la proliferación de A549 con valores de IC_{50} de 6.6 ± 11 , 6.7 ± 0.6 , 24.9 ± 0.6 , 37.8 ± 2 y 49.3 ± 0.4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. De acuerdo a lo señalado por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI, USA), estas fracciones presentaron citotoxicidad sobre ambas líneas celulares y son buenos candidatos para la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales debido a que sus valores de IC_{50} se encontraron por debajo de 30 $\mu\text{g/mL}$.

Aislamiento de los Principios Bioactivos

La separación por fase reversa de FAE-5 resultó en la obtención de 5 fracciones (FAE-5-1 – FAE-5-5). El análisis por TLC de FAE-5-3 reveló que dicha fracción estaba compuesta por una banda ($R_f = 0.5$) que se coloreaba amarilla al revelarse con anisaldehído/ $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{EtOH}$ (98:1:1) (Figura 4).

Tabla II. Actividad antiproliferativa de las fracciones cromatográficas.

	Líneas Celulares *IC ₅₀ (µg/mL)	
	HeLa	A549
FH-1 – FH-13	>100	>100
FEA-1 – FEA-2	>100	>100
FAE-3	10.4 ± 0.1	6.6 ± 11
FAE-4	11.1 ± 0.2	6.7 ± 0.6
FAE-5	12.2 ± 2.4	24.9 ± 0.6
FAE-6	49.7 ± 3.4	37.8 ± 2
FAE-7	>100	49.3 0.4
FAE-8 – FAE-15	>100	>100

*IC₅₀: Concentración media máxima que inhibe en un 50% la proliferación celular.

EM: Extracto metanólico.

FH: Fracción de hexano.

FAE: Fracción de acetato de etilo.

FR: Fracción residual.

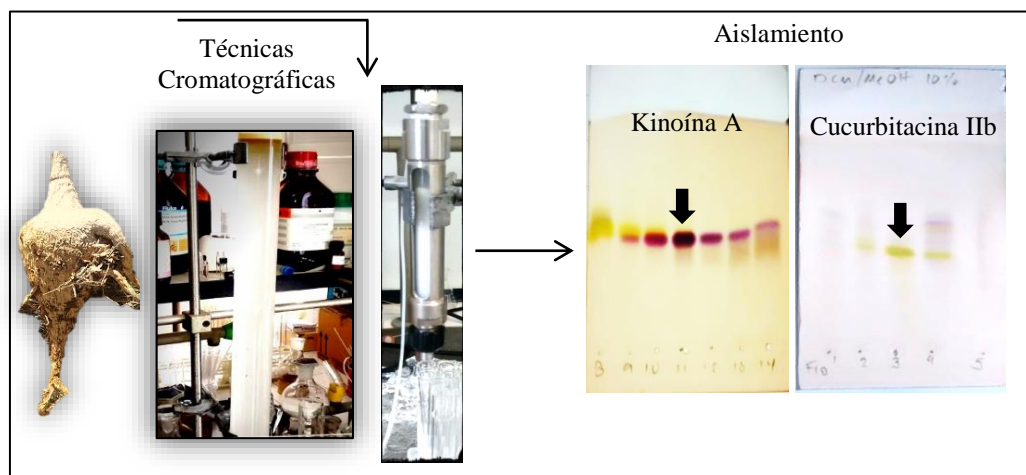


Figura 4. Purificación de los triterpenoides bioactivos de *Ibervillea sonora*. A través de técnicas cromatográficas, se logró el aislamiento de dos moléculas del tipo triterpenoides a partir del extracto metanólico de *Ibervillea sonora*. Kinoína A y cucurbitacina IIb presentaban un color violeta y amarillo, respectivamente, al ser reveladas con anisaldehído/H₂SO₄/EtOH (98:1:1).

Los patrones de multiplicidad observados en los experimentos de ^1H -RMN (400 MHz) (Figura 5) y ^{13}C -RMN (100 MHz) (Figura 6) llevaron a establecer que la fracción estaba constituida por un compuesto tetracíclico esteroidal de naturaleza triterpénica con fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_7$. Adicionalmente, a través del análisis bidimensional de correlación COSY se identificó que la molécula presentaba acoplamiento entre los grupos $-\text{OH}$ enlazados a C2 y C3 (Figura 7).

La comparación de los datos espectroscópicos con lo reportado en la literatura (Tabla III), permitió concluir que FEA-5-3 estaba constituida por la molécula cucurbitacina Iib también conocida como 23,24-dihidrocucurbitacina F o hemslecina B (compuesto **1**, Figura 8) (Liu y col., 1994; Maloney y col., 2008). El compuesto **1**, ya había sido aislado y caracterizado en otras fuentes botánicas, principalmente en plantas medicinales del género *Hemsleya* (Meng y col., 1985; Chen y col., 2014; Figueroa-Hernández y Martínez-Vázquez, 2014). Sin embargo, este es el primer estudio donde se logra identificar a **1** como un constituyente químico de *I. sonorae*. La purificación mediante CC del EM dió como resultado la obtención de 10 fracciones finales (M1–M10). Tras el análisis espectroscópico (Tabla IV), M8 y M11 fueron identificadas como **1** y kinoína A ($\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}_6$) (compuesto **2**, Figura 8), respectivamente (Torres-Moreno y col., 2015). Estudios anteriores demostraron que **1** induce efecto anti-inflamatorio e inhibe la activación del Virus de Epstein Barr inducida por el promotor de tumores 12-O-tetradecanoiforbol-13-acetato (TPA). Sin embargo, poco se conoce acerca del efecto antiproliferativo de **1** frente a líneas celulares tumorales (Olmedo y col., 2007; Xu y col., 2014).

Inhibición de la Proliferación de Células Cancerosas *in Vitro*

A través de la técnica de MTT se demostró que **1** es capaz de suprimir el crecimiento de las líneas tumorales HeLa, A549, LS180, RAW 264.7 y SiHa de manera dosis-respuesta (Fig. 9).

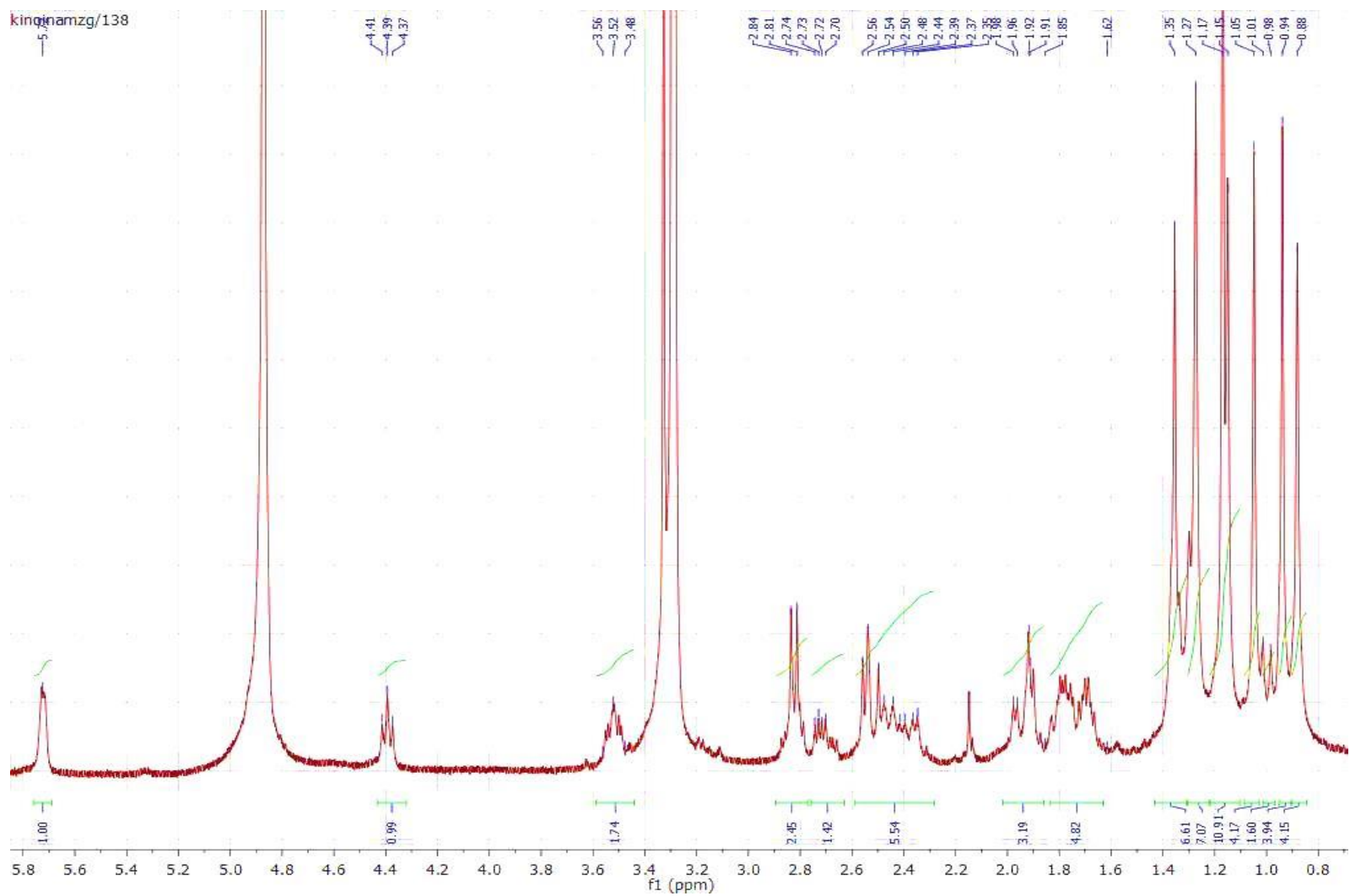


Figura 5. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, CD_3OD) de cucurbitacina IIb o 23, 24-dihidroxicucurbitacina F. Los desplazamientos se presentan en unidades δ (ppm).

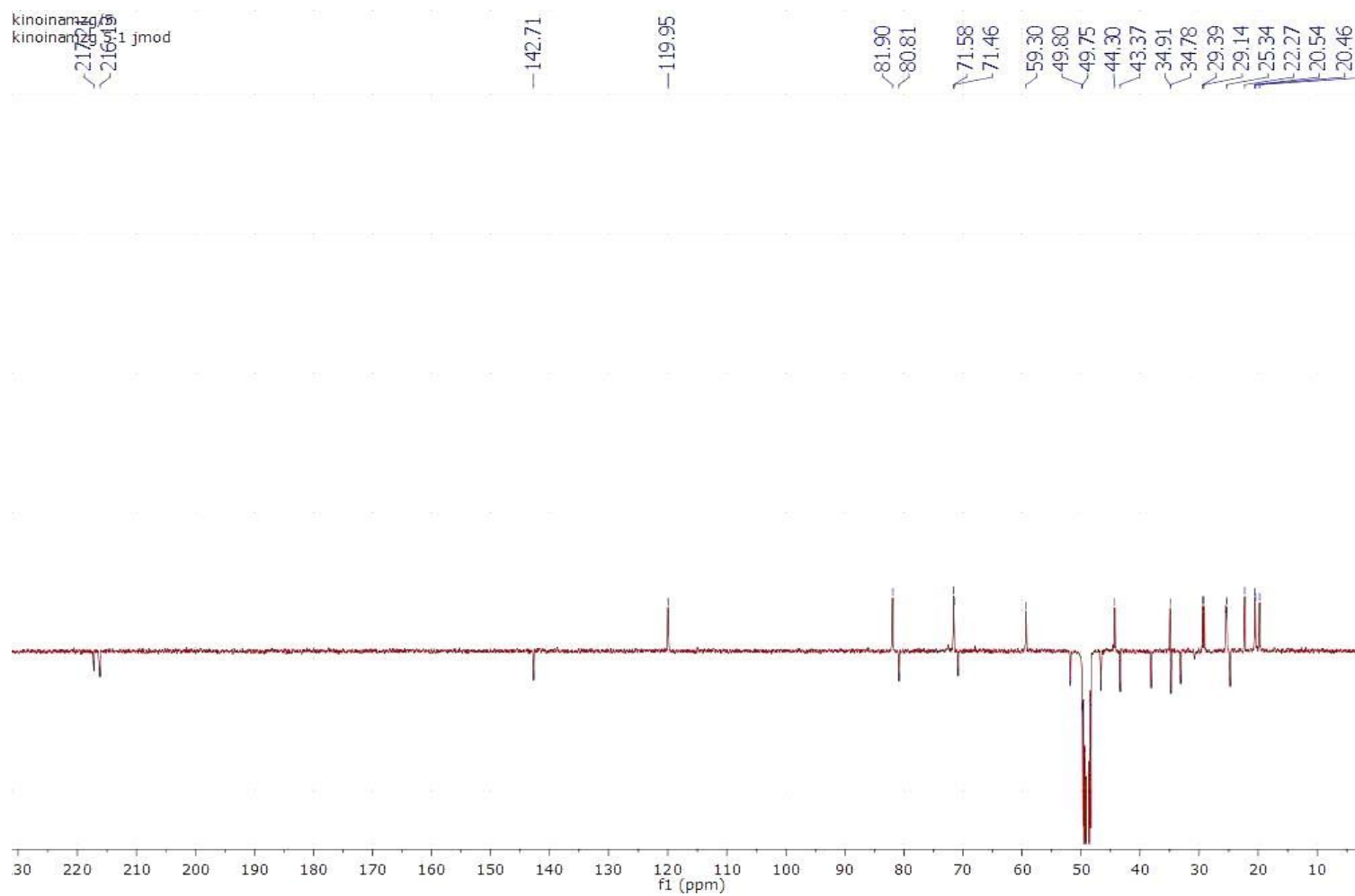


Figura 6. Espectro de ^{13}C -RMN (400 MHz, CD_3OD) de cucurbitacina Iib o 23,24-dihidroxycucurbitacina F. Los desplazamientos se presentan en unidades δ (ppm).

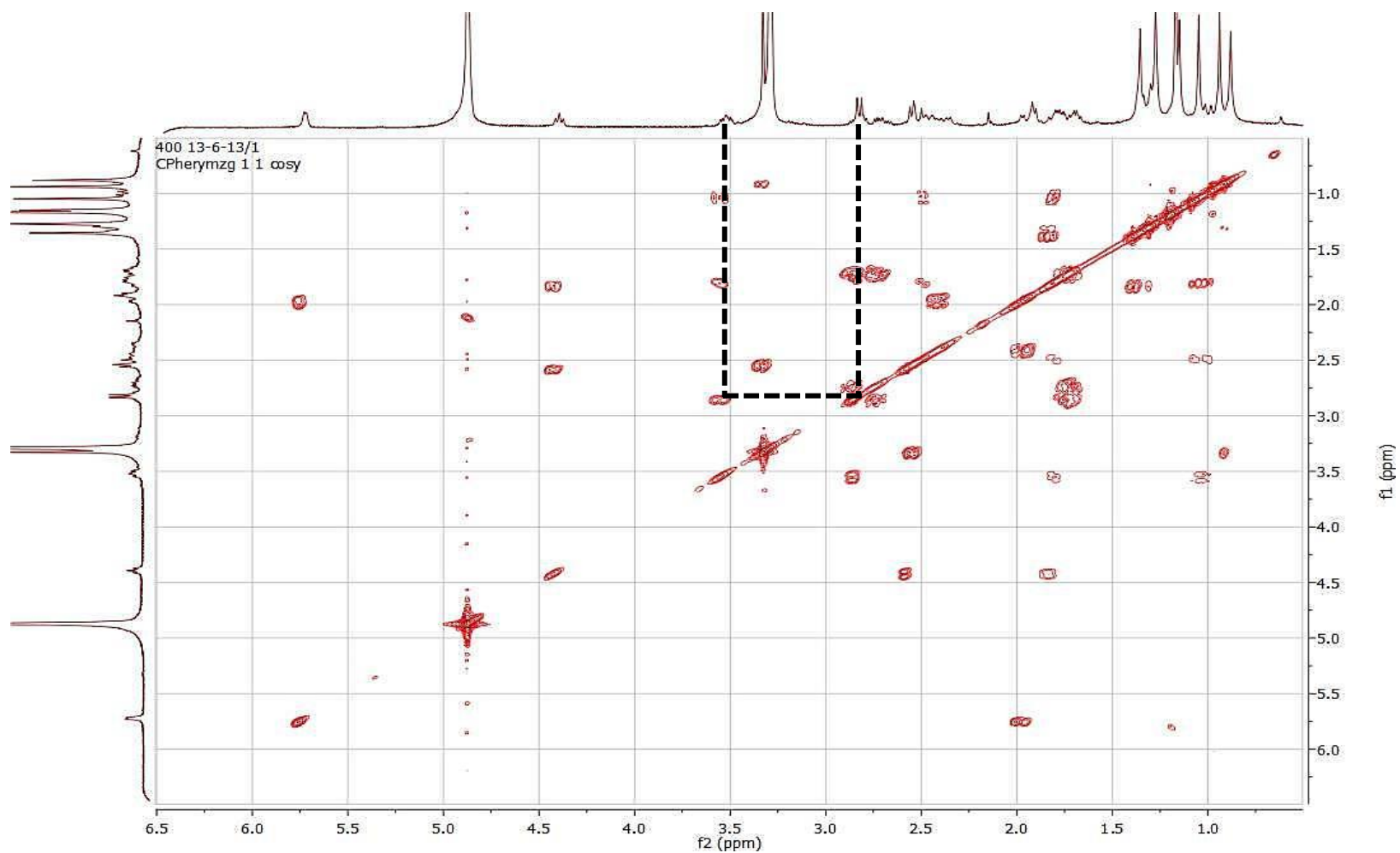


Figura 7. Espectro de COSY (400 MHz, CD₃OD) de cucurbitacina IIB o 23,24-dihidroxicucurbitacina F. Los desplazamientos se presentan en unidades δ (ppm). Marcado con negro se representa el acoplamiento entre los OH enlazados a C2 y C3.

Tabla III. Datos de RMN de cucurbitacina IIb (23,24-dihidrocucurbitacina F).

Datos espectroscópicos de 1			Datos de la literatura de 1	
C n°	δ_C , tipo ^b	δ_H (mult, <i>J</i> en Hz) ^c	δ_C , tipo	δ_H (mult, <i>J</i> en Hz)
1	???, CH ₂	1.03 (m)	34.4	1.02
		1.74 (m)		1.80
2	71.5, CH*	3.54 (m)	71.5	3.54
3	81.9, CH	2.85 (d, 9.5)	81.9	2.85
4	43.4, C		43.0	
5	142.7, C		142.5	
6	120.0, CH	5.74 (bs)	119.7	5.74
7	24.8, CH ₂	1.96-2.08 (m)	24.6	1.97
		2.33-2.43 (m)		2.40
8	44.3, CH	2.01 (m)	44.2	1.93
9	49.8, C**	=	49.6	
10	34.9, CH	2.47 (m)	34.9	2.48
11	216.5, C***		215.8	
12	49.7, CH ₂ **	2.54 (d, 15.5)	49.7	2.55
		3.33 (d, 15.5)		3.31
13	46.7, C		48.9	
14	51.8, C		51.7	
15	46.7, CH ₂	1.350-1.35 (m)	46.4	1.38
		1.75-1.84 (m)		1.82
16	71.6, CH*	4.41 (t, 7.9)	71.2	4.41
17	59.3, CH	2.57 (d, 7.9)	59.0	2.57
18	19.8, CH ₃	0.90 (s)	20.1	0.90
19	???, CH ₃		20.3	1.07
20	80.9, C		80.5	
21	25.5, CH ₃	1.38 (s)	25.3	1.38
22	217.5, C***		216.9	
23	33.2, CH ₂	2.67-2.77 (m)	33.0	2.72
		2.79-2.89 (m)		2.85
24	38.1, CH ₂	1.72 (m)	37.9	1.71
				1.72
25	70.9, C		70.7	
26	29.2, CH ₃	1.19 (s)	29.1	1.19
27	29.4, CH ₃	1.19 (s)	29.1	1.19
28	22.3, CH ₃	0.96 (s)	22.1	0.96
29	25.4, CH ₃	1.17 (s)	25.2	1.17
30	22.3, CH ₃	1.30 (s)	28.9	1.30

^a Los espectros fueron adquiridos en CD₃OD. ^b Desplazamientos químicos: los valores δ fueron dados en ppm con referencia al centro del pico de la señal de CDCl₃ (δ 77.1 ppm). ^c Desplazamientos químicos: los valores δ fueron dados en ppm con referencia a la señal de CDCl₃ (δ 7.26 ppm).

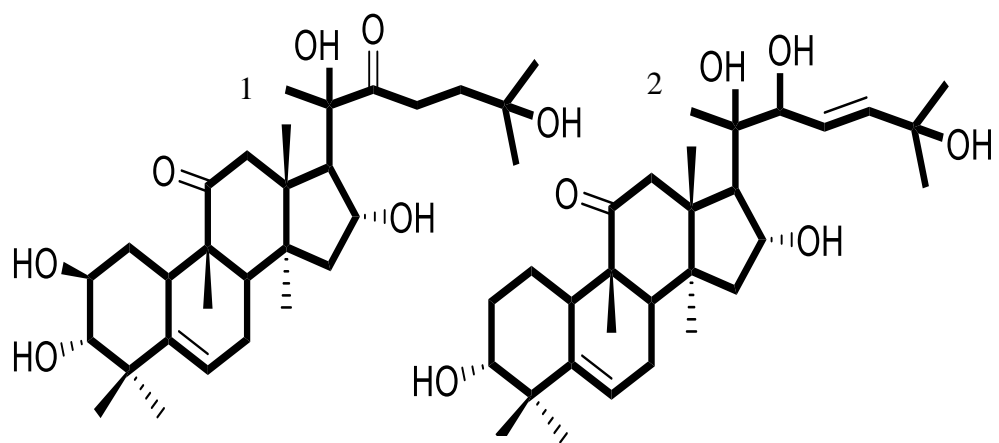


Figura 8. Cucurbitacina IIb (1) y kinoaína A (2).

Tabla IV. Datos de RMN de kinoína A.

Datos espectroscópicos de 2			
C n°	δ_C , tipo ^b		δ_H (mult, <i>J</i> en Hz) ^c
1	24.9, CH ₂	1 α	1.65 (d, <i>J</i> = 13.1 Hz)
		1 β	0.86-1.03 (m)
2	30.5, CH ₂	2 α	1.43 (m)
		2 β	1.77 (d, <i>J</i> = 12.6 Hz)
3	76.6, CH	3	3.22 (dd, <i>J</i> ₁ = 10.6 Hz, <i>J</i> ₂ = 3.3 Hz)
4	42.2, C		
5	141.8, C		
6	118.4, CH	6	5.71 (d, H=3.1)
7	23.9, CH ₂	7 α , 8, 15 β	1.84-1.99(m, H-7 α)
8	42.6, CH	10	2.16 (d, <i>J</i> = 13.7 Hz)
9	48.6, C**		
10	35.3, CH	12 β	2.53 (d, <i>J</i> = 14.4 Hz)
11	213.7, C***	15 α	1.51 (d, <i>J</i> = 13.3 Hz)
12	48.8, CH ₂ **	12 α	3.03 (d, <i>J</i> = 14.4 Hz)
		12 β	2.53 (d, <i>J</i> = 14.4 Hz)
13	47.8, C		
14	51.4, C		
15	45.1, CH ₂	15 α	1.51 (d, <i>J</i> = 13.3 Hz)
16	71.8, CH*	16	4.59 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz)
17	55.2, CH	17	2.31 (d, <i>J</i> = 6.2 Hz)
18	19.7, CH ₃	Me-18	0.94 (s)
19	20.2, CH ₃	Me-19	1.06 (s)
20	75.9, C		
21	24.4, CH ₃	Me-21	1.27 (s)
22	82.0, CH	H-22	3.91 (d, <i>J</i> = 5.7 Hz)
23	124.2, CH	23	5.77 (dd, <i>J</i> ₁ = 15.7 Hz, <i>J</i> ₂ = 5.4 Hz)
			5.90 (d, <i>J</i> = 15.7 Hz)
24	141.9, CH	24	
25	70.7, C	25	
26	29.8, CH ₃	Me-26,	1.35 (s)
		Me-27	
27	29.9, CH ₃	27	3.90 d 6 Hz
28	20.3, CH ₃	Me-28	0.94 (s)
29	24.5, CH ₃		
30			

^a Los espectros fueron adquiridos en CDCl₃. ^b Desplazamientos químicos: los valores δ fueron dados en ppm con referencia al centro del pico de la señal de CDCl₃ (δ 77.1 ppm). ^c Desplazamientos químicos: los valores δ fueron dados en ppm con referencia a la señal de CDCl₃ (δ 7.26 ppm).

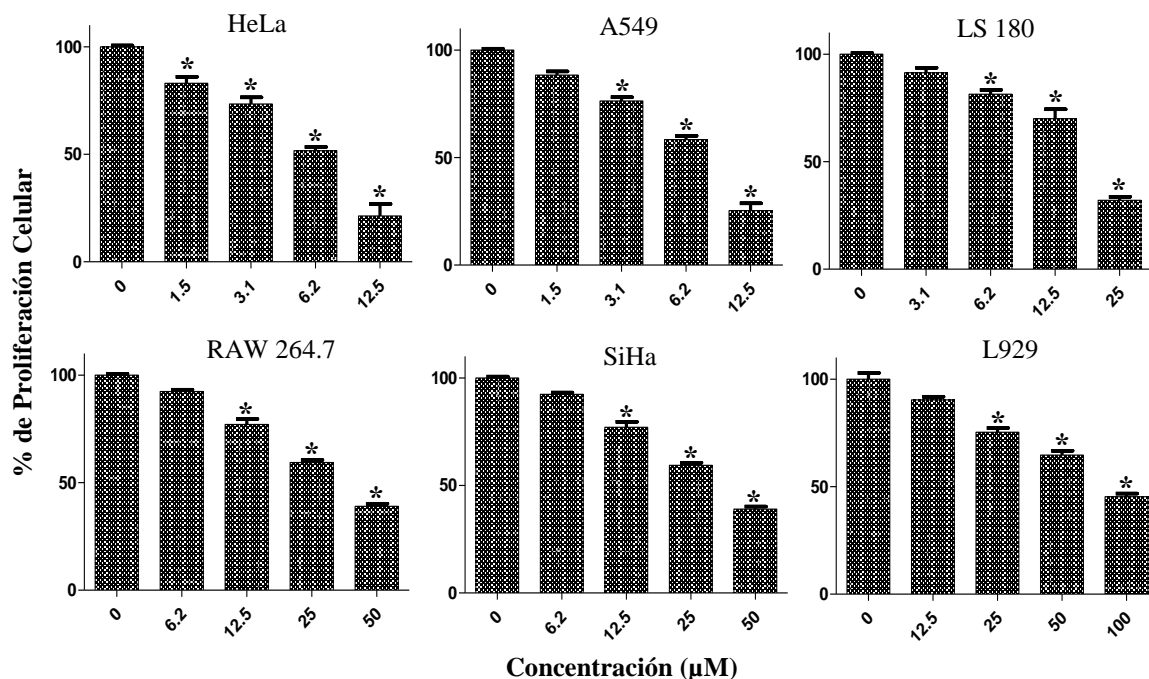


Figura 9. Efecto de cucurbitacina IIb sobre la proliferación celular de diversas líneas celulares. Los valores representan la media (\pm) y la desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes ($n = 3$). Para el análisis estadístico, el control no tratado se comparó con los tratamientos de cucurbitacina IIb mediante la prueba de Tukey ($*p < 0.05$).

Los valores de IC_{50} para las cinco líneas celulares, se encontraron en concentraciones micromolares (Tabla V). HeLa y A549 fueron inhibidas preferencialmente por **1**, las IC_{50} registradas para estas líneas celulares fueron de 7.3 y 7.8 μ M respectivamente. El índice de selectividad de **1** fue mayor para HeLa y A549 en relación a la línea celular no cancerosa L929, donde la IC_{50} calculada para **1** en esta última fue de 85 μ M (Tabla VI). Asimismo, LS180, RAW 264.7 y SiHa fueron más sensibles al tratamiento con **1** en comparación con L929, lo que sugiere que **1** inhibe selectivamente la proliferación de las células cancerosas. El aislamiento y caracterización química del compuesto **2** y el diglucósido de kinaína B (**3**), ya había sido reportado anteriormente. La evaluación del efecto antiproliferativo de ambos compuestos, permitió demostrar que solo **2**, es capaz de inhibir la proliferación de múltiples líneas celulares cancerosas. De manera consistente con **1**, el mayor efecto antiproliferativo de **2** se observó sobre HeLa, donde la IC_{50} calculada fue de 18 μ M. Por otro lado, L929 presentó mayor resistencia al tratamiento con **2**, no lográndose encontrar el valor de IC_{50} a la concentración máxima probada de 100 μ M (Torres y col., 2015).

Las Cus son conocidas por causar inhibición de la proliferación celular, inducción de apoptosis y arresto del ciclo celular a través de la modulación de múltiples vías de señalización, principalmente STAT3, MAPK y sus objetivos moleculares (Silva y col., 2015). Asimismo, se ha demostrado que el citoesqueleto, es uno de los blancos potenciales más importantes de las Cus (Coleman y col., 2001; Sørensen y col., 2012).

STAT3 es un factor de transcripción citosólico que es activado en respuesta a una serie de ligandos extracelulares. Mecánicamente, la activación de STAT3, sucede tras el ataque electrofílico de un grupo fosfato sobre el hidroxilo del residuo de tirosina 705 (Tir 705) de STAT3. La fosforilación de Tir 705, promueve la dimerización de STAT3 a través de la interacción entre sus dominios SH2. Posteriormente, el dímero de STAT3, es translocado al núcleo donde regula la expresión de genes relacionados con diferenciación, proliferación, supervivencia y apoptosis celular.

Tabla V. Actividad antiproliferativa de triterpenos de *Ibervillea sonora*.

	Líneas celulares *IC ₅₀ (μM)					
	HeLa	A549	LS-180	RAW 264.7	SiHa	L929
^a 1	7.3 ± 0.1	7.8 ± 0.1	9.4 ± 0.2	16.9 ± 0.6	34 ± 2	85 ± 4
^b 2	18 ± 4	40 ± 5	26 ± 5	61.5 ± 5	100 ± 4.1	>100
CAPE	72 ± 2	63 ± 1	-	5.5 ± 3	-	49 ± 5

*IC₅₀: Concentración media máxima que inhibe en un 50% la proliferación celular.

^a1: Cucurbitacina IIb.

^b2: Kinoína A.

CAPE: Éster fenetílico del ácido cafeico.

Tabla VI. Índice de selectividad de triterpenos de *Ibervillea sonoreae*.

	Líneas celulares (**IS)				
	HeLa	A549	LS-180	RAW 264.7	SiHa
^a 1	0.08	0.09	0.11	0.19	0.4
^b 2	≤0.18	≤0.4	≤0.26	≤0.61	≤1
CAPE	1.4	1.28	-	0.05	-

*IS₅₀: Índice de selectividad.

^a1: Cucurbitacina IIb.

^b2: Kinoína A.

CAPE: Éster fenetílico del ácido cafeíco.

La activación aberrante de STAT3, se ha asociado fuertemente con la promoción de la carcinogénesis, proliferación celular, progresión del ciclo celular y la transformación maligna. Asimismo, la sobreexpresión de STAT3, ha sido observada en diversos tumores primarios y en un gran número de carcinomas como el de mama, próstata, pulmón, ovario, cabeza, cuello, leucemias, linfomas y cáncer de cérvix. Se ha reportado que la supresión de la fosforilación de STAT3, promueve la inhibición de la proliferación celular y la inducción de la apoptosis (Mitchell y Johnson 2005; Shukla y col., 2010). Estudios de relación estructura-actividad (SAR/QSAR), revelaron que la presencia de una hidroxilación en C-3 y un aceptor de Michael en la cadena lateral unida al anillo D, se correlacionan positivamente con la capacidad de las Cus de inhibir la proliferación celular y de perturbar la dinámica del citoesqueleto (Coleman y col., 2001; Sörensen y col., 2012). Nuestros resultados sugieren que **1** y **2** inhiben el crecimiento celular en HeLa vía inhibición de STAT3. Probablemente la presencia de un –OH en C-3, en **1** y **2**, les confiere la capacidad a estas moléculas de bloquear la fosforilación de Tir 705 de STAT3, a través de la formación de un puente de hidrógeno, evitándose así la fosforilación de STAT3 y su posterior dimerización (Figura 10).

Esta hipótesis es consistente a lo observado previamente con **3**. Este compuesto no mostró actividad antiproliferativa frente a HeLa, M12.C3F6, A549 y RAW 264.7 a la máxima concentración probada de 100 μ M (Torres-Moreno, 2013). La sustitución de C-3 con un glucósido, probablemente le impide a **3** interaccionar con STAT3 lo que lo vuelve inactivo. En este estudio, se comprobó que **1** posee mayor efecto anti-proliferativo en comparación con **2**. El compuesto **1**, presenta tres diferencias estructurales en relación a **2**: pérdida de un doble enlace entre C-23 y C-24, un grupo carbonilo unido a C-21 y un grupo -OH unido a C-2. Nuestros resultados sugieren, que la presencia en **1** de un segundo grupo donador de hidrógeno enlazado a C-2 potencializa su efecto antiproliferativo, debido a que le permite formar un segundo puente de hidrógeno con el sitio blanco (Mitchell y Johnson 2005; Shukla y col., 2010).

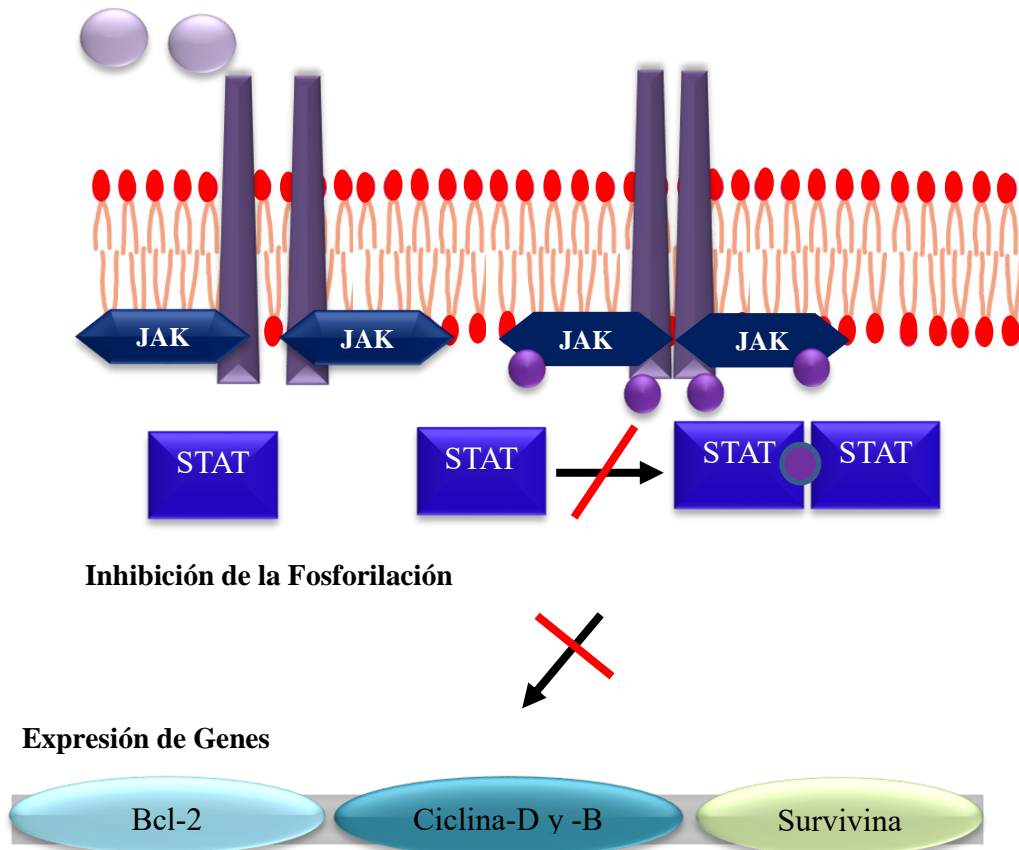


Figura 10. Posible mecanismo efector de cucurbitacina IIb y kinoína A en HeLa. En este diagrama se describe el posible mecanismo efector de cucurbitacina IIb y kinoína A en HeLa. Teóricamente, estas moléculas, bloquean la activación de STAT3, al inhibir la fosforilación del residuo de Tir 705. Esto impide la dimerización de STAT3 y su posterior migración al núcleo donde actúa como factor de transcripción de proteínas como Bcl-2, las ciclina-D y -B y survivina.

Asimismo, LS180, RAW 264.7 y SiHa fueron más sensibles al tratamiento con **1** en comparación con L929, lo que sugiere que **1** inhibe selectivamente la proliferación de las células cancerosas.

Los estudios SAR/QSAR también señalan que otros parámetros como la simetría, el volumen y la densidad, influyen directamente en el efecto antiproliferativo de las Cus (Mitchell y Johnson 2005; Shukla y col., 2010). **1** y **2** son moléculas menos ramificadas, más simétricas y de menor volumen en comparación con **3**. Considerando que la densidad de una molécula es inversamente proporcional a su volumen, es posible proponer que el menor tamaño y mayor densidad de **1** y **2** les permite penetrar la membrana plasmática de manera más rápida que **3**, lo que les facilita su incorporación al citoplasma y su posterior interacción con sus moléculas blanco.

Las células que mueren por apoptosis presentan una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que incluyen la contracción celular, formación de “blebs” de membrana y fragmentación nuclear. La reorganización del citoesqueleto de actina juega un rol crítico en los cambios morfológicos celulares. Durante la fase efectora de la apoptosis, la activación de las caspasas resulta en la escisión proteolítica de una variedad de proteínas celulares, incluyendo componentes del citoesqueleto de actina y proteínas cinasas involucradas en la reorganización del citoesqueleto de actina. Estudios recientes han observado que la escisión y activación de la cinasa LIMK1 mediada por caspasa-3, juega un rol esencial en la inducción de la acumulación de F-actina y la formación de los “blebs” de membrana vía fosforilación e inactivación de cofilina (proteína que activa la despolimerización de los filamentos de actina). Shuai y cols. en el 2012, reportaron que **1** fue capaz de inducir efecto antiproliferativo en las líneas celulares humanas de cáncer de próstata DU145, PC3 y LNCaP, a través de la formación de agregados de actina vía fosforilación de cofilina.

El tratamiento de HeLa con el compuesto **1**, provocó cambios dramáticos en la arquitectura celular en comparación con el control de células no tratadas; contracción, redondeo celular, formación de “blebs” de membrana y cuerpos apoptóticos fueron observados después de 24 h de tratamiento (Figura 11).

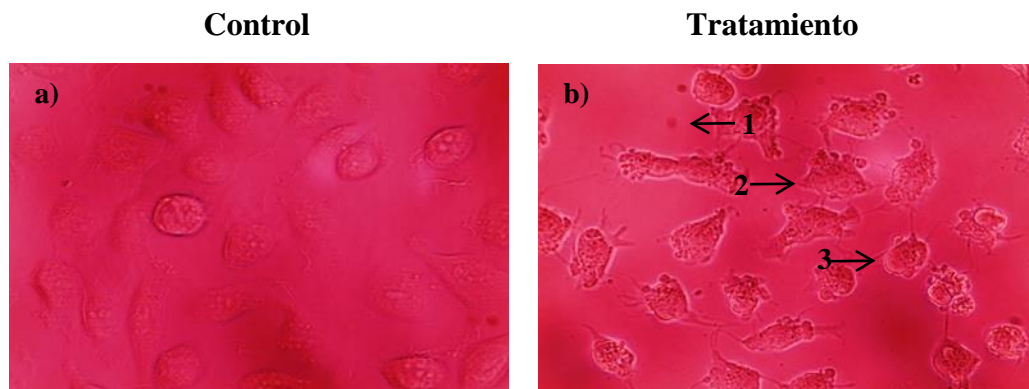


Figura 11. El compuesto 1 induce cambios morfológicos típicos de apoptosis en la línea celular HeLa. 1) “Blebs” de membrana, 2) cuerpos apoptóticos, 3) contracción y redondeo celular. Las células fueron tratadas con el compuesto 1 (8 μM) por 24 h y fotografiadas con un microscopio invertido (magnificación de 40x).

Esto sugiere que **1**, causa perturbación en la dinámica de la actina como consecuencia de la activación de la apoptosis celular a través de un mecanismo similar al observado previamente en DU145, PC3 y LNCaP.

Otros autores señalan que las Cus inducen estabilización del citoesqueleto a través de la formación de un enlace del tipo tioéster con el citoesqueleto de actina. La presencia de un grupo α , β - insaturado en la cadena lateral unida al anillo D en estas moléculas, les permite interactuar de forma covalente con los grupos SH de los residuos de cisteína presentes en el citoesqueleto de actina a través de una reacción de adición de Michael (Wang y col., 2017). Los compuestos **1** y **2** carecen de este farmacóforo en su estructura, por tal motivo, este mecanismo de acción es más improbable para **1** y **2**.

Inducción de Muerte Celular por Apoptosis

Con el fin de comprender el mecanismo de acción responsable de la potente actividad antiproliferativa demostrada por **1** y **2** sobre HeLa, se analizó por citometría de flujo la capacidad de inductora de apoptosis de ambas moléculas sobre esta línea celular. Nuestro estudio reveló que **1** y **2** inhiben la proliferación celular de HeLa a través de la inducción de la muerte celular por apoptosis (Figura 12).

Tras el análisis, el control de células no tratadas presentó $96.3\% \pm 2.1$ de células viables AN⁻/PI⁻, $1.6\% \pm 0.3$ de células no viables AN⁻/PI⁺ y 45.3% de apoptosis total ($0.7\% \pm 0.2$ AN⁺/PI⁻ de apoptosis temprana y $1.4\% \pm 0.2$ de apoptosis tardía AN⁺/PI⁺) (Tabla VII). Interesantemente, después de 24 h de exposición con **1**, el porcentaje de apoptosis total se incrementó en 56.9% ($p < 0.05$ vs control). De manera análoga, **2** fue capaz de incrementar el porcentaje de apoptosis total de manera significativa en comparación con el control ($p < 0.05$).

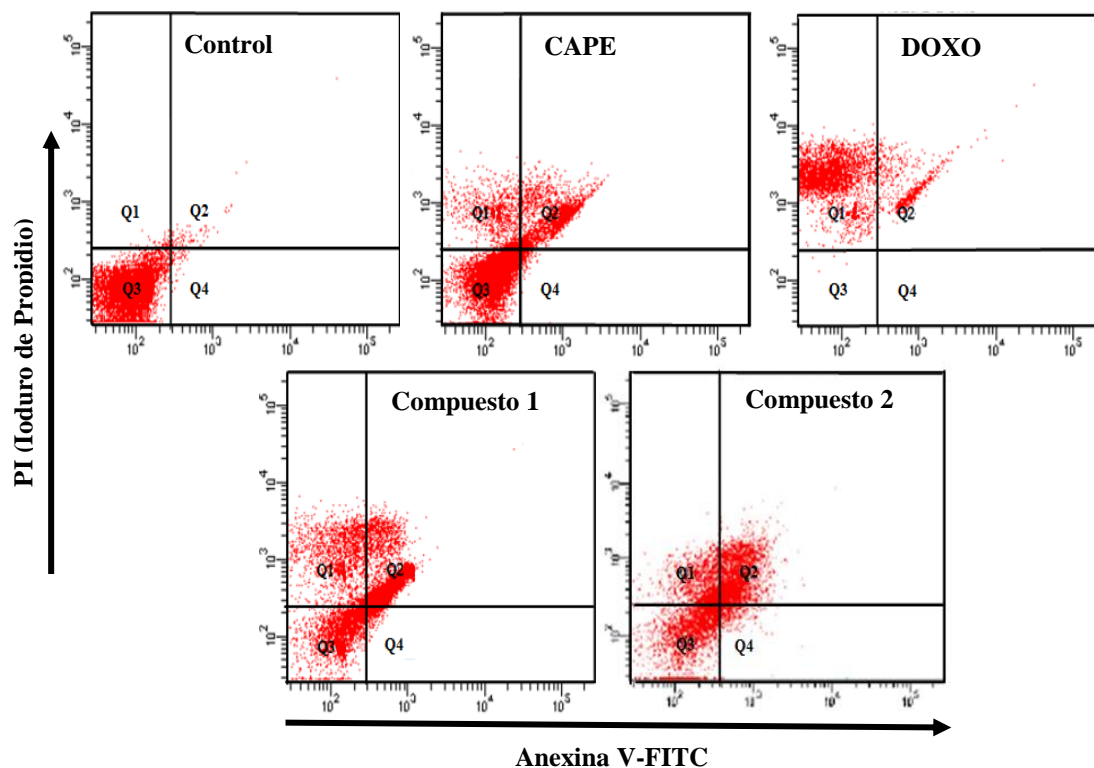


Figura 12. Capacidad inductora de apoptosis de 1 y 2 en HeLa. Los dot plots representan la media (\pm) y la desviación estándar (SD) de tres experimentos independiente ($n = 3$). Control (DMSO al 1.8% v/v), DOXO ($1 \mu\text{M}$), CAPE ($126 \mu\text{M}$), compuesto 1 ($8 \mu\text{M}$), compuesto 2 ($18 \mu\text{M}$).

Tabla VII. Inducción de apoptosis de 1 y 2 en HeLa.

	^a (AN ⁻ /PI ⁻)	^d (AN ⁻ /PI ⁺)	^c (AN ⁺ /PI ⁻)	^d (AN ⁺ /PI ⁺)	Total apoptosis
Control	96.3 ± 2.1	1.6 ± 0.3	0.7 ± 0.2	1.4 ± 0.2	2.1
^b 1	23.8 ± 1.8	19.3 ± 1.9	9.7 ± 1.9	47.2 ± 2.6	56.9
^a 2	35.5 ± 3	19.5 ± 2.3	7.8 ± 1.1	37.5 ± 2.7	45.3
CAPE	64.5 ± 3.7	13.6 ± 1.7	2.6 ± 0.7	19.3 ± 1.8	21.9
DOXO	0.2 ± 0.1	93.1 ± 5.5	1.1 ± 0.3	5.6 ± 1.4	6.7

Los compuestos 1 y 2 fueron evaluados a 8 y 18 μ M, respectivamente. Los valores representan la media (\pm) y la desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes (n = 3). Control (DMSO al 0.1% v/v), DOXO (clorohidrato de doxorubicina) (1 μ M) y CAPE (126 μ M) fueron usados como controles positivos. ^a(AN⁻/PI⁻): células viables; ^b(AN⁻/PI⁺): células muertas; ^c(AN⁺/PI⁻): apoptosis temprana; ^d(AN⁺/PI⁺): apoptosis tardía.

Después de 24 h del tratamiento con **2**, el porcentaje de apoptosis total se incrementó en 45.3%. Por el contrario, el porcentaje de células viables se redujo a 23.8% \pm 1.8 y 35.5% después del tratamiento con **1** y **2**, respectivamente. Adicionalmente, **1** y **2** mostraron mayor efecto inductor de apoptosis que el CAPE y el antineoplásico DOXO (Figura 13).

En los organismos multicelulares las células que mueren por apoptosis son reconocidas y posteriormente eliminadas por el sistema fagocítico a través de mecanismos que no se encuentran asociados a la liberación de componentes pro-inflamatorios. Por el contrario, en la necrosis, los componentes celulares se liberan al espacio extracelular provocando la activación de la respuesta inflamatoria (Kasibhatla y Tseng, 2003). Diversos autores señalan que el éxito de las estrategias terapéuticas contra el cáncer depende principalmente de la capacidad de los fármacos de inducir apoptosis en las células tumorales. Idealmente, los agentes anticancerígenos deben destruir la célula cancerosa a través de la inducción de la muerte celular por apoptosis y ocasionando el mínimo efecto sobre las células normales (Fischer y Schulze-Osthoff, 2005).

En este estudio se observó que **1** y **2** poseen actividad antiproliferativa del tipo selectiva y capacidad inductora de apoptosis en HeLa, es por ello que resulta interesante evaluar los mecanismos moleculares asociados al efecto inductor de apoptosis de dichos compuestos.

Efecto Sobre el Potencial de Membrana Mitocondrial

La mitocondria juega un papel central en la señalización de la apoptosis y actúa como un sensor integrativo para una variedad de estímulos de muerte. El control del potencial de membrana mitocondrial (PMM) es crucial para en el mantenimiento de la función de la cadena transportadora de electrones y la generación de energía en la célula. Diversos estímulos regulan positivamente el destino de la célula hacia su muerte a través de la alteración del PMM.

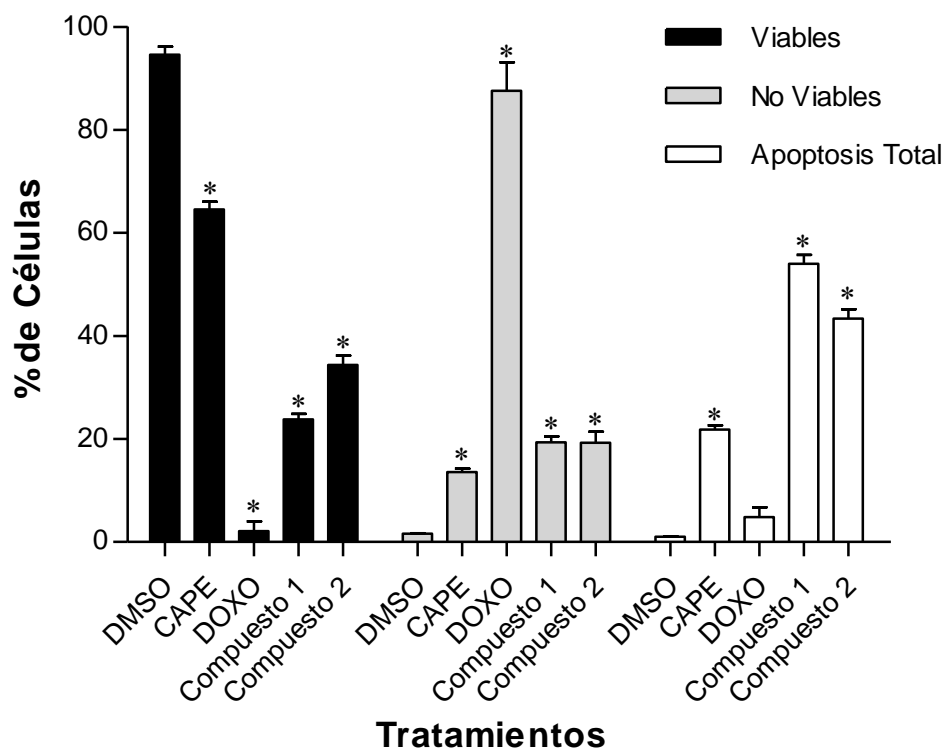


Figura 13. Porcentaje de células viables, células muertas y apoptosis total después del tratamiento con 1 y 2. Los compuestos 1 y 2 fueron evaluados a 8 y 18 μM , respectivamente. DMSO al 0.1% v/v fue utilizado como control de vehículo. DOXO (clorohidrato de doxorubicina) (1 μM) y CAPE (126 μM) fueron usados como controles positivos. Los valores representan la media (\pm) y la desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes ($n = 3$). Para el análisis estadístico, el control sin tratamiento se comparó con los diversos tratamientos utilizando el test de Tukey, el asterisco (*) representa $p < 0.05$.

Con el objetivo de demostrar si **1** y **2** causan disrupción del PMM a causa de la apoptosis inducida, se procedió a realizar una tinción con JC-1. Este colorante es conocido por presentar acumulación dependiente del PMM en las mitocondrias de células sanas, lo cual se indicaba por un cambio en la emisión de la fluorescencia desde el verde (~ 525 nm) al rojo (~ 590 nm) (Rascón y col., 2016).

Como se observa en la figura 14, las células tratadas con DMSO, mostraron un desplazamiento de la señal de fluorescencia hacia el cuadrante superior derecho, como resultado de la formación de agregados JC-1 que emiten fluorescencia roja. Sin embargo, después del tratamiento con **1** y **2**, las células presentaron pérdida de la intensidad de la fluorescencia roja a consecuencia de la disminución de su PMM.

El compuesto **1**, redujo en un 72.9% la intensidad de la fluorescencia roja/verde con respecto al vehículo ($p < 0.05$). Por otro lado, **2** mostró un efecto similar, logrando disminuir la intensidad de la fluorescencia roja/verde en un 51.8% con respecto al control ($p < 0.05$) (Figura 15). Cuando el PMM es interrumpido, las células llegan a un punto de “no retorno” en su camino de muerte y sufre depleción de energía. Esto último, promueve la liberación de proteínas pro-apoptóticas al citosol, lo cual desencadena la activación de la cascada de muerte mitocondrial. Nuestros resultados sugieren que la disminución en el PMM observado después de 24 h del tratamiento de HeLa con **1** y **2**, se debe a la capacidad de las moléculas de activar la apoptosis por la vía mitocondrial intrínseca (Perry y col., 2011).

Activación de Las Caspasas

Como se mencionó anteriormente, los eventos de activación y ejecución de la apoptosis celular, son finamente coordinados por la actividad de las caspasas. Estas proteínas, son categorizadas como inductoras (caspasa-2, -8, -9 y -10) o efectoras (caspasa-3, -6 y -7), según su posición en la vía de señalización de la apoptosis. Distintas señales de muerte pueden desencadenar la activación de la apoptosis a través de dos vías principales: 1) la vía extrínseca asociada a receptores de muerte y 2) la vía intrínseca mitocondrial (Shi, 2004).

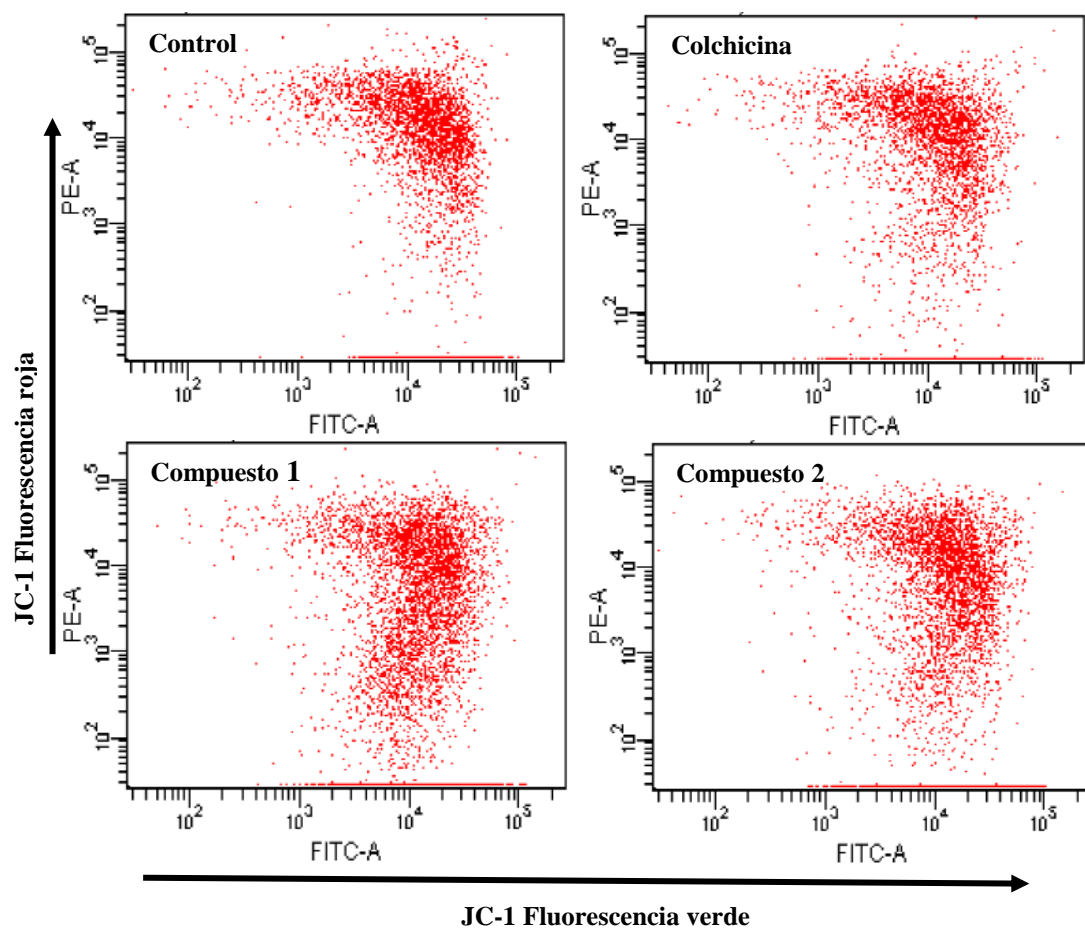


Figura 14. Efecto de 1 y 2 sobre el potencial de membrana mitocondrial. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

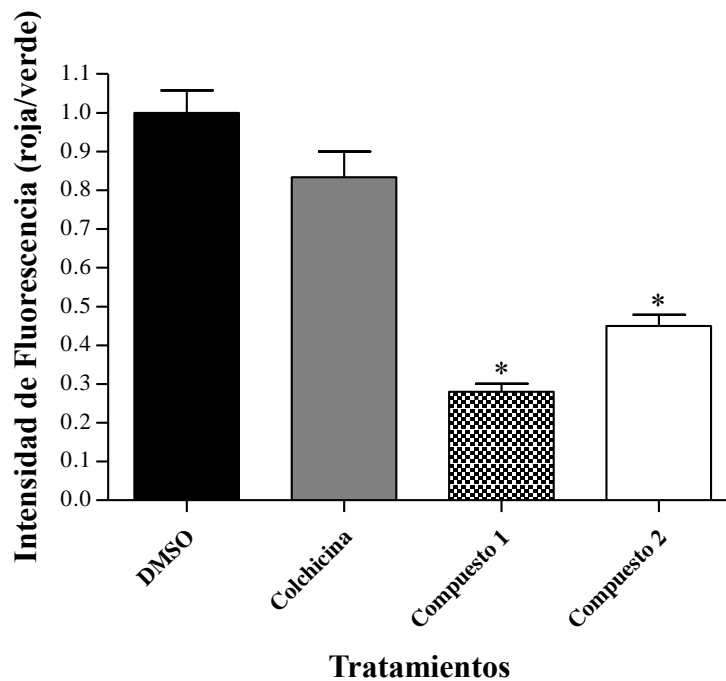


Figura 15. Despolarización de la membrana mitocondrial inducida por 1 y 2. Los resultados se expresan como la intensidad de la fluorescencia (roja/verde) de JC-1. Los compuestos 1 y 2 fueron evaluados a 8 y 18 μM , respectivamente. DMSO al 0.1% v/v fue utilizado como control de vehículo. Colchicina (1.5 μM) fue utilizada como control positivo. Los valores representan la media (\pm) y la desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes ($n= 3$). Para el análisis estadístico, el control sin tratamiento se comparó con los diversos tratamientos utilizando el test de Tukey, el asterisco (*) representa $p < 0.05$.

La vía extrínseca es iniciada una vez que el receptor de muerte interactúa con su ligando, esta asociación ligando-receptor, causa la oligomerización del receptor y el posterior reclutamiento de la proteína adaptadora FADD. Posteriormente, FADD se une a TRADD y forman el DISC, este último, activa secuencialmente a las Caspasas-8 y -3, conduciendo a la apoptosis. La vía intrínseca, es activada por distintas tensiones intracelulares que desencadenan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (PMME) y la posterior liberación del citocromo c desde el espacio intermembrana mitocondrial al citoplasma. Esto resulta en la formación del apoptosoma (compuesto por Apaf-1 y citocromo c) y la activación secuencial de las caspasas-9 y -3. La activación de la caspasa-8 también puede ocurrir en el citosol como parte de la cascada de caspasas activadas por el citocromo c (Fiandalo y col., 2012).

Con el objetivo de comprender más a detalle el mecanismo por el cual los compuestos **1** y **2** inducen apoptosis en HeLa, se procedió a evaluar por citometría de flujo la actividad de las caspasa-3, -8 y -9. Después de 24 h de tratamiento con **1** y **2**, las células fueron incubadas con los inhibidores de caspasas acoplados a FITC (IEDTD-FMK, LEHD-FMK y DEVD-FMK para -3, -8 y 9, respectivamente). Estos inhibidores acoplados a FITC, son permeables a la membrana plasmática y se unen de manera irreversible a sus correspondientes caspasas en estado activo, por lo que la intensidad de la fluorescencia de FITC, se correlaciona directamente con el grado de actividad de estas proteínas.

Como se muestra en las figuras 16, 17 y 18; las intensidades de las fluorescencias de FITC-IEDTD-FMK, FITC-LEHD-FMK y FITC-DEVD-FMK, aumentaron después del tratamiento con **1** y **2**, como resultado de un incremento en la actividad de las caspasas -3, -8 y -9. El compuesto **1**, incrementó 4.0 veces la actividad de caspasa-3 en relación al control ($p < 0.05$). Por su parte **2**, aumentó 2.9 veces la actividad de caspasa-3 en comparación con el control de células no tratadas ($p < 0.05$).

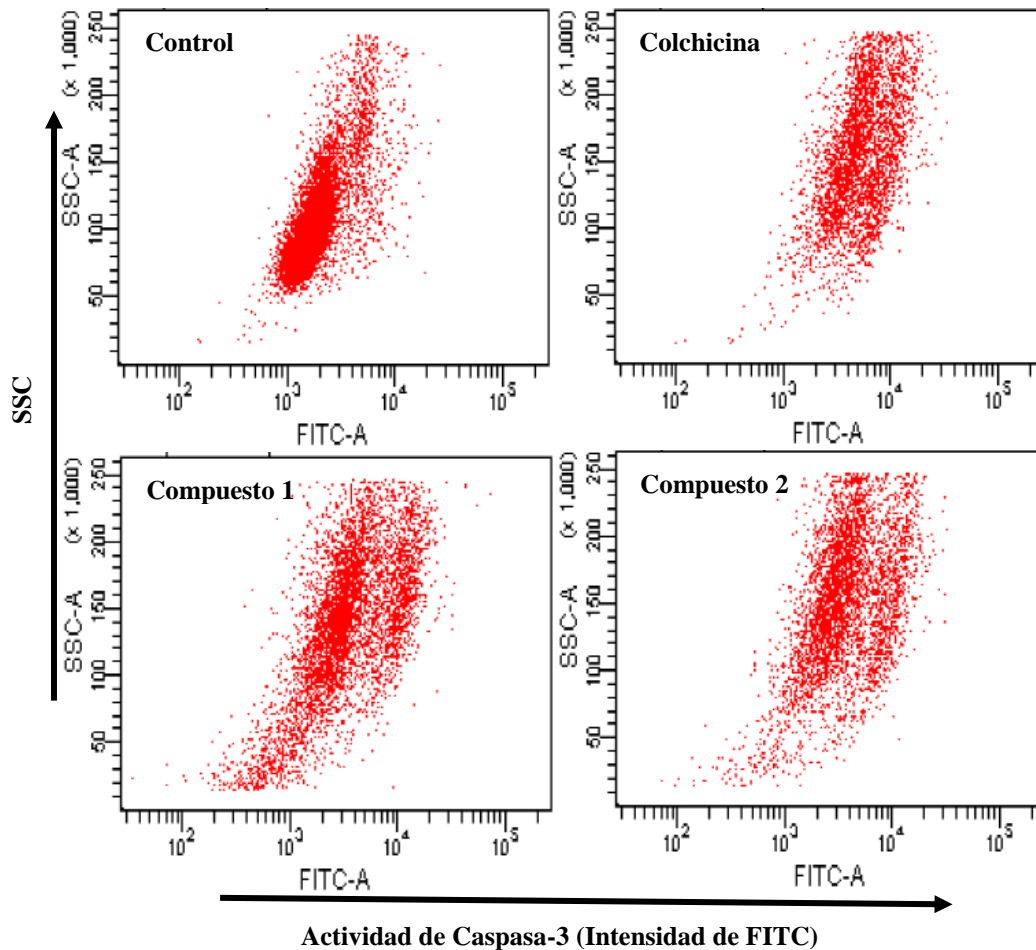


Figura 16. Efecto de 1 y 2 sobre la actividad de caspasa-3. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

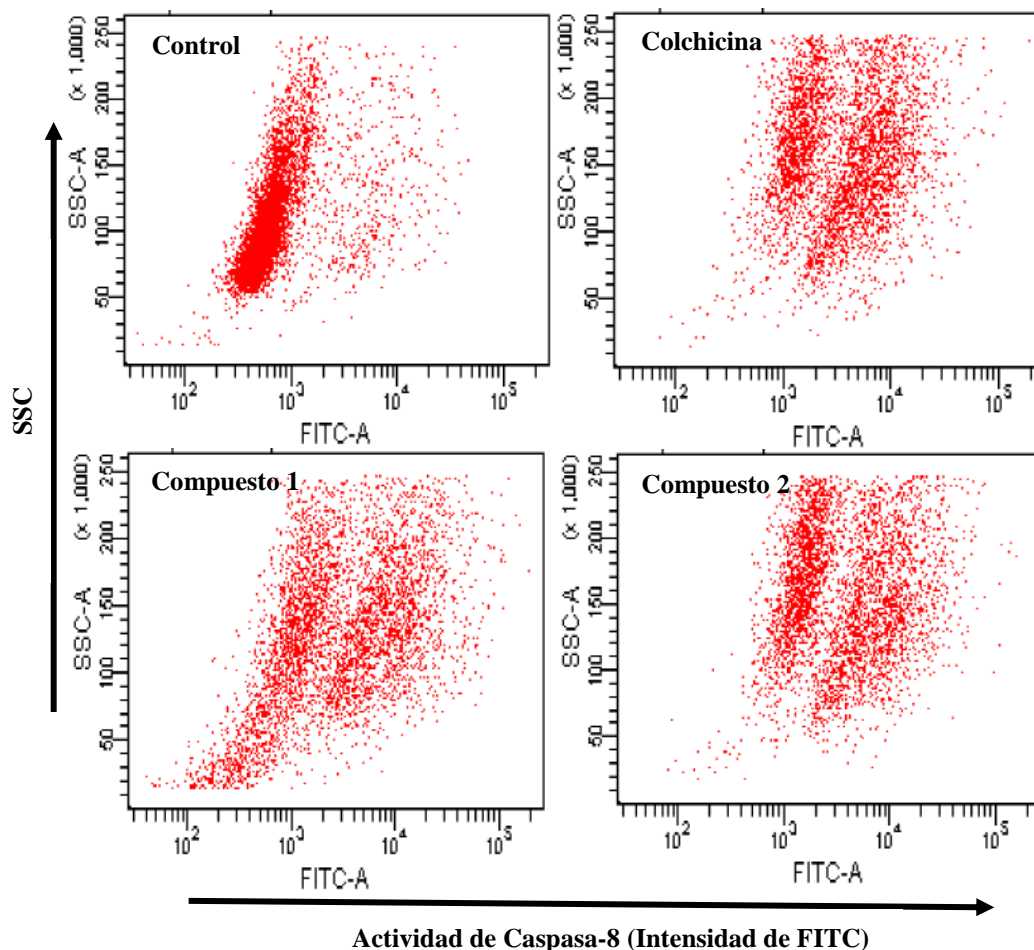


Figura 17. Efecto de 1 y 2 sobre la actividad de caspasa-8. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

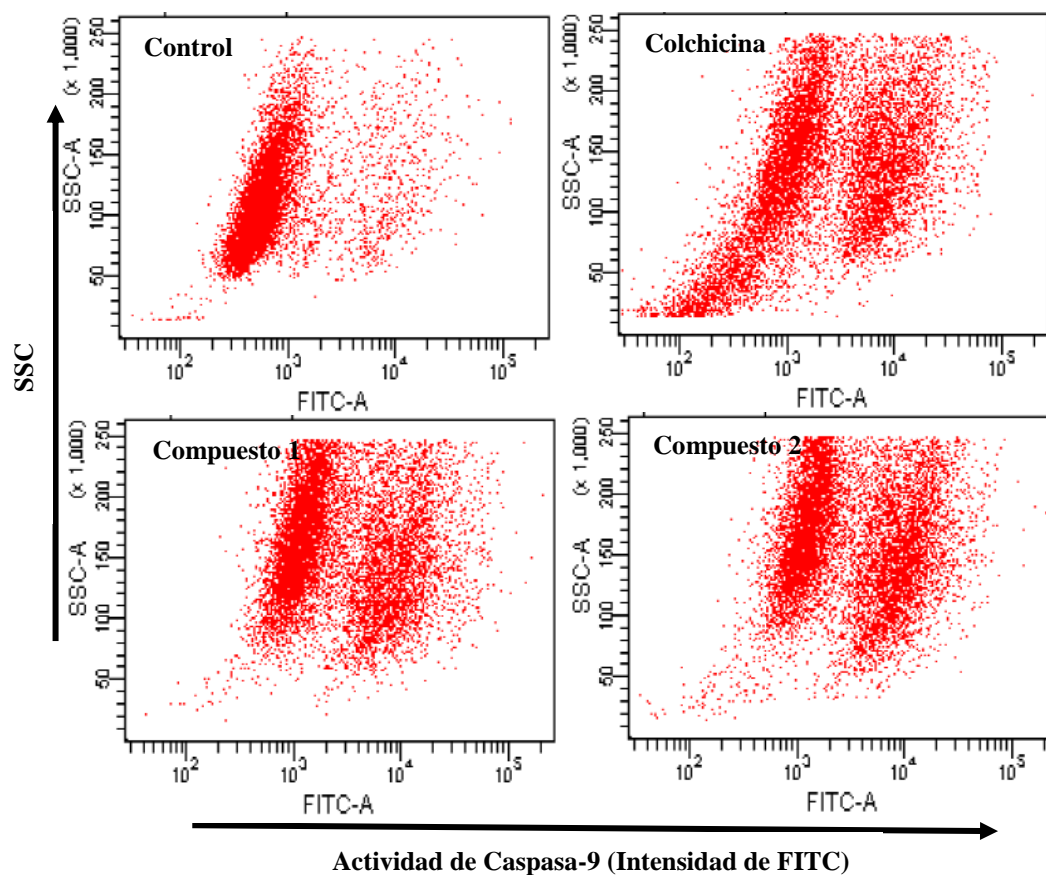


Figura 18. Efecto de 1 y 2 sobre la actividad de caspasa-9. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Por otro lado, **1** y **2** incrementaron en 4.7 y 4.6 la actividad de caspasa-9, respectivamente, en comparación con el control negativo ($p < 0.05$). Asimismo, **1** y **2** aumentaron en 6.4 y 5.0 veces, respectivamente, la actividad de caspasa-8 en relación a las células tratadas con el control ($p < 0.05$) (Figura 19).

Varios autores señalan que la inhibición de STAT3 regula a la baja la expresión de genes que son cruciales para el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales, tal es el caso de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Zhang y col., 2017). En nuestro estudio, demostramos que **1** y **2**, inhiben la proliferación celular de HeLa a través de la inducción de apoptosis, disrupción del PMM e incremento en la actividad de las caspasas-3, -8 y -9. Como se mencionó anteriormente, nuestros resultados sugieren que **1** y **2** inducen efecto anti-proliferativo e inducción de apoptosis en HeLa a través del bloqueo de la fosforilación de STAT3.

Hipotéticamente, la inhibición de la fosforilación de STAT3 por **1** y **2** impiden su dimerización y su posterior migración al núcleo donde regula la actividad transcripcional de genes como Bcl-2. La baja expresión de Bcl-2, promueve la activación de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak y con ello la activación de la apoptosis intrínseca mitocondrial tras la disrupción del PMM. Consecuentemente, citocromo c es liberado al citoplasma y en asociación con Apaf-1 forma el apoptosoma, el cual activa de manera sucesiva a caspasa-9 y -3. Caspasa-3 a su vez, induce acumulación de la fracción polimerizada de la actina (F-actina) y la posterior formación de los “blebs” de membrana vía fosforilación e inhibición de la proteína despolimerizadora de actina, cofilina.

Este mecanismo, es consistente a lo reportado por Zhang y colaboradores en el 2014, quienes revelaron que Cucurbitacina B (una de las Cus más potentes y más ampliamente estudiadas) inhibe la proliferación celular de A549 a través de la inhibición de la fosforilación de STAT3, baja regulación de Bcl-2 y ciclina B-1, disrupción del PMM, liberación de citocromo c, elevada actividad de caspasa-3 y -9 y arresto del ciclo celular en G2/M.

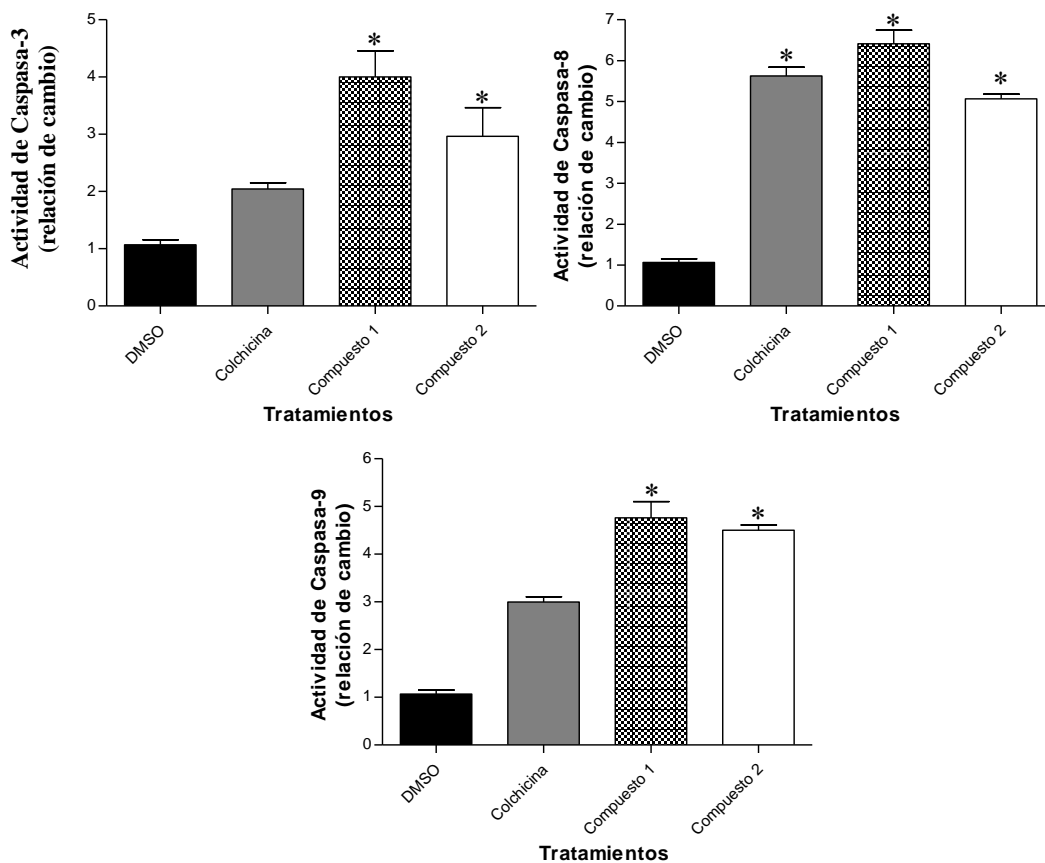


Figura 19. Actividad de las caspasas -3, -8 y -9 en células HeLa tratadas con 1 y 2. Los compuestos 1 y 2 fueron evaluados a 8 y 18 μM , respectivamente. DMSO al 0.1% v/v fue utilizado como control de vehículo. Colchicina (1.5 μM) fue utilizada como control positivo. Los valores representan la media (\pm) y la desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes ($n = 3$). Para el análisis estadístico, el control sin tratamiento se comparó con los diversos tratamientos utilizando el test de Tukey, el asterisco (*) representa $p < 0.05$.

Aún no está claro el mecanismo por el cual algunas cucurbitacinas inducen activación de caspasa-8. Se ha descrito que esta proteína puede ser activada por caspasa-6 en un mecanismo dependiente de citocromo c. En este mecanismo, la formación del apoptosoma producto de la liberación del citocromo c desde la mitocondria activa secuencialmente a caspasa-3 y 6. Acto seguido, caspasa-6 activa a caspasa-8, quién posteriormente activa a Bid, esta última, genera un ciclo de retroalimentación positivo al promover la activación de las caspasas vía liberación de citocromo c (Cowling y Downward, 2002).

El análisis de la función mitocondrial y de la actividad de las caspasas, señalan que **1** y **2** causan disrupción del PMM y activación de las caspasas -3, -8 y -9. Estas observaciones sugieren que la activación de caspasa-8 por **1** y **2** es ocasionada por la activación de la apoptosis intrínseca a través de un mecanismo similar al mencionado anteriormente y no por un mecanismo dependiente de receptores de muerte. Esta hipótesis coincide con lo reportado por Zhang y colaboradores (2017), quienes demostraron que cucurbitacina B induce elevada expresión de las caspasas-3, 8 y -9 en U-2 OS debido a la inducción de la vía intrínseca de la apoptosis a través de la supresión de STAT3 y Bcl-2 e incremento en la expresión de Bax y Bad.

Efecto Sobre el Ciclo Celular

El arresto del ciclo celular y la inducción de la apoptosis, son los principales mecanismos acción antiproliferativa de los agentes quimioterapéuticos (Chan y col., 2010). Con el objetivo de investigar si **1** y **2** inhiben la proliferación celular mediante la promoción de cambios en la progresión del ciclo celular, se evaluó por citometría de flujo, el efecto de estos compuestos sobre las fases ciclo celular.

Los resultados demostraron que **1** y **2** inducen arresto del ciclo celular en las fases S y G2/M, tal como se observa en la figura 20. La cuantificación del contenido de ADN, permitió observar que las células sin tratamiento se distribuían de forma típica en las fases G0/G1, G2/M y S.

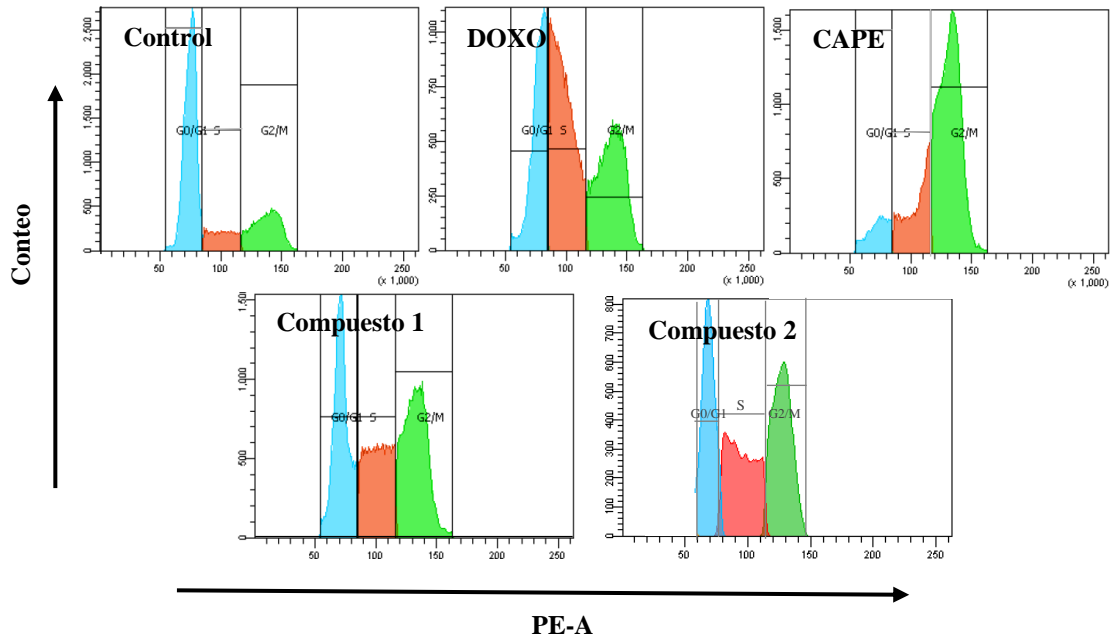


Figura 20. Arresto del ciclo celular inducido por 1 y 2. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Sin embargo, después de 24 h de tratamiento con **1** ó **2**, el porcentaje de células en G2/M, aumentó desde 24.3% en las células tratadas con el vehículo, a 41 y 35.0% en las células expuestas a **1** y **2**, respectivamente ($p < 0.05$). Por otro lado, el porcentaje de las células en S, se incrementó desde 13.4% en el control, a 26.7% y 21.2% en las células estimuladas con **1** y **2**, respectivamente ($p < 0.05$). La acumulación de las células en S y G2/M, fue seguida por una reducción de la fase G0/G1, desde 60.0% en el control sin tratamiento, a 32.3% en las células tratadas con **1** y 43.8% en la célula expuestas a **2** (Figura 21).

La regulación del ciclo celular, es un mecanismo fundamental que determina la proliferación de las células, y es finamente regulado por una compleja red de factores positivos (CDKs y ciclinas) y negativos (CDKIs). La progresión de las células a través de la fase S y G2/M, es regulada por la actividad de las ciclinas–A y –B. Los niveles de ciclina–A presentan su pico máximo durante la fase S y descienden abruptamente antes de la metafase. Durante la fase S, el complejo ciclina–A–CDK2 promueve la replicación del material genético y restringe la iniciación de la replicación a sólo una vez por ciclo gracias a su capacidad de inhibir a componentes de la maquinaria de replicación como Cdc6. Por su parte, ciclina–B1 es una molécula clave en la transición G2/M, el complejo ciclina–B1–CDK2, se encarga de regular los eventos tempranos de la mitosis; tales como, condensación cromosómica, desintegración de la envoltura nuclear y el montaje del huso mitótico (Yam y Poon 2002; Sánchez y Dynlacht 2005).

El arresto del ciclo celular usualmente se asocia a la modulación de la actividad de las CDKs y las ciclinas (Barnum y O'Connell 2014). Se ha observado que la inhibición de STAT3 por las Cus, resulta en la baja expresión de ciclina–B1 y la posterior detención de las células en G2/M (Zhang y col., 2014). Asimismo, se ha descrito que cucurbitacina E, induce acumulación de las células en fase S y bloqueo en G2/M como resultado de la alta regulación de los inhibidores de CDKs p27 y p21 e inhibición de la fosforilación de STAT3 (Lan y col. 2013; Abukhdeir y Park 2008; Abbas y Dutta 2009; Thoennissen y col. 2009).

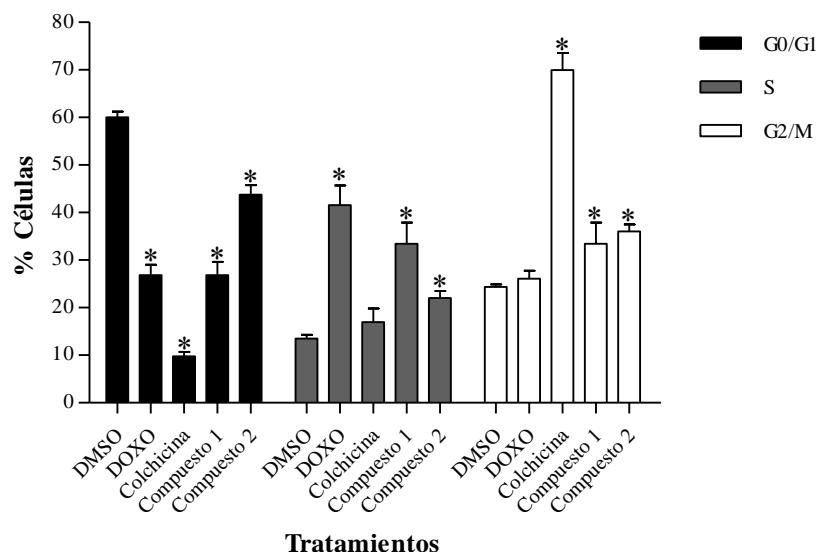


Figura 21. Efecto de 1 y 2 sobre las fases del ciclo celular de HeLa. Los compuestos 1 y 2 fueron evaluados a 8 y 36 μM , respectivamente. DMSO al 0.2% v/v fue utilizado como control de vehículo. DOXO (1 μM) y colchicina (1 μM) fueron utilizados como controles positivos. Los valores representan la media (\pm) y la desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes ($n = 3$). Para el análisis estadístico, el control sin tratamiento se comparó con los diversos tratamientos utilizando el test de Tukey, el asterisco (*) representa $p < 0.05$.

Aún no está claro el mecanismo por el cual **1** y **2** inducen el arresto del ciclo celular, sin embargo, se sugiere que ambos compuestos, modulan de manera negativa la actividad de las ciclinas –A y –B a través de un mecanismo dependiente de STAT3, p21 y p27, conduciendo a la detención de las células en las fases S y G2/M. Varios estudios han demostrado que los agentes capaces de inducir el arresto del ciclo celular pueden ser utilizados en el tratamiento de diversos tipos de cáncer (Huang y col., 2012). En este estudio, se demostró que **1** y **2**, inhiben la proliferación celular de HeLa a través de la inducción de apoptosis y el arresto del ciclo celular en S y G2/M, lo cual posiciona a ambos compuestos como candidatos potenciales para la realización de estudios posteriores donde se logren esclarecer los mecanismos de acción antiproliferativa y la evaluación del efecto de estos compuestos sobre otras líneas celulares y en modelos de cáncer *in vivo*.

Efecto Antitumoral *in Vivo*

Alrededor de 266, 000 mujeres mueren cada año en todo el mundo por cáncer cervicouterino (CCU). A nivel mundial el CCU es el cuarto tipo de cáncer más común en términos de incidencia en mujeres, con un estimado de 528, 000 nuevos casos en 2012. En las regiones menos desarrolladas, el CCU ocupa la segunda posición dentro de los cánceres más frecuentes en mujeres y se estima que en el 2012 hubo 445, 000 nuevos casos (84% de los nuevos casos mundiales). Para ese mismo año, aproximadamente 270, 000 mujeres murieron por CCU, más del 85% de esas muertes se produjeron en países de ingresos bajos y medianos.

Las infecciones por las cepas de alto riesgo del virus de papiloma humano (HPV), son el principal factor para desarrollar CCU. Existen más de cien tipos de HPV, de los cuales, al menos trece, son considerados como oncogénicos o de alto riesgo. Entre los subtipos de alto riesgo, las cepas de VPH 16 y 18, son causantes del 70% de los CCU. Dos vacunas profilácticas contra el VPH (Gardasil y Cervarix) existen en el mercado, sin embargo, su efecto es limitado debido a que no presentan ningún beneficio sobre la infección por VPH o el CCU. Los tratamientos actuales para combatir el CCU son la radioterapia, quimioterapia y cirugía. Cisplatino es el fármaco de elección contra el CCU,

y es utilizado solo o en combinación con topotecan. No obstante, el uso del cisplatino se ha restringido, debido a que ocasiona la aparición de graves efectos colaterales como depresión de la médula ósea, neutropenia, trombocitopenia, nefrotoxicidad, neurotoxicidad y quimioresistencia adquirida. Es por ello, que existe la necesidad de encontrar nuevas estrategias para tratar el CCU que sean más efectivas y menos tóxicas (Braaten y Laufer, 2008). Los estudios *in vitro* demostraron que **1** y **2** poseen gran efecto antiproliferativo sobre la línea celular de adenocarcinoma humano HeLa. Con el objetivo de conocer si estos compuestos inhiben el crecimiento tumoral *in vivo*, se evaluó la capacidad antitumoral de estas moléculas contra tumores subcutáneos de células HeLa inducidos en ratones atómicos (nu/nu).

Cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 100 cm³, los animales fueron agrupados al azar en 6 grupos: grupo 1: Control; grupo 2: doxorubicina (1 mg/kg); grupo 3: cucurbitacina IIb (1 mg/kg); grupo 4: cucurbitacina IIb (10 mg/kg); grupo 5: kinoína A (1 mg/kg); grupo 6: kinoína A (10 mg/kg). La figura 22, muestra que el desarrollo de los tumores de los animales tratados con **1** o **2**, disminuyó de manera significativa en comparación con el control del vehículo. Dicho efecto pudo ser observado durante todo el experimento, desde el día 3, hasta el día 15 post-tratamiento. De manera consistente a los experimentos *in vitro*, el compuesto **1**, mostró mayor capacidad de inhibir el desarrollo de los tumores en comparación con **2**. Al día 15 post-tratamiento, **1** (10 mg/kg), fue capaz de inhibir el 88.2% del desarrollo tumoral ($p < 0.05$ vs control); mientras que, este mismo compuesto, a la concentración de 1 mg/kg, redujo en un 83.3% el desarrollo de los tumores con respecto al control sin tratamiento ($p < 0.05$ vs control). **2** por su parte, disminuyó en un 69.5% y 62.5% el desarrollo tumoral en comparación con el control a las concentraciones de 10 y 1 mg/kg ($p < 0.05$), respectivamente (Figura 23).

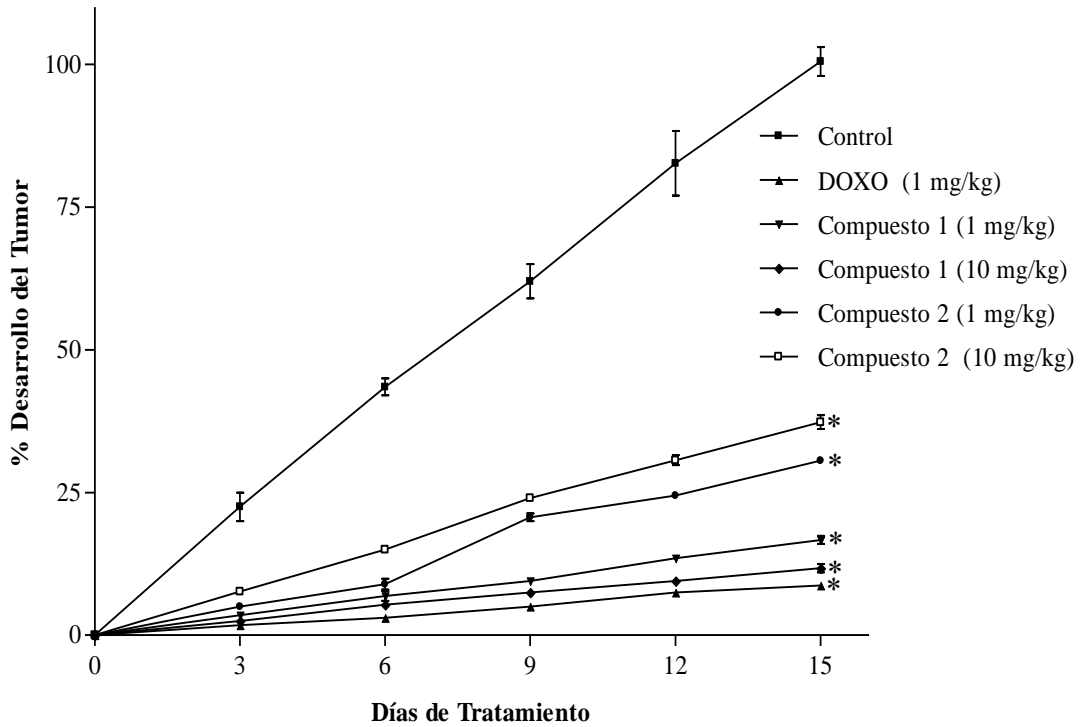


Figura 22. Efecto antitumoral de 1 y 2 en xenoinjertos de HeLa. Los valores representan la media (\pm) y la desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes ($n = 3$). Para el análisis estadístico, el control sin tratamiento se comparó con los diversos tratamientos utilizando el test de Tukey, el asterisco (*) representa $p < 0.05$.

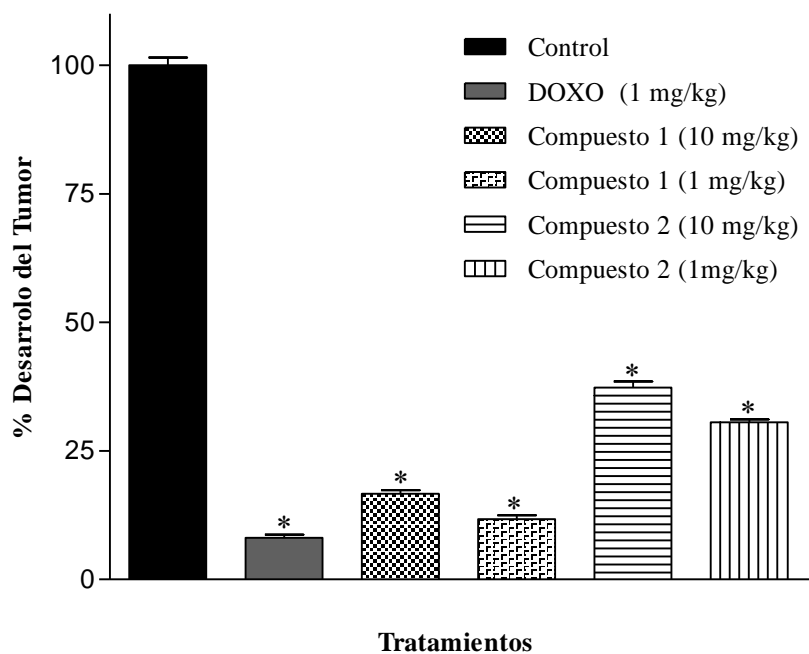


Figura 23. Efecto de 1 y 2 sobre el desarrollo tumoral *in vivo*. Los valores representan la media (\pm) y la desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes ($n = 3$). Para el análisis estadístico, el control sin tratamiento se comparó con los diversos tratamientos utilizando el test de Tukey, el asterisco (*) representa $p < 0.05$.

De forma análoga al efecto observado sobre el desarrollo tumoral, **1** y **2** fueron capaces de reducir de manera significativa el peso de los tumores al finalizar el tratamiento. Como se muestra en la figura 24, el compuesto **1** a las concentraciones de 10 y 1 mg/kg, disminuyó el peso de los tumores en un 86 y 81% ($p < 0.05$), respectivamente. Por su parte, el compuesto **2**, disminuyó en un 72 y 65% el peso de los tumores en comparación con el control a las dosis de 10 y 1 mg/kg ($p < 0.05$), respectivamente. Interesantemente, **1** y **2** presentaron efecto antitumoral *in vivo* sin signos aparentes de toxicidad sobre los ratones. En ambas dosis (1 y 10 mg/kg), **1** y **2**, no tuvieron efecto sobre el peso corporal de los ratones.

DOXO es una de las drogas antineoplásicas de uso clínico más importante, es utilizada sola o en combinación con otros fármacos en el tratamiento del cáncer de mama, linfomas, sarcomas y otras neoplasias. Infortunadamente, el efecto de la DOXO sobre las células tumorales, se ve acompañado de graves toxicidades tisulares, principalmente cardiotoxicidad. La ruptura de las mitocondrias y la fragmentación de los miocitos cardíacos, se ha asociado a la generación de insuficiencia cardíaca congestiva y cardiopatía tardía (Lu y col., 2011; Zombeck y col., 2013).

En este estudio, DOXO mostró mayor capacidad de inhibir el desarrollo tumoral con respecto a **1** y **2**. A una dosis de 1 (mg/kg), DOXO logró disminuir en un 91.9% el desarrollo tumoral en relación al control sin tratamiento ($p < 0.05$). Asimismo, después del tratamiento con DOXO, el peso de los tumores se redujo en un 93% ($p < 0.05$ vs control). Por otro lado, los ratones tratados con DOXO, mostraron una disminución del peso del 37.5% en relación a los ratones tratados con el vehículo (Figura 25). Este hallazgo, es consistente con las observaciones clínicas y se correlaciona de manera positiva con la toxicidad generada por este compuesto.

Solo alrededor del 5% de los agentes anticancerígenos que pasan por estudios preclínicos son aprobados para su uso por la FDA. Para exacerbar la situación, los medicamentos aprobados por la FDA están siendo retirados o su uso ha sido interrumpido debido a la toxicidad que generan (Malaney y Davé, 2014).

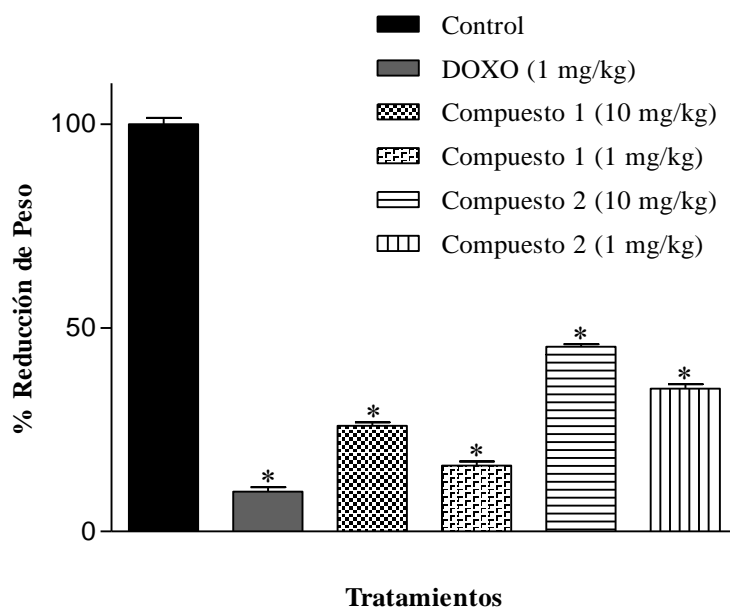
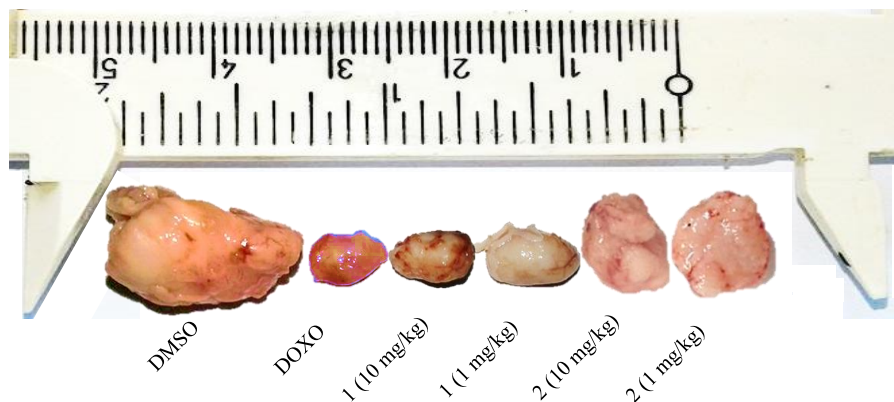


Figura 24. Efecto de 1 y 2 sobre el peso tumoral. Los valores representan la media (\pm) y la desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes ($n = 3$). Para el análisis estadístico, el control sin tratamiento se comparó con los diversos tratamientos utilizando el test de Tukey, el asterisco (*) representa $p < 0.05$.

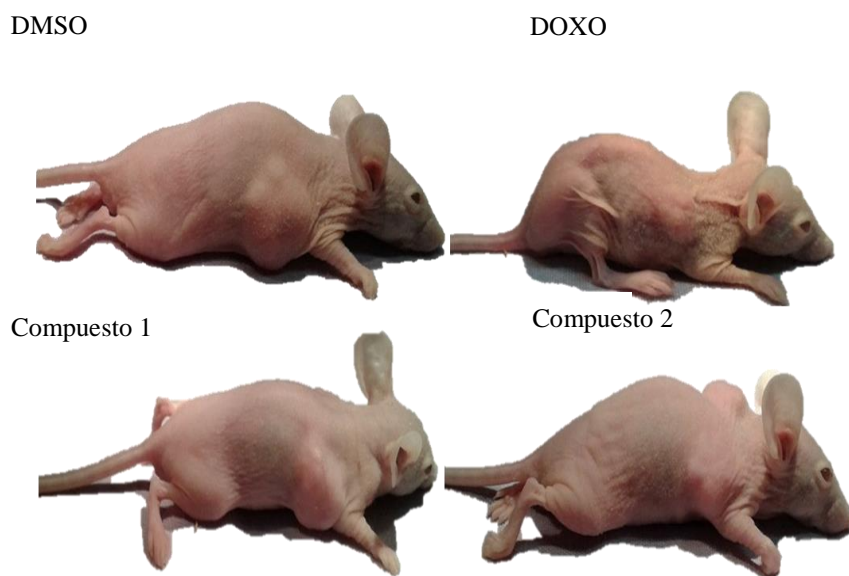


Figura 25. Estado físico de los ratones después del tratamiento. 1 y 2 (10 mg/kg) no presentaron efecto sobre la reducción del peso en los ratones. Los ratones tratados con DOXO (1 mg/kg) presentaron reducción del peso del 37.5% al finalizar el tratamiento.

Aunque se desconoce si el uso crónico de **1** y **2** causan toxicidad *in vivo*, en este estudio se demostró que ambos compuestos no inducen pérdida de peso en los ratones, lo cual es un signo indicativo de su menor toxicidad en comparación con la DOXO. Los modelos de xenoinjertos establecidos en ratones inmunodeficientes utilizando células neoplásicas humanas, son considerados los modelos clínicamente más relevantes para el descubrimiento de medicamentos antineoplásicos (Arjomandnejad y col., 2014). Por tal motivo, los resultados obtenidos en este estudio, sugieren que **1** y **2**, podrían ser considerados como una estrategia factible para el tratamiento de pacientes con CCU.

El efecto antitumoral de las Cus ha sido demostrado en distintas publicaciones. Thoennissen y colaboradores en el 2009, demostraron que Cucurbitacina B es capaz de inhibir el crecimiento de xenoinjertos de tumores pancreáticos humanos Panc-1 *in vivo*. 1×10^7 células fueron implantadas por vía subcutánea en ambos flancos de ratones atímicos nu/nu. La administración de Cucurbitacina B (1 mg/kg) se hizo de manera intraperitoneal, tres veces por semana. Al final del tratamiento, el volumen de los tumores tratados con Cucurbitacina B se redujo en un 69.2% en comparación con el control.

En otro estudio, 5×10^6 células de cáncer de laringe humano Hep-2 se inyectaron de manera subcutánea en el flanco derecho de ratones atímicos (nu/nu). Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 150 mm^3 , los ratones fueron tratados por vía intravenosa con liposoma de Cucurbitacina B ($55 \mu\text{g/kg/día}$), docetaxel (7.5 mg/kg/semana) o con combinaciones de ambos por 14 días. El tratamiento único con Cucurbitacina B disminuyó en un 41.9% el volumen tumoral, mientras que el tratamiento combinado, logró reducir en un 75.9% el volumen del tumor en relación al control (Liu, 2008).

Sikander y colaboradores en el 2016, demostraron que la administración intratumoral de Cucurbitacina D (1 mg/kg), inhibe significativamente el desarrollo de tumores de xenoinjertos ortotópicos derivados de células CaSki. 4×10^6 células fueron dispersadas en Matrigel (BD Biosciences) y se inyectaron directamente en el cuello uterino de cada ratón. La administración de Cucurbitacina D se hizo tres veces por semana durante 4 semanas.

Por su parte, Ma y colaboradores en el 2014, reportaron el efecto de Cucurbitacina B en un modelo xenoinjerto humano de HeLa. En este estudio, ratones atímicos nu/nu, fueron trasplantados de manera subcutánea con 5×10^7 células HeLa en la región del flanco. Cucurbitacina B fue administrada por vía oral tres veces por semana durante 35 días, a dosis de 1 y 5 mg/kg, el tratamiento se inició al día 10 posterior de la implantación de las células en los ratones. Cucurbitacina B a 5 mg/kg, inhibió en un 52.9% el crecimiento de los tumores, en comparación con el grupo control tratado con el vehículo.

Si bien, los modelos utilizados para la evaluación de la actividad antitumoral *in vivo* de las Cus son variables, los resultados encontrados en este estudio, sugieren que **1** y **2** poseen un valor potencial para ser utilizados en la quimioterapia del CCU.

Se recomienda para futuras investigaciones, estudiar los mecanismos relacionados con el efecto antitumoral *in vivo* de **1** y **2**, evaluar otras vías de administración de estos compuestos, probar el efecto antitumoral *in vivo* en otros modelos distintos al utilizado en esta investigación y realizar estudios de farmacocinética, farmacodinamia y toxicidad *in vivo*.

CONCLUSIONES

- ❖ Se logró el aislamiento y caracterización química de los triterpenoides del tipo cucurbitacina, cucurbitacina IIb y kinoína A, a partir del extracto metanólico de *Ibervillea sonora*.
- ❖ Se logró establecer por primera ocasión que cucurbitacina IIb es un constituyente químico de *Ibervillea sonora*.
- ❖ Se demostró que cucurbitacina IIb y kinoína A suprimen fuertemente el crecimiento *in vitro* de las células tumorales HeLa, A549, LS-180, RAW 264.7 y SiHa de manera dosis-respuesta.
- ❖ Se demostró que cucurbitacina IIb y kinoína A inducen efecto antiproliferativo en HeLa a través de mecanismos asociados a la inducción de apoptosis y al arresto del ciclo celular.
- ❖ Se demostró por primera ocasión que cucurbitacina IIb y kinoína A poseen efecto antitumoral *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, T., Dutta, A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. 9(6):400-414.
- Abukhdeir, A.M., Park, B.H. 2008. P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med*. 10:e19.
- Achenbach, H., Horn, K., Domínguez, X., Rombold, C., Gómez, E. 1993. Cucurbitanes and cucurbitane-type glycosides from *Ibervillea sonora*. *Phytochemistry*. 33(2):437-445
- American Cancer Society (ACS). 2017. Cancer Facts & Figures 2017. Atlanta: American Cancer Society.
- Al, Z., Siddiquee, K., Turkson, J. 2008. STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell Res*. 18(2):254-267.
- Alarcon-Aguilar, F.J., Calzada-Bermejo, F., Hernandez-Galicia, E., Ruiz-Angeles, C., Roman-Ramos, R. 2005. Acute and chronic hypoglycemic effect of *Ibervillea sonora* root extracts-II. *J Ethnopharmacol*. 97(3):447-452.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K.P.W. 2002. Components of the Cell-Cycle Control System. In: Sciences G. Molecular Biology of the Cell.
- Alghasham, A.A. 2013. Cucurbitacins - a promising target for cancer therapy. *Int J Health Sci (Qassim)*. 7(1):77-89.
- Andrade-Cetto, A., Wiedenfeld, H. 2011. Anti-hyperglycemic effect of *Opuntia streptacantha* Lem. *J Ethnopharmacol*. 133(2):940-943.
- Araujo, A.R., Gelens, L., Sheriff, R.S., Santos, S.D. 2016. Positive Feedback Keeps Duration of Mitosis Temporally Insulated from Upstream Cell-Cycle Events. *Mol Cell*. 64(2):362-375.
- Arjomandnejad, M., Muhammadnejad, A., Haddadi, M., Sherkat-Khameneh, N., Rismanchi, S., Amanpour, S., Muhammadnejad, S. 2014. HeLa cell line xenograft tumor as a suitable cervical cancer model: growth kinetic characterization and immunohistochemistry array. *Arch Iran Med*. 17(4):273-277.

- Barnum, K.J., O'Connell, M.J. 2014. Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol Biol.* 1170:29-40.
- Braaten, K.P., Laufer, M.R.. 2008. Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. *Rev Obstet Gynecol.* 1(1):2-10.
- Brunelle, J.K., Letai, A. 2009. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci.* 122(4):437-441.
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. 2015. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants.* Vol Second edition: Wiley-Blackwell.
- Chai, J. Y. S. 2014. Apoptosome and inflammasome: conserved machineries for caspase activation. *Natl Sci Rev.* 1(1):101-118.
- Chan, K.T., Meng, F.Y., Li, Q., et al. 2010. Cucurbitacin B induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in BEL-7402 human hepatocellular carcinoma cells and is effective via oral administration. *Cancer Lett.* 294(1):118-124.
- Chen, J.C., Chiu, M.H., Nie, R.L., Cordell, G.A., SX, Q. 2005. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat Prod Rep.* 22:387-399.
- Chen, X., Bao, J., Guo, J., Ding, Q., Lu, J., Huang, M., Wang, Y. 2012. Biological activities and potential molecular targets of cucurbitacins: a focus on cancer. *Anticancer Drugs.* 23(8):777-787.
- Chen, X.B., Chen, G.Y., Liu, J.H., Lei, M., Meng, Y.H., Guo, D.A., Liu, X., Hu, L.H. 2014. Cytotoxic cucurbitane triterpenoids isolated from the rhizomes of *Hemsleya amabilis*. *Fitoterapia.* 94:88-93.
- Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., Olson, M.F. 200. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol.* 3(4):339-345.
- Cowling, V., Downward, J. 2002. Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death Differ.* 9(10):1046-5

- Deepa, S. K. 2016. Impact of Western Lifestyle on Cancer Progression. *International Journal of Healthcare Sciences*. 4(1):305-310.
- Diaz-Moralli, S., Tarrado-Castellarnau, M., Miranda, A., Cascante, M. 2013. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 138(2):255-271.
- Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Markova, L., Urban, M., Sarek, J.. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat Prod Rep*. 23(3):394-411.
- Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology*. 35(5):495-516.
- Fiandalo, M.V., Kyprianou, N. 2012. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. *Exp Oncol*. 34(3):165-175.
- Figueroa-Hernández, J.L., Martínez-Vázquez, M. 2014. Chemical constituents from *Ibervillea lindheimeri* (A. Gray) Greene. *Biochem Syst Ecol*. 54:237–239.
- Fischer, U., Schulze-Osthoff, K. 2005. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev*. 57(2):187-215.
- Fisher, D. 2011. Control of DNA replication by cyclin-dependent kinases in development. *Results Probl Cell Differ*. 53:201-217.
- Fu, J., Wang, S., Lu, H, et al. 2015. *In vitro* inhibitory effects of triterpenoids from *Chlorantus multistachys* on epithelial-mesenchymal transition via down-regulation of Runx2 activation in human breast cancer. *Phytomedicine*. 22:165-172.
- Fulda, S., Debatin, K.M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 25(34):4798-4811.
- Gabrielsen, M., Schuldt, M., Munro, J., Borucka, D., Cameron, J., Baugh, M., Mleczak, A., Lilla, S., Morrice, N., Olson, M.F. 2013. Cucurbitacin covalent bonding to cysteine thiols: the filamentous-actin severing protein Cofilin1 as an exemplary target. *Cell Commun Signal*. 11:58.
- Graña, X., Reddy, E.P. 1995. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene*. 11(2):211-219.

- Gurib-Fakim, A. 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med.* 27(1):1-93.
- Hanh, T., Akporiaye, E.T. 2011. Repeat dose study of the novel proapoptotic chemotherapeutic agent alpha-tocopheryloxy acetic acid in mice. *Anti-Cancer Drug*, 00:00.
- Henry, C.M., Hollville, E., Martin, S.J. 2013. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods.* 61(2):90-97.
- Henson, P., Bratton, D. 2013. Antiinflammatory effects of apoptotic cells. *J Clin Invest.* 123(7):2773-2774.
- Hernández-Galicia, E., Calzada, F., Roman-Ramos, R., Alarcón-Aguilar, F.J. 2007. Monoglycerides and fatty acids from *Ibervillea sonora* root: isolation and hypoglycemic activity. *Planta Med.* 73(3):236-240.
- Hill, R.A., Connolly, J.D. 2013. Triterpenoids. *Nat Prod Rep.* 29:1028–1065.
- Hongmei, Z. 2012. Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review. In: InTech. *Apoptosis and Medicine.* <http://dx.doi.org/10.5772/50129>.
- Horvath, C.M. 2000. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci.* 25(10):496-502.
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., Sarkar, S. 2014. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers.* 5:1769-1792.
- Huang, W.W., Yang, J.S., Lin, M.W., Chen, P.Y., Chiou, S.M., Chueh, F.S., Lan, Y.H., Pai, S.J., Tsuzuki, M., Ho, W.J., Chung, J.G. 2012. Cucurbitacin E Induces G 2 /M Phase Arrest through STAT3/p53/p21 Signaling and Provokes Apoptosis via Fas/CD95 and Mitochondria-Dependent Pathways in Human Bladder Cancer T24 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* doi:10.1155/2012/952762.
- IAC. 2017. Cancer Cell Culture: Methods and Protocols. Vol 731. Second edition ed2011.
- Instituto Nacional de Estadística y Geográfica (INEGI). "Estadísticas a Propósito del Día Mundial Contra el Cáncer (4 de febrero) ".
- Ji, H.F., Li, X.J., Zhang, H.Y. 2009. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug

- combinations in the fight against cancer and dementia?. *EMBO Rep.* 10(3):194-200.
- Jorn, G., Inge, S., C.A.H. 2006. Cucurbitacins in plant food. 556.
- Kasibhatla, S., Tseng, B. 2003. Why target apoptosis in cancer treatment?. *Mol Cancer Ther.* 2(6):573-580.
- Kaushik, U., Aeri, V., Mir, S.R. 2015. Cucurbitacins - An insight into medicinal leads from nature. *Pharmacogn Rev.* 9(17):12-18.
- Ko, H.H., Hung, C.F., Wang, J.P., Lin, C.N. 2008. Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry.* 69(1):234-239.
- Lan, T., Wang, L., Xu, Q., Liu, W., Jin, H., Mao, W., Wang, X., Wang, X. 2013. Growth inhibitory effect of Cucurbitacin E on breast cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol.* 6(9):1799-1805.
- Langenfeld, F., Guarracino, Y., Arock, M., Trouvé, A., Tchertanov, L. 2015. How Intrinsic Molecular Dynamics Control Intramolecular Communication in Signal Transducers and Activators of Transcription Factor STAT5. *PLoS One.* 10(12):e0145142.
- Lavie, D., Glotter, E. 1971. The cucurbitanes, a group of tetracyclic triterpenes. *Fortschr Chem Org Naturst.* 29:307-362.
- Li, L., Zhao, G.D., Shi, Z., Qi, L.L., Zhou, L.Y., Fu, Z.X. 2016. The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC. *Oncol Lett.* 12(5):3045-3050.
- Liang, C., Ding, Y., Nguyen, H.T., Kim, Y.H. 2010. Oleanane-type triterpenoids from *Panax stipuleanatus* and their anticancer activities. *Bioorg Med Chem Lett.* (23):7110-7115.
- Lim, S., Kaldis, P. 2013. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development.* 140(15):3079-3093.
- Liu, C.H., Yen, M.H., Tsang, S.F., Gan, K.H. 2010. Antioxidant triterpenoids from the stems of *Momordica charantia*. *Food Chemistry.* 2010(118):751-756

- Liu, J., Davidson, R.S., Ho, O.W. 1994. The structure of 23,24-dihydrocucurbitacin F: full assignments of the ¹H and ¹³C NMR spectra. *J. prakt Chem.* 336(1):16-18.
- Liu, T., Zhang, M., Zhang, H., Sun, C., Yang, X., Deng, Y., Ji, W. 2008. Combined antitumor activity of cucurbitacin B and docetaxel in laryngeal cancer. *Eur J Pharmacol.* 587(1-3):78-84.
- LoPiccolo, J., Blumenthal, G.M., Bernstein, W.B., Dennis, P.A. 2008. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat.* 11(1-2):32-50.
- Lu, M., Merali, S., Gordon, R., Jiang, J., Li, Y., Mandeli, J., Duan, X., Fallon, J., Holland, J.F. 2011. Prevention of Doxorubicin cardiopathic changes by a benzyl styryl sulfone in mice. *Genes Cancer.* 2(10):985-992.
- Ma, J., Zi, J.Y., Shi, H., Mi, C., Li, J., Xing, N.J., Wu, X., Joon, L.J., Jin, X. Cucurbitacin B inhibits the translational expression of hypoxia-inducible factor-1 α . *Eur J Pharmacol.* 15(723):46-54.
- Malaney, P., Nicosia, S.V., Davé, V. 2014. One mouse, one patient paradigm: New avatars of personalized cancer therapy. *Cancer Lett.* 344(1):1-12.
- Maloney, K.N., Fujita, M., Eggert, U.S., Schroeder, F.C., Field, C.M., Mitchison, T.J., Clardy, J., 2008. Actin-aggregating cucurbitacins from *Physocarpus capitatus*. *J. Nat. Prod.* 7:1927-1929.
- Marostica, L.L., Silva, I.T., Kratz, J.M., Persich, L., Geller, F.C., Lang, K.L., Caro, M.S., Durán, F.J., Schenkel, E.P., Simões, C.M. 2015. Synergistic Antiproliferative Effects of a New Cucurbitacin B Derivative and Chemotherapy Drugs on Lung Cancer Cell Line A549. *Chem Res Toxicol.* 28(10):1949-1960.
- McBride, K.M., Banninger, G., McDonald, C., Reich, N.C. 2002. Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha. *EMBO J.* 21(7):1754-1763.
- McIlwain, D.R., Berger, T., Mak, T.W. 2012. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(4):a008656.

- Meng, X.J., Chen, Y.Z., Nie, R.L., Zhou, J. 1985. [A new cucurbitacin from *Hemsleya graciliflora*]. *Yao Xue Xue Bao*. 20(6):446-449.
- Messina, F., Curini, M., Di, S.C., Gigliarelli, G., Rascón-Valenzuela, L.A., Robles-Zepeda, R.E., Marcotullio, M.C. 2015. Diterpenoids and Triterpenoids from the Resin of *Bursera microphylla* and Their Cytotoxic Activity. *J Nat Prod*. 78(5):1184-1188.
- Millimouno, F.M., Dong, J., Yang, L., Li, J., Li, X. 2014. Targeting apoptosis pathways in cancer and perspectives with natural compounds from mother nature. *Cancer Prev Res (Phila)*. 7(11):1081-1107.
- Mitchell, T.J., John, S. 2005. Signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling and T-cell lymphomas. *Immunology*. 114(3):301-312.
- Morris, L., Allen, K.E., Thangue, N.B. 2000. Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators. *Nat Cell Biol*. 2(4):232-239.
- Nazaruk, J., Borzym-Kluczyk, M. 2015. The role of triterpenes in the management of diabetes mellitus and its complications. *Phytochem Rev*. 14(4):675-690.
- Nguyen, V.T., Tung, N.T., Cuong, T.D., Hung, T.M., Kim J.A., Woo, M.H., Choi, J.S., Lee, J.H., Min, B.S. 2015. Cytotoxic and anti-angiogenic effects of lanostane triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. *Phytochem Lett*. 12:69-74.
- Olivas-Aguirre, F.J., González-Aguilar, G.A., Velderraín-Rodríguez, G.R, Torres-Moreno, H., Robles-Zepeda, R.E., Vázquez-Flores, A.A., de la Rosa, L.A., Wall-Medrano, A. 2017. Radical scavenging and antiproliferative capacity of three freeze-dried tropical fruits. *Int J of Food Sci Technol*. 52:1699-1709.
- Olmedo, D., Rodríguez, N., Vásquez, Y, Solís, P.N., López-Pérez, J.L., Feliciano, A.S., Gupta, M.P. 2007. A new coumarin from the fruits of *Coutarea hexandra*. *Nat Prod Res*. 21(7):625-631.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Cáncer, Nota descriptiva, Febrero de 2017. 2017; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>. Accessed 07/07/2017, 2017.

- Pan, S.Y., Litscher, G., Gao, S.H., Zhou, S.F., Yu, Z.L., Chen, H.Q., Zhang, S.F., Tang, M.K., Sun, J.N., Ko, K.M. 2014. Historical perspective of traditional indigenous medical practices: the current renaissance and conservation of herbal resources. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014:525340.
- Pandreka, A., Dandekar, D.S., Haldar, S., Uttara, V., Vijayshree, S.G., Mulani, F.A., Aarthy, T., Thulasiram, H.V. 2015. Triterpenoid profiling and functional characterization of the initial genes involved in isoprenoid biosynthesis in neem (*Azadirachta indica*). *BMC Plant Biol.* 15:214.
- Perry, S.W., Norman, J.P., Barbieri, J., Brown, E.B., Gelbard, H.A. 2011. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques.* 50(2):98-115.
- Polivka, J., Janku, F. 2014. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacol Ther.* 142(2):164-175.
- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M., Greenwood, M.T. 2011. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta.* 1813(1):238-259.
- Ramalhete, C., da Cruz, F.P., Lopes, D., Mulhovo, S., Rosário, V.E., Prudêncio, M., Ferreira, M.J. 2011. Triterpenoids as inhibitors of erythrocytic and liver stages of Plasmodium infections. *Bioorg Med Chem.* 19(24):7474-7481.
- Ramírez-Espinosa, J.J., Rios, M.Y., López-Martínez, S., López-Vallejo, F., Medina-Franco, J.L., Paoli, P., Camici, G., Navarrete-Vázquez, G., Ortiz-Andrade, R. 2011. Antidiabetic activity of some pentacyclic acid triterpenoids, role of PTP-1B: *in vitro*, *in silico*, and *in vivo* approaches. *Eur J Med Chem.* 46(6):2243-2251.
- Rascón-Valenzuela, L.A., Velázquez-Contreras, C., Garibay-Escobar, A., Vilegas, W., Medina-Juárez, L.A., Gámez-Meza, N., Robles-Zepeda, R.E. 2016. Apoptotic activities of cardenolide glycosides from *Asclepias subulata*. *J Ethnopharmacol.* 193:303-311.
- Sánchez, I., Dynlacht, B.D. 2005. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol.* 16(3):311-321.

- Santarpia, L., Lippman, S.M., El-Naggar, A.K. 2012. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 16(1):103-119.
- Shi, Y. 2004. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci*. 13(8):1979-1987.
- Shiozaki, E.N., Chai, J., Shi, Y. 2002. Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proc Natl Acad Sci*. 99(7):4197-4202.
- Shuai, K., Liu, B. 2003. Regulation of Jak-Stat Signalling in the Immune System *Nature Reviews Immunology*. 3(11):900-911.
- Shukla, S., Shishodia, G., Mahata, S., Hedau, S., Pandey, A., Bhambhani, S., Batra, S., Basir, S.F., Das, B.C., Bharti, A.C. 2010. Aberrant expression and constitutive activation of STAT3 in cervical carcinogenesis: implications in high-risk human papillomavirus infection. *Mol Cancer*. 9:282.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. 2017. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 67(1):7-30.
- Sikander, M., Hafeez, B.B., Malik, S., Alsayari, A., Halaweish, F.T., Yallapu, M.M., Chauhan, S.C., Jaggi, M. 2016. Cucurbitacin D exhibits potent anti-cancer activity in cervical cancer. *Sci Rep*. 6:36594.
- Silva, I.T., Carvalho, A., Lang, K.L., Dudek, S.E., Masemann D., Durán, F.J., Caro, M.S.B., Rapp, U.R., Wixler, V., Schenkel, E.P., Simões, C.M.O., Ludwing, S. 2015. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of a novel semisynthetic derivative of cucurbitacin B. *PLoS One*. 10(2):e0117794.
- Siveen, K.S., Sikka, S., Surana, R., Dai, X., Zhang, J., Kumar, A.P., Tah, B.K.H., Sethi, G., Bishayee, B. 2014. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors. *Biochim Biophys Acta*. 1845(2):136-154.
- Sörensen, P.M., Iacob, R.E., Fritzsche, M., Engen, J.R., Briehner, W.M., Charras, G., Eggert, U.S. 2012. The natural product cucurbitacin E inhibits depolymerization of actin filaments. *ACS Chem Biol*. 7(9):1502-1508.

- Thoennissen, N.H., Iwanski, G.B., Doan, N.B., Okamoto, R., Lin, P., Abbassi, S., Song, J.H., Yin, D., Toh, M., Xie, W.D., Said, J.W., Koeffler, H.P. 2009. Cucurbitacin B induces apoptosis by inhibition of the JAK/STAT pathway and potentiates antiproliferative effects of gemcitabine on pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 69(14):5876-5884.
- Tian, Z., Yang, M., Huang, F., Li, K., Si, J., Shi, L., Chen, S., Xiao, P. 2005. Cytotoxicity of three cycloartane triterpenoids from *Cimicifuga dahurica*. *Cancer Lett.* 226(1):65-75.
- Tiwari, K.K., Chu, C., Couroucli, X., Moorthy, B., Lingappan, K. 2014. Differential concentration-specific effects of caffeine on cell viability, oxidative stress, and cell cycle in pulmonary oxygen toxicity *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* 450(4):1345-1350.
- Torres-Moreno, H., 2013. Aislamiento y Caracterización Química de Compuestos con Actividad Antiproliferativa de *Ibervillea sonorae*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora.
- Torres-Moreno, H., Velázquez-Contreras, C.A., Garibay-Escobara, A., Curini, M., Marcotullio, M.C., Robles-Zepeda, R.E. 2015. Antiproliferative and apoptosis induction of cucurbitacin-type triterpenes from *Ibervillea sonorae*. *Industrial Crops and Products.* 2015;77:895-900.
- Wang, X., Tanaka, M., Peixoto, H.S., Wink, M. 2017. Cucurbitacins: elucidation of their interactions with the cytoskeleton. *PeerJ.* 5:e3357.
- Wong, R.S.Y. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 30(87).
- Wuarin, J., Buck, V., Nurse, P., Millar, J.B. 2002. Stable association of mitotic cyclin B/Cdc2 to replication origins prevents endoreduplication. *Cell.* 111(3):419-431.
- Xu, X., Bai, H., Zhou, L., Deng, Z., Zhong, H., Wu, Z., Yao, Q. 2014. Three new cucurbitane triterpenoids from *Hemsleya penxianensis* and their cytotoxic activities. *Bioorg Med Chem Lett.* 24(9):2159-2162.

- Yam, C.H., Fung, T.K., Poon, R.Y. 2002. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci.* 59(8):1317-1326.
- Yan, X.J., Gong, L.H., Zheng, F.Y., Cheng, K.J., Chen, Z.S., Shi, Z. 2014. Triterpenoids as reversal agents for anticancer drug resistance treatment. *Drug Discov Today.* 19(4):482-488.
- Zapata-Bustos, R., Alonso-Castro, A.J., Gómez-Sánchez, M., Salazar-Olivo, L.A. 2014. *Ibervillea sonora* (Cucurbitaceae) induces the glucose uptake in human adipocytes by activating a PI3K-independent pathway. *J Ethnopharmacol.* 152(3):546-552.
- Zhang, L., Wu, C., Zhang, Y., Liu, F., Wang, X., Zhao, M., Hoffman, R.M. 2014. Comparison of efficacy and toxicity of traditional Chinese medicine (TCM) herbal mixture LQ and conventional chemotherapy on lung cancer metastasis and survival in mouse models. *PLoS One.* 9(10):e109814.
- Zhang, M., Bian, Z.G., Zhang, Y., Wang, J.H., Kan, L., Wang, X., Niu, H.Y., He, P. 2014. Cucurbitacin B inhibits proliferation and induces apoptosis via STAT3 pathway inhibition in A549 lung cancer cells. *Mol Med Rep.* 10(6):2905-2911.
- Zheng, X., Luo, X., Ye, G., Chen, Y., Ji, X., Wen, L., Xu, Y., Xu, H., Zhan, R., Chen, W. 2015. Characterisation of two oxidosqualene cyclases responsible for triterpenoid biosynthesis in *Ilex asprella*. *Int J Mol Sci.* 16(2):3564-3578.
- Zhou, M., Li, Y., Hu, Q., Huang, W., Yan, C., Scheres, S.H., Shi, Y. 2015. Atomic structure of the apoptosome: mechanism of cytochrome c- and dATP-mediated activation of Apaf-1. *Genes Dev.* 29(22):2349-2361.
- Zombeck, J.A., Fey, E.G., Lyng, G.D., Sonis, S.T. 2013. A clinically translatable mouse model for chemotherapy-related fatigue. *Comp Med.* 63(6):491-497.