



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EFFECTO DE LA ARGENTATINA B EN RATONES ATÓMICOS
XENOTRANSPLANTADOS CON CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON (HCT-15) Y
PRÓSTATA (PC-3)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ELA ALCÁNTARA FLORES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA
DRA. ALICIA ENRIQUETA BRECHÚ FRANCO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F. MARZO, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EFFECTO DE LA ARGENTATINA B EN RATONES ATÓMICOS
XENOTRANSPLANTADOS CON CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON (HCT-15) Y
PRÓSTATA (PC-3)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ELA ALCÁNTARA FLORES

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA, UNAM
DRA. ALICIA ENRIQUETA BRECHÚ FRANCO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

MÉXICO, D.F. MARZO, 2016.



OFICIO FCIE/DEP/107/16

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de enero de 2016**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **ALCÁNTARA FLORES ELA** con número de cuenta **93357636** con la tesis titulada: **"Efecto de la argentatina B en ratones atómicos xenotransplantados con células de cáncer de colon (HCT-15) y próstata (PC-3)"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ**:

Presidente: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
Vocal: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS
Secretario: DRA. ALICIA ENRIQUETA BRECHÚ FRANCO
Suplente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Suplente: DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 24 de febrero de 2016.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



MCAA/MJFM/ASR/ipp

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Agradezco el apoyo recibido del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por haberme otorgado la beca con número de registro: 317580

Agradezco también, a mi Tutor Principal:

Dr. Mariano Martínez Vázquez

y a los miembros del Comité Tutor:

Dra. Patricia García López

Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS

Agradezco los Técnicos Académicos M. en C. Ma. Teresa O. Ramírez Apan y M. en C. Antonio Nieto Camacho, del Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química, UNAM, por el apoyo y la ayuda en el desarrollo de las pruebas biológicas y manejo de animales de laboratorio, porque siempre me proporcionaron su tiempo, el material y las instalaciones necesarias.

Agradezco a la Técnico Académico M. en C. Ma. Cecilia Aguilar Zacarías por el apoyo académico y por proporcionarme la información y el material necesario para el desarrollo de mi trabajo en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, y por el espíritu positivo y de colaboración en todo momento.

Agradezco al Dr. Miguel Tapia Rodríguez por la ayuda, disposición y orientación en la toma de imágenes de Microscopía en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de estudiar, brindarme los medios y los recursos para mi formación como profesional.

Agradezco al Dr. Mariano Martínez Vázquez por la formación que me proporcionó en el campo de la Química, en lo personal y en lo profesional.

Agradezco a la Dra. Alicia Enriqueta Brechú Franco por acompañarme en el desarrollo de toda mi formación como profesional desde la Licenciatura, Maestría y hasta el Doctorado. Eres un gran ejemplo de apoyo y amistad.

Agradezco a la Dra. Patricia García López por la formación ética en el trabajo con animales de Laboratorio y también por su amistad.

Agradezco a la Dra. Leticia Rocha Zavaleta por el ejemplo que me dio como investigadora y como ser humano íntegro y dedicado, por el apoyo académico y formativo y por la oportunidad de conocer y vivir el ambiente trabajo y de cordialidad de su laboratorio.

Agradezco a la Dra. Rebeca López Marure por la ayuda y el interés mostrado siempre en mi trabajo, en el desarrollo de las pruebas realizadas por citometría de flujo, gracias Dra. porque como siempre me lo dijo ¡hay que echarle ganas y va a salir muy bien! y ahora ya está listo.

Agradezco a la Dra. Mina Konigsberg Fainstein del Laboratorio de Envejecimiento celular, UAM, Iztapalapa, por proporcionarnos la información y los anticuerpos necesarios para finalizar las pruebas necesarias para la publicación de nuestro artículo.

Agradezco a las Dra. Marcela Lizano Soberón, Dra. Nadia Jacobo Herrera y a la Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas, por apoyarme y tomarse el tiempo para revisar, corregir y sugerir cambios y mejoras en la escritura de ésta tesis, son un gran ejemplo para mí de entrega e inteligencia en la ciencia.

Agradezco todos mis compañeros del Laboratorio 1-4 de Productos Naturales del Instituto de Química, UNAM, por su amistad, lealtad, ayuda y diversión en estos años de convivencia, Gaby, Mario, Ale, Juan Carlos, Ibrahim, Denisse, Beto, Carmela, Bety, José Luis, David.

Agradezco todos mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Lily, Edgar, Adriana, Majo, Tania, Andrés, Javier, Luis Javier, Alejandro ¡son un gran grupo de mentes brillantes y excelentes compañeros!

Agradezco a mis compañeros el Instituto Nacional de Cancerología (INCan): Montse, Fabricio y Miriam.

Agradezco a Antonio Farré Moragues, mi esposo. Te agradezco por apoyarme en todos estos años de superación profesional. Porque de ti aprendí la idea de que hay que hacer lo que nos gusta. Porque eres para mí un ejemplo de éxito. Y porque juntos tenemos el mejor proyecto de la vida que es nuestra familia.

Agradezco a Antonio y Miquel, mis hijos. Les agradezco por tener paciencia, apoyarme, ayudarme y acompañarme en este proyecto. De ustedes he recibido el amor más grande que conozco.

Agradezco Teresa Flores Rodríguez y Ramón Alcántara Marmolejo, mis papás. Porque me enseñaron que la mejor herencia es la educación que me dieron y que disfrutaría de ella toda mi vida y así es.

Todos y cada uno de ustedes, y los que me faltaron mencionar, forman parte de esta tesis y no hubiera sido posible que la tuviera ahora sin su ayuda y su amistad. Gracias.

A Toño, Antonio y Miquel.

ÍNDICE

RESUMEN	14
ABSTRACT	15
1.- INTRODUCCIÓN	16
1.1 Cáncer	16
1.2 Características de las células cancerosas	16
1.3 Epidemiología	18
1.4 Tratamientos del cáncer	21
1.5 Agentes Quimioterapéuticos	24
1.6 Productos Naturales	30
1.6.1 Triterpenos	31
1.7 El ratón desnudo en la evaluación de nuevos fármacos	35
1.8 Senescencia	37
1.9 Marcadores moleculares de arresto del ciclo celular y senescencia	40
1.10 Justificación	43
1.11 Hipótesis	45
2.- OBJETIVOS GENERALES	46
2.1 Objetivos particulares	46
3.- ANTECEDENTES	45
3.1 <i>Parthenium argentatum</i> (Gray)	46
3.2 Argentatina B	49

4.- METODOLOGÍA	50
4.1 Aislamiento de la argentatina B	50
4.2 Fármacos y reactivos	51
4.2.1 Soluciones	51
4.3 Líneas celulares	52
4.4 Detección del ciclo celular por citometría de flujo	52
4.5 Detección de células apoptóticas por citometría de flujo	53
4.6 Detección de células apoptóticas mediante la tinción de HOECHST 33342	53
4.7 Tinción citoquímica con SA-B-galactosidasa	54
4.8 Ensayos de proliferación y análisis de Western Blot	54
4.9 Xenotransplantes	55
4.10 Pruebas de toxicidad en ratones sanos	57
4.11 Análisis de datos	58
5.- RESULTADOS	59
5.1 Obtención de argentatina B y otros compuestos	59
5.2 Cambios en la progresión del ciclo celular	60
5.3 Detección del efecto apoptótico	62
5.4 Detección del efecto senescente	65
5.5 Expresión de los marcadores moleculares del arresto del ciclo celular y senescencia	66
5.6 Xenotransplantes	69

5.7 Toxicidad	70
6.- DISCUSIÓN	74
7.- CONCLUSIONES	79
7.1 Perspectivas	79
LITERATURA CITADA	80
APÉNDICE	91
Artículo publicado	92

Resumen

Trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación mostraron que la argentatina B, un triterpeno de tipo cicloartano aislado de *Parthenium argentatum*, inhibió el crecimiento de las líneas celulares de cáncer de colon HCT-15 y de cáncer de próstata PC-3. Sin embargo el mecanismo por el cual la argentatina B inhibe la proliferación celular no se conoce. En este trabajo evaluamos el efecto de la argentatina B en el ciclo celular por citometría de flujo; la apoptosis utilizando la prueba de tinción con Annexin-V-Fluos Kit y la tinción con Hoechst 33342; la senescencia fue evaluada por tinción citoquímica para SA- β -galactosidasa y por los cambios en la expresión de PCNA, p21 y p27. *In vivo*, evaluamos la toxicidad de la argentatina B y el efecto en el crecimiento de tumores en un modelo de xenotransplantes utilizando las líneas celulares HCT15 y PC-3. Como resultados obtuvimos que la argentatina B indujo un incremento significativo de células en fase sub G1. El ensayo de SA- β -galactosidasa, demostró que el 43% y 66 % de células HCT-15 y PC-3, respectivamente, presentó tinción positiva. En ambas líneas celulares observamos disminución en la expresión de PCNA y sobre expresión de p21 y p27. *In vivo*, la administración de la argentatina B en ratones no provocó toxicidad y además, inhibió el crecimiento de xenotransplantes tan eficientemente como el cisplatino. Los resultados evidencian que la argentatina B induce la senescencia de las líneas celulares utilizadas y tiene efecto *in vivo*. Actualmente, la estimulación de la senescencia celular se considera un enfoque racional para el tratamiento del cáncer.

Abstract

Argentatin B has been shown to inhibit the growth of colon HCT-15, and prostate PC-3 cancer cells. We aimed to investigate the mechanism by which argentatin B inhibits cell proliferation. Cell cycle was studied by flow cytometry. Apoptosis was evaluated by Annexin-V-Fluos and Hoechst 33342 dye staining. Cell senescence was evaluated by proliferation tests, and staining for SA- β -galactosidase. Senescence-related proteins (PCNA, p21, and p27) were analysed by Western blotting. Potential toxicity of argentatin B was evaluated in CD-1 mice. Its effect on tumor growth was tested in a HCT-15 and PC-3 xenograft model. Argentatin B induced an increment of cells in sub G1, but did not produce apoptosis. Proliferation of both cell lines was inhibited by argentatin B. 43 % HCT-15, and 66 % PC-3 cells showed positive SA- β -galactosidase staining, compared with 2 % of untreated controls. The expression of PCNA was decreased, but the expression of p21 and p27 increased after treatment. Administration of argentatin B to healthy mice did not produce treatment-associated pathologies. However, it restricted the growth of HCT-15 and PC-3 tumors. These results indicate that treatment with argentatin B induces cell senescence.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El cáncer es un término que agrupa más de 100 enfermedades crónicas degenerativas que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Las células alteradas adquieren la capacidad de crecimiento descontrolado a través de un proceso de múltiples pasos, que involucra el avance gradual de una célula normal a una neoplásica [1].

Dichos cambios en las células son el resultado de anomalías genéticas que puede aparecer por la mutación de un grupo específico de genes, muchos de los cuales, actúan normalmente suprimiendo o estimulando la continuidad del ciclo celular, y su pérdida o inactivación da lugar a una división celular acelerada [2].

Durante este proceso se generan mutaciones e inactivación de las vías relacionadas con diferenciación y apoptosis así como la activación de las vías que promueven la proliferación y la diferenciación celular, el desarrollo de procesos de angiogénesis y la activación de la invasión y metástasis [1].

1.2 Características de las células cancerosas

Las principales características celulares adquiridas en el desarrollo y progresión del cáncer son: autosuficiencia de las señales moleculares que inducen crecimiento e insensibilidad de las señales de anticrecimiento, evasión de la apoptosis, potencial ilimitado de la replicación celular, angiogénesis aumentada, invasión tisular y desarrollo de metástasis, inestabilidad genómica y mutación e inflamación persistente promotora del tumor [1]. Desde hace algunos años, se han examinado otras características, entre las cuales destacan: la evasión de la senescencia

tumoral, las alteraciones epigenéticas que modifican los genes relacionados con el cáncer, las alteraciones de la expresión génica por interferencia del mRNA, las alteraciones en el metabolismo intermedio de la glucosa y la glutamina, la participación de las células madre o stem cells cancerosas en el mantenimiento de la proliferación celular, la participación de las células estromales, que son aquellas que forman el tejido de sostén o soporte del tejido para que éste cumpla la función específica de un órgano [3], en el microambiente tumoral y en las alteraciones en la presentación antigénica celular junto con la inmunosupresión por citocinas en el microambiente tumoral [4] (Figura 1).

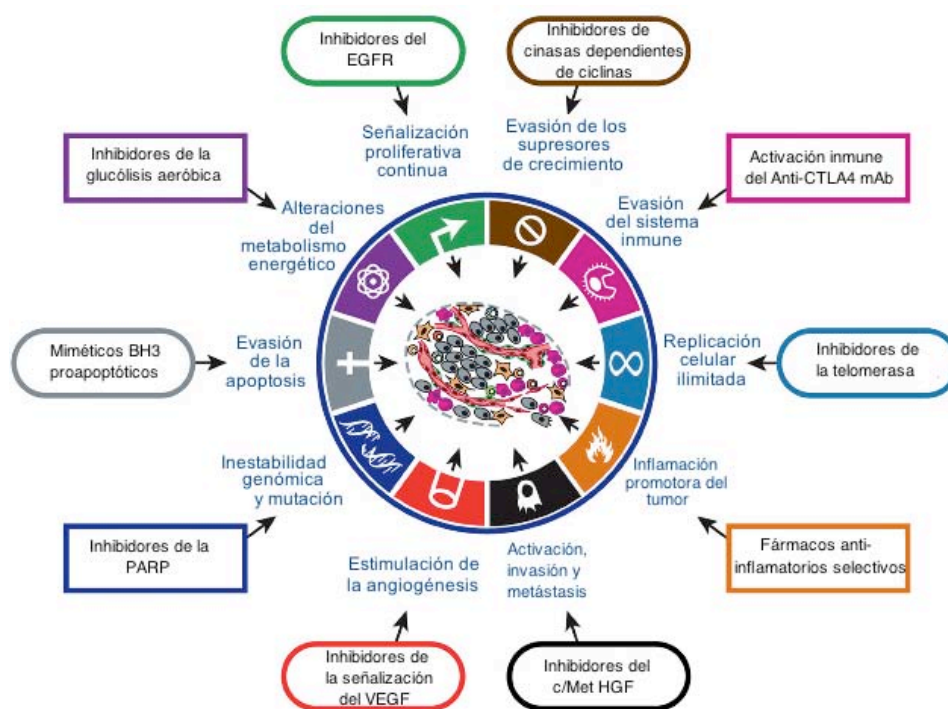


Figura 1. Biomarcas celulares y moleculares identificadas en las células tumorales. En el dibujo se encuentran en azul las biomarcas clásicas del cáncer descritas por Hanahan y Weinberg [4]. En la periferia, el mecanismo de acción de los fármacos utilizados para afectar cada una de las capacidades adquiridas por las células cancerosas.

Las células transformadas adquieren entonces diversas capacidades que son necesarias para el crecimiento y progresión tumoral y esto ha sido una de las bases para el entendimiento de su fisiopatología y el desarrollo tanto de estrategias terapéuticas dirigidas y de fármacos que interfieran en cada una de estas nuevas capacidades; algunos fármacos están ya en ensayos clínicos o incluso aprobados para su uso en el tratamiento de ciertas formas de cáncer humano [5]. El conocimiento acerca de cada una de las características ya conocidas y de la emergentes resultan prometedoras como previsión y terapéutica del cáncer.

1.3 Epidemiología

El cáncer figura entre las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, con aproximadamente 14 millones de casos nuevos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer en 2012. Se espera que el número de nuevos casos podría aumentar en un 70% en los próximos 2 años [6].

El cáncer también está asociado con el estilo de vida, el ambiente en el que vivimos y la exposición a sustancias nocivas. Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer se deben a los 5 principales riesgos conductuales y dietéticos, los cuales son: el índice de masa corporal alta, la baja ingesta de frutas y verduras, la falta de actividad física, el consumo de tabaco y el consumo de alcohol.

Las infecciones virales que causan cáncer, como el VHB / VHC (Virus de la hepatitis B y C respectivamente) y el VPH (Virus de papiloma humano) son responsables de hasta un 20% de las muertes por cáncer en los países de bajos y medianos ingresos [7]. Y más del 60% de los nuevos casos anuales totales del mundo se producen en África, Asia y América Central y del Sur. Estas regiones representan el 70% de las muertes por cáncer en el mundo.

Entre la población masculina, los 5 sitios más comunes de cáncer diagnosticados en 2012 fueron el de pulmón, próstata, colon y recto, estómago y cáncer de hígado; y entre las mujeres, fueron mama, colorrectal, pulmón, cuello uterino y cáncer de estómago [8].

Sin embargo en 2012, las principales neoplasias entre la población mexicana masculina de 20 años y más, se ubicaron en órganos digestivos (25.4%), en órganos genitales (11.5%) y en órganos hematopoyéticos (9.9%); mientras que en las mujeres de este mismo grupo de edad, los porcentajes fueron: en mama (30.8%); órganos genitales (16.5%) y órganos digestivos (13.8 por ciento) (Figura 2).

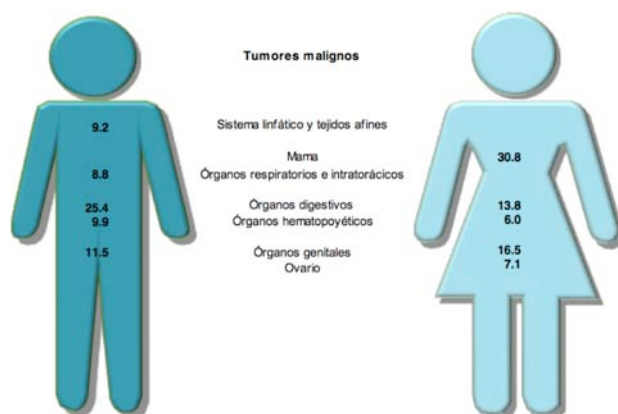


Figura 2. Porcentaje de morbilidad hospitalaria de los principales tumores malignos en la población de 20 años y más según sexo 2012. Tomado de [9].

Del total de tumores malignos en la población de 20 años y más, los de **órganos digestivos** son la primer causa de mortalidad entre esta población, con 32 casos por cada 100 mil habitantes igual ocupa **el primer lugar para los hombres y las mujeres** (33.24 contra 30.55, respectivamente); los tumores de órganos respiratorios e intratorácicos están en el segundo sitio (10.38 defunciones por cada 100 mil habitantes); en tercer lugar, se ubican los **tumores del sistema reproductor masculino** con 8.25 defunciones por cada 100 mil habitantes, el orden es el mismo en los varones. Para las mujeres, el cáncer de mama aparece como segundo en importancia con 14 defunciones por cada 100 mil mujeres de 20 años y más (Tabla 1).

Tabla 1. Tasa de mortalidad de los principales tumores malignos en la población de 20 años y más, según sexo 2013 [9].

Por cada 100 mil habitantes para cada sexo

Principales tumores malignos	Total	Hombres	Mujeres
Órganos digestivos	31.83	33.24	30.55
Órganos respiratorios e intratorácicos	10.38	14.45	6.68
Sistema Reproductor maculino	8.25	17.36	NA
Mama	7.42	0.13 ^a	14.04
Sistema Reproductor femenino	6.60	NA	12.59
Órganos hematopoyéticos	5.47	6.06	4.94 ^b
Vías urinarias	4.02	5.40	2.77 ^b
Tumores de ovario/testículo	3.38	1.27	5.29

^a Para los hombres, el cáncer de mama y tumor de testículo no son una de las principales causas de muerte, pero se incluye el dato para fines de comparación.

^b Para las mujeres, el cancer en órganos hematopoyéticos y de vías urinarias no son de las principales causas de muerte, pero se incluye el dato para fines de comparación.

NA No aplicable.

La Declaración Mundial contra el Cáncer 2013, señala como objetivo principal la reducción de las muertes prematuras por cáncer, el incremento de la calidad de vida y de la tasa de supervivencia de los pacientes afectados por esta enfermedad. En dicha declaración se destaca que para el 2025 se espera el fortalecimiento de los sistemas de salud para hacer frente adecuadamente a la enfermedad; implementar acciones que fomenten estilos de vida saludables y una baja exposición a factores de riesgo, especialmente una disminución del consumo de tabaco y combate a la obesidad, así como programas de vacunación efectivos contra el virus del papiloma humano y la hepatitis B; la promoción eficiente de la salud en la que se concientice a la población sobre la detección temprana junto con estrategias de salud que permitan dicha detección y acceso a tratamientos oportunos así como a cuidados paliativos [9].

1.4 Tratamientos del cáncer

Existen diversas opciones de tratamiento para combatir el cáncer, sin embargo la elección de algunos depende del diagnóstico realizado, tipo de cáncer, localización y el estadio en que se encuentre. Los principales objetivos de un programa de diagnóstico y tratamiento del cáncer son curar o prolongar considerablemente la vida de los pacientes, y garantizar la mejor calidad de vida posible a quienes sobreviven a la enfermedad [8].

Existen tres tipos principales de tratamiento para el cáncer: cirugía, radioterapia y quimioterapia. Recientemente se ha usado la foto radiación con derivados

hematoporfirínicos y la inmunoterapia, siendo el objetivo de cada uno de estos tratamientos erradicar el cáncer, normalmente por medio de la terapia combinada donde están asociados más de un tipo de tratamiento [10].

Cirugía: Es uno de los tratamientos contra el cáncer más usado desde la antigüedad, consiste en la remoción de tumor del órgano afectado, se recomienda cuando el tumor es pequeño y está localizado, es decir en estadios iniciales, cuando el cáncer aún no se ha diseminado a otros órganos (metástasis).

Radioterapia: La radioterapia (generalmente rayos gama, radioisótopos como cobalto-60, rayos X de alta energía) es el uso de un tipo de energía, llamada radiación ionizante, para destruir las células cancerosas, reducir el tamaño de los tumores y evitar el daño al tejido cercano sano [10]. La radioterapia lesiona o destruye las células en el área que recibe tratamiento al dañar su material genético y hacer imposible que crezcan y se dividan. Aunque la radiación daña las células cancerosas así como las normales, muchas células normales se recuperan de los efectos de la radiación y funcionan adecuadamente. El objeto de la radioterapia es destruir el mayor número posible de células cancerosas y limitar el daño que sufre el tejido sano del derredor. Existe también la terapia de radiación interna o braquiterapia en la cual se coloca material radioactivo en el sitio donde se localiza el cáncer o en un sitio cercano a él, estos implantes pueden ser temporales o permanentes.

Quimioterapia: se refiere específicamente a los tratamientos farmacológicos contra el cáncer que destruyen las células cancerosas al detener su capacidad de crecer y dividirse. El objetivo primario es destruir las células neoplásicas, preservando las normales. Estos fuertes medicamentos circulan en el torrente sanguíneo y dañan directamente las células que están creciendo en forma activa. Debido a que, por lo general, las células cancerosas crecen y se dividen más rápidamente que las células normales, son más susceptibles a la acción de estos fármacos. Sin embargo, el daño a las células normales es inevitable y explica los efectos secundarios vinculados a estos fármacos. Un factor importante para el éxito de la quimioterapia es el diagnóstico oportuno del tumor (entre 10^9 y 10^{12} células tumorales, es decir, un tumor con tamaño inferior a 1 cm) [10,11].

Inmunoterapia: La inmunoterapia (también llamada terapia biológica o bioterapia) es un tipo de tratamiento del cáncer que ayuda a estimular las defensas naturales del cuerpo para combatir el cáncer. Los anticuerpos monoclonales se fabrican en un laboratorio, y cuando se les da a los pacientes, funcionan como los anticuerpos que el cuerpo produce naturalmente. Los anticuerpos monoclonales se inyectan por vía intravenosa y actúan al atacar las proteínas específicas que se encuentran en la superficie de las células cancerosas o las células que apoyan el crecimiento de las células cancerosas. Cuando los anticuerpos monoclonales se unen a una célula cancerosa, pueden lograr los siguientes objetivos: evitar que las células cancerosas proliferen rápidamente, aplicar radiación directamente en las células cancerosas o transportar medicamentos potentes directamente en las células cancerosas [10,11].

Terapia hormonal: Este tratamiento emplea fármacos que cambian la cantidad o configuración química de las hormonas que circulan en el torrente sanguíneo y que regulan la actividad de determinadas células u órganos en el cuerpo. Se emplea principalmente en el tratamiento de aquellos tipos de cáncer que presentan dependencia hormonal para su desarrollo como son el cáncer de mama y el de próstata [4].

1.5 Agentes quimioterapéuticos

Los agentes quimioterapéuticos pueden clasificarse usando diferentes criterios, ya sea por su mecanismo de acción en las diferentes etapas de síntesis del ADN, transcripción y traducción de las células; por su naturaleza química tomando en cuenta los grupos funcionales presentes en la estructura de las moléculas; o por la interferencia que causan en la división celular, distinguiendo de esta manera los siguientes grupos: Agentes ciclo-celular específicos: son aquellos que ejercen su acción en etapas específicas del ciclo celular por lo que interfieren en la proliferación celular (Figura 3).

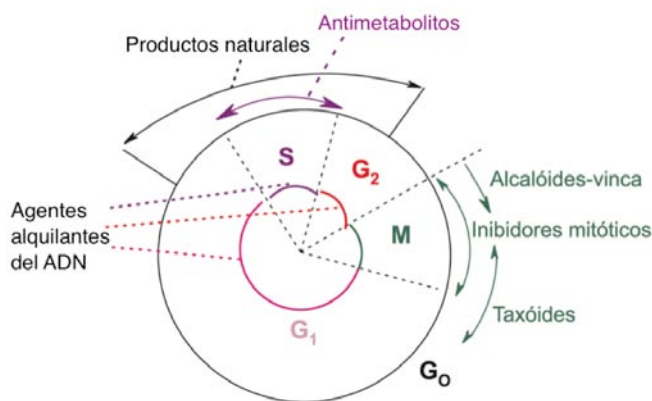


Figura 3. Ciclo celular que muestra las fases donde actúan algunos agentes antineoplásicos (Tomada y modificada de [10]).

Los antimetabolitos son sustancias que reemplazan, inhiben o compiten con un metabolito específico. Estos agentes actúan bloqueando bioquímicamente la síntesis del ADN al inhibir enzimas y procesos de transformación molecular que alteran o detienen la síntesis de nucleótidos o su traducción. Su acción se lleva a cabo durante la fase S del ciclo celular. Algunos ejemplos de antimetabolitos utilizados para tratar clínicamente el cáncer son: el análogo del ácido fólico, el metatrexato (MTX); los antagonistas de las pirimidinas como el fluracil o la citarabina y los análogos de las purinas como la mercaptopurina, pentostatina y cladribina [11].

Los alcaloides de vinca provocan la inhibición del huso mitótico uniéndose a determinadas proteínas microtubulares y por lo tanto interrumpiendo la división celular.

Los taxoides o taxanos son fármacos que se desarrollaron a partir de un compuesto aislado de la corteza de *Taxus brevifolia*. El paclitaxel junto con el docetaxel tienen como diana la tubulina, impiden la despolimerización de los microtúbulos. Esto bloquea la continuación de la mitosis activando los puntos de control, induciendo la apoptosis o bien revirtiendo el ciclo celular a la fase G, donde no se da división celular. Las podofilotoxinas actúan inhibiendo la actividad de las topoisomerasas I y II, bloqueando las fases S o G del ciclo celular[11].

Agentes ciclo-celular inespecíficos: este segundo grupo está formado por agentes citotóxicos que pueden actuar en varias fases del ciclo celular, entre ellos están: los agentes alquilantes adhieren grupos alquilo a las bases del ADN, esta

alteración resulta en la fragmentación del ADN por las enzimas de reparación, las mostazas nitrogenadas, nitrosureas y los alquilsulfonatos son algunos ejemplos [11].

Los antibióticos tumorales actúan intercalándose a las cadenas de nucleótidos lo cual inhibe la síntesis de ADN y ARN, las antraciclinas y la bleomicina son los compuestos más representativos.

Los alcaloides pirrozinínicos forman entrecruzamientos con las cadenas de ADN lo cual inhibe la síntesis de material genético.

Por último encontramos a los complejos de coordinación, los cuales son compuestos de metales con moléculas o grupos aniónicos, llamados ligantes, dichos compuestos forman, por lo general, aductos con las cadenas de ADN inhibiendo su síntesis y además pueden generar la unión cruzada entre dos bases de ADN [11,12].

Entre los agentes antineoplásicos anteriormente mencionados se encuentran varios productos de origen natural que en la actualidad son elaborados sintéticamente.

Así desde hace 65 años, los productos naturales han sido la piedra angular de la farmacología anticáncer, por lo que el descubrimiento de agentes citotóxicos extraídos de animales, plantas y microorganismos se siguen utilizando hoy para el tratamiento del cáncer [11].

Existen, en general, dos tipos de quimioterapias para el tratamiento del cáncer: la quimioterapia convencional o tradicional, en la cual los fármacos actúan contra todas las células que se dividen y la terapia dirigida, la cual actúa sobre los genes y las proteínas específicos del cáncer o sobre las condiciones del tejido que contribuyen al crecimiento y a la supervivencia del cáncer. La Vincristina, el irinotecán, el etopósido y el paclitaxel son ejemplos clásicos de compuestos derivados de plantas; la actinomicina D, mitomicina C, bleomicina, doxorubicina y l-asparaginasa son fármacos obtenidos a partir de microorganismos y la citarabina es el primer fármaco obtenido a partir de un organismo marino [12]. Muchos de estos fármacos continúan siendo prescritos y han salvado o prolongado la vida de millones de pacientes con cáncer. (Figura 4).

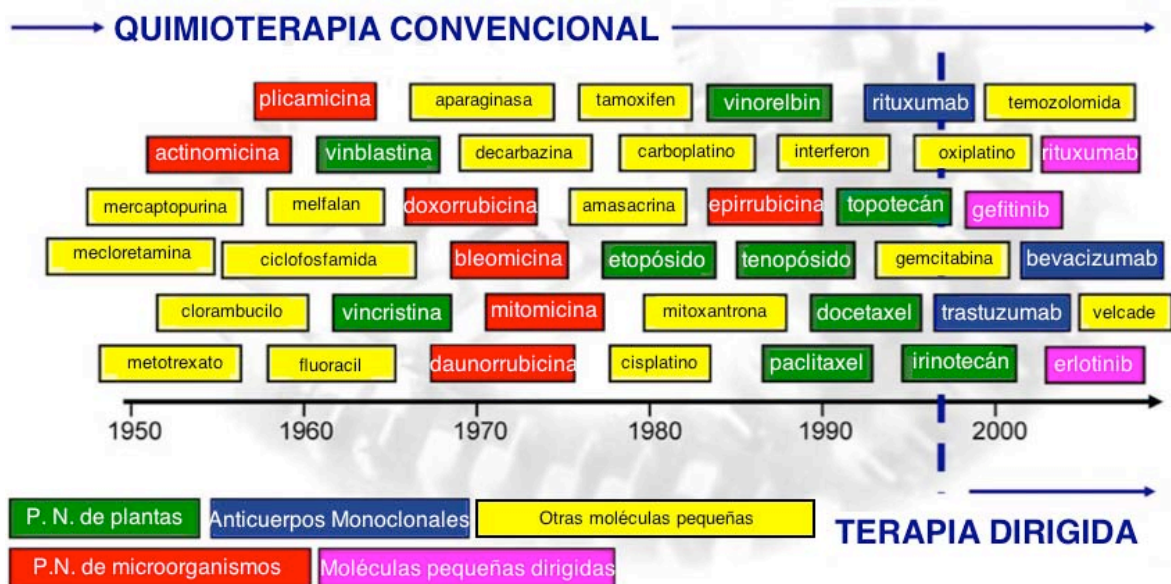


Figura 4. Cinco categorías para los fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer desde hace 50 años. Los productos citotóxicos son los más utilizados desde 1990 con el desarrollo de las terapias moleculares dirigidas usando anticuerpos monoclonales y pequeñas moléculas inhibidoras de cinasas, inmunosupresoras, agentes alquilantes etc. (Tomada y modificada de [11]).

Con el avance en la investigación, a finales de los años noventa, se descubrió un nuevo “universo farmacológico”, en el cual la importancia radicó en el uso de blancos terapéuticos hechos de moléculas pequeñas con receptores específicos como el imanitib o moléculas grandes como el rituximab. Así, terapia dirigida son fármacos u otras sustancias que bloquean el crecimiento y la diseminación del cáncer, al interferir en moléculas específicas (“blancos moleculares”) que participan en el crecimiento, el avance y la diseminación del cáncer.

Inmediatamente, la farmacología antitumoral adoptó éste nuevo concepto y la visión del descubrimiento de fármacos basados en el blanco (también llamada farmacología reversa) se convirtió en el objetivo. La búsqueda de productos naturales para oncología disminuyó, pero creció la esperanza de prever rápidamente un tratamiento personalizado del cáncer con esas “balas mágicas” diseñadas racionalmente, vía simulación computacional u “ómico” (ÓMICAS: disciplinas como la genómica, proteómica, metabolómica y citómica de gran ayuda para descubrir y desarrollar nuevas herramientas terapéuticas) controladas.

El objetivo persiste pero el camino es largo y el progreso ha sido lento. No hay duda de que el tratamiento del cáncer ha cambiado profundamente, con los avances de las terapias dirigidas. Actualmente, las mayores diferencias persisten entre los diferentes tipos de tumores. Los pacientes que sufren de leucemia mieloide crónica tienen una buena probabilidad de supervivencia a largo plazo, gracias al descubrimiento de inhibidores específicos de la tirosina cinasa como el imatinib (Gleevec), dasatinib (Sprycel®) o nilotinib (Tasigna) [11,12]. Sin embargo,

para la mayoría de los tumores sólidos, en particular para las etapas avanzadas y metastásicas, el tratamiento sigue siendo paliativo e insuficiente, a pesar del desarrollo de nuevos fármacos. Estos fármacos son eficaces, de lo contrario no estarían en el mercado, pero en muchos casos, sólo prolongan la vida de los pacientes durante algunas semanas o algunos meses, rara vez un año.

Actualmente los agentes anticáncer se utilizan en combinación ya que pocos tumores son sensibles a ser curados por una sola sustancia [13]. La quimioterapia efectiva depende usualmente de la identificación de combinaciones adecuadas para tratar tumores de tipo específico [14].

Con el avance en la investigación, hoy sabemos que el tratamiento del cáncer no es sólo cuestión de eliminar las células cancerosas induciendo su muerte. Las nuevas estrategias terapéuticas, incluyen también enfocarse en el microambiente tumoral, impedir la angiogénesis, modular la respuesta del sistema inmune o la inflamación crónica, la cuál ha sido asociada con el cáncer [15].

Existe por lo tanto una fuerte necesidad de nuevos fármacos anticancerosos eficaces cuya actividad no sea meramente citotóxica.

1.6 Productos naturales

La naturaleza es una fuente atractiva de nuevos compuestos, que podrían servir como candidatos terapéuticos debido a la gran diversidad química que se encuentra en millones de especies de plantas, animales y microorganismos marinos. Para muchos organismos vivos, esta diversidad química refleja el impacto de la evolución en la selección y conservación de los mecanismos de autodefensa que representan las estrategias empleadas para repeler o destruir a los depredadores.

Para sobrevivir, las plantas han desarrollado mecanismos sofisticados incluyendo un “arsenal químico” elaborado de sustancias tóxicas, tales como terpenos y alcaloides, que inhiben el crecimiento de otras plantas y las hacen poco atractivas para los depredadores [16].

Tradicionalmente, los productos naturales han sido una importante fuente de nuevos medicamentos, y muchos medicamentos exitosos han sido sintetizados originalmente para imitar la acción de moléculas que se encuentran en los compuestos naturales. Los productos naturales son muy diversos y con frecuencia ofrecen actividades biológicas muy específicas [17].

Aún con la llegada de la selección de alto rendimiento y la era post-genómica, más del 80% de las sustancias farmacológicas fueron productos naturales o inspiradas por un compuesto natural [18].

Las áreas que han sido más investigadas (en relación al número de fármacos aprobados) en la industria farmacéutica continúan siendo las enfermedades infecciosas (microbios, parásitos y virus), el cáncer, la hipertensión y la inflamación [19].

Actualmente, la proporción de nuevas sustancias químicas aprobadas, demuestra que hasta el 2010, el campo de los productos naturales produjo alrededor del 50 % de todas las pequeñas moléculas en los años 2000-2010.

De hecho, en el 2010, 10 de las 20 moléculas aprobadas correspondieron a la categoría de agentes antitumorales [19] y han sido las plantas, la fuente más significativa de obtención. Por el momento, existen 16 nuevos compuestos derivados de plantas siendo probados en fases clínicas, 13 de éstos en Fase I o II, y 3 están en Fase III [20].

1.6.1 Triterpenos

Los triterpenos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y son importantes en los mecanismos de defensa de las plantas contra insectos y estrés ambiental. Son compuestos extremadamente comunes y se hallan en una amplia variedad de plantas. Hay al menos 4000 triterpenos conocidos. Muchos de ellos se encuentran en su forma libre como glucósidos, mientras que otros se encuentran en formas combinadas [21]. Se localizan especialmente en las ceras de hojas y frutas y han sido encontrados en resinas, cortezas de árboles y en el latex de varias especies de plantas [22,23].

Los triterpenos son metabolitos secundarios formados a partir oligómeros de isopentenil pirofosfato, los cuales están relacionados con el escualeno. El escualeno por su parte es un gran grupo de compuestos con 30 átomos de carbono arreglados en cinco anillos con varios átomos de oxígeno unidos.

Los triterpenos son sintetizados a partir del pirofosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero, el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). Para su ciclación, tres preniltransferasas sintetizan una cadena lineal pirofosfato de geranilo (GPP), el cual es el precursor de los monoterpenos. La incorporación de otra unidad isoprenica da como producto el pirofosfato de farnesilo (FPP), precursor de los sesquiterpenos. Y una unidad más forma el pirofosfato de geranylgeranilo (GGPP), el cual es el compuesto base para formar diterpenos. El escualeno, precursor de los triterpenos y esteroides deriva biosintéticamente de la dimerización de dos unidades de FPP; dichas unidades pueden plegarse mediante 20 patrones diferentes, en presencia del prenil pirofosfato, para la ciclización y formación de derivados mono, di, tri, tetra o pentacíclicos [24].

Una vez que el escualeno está ciclizado, entra en la vía del ácido mevalónico (MEV), y por acción de dos moléculas de adenosin trifosfato (ATP), el mevalonato se fosforila (MEV-P y MEV-PP) y descarboxila para dar como productos los precursores de los terpenos, el pirofosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). La ruta del ácido mevalónico se lleva a cabo en el citosol. Por esta ruta se sintetizan principalmente sesquiterpenos, triterpenos

y politerpenos. La variedad de triterpenos en la naturaleza es el resultado de la evolución de la gran superfamilia de triterpeno sintasas (Figura 5).

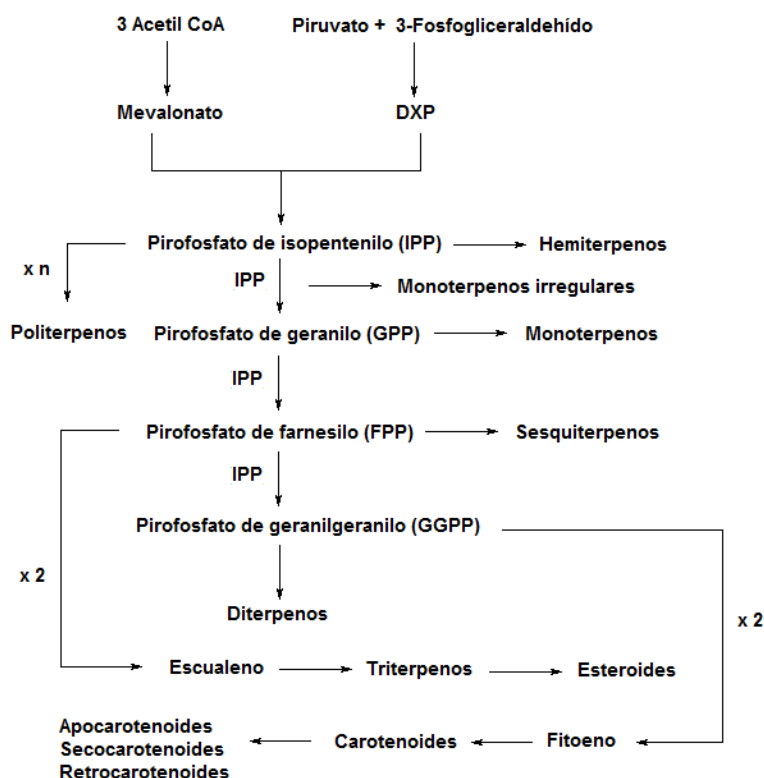


Figura 5. Resumen biosintético de los terpenos. Tomado de [25].

La investigación de triterpenos es amplia y se ha basado tanto en cuestiones quimioprotectoras como terapéuticas. Los estudios se han realizado utilizando varios modelos así como tipos de cáncer, entre los que podemos mencionar: el de mama [22], hígado [26], cáncer de piel, de colon y de próstata [27] y se ha reportado que no se ha presentado ningún tipo de toxicidad en células normales [28].

Se ha reportado también que los triterpenos presentan actividad sobre distintos blancos terapéuticos como son la inflamación, proliferación, apoptosis, invasión, metástasis y angiogénesis [29].

La variedad de compuestos es amplia y principalmente se han referido como anticancerosos, los triterpenos de tipo ursano, oleano, cicloartano y lupano, así como las cucurbitacinas y las quinonas metilúricas [30].

Dichos compuestos han demostrado poseer la capacidad para bloquear la activación de NF- κ B, inducir la apoptosis e inhibir la proliferación celular, la invasión, metástasis y la angiogénesis [29].

Se ha encontrado que la inhibición de la proliferación de células tumorales, como resultado del tratamiento con triterpenos, se lleva a cabo mediante diferentes mecanismos, por ejemplo, algunos triterpenos pueden interferir con la replicación del ADN, inhibiendo la DNA polimerasa [31], la topoisomerasa I [32] o la topoisomerasa II [33], mientras que otros triterpenos pueden inducir modificaciones en el citoesqueleto despolimerizando las fibras de actina [34].

Algunos más, poseen la capacidad de detener el ciclo celular en las fases G0/G1, S, G2/M. Ejemplos de estos son el ácido ursólico, el cual ha mostrado efectos citostáticos tempranos en G1 en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 [35], y el ácido boswelico el cuál mostró actividad citostática en cinco líneas de leucemia (HL-60, K 562, U937, MOLT-4, THP-1) [36].

El enorme potencial de los distintos triterpenos aislados de plantas en los últimos años ha demostrado, que son una gran promesa como quimiopreventivos y agentes terapéuticos de la inhibición de moléculas de señalización clave, mediadores de la inflamación, la proliferación de células tumorales, invasión, metástasis, y la angiogénesis en diversos modelos de cáncer *in vitro* e *in vivo*.

1.7 El ratón desnudo en la evaluación de nuevos fármacos

La característica más interesante del ratón desnudo o carente de pelo es la ausencia de timo. Éstas características se presentan cuando el ratón es homocigoto para el gene recesivo *nu*.

La mutación *nu* fue descrita por primera vez por Flanagan en 1966 [37]. Sin embargo no fue sino hasta 1968 en que se descubrió que el ratón desnudo homocigoto era atímico. Los estudios posteriores revelaron que el timo se mantenía rudimentario después del día 14, además de que los ratones mostraban leucopenia (815 a 3380 leucocitos/ μ L) y linfopenia mantenida en el tiempo, además de atrofia de las células linfoides dependientes del timo en la precorteza de los linfonodos y en las regiones periarteriolas del bazo [38].

Se considera que la condición sin pelo y la falta de desarrollo del timo ocurren por un defecto en el ectodermo embrionario cuyas primeras señales se observan a partir del día 11 de gestación. El sistema inmune de este ratón se caracteriza por tener: una población pequeña de células T que no llegan a madurar, una respuesta inmune humoral confinada a la clase de IgM; un nivel bajo de respuesta

a los antígenos T-dependientes y un aumento compensatorio en el nivel de células NK [39].

Debido a la ausencia de timo, no pueden desarrollar las siguientes inmunorrespuestas:

- La formación de anticuerpos que requieren de células T cooperadoras (T_H o CD4)
- Inmunorrespuestas que requieren células CD4 o CD8
- Respuesta de hipersensibilidad tardía
- Desarrollar células citotóxicas CD8 (T_C)
- Rechazo a injertos (por el requerimiento de células CD4 y CD8)

Dichas características evitan que los ratones desnudos rechacen los injertos de la misma especie (aloinjertos o alotransplantes) e incluso injertos de otras especies (xenoinjertos o xenotransplantes) [37].

El trasplante puede llevarse a cabo con trozos tumorales de 2 a 3 mm de diámetro, así como con células tumorales en suspensión [40]. El implante subcutáneo es el sitio predominante para la transplantación de tumores humanos en el ratón desnudo debido a su simplicidad y fácil acceso al tumor.

Por las características antes mencionadas, el ratón atímico *nu/nu* desnudo, provee el soporte principal para una prueba *in vivo* en el descubrimiento de fármacos y en

el programa de cernimiento preclínico de fase I del Instituto Nacional del Cáncer (NCI, E.U.A.) ya que las interacciones multisistémicas permanecen intactas en el organismo.

1.8 Senescencia

Senescencia deriva de *senex*, una palabra en latín que significa hombre viejo o de edad madura. En biología, la senescencia describe un proceso de deterioro del desarrollo y la madurez, el término es utilizado indistintamente para denotar envejecimiento, sin embargo, el término senescencia aplicado a las células, es para aquellas que cesan su división en cultivo, basados en la especulación de que su comportamiento asemeja el envejecimiento de un organismo [41].

La senescencia fue originalmente definida como un proceso fisiológico que limita la proliferación de células normales. Este proceso, el cual se conoce como “senescencia replicativa” (SR), resulta en principio del acortamiento de los telómeros y otros cambios estructurales después de múltiples divisiones celulares [42]. Los telómeros son secciones de ADN repetitivo (5'-TTAGGG-3' en los vertebrados) y proteínas asociadas que cubren los extremos de los cromosomas lineales y los protegen de la degradación o la fusión en los procesos de reparación de ADN.

La senescencia celular fue descrita por primera vez hace 60 años por Hayflick y Moorehead por lo que también se le llamó “Límite de Hayflick” [43].

El proceso de senescencia está acompañado por cambios en las células, las cuales tienen una morfología aplanada y alargada y muestran elevada

granularidad citoplásmica. Además de las características morfológicas, las células senescentes presentan otras diferencias que las distinguen de las células quiescentes, éstas diferencias incluyen la actividad de la β -galactosidasa a pH 6.0 asociada a la senescencia (SA- β -gal) un marcador común en células humanas, focos de heterocromatina condensada (SAHF por sus siglas en inglés *senescence-associated heterochromatin foci*) evidentes con tinción de Hoechst 33342 o DAPI, y elevados niveles de expresión de p16^{INK4a}, p21^{Waf1}, y p27 entre otros. [44-46].

Además de la senescencia replicativa, la senescencia celular puede ser inducida por otro tipo de estrés no letal que resulta en citostasis persistente con un fenotipo morfológico y bioquímico distinto, como por ejemplo la activación de oncogenes [47] o el daño al DNA [48].

La senescencia inducida por oncogenes (SIO) es más rápida que la RS y además es independiente del acortamiento de los telómeros; se sabe que es desencadenada por la señalización anormal en una célula, la cual es mediada por los productos protéicos de oncogenes y está a menudo acompañada por la activación de la vía de supresores de tumores [49]. Existen vías de señalización que son compartidas por ambos tipos de senescencia SR y SIO, y son las que involucran a p53 y p16 / PRB (supresor del tumor de retinoblastoma). Algunos oncogenes tales como RAS, STAT5 y la ciclina E no sólo inducen senescencia, sino también desencadenan una respuesta a daños en el ADN, que se asocia con su hiper-replicación la cual parece estar implicada en SIO [50].

Otra forma de inducir senescencia celular es por medio de fármacos, a esto se le conoce como terapia para inducir senescencia (TIS). Aunque TIS es causada por agentes genotóxicos como la irradiación y los fármacos quimioterapéuticos, comparte muchas similitudes con SIO, por ejemplo, los marcadores [51].

Existe una amplia variedad de agentes contra el cáncer que pueden inducir cambios morfológicos asociados a la senescencia en las células tumorales. Estos fármacos incluyen al inhibidor de topoisomerasa I, la camptotecina [52] el inhibidor de la topoisomerasa II, la doxorubicina [53], los agentes que dañan al ADN, el cisplatino y doxorubicina [54] y la radiación- γ [55]. Por lo tanto, diferentes fármacos pueden activar la senescencia a través de diferentes vías de señalización. Las vías de respuesta a los daños en el ADN desempeñan un papel crítico en SIO y SR, así como en TIS. Por ejemplo, el inhibidor de la ADN metiltransferasa, 5-azacitidina, causó la senescencia en células de cáncer de próstata DU145 y LNCaP en un plazo de 7 días después del tratamiento [56]. El sirtinol, un inhibidor de la ADN histona acetilasa, indujo senescencia en la línea celular de cáncer de mama MCF7 y de pulmón H1299 después de 24 horas de exposición a este agente [57]. El ganoderiol F, un triterpeno tetracíclico, indujo senescencia en el 50% de las células de la línea HepG2 después de 18 días de tratamiento continuo [58]. Estos estudios demostraron además, que la inducción de senescencia en tumores puede conseguirse con menores concentraciones de

agentes terapéuticos, que pueden ayudar a disminuir los efectos tóxicos relacionados con algunos los fármacos [51].

La terapia para inducir la senescencia tiene varias características que pueden ser beneficiosas para la gestión y el tratamiento del cáncer. En primer lugar, la senescencia estimula una detención persistente del crecimiento, y las células senescentes pueden mantenerse en un estado estable, incluso *in vivo*. Un ejemplo, son los melanocitos senescentes que se han identificado en nevos benignos (proliferación de distintos tipos de células en la piel) que permanecieron latentes durante años [59]. También se ha informado de que un subconjunto de células de cáncer de próstata senescentes persistió durante al menos 6 semanas después del establecimiento de xenoinjertos con células senescentes inducidas por doxorubicina en cáncer de próstata [60].

La senescencia inducida por fármacos combinada con otros enfoques terapéuticos clásicos, puede llegar a ser más eficaz en el tratamiento de cáncer. Por lo tanto, una mejor comprensión de la senescencia celular y la exploración de la modulación de este proceso celular enfocado como una intervención terapéutica en la terapia del cáncer se ha convertido en un área de una extensa investigación.

1.9 Marcadores moleculares de arresto del ciclo celular y senescencia

La senescencia inducida por el tratamiento con algún compuesto o fármaco provoca ciertas características celulares que podrían ser benéficas para el tratamiento del cáncer.

Actualmente, no existen marcadores definitivos para determinar la senescencia, sin embargo, se está evaluando si bajo el tratamiento de algún fármaco, los niveles de ciertas proteínas son más altos que en células no tratadas o en células proliferando para determinar si esas proteínas podrían servir como marcadores de diagnóstico.

Sabemos que las células senescentes permanecen viables y que metabólicamente están activas pero se encuentran permanentemente arrestadas en parte, por la disminución de la expresión de PCNA y el incremento en la expresión de inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas tales como p21^{Waf1/Cip1} y p27^{Kip1} [60].

PCNA

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína similar a un anillo, el cual está involucrado en la maquinaria de replicación, reparación y recombinación celular. Cuando no está involucrado en la replicación del DNA, PCNA (generalmente bajo el control de p53) está relacionado con el arresto y la reparación del daño en el DNA nuclear e incluso del DNA mitocondrial [61] o bien, cuando la reparación no es posible, la ausencia o los bajos niveles de PCNA pueden conducir a las células a apoptosis [62].

La interacción de PCNA con p21 que conduce al arresto celular es probablemente la interacción más estudiada. La unión de PCNA con p21 detiene la replicación del DNA pero no inhibe la reparación de éste [63]. Por otro lado la unión de p21 a PCNA puede inducir el arresto en las fases G1 o G2 en células deficientes en p53 [64].

p21^{Waf1}

El arresto de las células senescentes está mediado por la activación de p53, el cual detiene el ciclo celular a través de la inducción de p21^{Waf1/Cip1/Sdi1}, un inhibidor de las cinasas dependiente de ciclinas (CDK's), el cual inhibe directamente la actividad de las enzimas de los complejos ciclina-CDK2 y ciclina-CDK4 [65].

Por lo anterior P21^{WAF1/Cip1} ha sido identificado como un mediador del arresto celular inducido por p53, como un regulador directo de la actividad de las CDK y como un gen cuya expresión es inducida en concomitancia con la senescencia celular [66].

p27^{Kip1}

p27^{Kip1} es también un inhibidor de la cinasas dependientes de ciclinas CDK2 y CDK4, el cual por ejemplo es un promisorio marcador de la senescencia en células ya que el gen CDKN1B/p27^{Kip1} que codifica para la proteína, no está mutado ni inactivo en una gran cantidad de tipos de cáncer [60].

1.10 Justificación

Los metabolitos secundarios de las plantas son una de las fuentes más importantes en la búsqueda de moléculas activas para desarrollo de nuevos medicamentos [68].

En este sentido, los triterpenos son importantes constituyentes activos obtenidos a partir de diversas plantas, estudios previos han demostrado que podrían ser considerados para el tratamiento del cáncer ya que se ha encontrado que afectan diversas vías celulares relacionadas con esta enfermedad.

Aunque no existe una regla formal, varios autores y revistas especializadas consideran un compuesto citotóxico *in vitro* cuando éste presenta una concentración media (CI_{50}) menor de 4 μM .

Sin embargo, una molécula para ser considerada como fármaco potencial, debe tener una adecuada selectividad sobre las células blanco y el menor efecto tóxico para el organismo receptor.

Por ejemplo, el ácido ursólico, un triterpeno pentacíclico, con una CI_{50} de 22.3 μM contra células PC-3 (cáncer de próstata) se consideraría inactivo, sin embargo, a la dosis de 200 mg/Kg administrada dos veces por semana durante seis semanas este ácido inhibió el crecimiento tumoral en ratones desnudos inoculados con células de cáncer de próstata DU145 [69].

Un ejemplo más notable lo presentó el ácido β -acetilboswélico que presentó una CI_{50} de 70 μM , sin embargo a la dosis de 100 $\mu\text{mol/Kg}$ de peso administrada diariamente durante tres semanas inhibió el crecimiento tumoral de ratones *nu/nu* inoculados con células PC-3 [70]. Por otro lado, utilizando la misma línea de cáncer humano, el ácido β -acetoxitirucálico, un triterpeno tetracíclico presentó una CI_{50} de 28 μM y además inhibió el crecimiento tumoral en ratones desnudos inoculados con células PC-3 [10 $\mu\text{mol/Kg/día}$ por dos semanas] [71].

En todos los trabajos antes mencionados no se han observado efectos tóxicos relacionados con la administración de dichos compuestos.

Estos resultados indican la importancia que tienen los triterpenos como agentes anticancerosos *in vivo*, porque si bien su citotoxicidad en líneas de cáncer humano fue baja, también demuestran que los ensayos en líneas celulares varias veces no reflejan la actividad *in vivo* de algunos compuestos.

Dentro de la gran gama de triterpenos que han presentado propiedades antiinflamatorias y citotóxicas destacan, por su abundancia y relativa facilidad de obtención, los triterpenos del tipo del cicloartano que están presentes en la resina de *Parthenium argentatum* conocida como guayule, en particular la argentatina B.

1.11 Hipótesis

Si la argentatina B, un triterpeno de tipo cicloartano inhibe la proliferación de las células cancerosas en cultivo *in vitro*, entonces es factible que éste compuesto presente actividad antitumoral en un modelo de xenotransplantes.

2. OBJETIVOS GENERALES

Determinar el mecanismo de acción de la argentatina B en las líneas celulares HCT-15 y PC-3 en cultivo *in vitro*. Evaluar el efecto antitumoral de la argentatina B en ratones atímicos xenotransplantados subcutáneamente con células de carcinoma de colon HCT-15 y con células de carcinoma de próstata PC-3.

2.1 Objetivos particulares

- Aislar y purificar la argentatina B a partir de la resina obtenida como subproducto durante el proceso de obtención del hule de la especie *Parthenium argentatum* A. Gray.
- Determinar el efecto de la argentatina B en el ciclo celular de las líneas celulares HCT-15 y PC-3 *in vitro*.
- Determinar el efecto de la argentatina B en la muerte de las líneas celulares HCT-15 y PC-3 *in vitro*.
- Evaluar la variación en la expresión de los reguladores negativos del ciclo celular p21 y p27.
- Evaluar la eficacia farmacológica *in vivo* de la argentatina B en xenotransplantes con las líneas tumorales humanas de colon HCT-15 y próstata PC-3.

3. ANTECEDENTES

3.1 *Parthenium argentatum* (Gray)

Clasificación Taxonómica

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Subfamilia:	Asteroideae
Tribu:	Heliantheae
Género:	<i>Parthenium</i>
Especie:	<i>P. argentatum</i>

Nombre binomial

Parthenium argentatum A. Gray

P. argentatum es un arbusto que crece en las zonas áridas del norte de México y del Sur de los Estados Unidos de América (Figura 6). Este arbusto es conocido con el nombre de “guayule”, que significa “planta que contiene hule”.



Figura 6 . Imagen de un arbusto de *Parthenium argentatum* Gray.

El guayule se explotó comercialmente -por su contenido de hule- desde inicios del siglo pasado (1903-1951). El aprovechamiento industrial de esta especie alcanzó su auge durante la segunda guerra mundial, auge que decayó a la llegada del hule producido sintéticamente.

En nuestro país, los estudios sobre *P. argentatum* se iniciaron en forma sistemática en 1970. En 1977, durante la Segunda Conferencia Internacional sobre el Guayule, se planteó la posibilidad de hacer económicamente más atractiva la explotación de guayule, mediante la utilización de los compuestos presentes en la resina. Dicha resina se obtenía como material de desecho durante el proceso de extracción del hule [61].

En este sentido, las investigaciones químicas de la especie, demuestran que esta planta sintetiza de manera muy importante triterpenos del tipo cicloartano y lanostano, conocidos como argentatinas e isoargentatinas, respectivamente [62]. Estos compuestos se aíslan con un elevado rendimiento del desecho resinoso obtenido como subproducto en el proceso industrial para el aislamiento de hule natural a partir del guayule [63].

Se estima que la resina constituye el 5% en peso del arbusto y que un 55% de la resina está constituido por triterpenos [64], donde aproximadamente la mitad son las argentatinas [63].

3.2 Argentatina B

La argentatina B es un triterpeno de tipo cicloartano, la cual constituye el 10% del total de la resina obtenida de *Parthenium argentatum* (Figura 7).

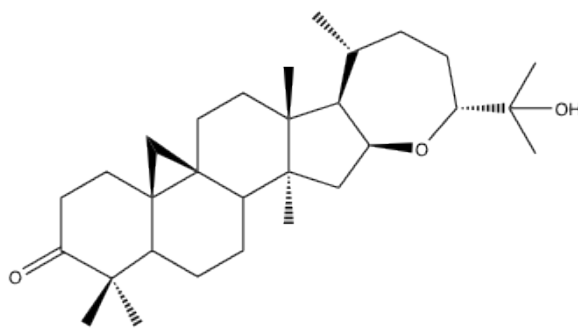


Figura 7. Argentatina B [(16 β ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona]

Tomando en cuenta los antecedentes biológicos de los cicloartanos, así como la naturaleza química y la elevada abundancia en la que se encuentra la argentatina B en la resina de *P. argentatum*, en un principio se planteó investigar las

propiedades biológicas de dicho compuesto. Así, en una etapa preliminar, nuestro grupo de investigación demostró que la argentatina B inhibe, de manera dependiente de la dosis, el edema inducido por el promotor de tumores 13-acetato-12-O-decaínoil forbol (TPA) en el modelo de inflamación de oreja de ratón [65]. Además se demostró también que la argentatina B es un inhibidor no competitivo de la unión 3H-estradiol a su receptor en tumores de mama humanos dependientes de hormonas [66].

Posteriormente, se evaluó la propiedad de inhibición de proliferación de la argentatina B en las líneas celulares de cáncer de leucemia K562, mama MCF-7, próstata PC-3, colon HCT-15 y SNC U251 y se demostró que la argentatina B, presentó efecto citostático a concentraciones 24 a 79 μM (Tabla 2). Además se determinó que la argentatina B no mostró efectos citotóxicos ni genotóxicos a las mismas concentraciones en pruebas hechas con el modelo de micronúcleos en linfocitos humanos en proliferación [67].

Tabla 2. Actividad citotóxica de la argentatina B en diferentes líneas celulares.

Tratamiento	IC_{50} (μM) \pm EE				
	Líneas celulares de cáncer humano				
	U251 (CNS)	PC-3 (próstata)	HCT15 (colon)	MCF-7 (mama)	K562 (leucemia)
Argentatina B	36.4 \pm 6.79	33.41 \pm 3.71	24.14 \pm 5.58	33.06 \pm 5.95	79.38 \pm 0.08
Doxorrubicina	0.09 \pm 0.02	0.32 \pm 0.02	0.23 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	0.28 \pm 0.01

4. METODOLOGÍA

4.1 Aislamiento de la argentatina B

La resina, un subproducto de desecho del proceso industrial para obtener hule natural de *P. argentatum*, fue donada por la Comisión Nacional de Zonas Áridas CONAZA (Coahuila, México). Los procedimientos de cromatografía en columna abierta se efectuaron en columnas de vidrio de diferentes capacidades, se empleó tonsil y gel de sílice F₂₅₄ como adsorbentes. Para los procedimientos de extracción se utilizaron disolventes de grado industria destilados en el laboratorio. Los disolventes y reactivos empleados para efectuar la purificación, el análisis y las reacciones fueron de grado reactivo analítico (Sigma). Se emplearon placas recubiertas con gel de sílice F254 de 0.2 mm de espesor para los análisis cromatográficos en capa fina (CCF). El revelado se realizó con luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y larga (350 nm), y con una solución de sulfato cérico.

163.43 g de resina se disolvieron en 100 ml de hexano, posteriormente se colocaron en una proporción 1:1 tonsil con el propósito de hacer el punto de aplicación y se percolaron a través de una columna empacada con tonsil 1:10, que posteriormente se eluyó con disolventes de polaridad ascendente hexano, AcOEt y MeOH, para obtener fracciones de 100 mL.

4.2 Fármacos y reactivos

El Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) se compró a Caisson Laboratories INC, USA. SFB (Suero Fetal Bovino), EDTA, anfotericina B y L – glutamina se compraron en Gibco, BRL (Grand Island, NY, USA). Ioduro de Propidio, Hoechst 33342 y cisplatino (cis-Diammineplatinum (II) dicloride) fue comprado a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tripsina, DMSO, Annexin-V-Fluos staining kit se compró a Roche Diagnostics (GmbH, Mannheim, Germany). Senescence β -Galactosidase Staining Kit se compró a Cell Signaling Technology (Danver Massachusetts, USA). Se utilizó Aceite de ajonjolí extra virgen, de la marca San Miguel®. Se empleó agua de alta calidad, para preparar todas las soluciones, la cual se obtuvo de Milli-Q Reagent Water System (Continental Water Systems; El Paso, TX, USA).

4.2.1 Soluciones

Las soluciones concentradas (1 mg/mL) de cisplatino se prepararon con solución salina. Las soluciones concentradas de cisplatino (20 mM) utilizadas para todas las líneas celulares se prepararon en DMSO. La argentatina B (40mg/mL) utilizada para administrar a los ratones, se disolvió en aceite de ajonjolí. Las soluciones concentradas de argentatina B (20 mM) utilizadas para las pruebas con líneas celulares se prepararon con DMSO y se almacenaron a -20 °C. Las concentraciones finales de la argentatina B se prepararon diluyendo la solución concentrada con RPMI 1640.

4.3 Líneas celulares

Las dos líneas celulares de cáncer humano que se utilizaron fueron: HCT-15 ATCC® CCL-225™ (cáncer de colon) y PC-3 ATCC® CRL-1435™ (cáncer de próstata) (Rockville, Maryland, USA). Las células se rutinariamente como monocapa en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, 250 U/mL de sulfato de estreptomicina, 100 IU/mL de penicillina, 0.25 mg/mL de amphotericina B y 2mM de L -glutamina, e incubadas a 37 °C en atmósfera 5% CO₂ con alta humedad. Las células se cosecharon con tripsina 0.025% y EDTA 1mM. Ambas líneas celulares se incubaron con argentatina B a concentraciones de 24 µM para HCT-15 y 34 µM para PC-3 durante 48 o 72h.

Se utilizó DMSO como control negativo y cisplatino como control positivo.

4.4 Detección del ciclo celular por Citometría de Flujo.

Se determinó el ciclo celular mediante ensayos de Citometría de flujo. 1.5×10^5 células fueron sembradas en cajas de 6 pozos y tratadas con argentatina B durante 48 y 72 h. Las células fueron cosechadas con tripsina, lavadas con PBS y resuspendidas en EtOH 70% a 4°C durante 10 min. Transcurrido el tiempo, las células fueron lavadas con PBS e incubadas durante 60 min en una solución de PBS con RNAsa 50 U/mL a 37°C. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS y teñidas con una solución de ioduro de propidio 20 uL/mL en PBS durante 2 min. La distribución del ciclo celular fue analizada con un citómetro de flujo

FACSCalibur (Becton Dickinson, USA). 10000 células fueron analizadas con el programa BD CellQuest Pro Software.

4.5 Detección de células apoptóticas por Citometría de flujo

Las líneas celulares HCT-15 y PC-3 tratadas fueron cosechadas con tripsina y lavadas dos veces con PBS frío (4°C). La muerte de las células se determinó utilizando Annexin-V-Fluos staining kit Roche, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células fueron analizadas utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur, Becton Dickinson, USA, 10000 células fueron analizadas con el programa BD CellQuest Pro Software.

4.6 Detección de células apoptóticas mediante la tinción con HOECHST 33342

5×10^4 células fueron sembradas en placas de 24 pozos e incubadas con argemone B. Posteriormente, las células fueron fijadas con una solución de formaldehído 3.7% durante 10 min, se realizó un lavado de 10 min con PBS, posteriormente otro lavado con agua desionizada y finalmente las células se tiñeron con Hoechst 33342 diluido 1:1000 en PBS durante 15 min a 37°C en oscuridad. Las observaciones se hicieron con un microscopio Nikon Optiphot-2. Las células con el núcleo fragmentado o condensado fueron consideradas apoptóticas.

4.7 Tinción citotoquímica de SA-β-Galactosidasa

7.5 x 10³ células se sembraron en placas de 24 pozos y se incubaron con argentatina B. La tinción citoquímica se realizó con SA-β-galactosidasa Staining Kit, a pH 6.0, utilizando las instrucciones del kit. El porcentaje de células teñidas de azul, es decir, positivas para SA-β-galactosidasa fue determinado contando las células por campo, teniendo en cuenta contabilizar 300 células por cada muestra o 10 campos por preparación. El conteo celular se realizó en un microscopio de campo claro Nikon Optiphot-2. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

4.8 Ensayos de proliferación y Western Blot

Para evaluar la proliferación celular, 5 x 10³ células HCT-15 o PC-3 se sembraron en placas de 96 pozos, y se incubaron con argentatina B diluida en 0.2% de DMSO a concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 μM, durante 48 h. La proliferación fue evaluada por un ensayo colorimétrico de MTT.

Para el análisis por Western Blot, las células fueron resuspendidas en buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% NP40; 0.25% deoxicolato de sodio), conteniendo 100 μl/ml de cocktail de inhibidor de proteasas (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) y 10 μl/ml de inhibidor de fosfatasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). El contenido de proteína total fue determinado, usando el Kit de ensayo de proteínas DC (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Un total de 30 μg de proteína fue separado con 10% SDS-PAGE y transferido a una membrana PVDF (Millipore, Billerica, MA, USA). Las

membranas fueron incubadas a 4°C, toda la noche con anticuerpos específicos, diluidos 1:1,000 y posteriormente lavados e incubados con los anticuerpos secundarios HRP apropiados, diluidos 1:5,000 (Zymed Laboratories, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Los anticuerpos primarios utilizados fueron: rabbit-monoclonal anti-human PCNA (GeneTex Inc., USA), mouse-monoclonal anti-human p21, and mouse-monoclonal anti-human p27 (ambos de Santa Cruz Biotechnology, USA). Las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia utilizando Amersham ECL plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA). Como control interno se utilizó el anticuerpo: rabbit anti-GAPDH (GeneTex Inc.).

4.9 Xenotransplantes

Se adquirieron ratones machos *nu/nu*, de 6-8 semanas de edad en el Bioterio del Instituto Nacional de Nutrición “Salvador Zubirán” (México D.F., México), los ratones se mantuvieron en microaisladores, en ambiente libre de patógenos, alimentados *ad libitum*, con temperatura ambiental de 22° C ± 1° C, humedad relativa de 55% y ciclos luz-oscuridad de 12/12 hrs. Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo a la Guía de cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Cancerología (México D.F., México). Grupos de seis animales se implantaron con 1.5×10^6 células de las líneas de cáncer de colon HCT-15 y cáncer de próstata PC3, las cuales se inocularon subcutáneamente en el flanco derecho del dorso del animal. Las células se resuspendieron en DMEM sin rojo de fenol ni suero fetal bovino para la

inoculación. Se monitoreó el crecimiento del xenotransplante hasta que los tumores alcanzaron una medida promedio aproximada de 5x5 mm (día 0), momento en el cual se inició con el tratamiento con argentatina B. Los ratones recibieron 125, 250 or 500 mg/kg de argentatina B disuelta en aceite de ajonjolí extravirgen San Miguel ® en los días 0, 7 y 14, administrada intraperitonealmente (Tabla 3). Los animales control negativo VH recibieron aceite de ajonjolí administrado intraperitonealmente. Los animales control recibieron cisplatino 4 mg/Kg de cisplatino disuelto en solución salina 0.9%. Los ratones se pesaron cada tercer día. El tumor fue medido con calibrador (Vernier digital), tres veces por semana. El volumen tumoral fue calculado usando la fórmula: Volumen (mm³) = (largo (mm) x ancho² (mm)) π/4. El volumen relativo tumoral (VRT) fue calculado usando la fórmula: (volumen al día x/ volumen en el día 0) x 100. El experimento se llevó a cabo durante 21 días, al final los animales fueron pesados y sacrificados.

Volumen Tumoral:

$$\text{Vol.} = a \times b^2 \pi / 4$$

Donde a = Largo del tumor b = Ancho del tumor.

Volumen Relativo del Tumor: Se calculó el VRT los días 0, 7, 14, 21, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{VRT} = \text{Vol. al día (n)} / \text{Vol. al día 0} \times 100$$

El valor anterior indico el porcentaje de incremento en los días indicados.

Tabla 3. Esquema de administración empleado para la evaluación de la argentatina B. qd: cada día. Se empleo un esquema de administración intermitente, en el que el compuesto es administrado cada 7 días en 3 ocasiones (qd 7x3) empleando dosis de 125, 250 y 500 mg/Kg. (n=6)

Tratamiento	Dosis	Esquema
VH (aceite de ajonjolí)	--	qd 7 x 3
Argentatina B 125	125 mg/Kg	qd 7 x 3
Argentatina B 250	250 mg/Kg	qd 7 x 3
Argentatina B 500	500 mg/Kg	qd 7 x 3
Cisplatino	4 mg/kg	qd 7 x 3

Se administraron 125, 250 y 500 mg/Kg de peso, debido a que es la primera evaluación *in vivo* usando el modelo de xenotransplante que se realiza con este compuesto; dichas dosis permitirían observar la posible respuesta biológica.

El cisplatino se administró en la dosis recomendada para su evaluación en modelos *in vivo* (4 mg/Kg).

4.10 Prueba de toxicidad en ratones sanos CD1 .

Ratones hembra CD-1, de 6 semanas de edad y 25-30 g de peso, fueron administrados intraperitonealmente una vez por semana durante tres semanas, con tres dosis de 125, 250, y 500 mg/kg de argentatina B. Siguiendo el mismo esquema, probamos el efecto de tres dosis de 2, 4 y 8 mg/Kg de cisplatino. El peso y conducta de los ratones fue registrado cada tercer día durante el tratamiento y el periodo de observación (7 días después de la última inyección). Los ratones fueron pesados y sacrificados 22 días después de la primera

inyección. Se realizaron análisis histopatológicos de diferentes órganos, incluyendo el corazón, pulmones, hígado, riñón, intestino, bazo, estómago y ovarios de los ratones, en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

4.11 Análisis de datos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Las comparaciones entre los grupos tratados y control se realizaron con la prueba de ANOVA de una vía y la de Tukey-Kramer. Los datos se expresaron como la media \pm ES. Se consideró un nivel de significancia cuando $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Obtención de la argentatina B y otros compuestos

Se reunieron las fracciones 4-204 y se obtuvieron 9.56 g de argentatina B, los cuales se purificaron por recristalización con acetato de etilo y hexano. Las aguas madre de las fracciones 126-204 se reunieron y cromatografiaron empleando una columna 1:10 de gel de sílice como adsorbente y mezclas de Hex-AcOEt como eluyentes (de 0 a 100% de AcOEt). De esta columna se aislaron 6.07 g más de argentatina B, los cuales se purificaron por recristalización. La argentatina B fue purificada al 99% por procedimientos convencionales, su identificación se realizó mediante la comparación de las constantes físicas y espectroscópicas (punto de fusión y Resonancia Magnética Nuclear ^1H y ^{13}C) las cuales han sido reportadas previamente en la literatura [62,64,72]. En total, se obtuvieron 15.63 g de argentatina B.

La columna de separación que se montó para aislar la Argentatina B permitió aislar los compuestos (Figura 8) que se enlistan a continuación:

- Argentatina A= 881.3 mg
- Argentatina D= 249.6 mg
- Guayulina C= 149 mg

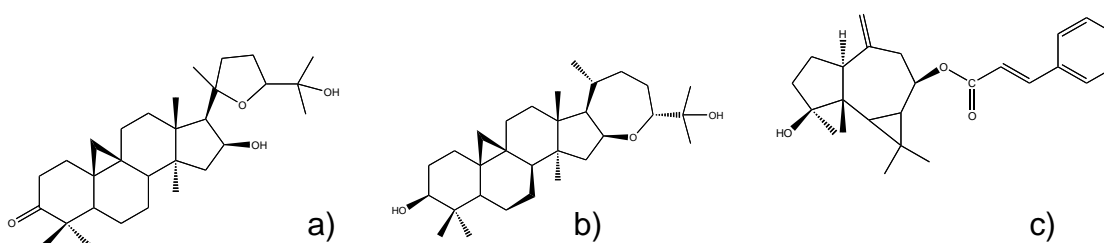


Figura 8. Estructura química de: a) argentatina A, b) argentatina D y c) guayulina c.

Con la guayulina C, se realizó además la evaluación de la prueba de inhibición de edema inducido por TPA en oreja de ratón [73]. El ensayo de TPA (*13-Acetato-tetrahydroforbol*) consiste en tratar ambas orejas con este agente y sólo en la oreja derecha aplicar el producto a ensayar, la actividad antiinflamatoria se determina comparando el peso de la oreja tratada con la no tratada.

El resultado obtenido con el tratamiento con guayulina c fue un porcentaje de inhibición de 54% (Tabla 4).

Tabla 4. Evaluación de la actividad anti inflamatoria de la guayulina C en el modelo de inflamación inducido por TPA.

Muestra	Dosis ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$)	Inhibición (%)
Vehículo $\text{Me}_2\text{CO}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$	--	--
Guayulina C	1	54.14

Efecto en el edema en oreja de ratones hembra CD-1. Medidas de seis animales en experimentos independientes. Los datos se expresan como el % de la media \pm DS del peso de la oreja (n=6). Todos los datos fueron analizados con la prueba t- Student.

5.2 Cambios en la progresión del ciclo celular

Para investigar si la argentatina B tiene algún efecto en la progresión del ciclo celular, analizamos por citometría de flujo, mediante la tinción con ioduro de propidio las células tratadas. Como puede observarse en la Figura 9A, no se presentaron cambios significativos en las fases del ciclo celular de la línea HCT-15 después de 48 h de tratamiento. Sin embargo, las células tratadas con argentatina

B por 72 h muestran una tendencia a incrementar la proporción de células en la fase sub G1, aunado a la reducción del número de células en G2/M, pero la proporción de célula en la fase S permanece sin cambios. Las células tratadas con cisplatino a 72 h producen un incremento significativo en la proporción de células sub G1, y una menor proporción de células en las fases S y G2/M; aunque esta reducción no es significativa. Por otro lado, los cambios en el ciclo celular de la línea PC-3 después de 48 h fueron observados únicamente en las células tratadas con cisplatino (Figura 9B). Sin embargo, el tratamiento con argentatina B durante 72 h indujo un incremento significativo en la proporción de células en la fase sub G1 aunado a la reducción de células en G0/G1, e inesperadamente un incremento modesto en las células de la fase S. De nuevo, el número de células en la fase G2/M no fue alterado por efecto de la argentatina B. En contraste, el cisplatino provoca un incremento elevado en las células de la fase sub G1, con la reducción de la proporción de células en las fases G0/G1, S y G2/M (Fig 9B).

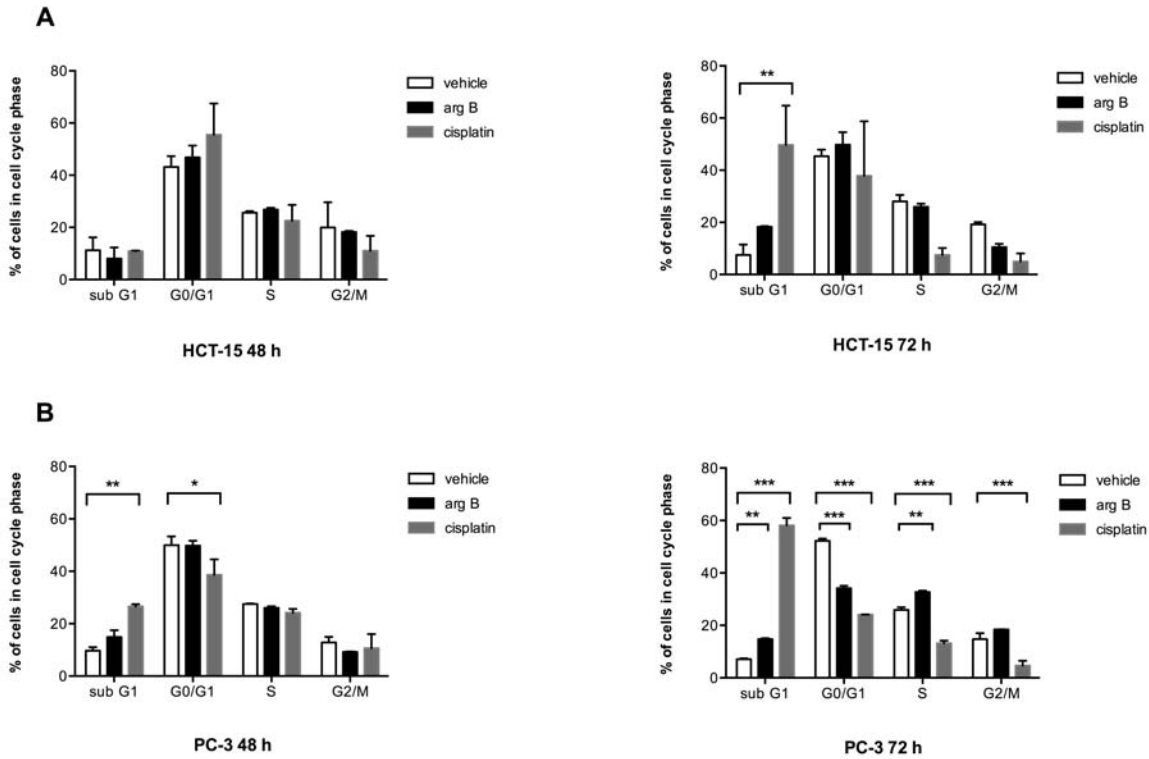
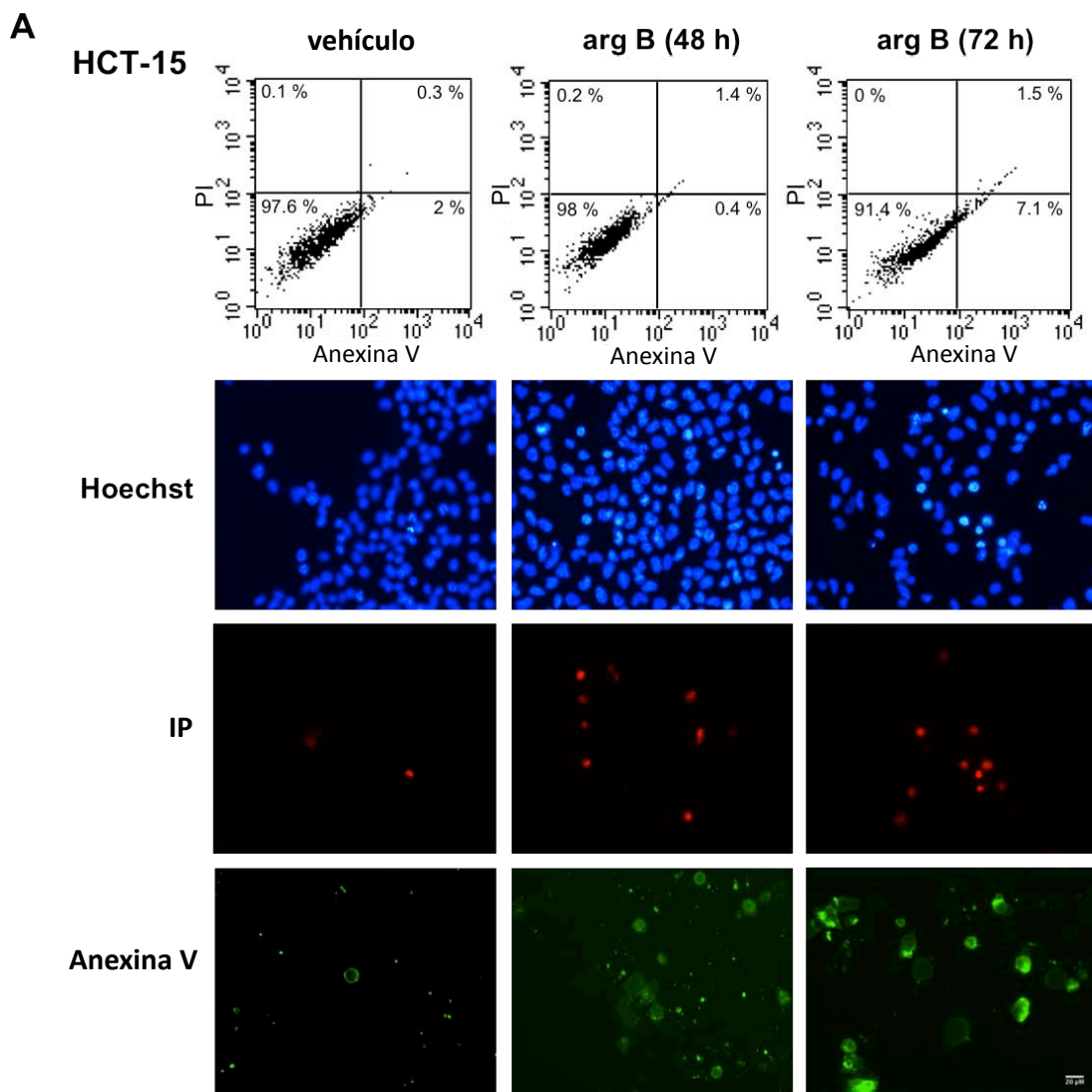


Figura 9. Efecto de la argentinina B en la progresión del ciclo celular. Las líneas celulares HCT-15 (A) y PC-3 (B) fueron incubadas con argentinina B 24 μ M o 34 μ M respectivamente, durante 48 y 72 h. Como control positivo las células fueron tratadas con cisplatino. Los controles negativos recibieron únicamente DMSO 0.2%. Las células fueron teñidas con ioduro de propidio, y la distribución del ciclo celular fue analizada con citometría de flujo utilizando Software BD CellQuest™ Pro. Los datos representan el promedio de tres ensayos independientes. Las barras indican el error estándar de la media. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, y *** $p < 0.0001$ vs. vehículo (ANOVA de una vía y Prueba de Tukey-Kramer).

5.3 Detección del efecto apoptótico de la argentinina B

Las líneas celulares HCT-15 y PC-3 fueron incubadas con argentinina B durante 48 y 72 h. La muerte celular fue evaluada mediante la tinción con Anexina V y yoduro de propidio (IP). Como se muestra en la Figura 10A, la argentinina B induce un modesto incremento en la apoptosis temprana (7.1%), y en la apoptosis tardía (1.5%) de HCT-15. De la misma manera es posible observar un ligero

incremento en la apoptosis temprana (4.3%), en la apoptosis tardía (6.1%), y en la necrosis (3.9%) en la línea celular PC-3 (Figura 10B). De acuerdo con estas observaciones, la argentatina B es incapaz de inducir un fuerte efecto citotóxico.



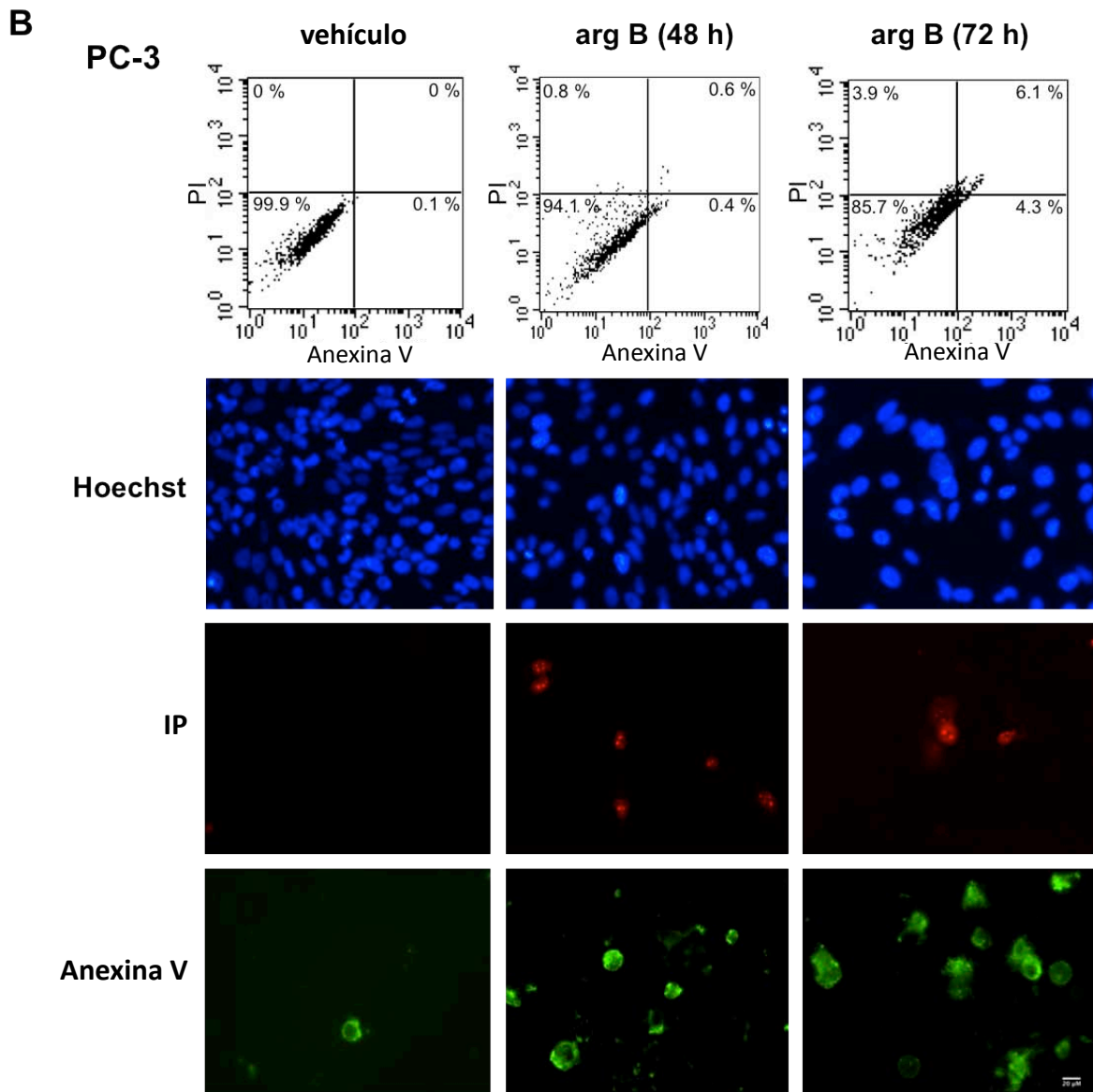


Figura 10. Determinación del efecto apoptótico de la argentatina B. Las líneas celulares HCT-15 y PC-3 fueron incubadas con argentatina B o con el vehículo durante 48 y 72 h. La presencia de núcleos apoptóticos o fragmentados fue evaluada mediante la tinción con reactivo de Hoescht. La muerte celular fue evaluada mediante la tinción con Anexina V y yoduro de propidio (IP). A) Línea celular HCT-15; B) Línea celular PC-3. Se muestran las imágenes representativas de tres experimentos independientes. Todas las fotografías fueron tomadas con el mismo aumento.

5.4 Detección del efecto senescente de la argentatina B

Con base en los resultados anteriores, y con el objetivo de explicar el efecto de la argentatina B observado *in vivo*, realizamos una prueba para determinar el estado senescente de las células en cultivo, tratadas con argentatina B. Después de la incubación con argentatina B durante 72 h, ambas líneas celulares presentaron cambios fenotípicos que son característicos de las células senescentes como morfología aplanada, aumento de tamaño y apariencia vacuolada (Figura 11).

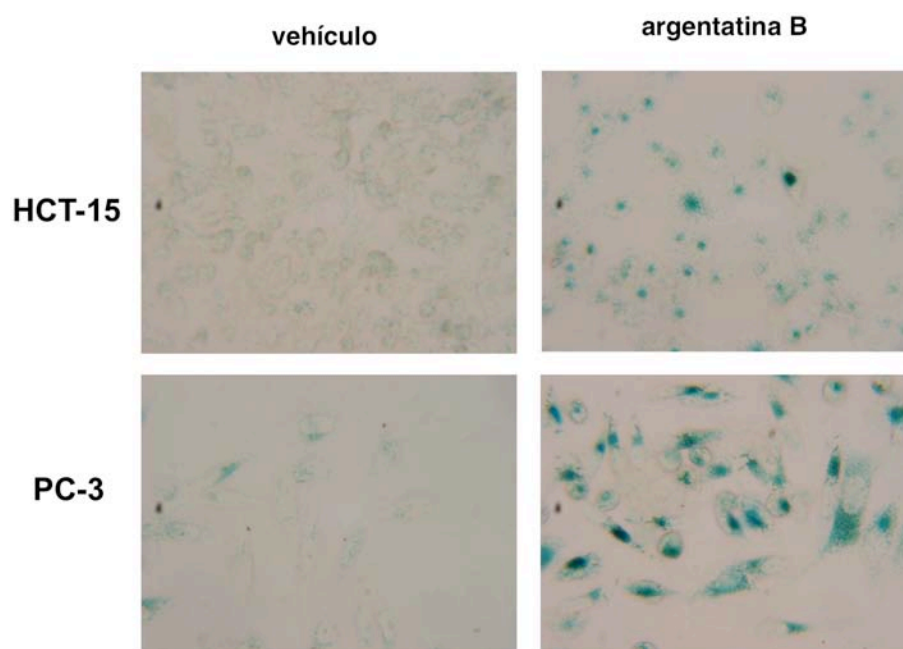


Figura 11. Actividad de la SA- β -galactosidasa inducida por el tratamiento con argentatina B en las líneas celulares HCT-15 y PC-3. (1); La línea celular HCT-15 fue tratada con arg B 24 μ M y la línea celular PC-3 con arg B 34 μ M (2). Después de 72 h de incubación, las células fueron fijadas y analizadas con la tinción para SA- β -gal (un marcador de senescencia) utilizando microscopía de campo claro. Las fotografías tienen un aumento 40x. Se muestran los resultados representativos de tres experimentos.

Los resultados porcentuales de la actividad de la SA- β -Galactosidasa, mostraron que una proporción del 43 % de células de la línea HCT-15 y un 66% de células

de la línea PC-3 presentaron tinción positiva, comparado con el 2 % de las células control, no tratadas (Figura 12). Estas observaciones sugirieron que la argentatina B inhibe la proliferación celular induciendo senescencia.

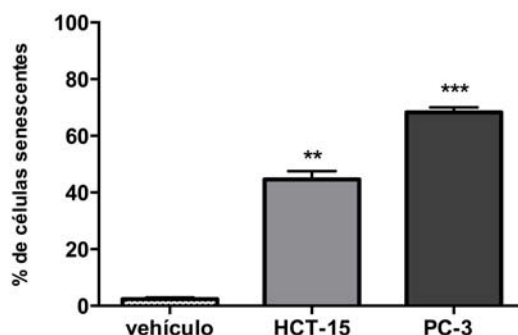


Figura 12. Actividad porcentual de la SA- β -galactosidasa inducida por el tratamiento con argentatina B en las líneas celulares HCT-15 y PC-3. La línea celular HCT-15 fue tratada con arg B 24 μ M y la línea celular PC-3 con arg B 34 μ M durante 72 h. Aproximadamente 43 % y 66 % de las células tratadas se encuentran en estado senescente, mientras que las células control no muestran este fenotipo (aproximadamente 2 % de las células se tiñeron con SA- β -gal). Se muestran los resultados representativos de tres experimentos.

5.5 Expresión de los marcadores moleculares de arresto del ciclo celular y senescencia

Sabemos que una de las características principales de las células senescentes es la inhibición de la proliferación. La expresión de PCNA es un hallmark de la división celular. En este trabajo, nosotros analizamos el efecto del tratamiento con concentraciones crecientes de argentatina B en la proliferación de las líneas celulares HCT-15 y PC-3, así como su efecto en la expresión de PCNA.

Como se muestra en la Figura 13, la argentatina B induce la disminución de la proliferación de manera dosis dependiente en ambas líneas celulares, HCT-15 (Fig. 13A), y PC-3 (Fig. 13B).

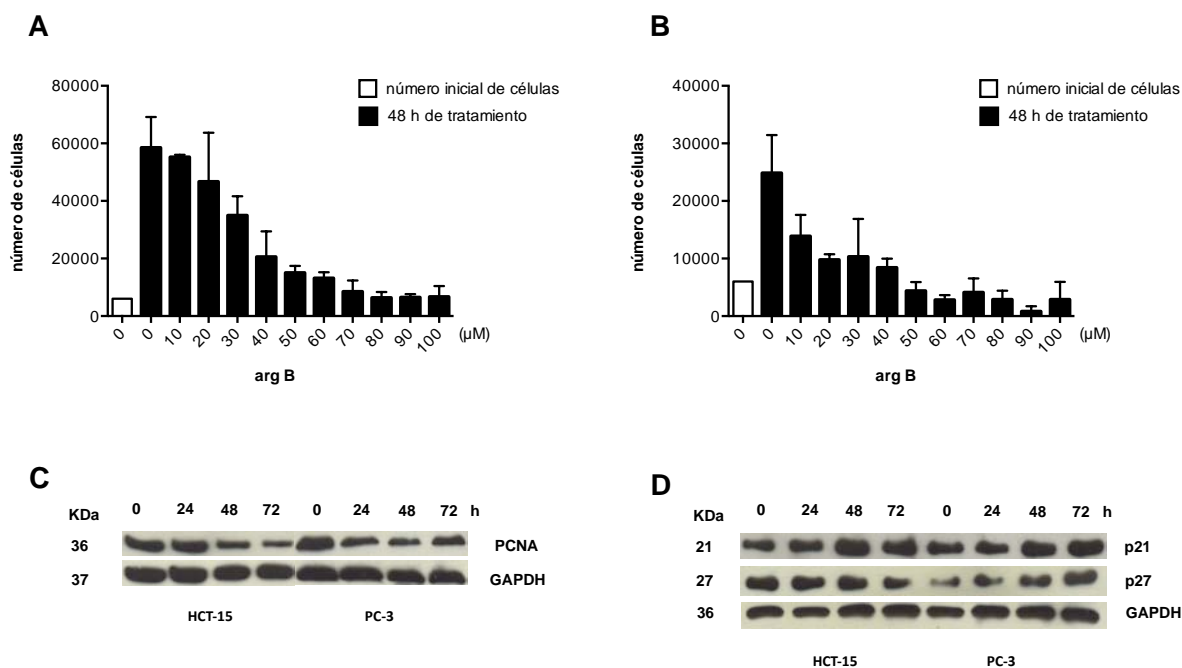


Figura 13. Efecto de la argentatina B en la inhibición de la proliferación e incremento de la expresión de proteínas asociadas con la senescencia. A) HCT-15 y B) PC-3, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de argentatina B durante 48 h. El número de células fue evaluado usando el ensayo colorimétrico de MTT. Los valores presentados son la media de tres experimentos independientes. Las barras indican el error estándar de la media. * $p < 0.05$, vs. El número de células sembradas al inicio del experimento (número inicial de células) (ANOVA de una vía y Prueba de Tukey-Kramer). C) Análisis por Western blot de la expresión del marcador de proliferación PCNA. Las células HCT-15 y PC-3 fueron incubadas durante 24, 48 y 72 h. Se incluye la detección de GAPDH como un control interno. D) Análisis por Western blot de la expresión de p21 y p27, reguladores negativos del ciclo celular, en respuesta al tratamiento con argentatina B. Las células HCT-15 y PC-3 fueron incubadas con 24 o 34 μM de argentatina B, respectivamente, durante 24, 48 y 72 h. Se incluye la detección de GAPDH como un control interno.

Se observó una disminución significativa de la proliferación celular, cuando la concentración de argentatina B fue de 30-100 μM para HCT-15 y de 10-100 μM

para células PC-3. Sin embargo, la inhibición de la proliferación de las células nunca fue significativamente menor al número inicial de células sembradas, sosteniendo la observación de que la argentatina B induce inhibición de la proliferación más que la muerte celular.

En concordancia con los resultados anteriores, los análisis de PCNA por Western blot mostraron que la expresión de ésta proteína asociada a la división celular disminuye cuando las células son incubadas con argentatina B (Figura 13 C).

La senescencia es promovida por varios mecanismos antiproliferativos. p21 y p27 son reguladores negativos del ciclo celular, y clásicamente han sido asociados al fenotipo senescente. Por lo tanto, analizamos la expresión de p21 y p27 en cultivos celulares tratados con argentatina B.

Las líneas celulares HCT-15 y PC-3 fueron incubadas con 24 μ M o 34 μ M de argentatina B, respectivamente. La expresión de p21 y p27 se evaluó a 24, 48 y 72 h por Western blot. Como se muestra en la figura 13 D, el tratamiento con argentatina B induce un incremento de p21 y p27 en la línea celular PC-3 después de 48 y 72 h de incubación. En el caso de la línea HCT15, se observó un incremento en la expresión de p21 después de 48 y 72 h de tratamiento. En contraste, el nivel de p27 no cambió en HCT-15 después de 24 y 48 h de tratamiento con argentatina B y se observó una reducción de la expresión a 72 h.

Los resultados obtenidos con los experimentos anteriormente presentados, indican que la argentatina B induce la senescencia de las líneas HCT-15 y PC-3.

5.6 Xenotransplantes

Uno de los aspectos importantes de este trabajo es el xenotransplante de las dos líneas celulares utilizadas PC-3 y HCT-15.

La elección de estas líneas se realizó con referencia en los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* en el trabajo llevado a cabo por Parra-Delgado [67]. Una buena parte del trabajo experimental consistió en estandarizar la prueba.

Ambas líneas celulares desarrollan tumores rápidamente. No se registró ningún caso de regresión. Observamos que el crecimiento de los tumores fue rápido, una semana en alcanzar 5 x 5 mm, por lo que es necesario tener cuidado con el número de células que se inoculan. Nuestros experimentos demostraron que no se deben inocular más de 1.5×10^6 células, porque se corre el riesgo de que el crecimiento del tumor se dispare y esto impida mantener el experimento durante el tiempo requerido.

Los animales en los cuales se realizaron los xenotransplantes, fueron tratados con diferentes concentraciones de argentatina B, utilizando cisplatino como control positivo y la administración del vehículo, aceite de ajonjolí, en el grupo control. Como se muestra en la figura (14A), el crecimiento de los tumores generados con la línea HCT-15, fue significativamente menor después del tratamiento con 125 mg/Kg ($p < 0.001$), 250 mg/Kg ($p < 0.001$) y 500 mg/Kg de argentetina B ($p < 0.0001$) para el día 21. Como se esperaba, el crecimiento de éstos tumores fue también inhibido por el tratamiento con cisplatino.

En la figura (14B) se observa, el crecimiento de los tumores inducidos con la línea celular de cáncer de próstata PC-3, fue sinificativamente reducido por el tratamiento con cisplatino 4 mg/Kg ($p < 0.0001$), 500 mg/Kg, 250 mg/Kg ($p < 0.001$), y 125 mg/Kg de argentatina B $p < 0.05$ al final del experimento (día 21). Los resultados del presente trabajo resultados sugieren que la argentatina B restringe la proliferación celular *in vivo* de las líneas de cáncer HCT-15 y PC-3, tan eficientemente como el cisplatino.

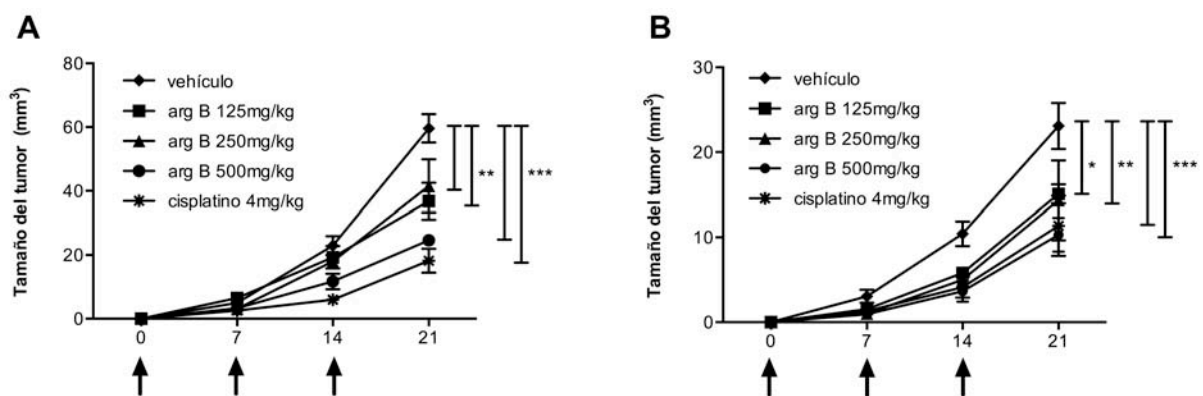


Figura 14. Efecto de la argentatina B en el crecimiento de tumores *in vivo*. Grupos de seis ratones *nu/nu* fueron implantados con 1.5×10^6 células de las líneas HCT-15 (A) y PC-3 (B). Los ratones recibieron las concentraciones indicadas de argentatina B, cisplatino o vehículo, en los días 0, 7 y 14. El tamaño de los tumores fue medido dos veces por semana. Las barras indican el error estándar de la media * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ y $p < 0.0001$ vs. vehículo (ANOVA y Tukey-Kramer).

5.7 Toxicidad de la argentatina B

Los resultados de las pruebas de toxicidad demostraron que la argentatina B no es tóxica en ninguna de las cantidades administradas a los animales, ratones *nu/nu* (Figura 15), y sanos CD-1 (Figura 16) en nuestros experimentos. Todos los animales fueron observados continuamente durante los 30 min posteriores a la administración de la argentatina B y después fueron revisados cada hora hasta 4

h. Posteriormente se observaron diariamente hasta 14 días después del tratamiento.

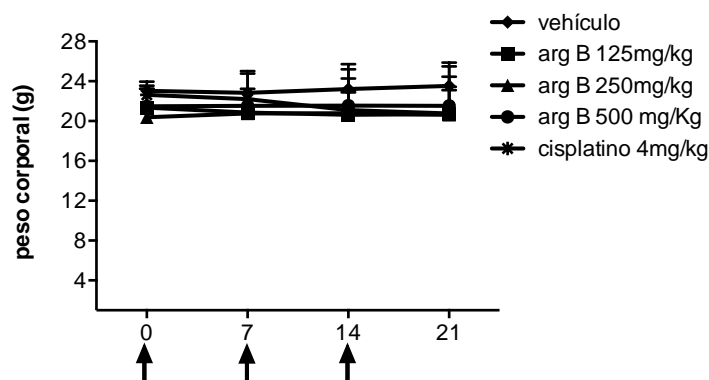


Figura 15. Evaluación del cambio en el peso corporal de ratones *nu/nu*. Se indican las diferentes dosis de argentatina B evaluadas, así como el vehículo (aceite de ajonjolí) y el control positivo cisplatino, los cuales fueron administrados vía intraperitoneal semanalmente. Las flechas indican el día de administración. El peso de los ratones fue registrado cada tercer día. Las barras indican el error estándar de la media.

Las observaciones consistieron en la detección de cambios en la piel o el pelo, ojos y membranas de las mucosas, así como su conducta tratando de identificar temblores, convulsiones, diarrea, letargo y adormecimiento, cola de Straub o síntomas de dolor como estiramientos, tal como se indica en las Guías de la OECD [74].

Se registró cada tercer día el peso de cada ratón durante todos los experimentos, para determinar la variación del peso.

Al momento de cada administración de argentatina B, los ratones presentaron estiramientos leves que duraban aproximadamente 3-5 min, transcurrido ese tiempo todos retomaban su conducta habitual de acicalamiento, y movimiento por

la caja (Tabla 5 y 6). Todos los animales sobrevivieron al tratamiento. No observamos diferencias significativas en el consumo de alimento o agua en ninguno de los grupos, tratados o control.

Tabla 5. Evaluación de la toxicidad de la argentatina B. Observaciones inmediatas después de la administración. No se observó pérdida de peso.

Tratamiento	Síntomas de toxicidad
Aceite de ajonjolí VH	Estiramientos durante \approx 3 min, al momento de la administración
Arg B 125 mg/Kg	Estiramientos durante \approx 3 min, al momento de la administración
Arg B 250 mg/Kg	Estiramientos durante \approx 3 min, al momento de la administración
Arg B 500 mg/kg	Estiramientos durante \approx 3 min, al momento de la administración

Tabla 6. Evaluación de la toxicidad del cisplatino. No se observó ningún efecto inmediato después de su administración, sin embargo sí se observó pérdida de peso.

Tratamiento	Síntomas de toxicidad
Solución salina 0.9% VH	--
Cisplatino 2 mg/Kg	Pérdida de peso del 7%
Cisplatino 4 mg/Kg	--
Cisplatino 8 mg/kg	Pérdida de peso del 10%

Aunque con la prueba estadística obtuvimos que no existen diferencias significativas en la variación de peso antes y después de los tratamientos, todos los animales tratados con argentatina B tuvieron un incremento de peso del aproximadamente el 10 %, semejante al grupo control, mientras que los ratones tratados con cisplatino, tuvieron una pérdida de peso del 7 al 10 %, siendo el grupo que recibió el tratamiento de 8 mg/Kg el que más peso perdió en este

experimento (Figura 16). Los resultados obtenidos en éste experimento sugieren que la argentatina B no es tóxica a las concentraciones probadas.

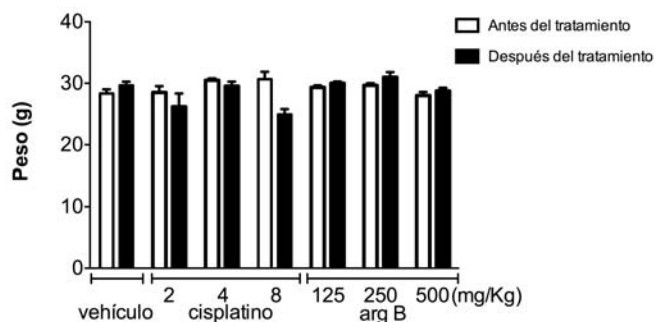


Figura 16. Evaluación de la toxicidad de la argentatina B. La toxicidad de la argentatina B fue probada en grupos de 3 ratones CD-1. Las dosis indicadas de argentatina B, cisplatino o vehículo fueron administradas intraperitonealmente cada semana. El peso de los ratones fue registrado cada tercer día. Los ratones fueron sacrificados al día 22. Las barras indican el error estándar de la media * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ y $p < 0.0001$ vs. vehículo (ANOVA y Tukey-Kramer).

Se realizaron análisis histopatológicos de diferentes órganos, los informes finales de los estudios *posmortem* (P14-2471) llevados a cabo en el Departamento de Patología de Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia indicaron que los ratones no presentaron ningún daño en los órganos relacionado con cualquiera de los tratamientos.

6. DISCUSIÓN

En éste trabajo presentamos evidencia de que la argentatina B inhibe la proliferación de las líneas celulares HCT-15 y PC-3 mediante la inducción de senescencia. El efecto citotóxico de algunos triterpenos de tipo cicloartano ha sido asociado con una fuerte actividad pro-apoptótica [75], algunos de éstos compuestos han sido aislados y probados contra células cancerosas. El efecto citotóxico descrito para dichos compuestos, tiene relación con diferentes mecanismos celulares. Algunos reportes sugieren que los triterpenos inhiben la proliferación celular interfiriendo con la replicación del DNA [31-33]. Interesantemente, un triterpeno de tipo cicloartano aislado de *Commiphora opobalsamum* mostró un moderado efecto antiproliferativo en células de cáncer humano de próstata, pero dicho compuesto fue capaz de inhibir la expresión de los receptores de andrógenos en las células [76], sugiriendo que los triterpenos pueden modular algunos mecanismos involucrados en la regulación e la proliferación celular. Tian et al. [77], reportaron que los ácidos esquisandrónico e isoquisandrónico ejercen su efecto citotóxico mediante el arresto en las fases G0/G1 y la subsecuente apoptosis. Existe también evidencia de que los triterpenos de tipo cicloartano pueden inducir ambos efectos, citostático y citotóxico, incrementando el número de células en la fase sub G1 y arretando el ciclo celular en las fases S y G2/M [78]. De acuerdo con lo anterior, nosotros observamos que el tratamiento con argentatina B incrementa significativamente la proporción de células en la fase sub G1 a 72h de tratamiento. Se sabe que la acumulación de células en sub G1, puede ocurrir como una respuesta celular a especies reactivas de oxígeno, causando estrés oxidativo lo que lleva a las células a presentar un

estado de senescencia [79]. De hecho existen reportes de compuestos naturales, como el resveratrol, que tuvieron efecto en la inhibición del crecimiento de tumores, los cuales fueron atribuidos a la inducción de senescencia celular [80, 81].

En éste trabajo, observamos que las células tratadas con argentatina B presentaron cambios fenotípicos característicos de las células senescentes, como la morfología aplanada y el tamaño agrandado de las células. De hecho, a sólo 48 h de tratamiento también los cambios bioquímicos son evidentes y a 72 h el 66% de las células PC-3 y el 43% de las HCT-15, fueron positivas a la tinción de β -galactosidasa lo cual es un indicador asociado a la senescencia, ya que debido a la expansión de los lisosomas, las células senescentes muestran un incremento en la actividad de esta enzima. La senescencia celular es una condición de arresto celular muy compleja y multifactorial. La vías de señalización asociadas a la senescencia activan reguladores negativos importantes en el ciclo celular, tales como p21, el cual es un fuerte inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas CDK2 y CDK4, [82] y p27 el cual es un regulador negativo de la progresión a G1 [83]. De acuerdo con esto, nosotros observamos el aumento en la expresión de p27 en las células PC3 tratadas con argentatina B. Sin embargo, el nivel de p27 en las células HCT-15 permaneció sin cambio durante las primeras 48 h de tratamiento y disminuyó a las 72 h. En contraste con estos resultados, el aumento en la expresión de p21 se presentó en ambas líneas celulares. En relación con lo anterior, existen reportes en donde se ha demostrado que los inhibidores de la proliferación, como los derivados de adamantina [84] y el colecoxib [85], inducen el

incremento de la expresión de p21 en diferentes líneas celulares de cáncer. Sin embargo, el DPA derivado de la adamantina no produce cambios o incluso disminuye la expresión de p27 en las líneas celulares de cáncer de colon Colo 205 y HT-29 [84], mientras que el colecoxib induce la disminución de la expresión de p27 en tiempos de incubación cortos (0-5 a 8 h), seguido de un incremento a las 24 h en las líneas celulares HCT-15, HCT-29 y Caco-2 [85].

En resumen, nuestros resultados mostraron que la argentatina B inhibe la proliferación celular, disminuye la expresión de PCNA (marcador relacionado con la proliferación) y también induce un incremento de la expresión de p21 en las líneas celulares HCT15 y PC-3. Por lo anterior, sería muy interesante determinar si la argentatina B afecta la expresión de otras proteínas involucradas en la senescencia, por ejemplo: p16, p53 o moléculas proinflamatorias.

Debido a que las proteínas anteriormente mencionadas han sido asociadas a un estado de senescencia, nuestras observaciones indican fuertemente que la argentatina B induce senescencia celular. La senescencia celular se considera actualmente un blanco importante para el tratamiento del cáncer puesto que conduce a una detención irreversible de la capacidad de división celular. Por otra parte, ha sido reportado que las células tumorales activan los mecanismos de senescencia como una respuesta a tratamientos de quimioterapia y radioterapia [86].

En éste sentido, la senescencia celular inducida por estrés es conocida como senescencia prematura [86]. Se produce generalmente una semana después de la

exposición a condiciones de estrés sub letales. En nuestro trabajo se observaron células HCT-15 y PC-3 senescentes sólo tres días después del tratamiento con argentatina B, lo que sugiere la inducción de senescencia prematura. Hay pruebas que demuestran que otros triterpenos pueden inducir senescencia. Por ejemplo, Chang et al. [58] informó de que ganoderiol F, un triterpeno tetracíclico aislado de *Ganoderma amboinense*, induce senescencia en células HepG2, después de 18 días de tratamiento continuo. Del mismo modo, se ha informado que la administración de 20-50 μM de resveratrol induce senescencia en células de cáncer de pulmón después de 10-12 días de incubación [80].

Contrastantemente, las concentraciones de 24 y 34 μM de argentatina B pueden inducir senescencia en cultivos de células confluentes en sólo 48-72 h. Curiosamente, los fármacos quimioterapéuticos usados comúnmente, tales como cisplatino, doxorubicina, etopósido y otros inhibidores de la topoisomerasa son capaces de inducir la senescencia de las células cancerosas cuando se utilizan en concentraciones muy bajas [87,88].

Sabemos que triterpenos tales como el ácido ursólico y ácido acetil boswélico, los cuales han presentado actividad citotóxica baja, mostraron un efecto antitumoral efectivo en el modelo de xenotransplante en ratones . Con esto en mente, decidimos evaluar la actividad antitumoral de la argentatina B en un modelo de ratones xenotransplantados utilizando las líneas celulares humanas PC-3 y HCT-15.

Nuestros resultados sugieren que la argentatina B restringe la proliferación de células HCT-15 y PC-3 *in vivo* tan eficientemente como el cisplatino. Con

frecuencia, las pruebas *in vivo* de nuevos agentes antitumorales se lleva a cabo usando administraciones diarias de los fármacos o compuestos por períodos de 15 días. Un aspecto relevante de nuestro trabajo es que se demostró además, que tres administraciones semanales de argentatina B fueron suficientes para inducir una disminución significativa del crecimiento del tumor y no produjeron efectos tóxicos en los animales de experimentación. Es sabido que las células tumorales pueden sufrir senescencia en respuesta a la quimioterapia, también, que la detención mitótica normalmente no es tolerada por las células, y se resuelve mediante la muerte celular. Entonces, la actividad citostática puede llevar a la muerte celular. De hecho, muchos agentes citotóxicos son primeramente citostáticos [89]. La estimulación de la respuesta citostática, es considerada hoy en día un enfoque racional para el tratamiento del cáncer. Anteriormente se había reportado que la argentatina B poseía propiedades citotóxicas, sin embargo, ya que la demostración de un efecto citostático o citotóxico depende de las condiciones experimentales, sería importante probar la argentatina B en una amplia gama de dosis y tiempos, tanto *in vitro* como *in vivo* para evaluar su potencial utilidad farmacéutica.

Tradicionalmente, la apoptosis era considerada la única alternativa en los tratamientos antineoplásicos, sin embargo, ahora la senescencia podría ser también una alternativa potencial para la terapia *in vivo* de tumores, ya que conseguiría frenar la progresión de las células neoplásicas hacia tipos celulares más agresivos como aquellos con capacidad invasiva [90].

7. CONCLUSIONES

En éste trabajo, hemos demostrado que argentatina B puede inhibir la proliferación celular en las líneas HCT-15 y PC-3, mediante la inducción de la senescencia celular, lo cual se comprobó al encontrar cambios morfológicos y bioquímicos en las células tratadas, la disminución en la expresión de PCNA y la sobre expresión de proteínas como p21 y p27 las cuales son proteínas mediadoras del arresto celular. En estudios *in vivo*, la argentatina B disminuyó la velocidad de crecimiento de los xenotransplantes en ratones desnudos.

7.1. Perspectivas

Los resultados obtenidos en la investigación con argentatina B, nos permiten sugerir que dicha sustancia podría ser utilizada en estudios posteriores, en combinación con otros compuestos citotóxicos para determinar si el efecto de la terapia combinada tiene mejores resultados y si es posible utilizar dosis pequeñas con la finalidad de disminuir los efectos secundarios que provoca la quimioterapia. Por otra parte, en este trabajo obtuvimos cantidades importantes de argentatina A, argentatina D y guayulina C, las cuales en estudios preliminares mostraron disminuir la proliferación celular de varias líneas de cáncer humano además de presentar actividad antiinflamatoria, por lo que sugerimos continuar con su investigación para determinar su mecanismo de acción.

LITERATURA CITADA

1. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. **2000**;100(1):57-70.
2. Vega-Ávila E, Velasco-Lezama R, Jiménez-Estrada M. Las pantas como fuente de agentes antineoplásicos. *Bioquímica*. **2006**;31(003):97-111.
3. Álvaro T, Noguera-Salvá R, Fariñas-Guerrero F. La matriz extracelular: de la mecánica molecular al microambiente tumoral (parte II). *Rev Española Patol*. **2010**;43(1):24-32.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. **2011**;144(5):646-674.
5. Valdespino-Gómez VM, Valdespino-Castillo VE. Alteraciones celulares y moleculares no clásicas en el desarrollo del cáncer. *Gac Med Mex*. **2010**;146(3):185-198.
6. Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report 2014*.; 2014:953.
7. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol*. **2012**;13(6):607-615.
8. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. **2014**;64(1):9-29.
9. INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. *INEGI*. **2013**:1-5. www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Co? .

10. Almeida V, Leitão A, Reina L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim Nov.* **2005**.
11. Bailly C. Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochem Pharmacol.* **2009**;77(9):1447-1457.
12. Nobili S, Lippi D, Witort E, et al. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res.* **2009**;59(6):365-378.
13. Peters GJ, van der Wilt CL, van Moorsel CJA, Kroep JR, Bergman AM, Ackland SP. Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. *Pharmacol Ther.* **2000**;87(2-3):227-253.
14. Frei E 3rd, Elias A, Wheeler C, Richardson P, Hryniuk W. The relationship between high-dose treatment and combination chemotherapy: the concept of summation dose intensity. *Clin Cancer Res.* **1998**;4(9):2027-2037.
15. Laszczyk MN. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta Med.* **2009**;75(15):1549-1560.
16. Rocha A. Natural products in anticancer therapy. *Curr Opin Pharmacol.* **2001**;1(4):364-369.
17. Feher M, Schmidt JM. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *J Chem Inf Comput Sci.* **2003**;43(1):218-227.
18. Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today.* **2008**;13(October):894-901.

19. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* **2012**;75(3):311-335.
20. Saklani A, Kutty SK. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discov Today.* **2008**;13(3-4):161-171.
21. Seigler DS. Plant Secondary Metabolism. *Life Sci.* **1998**;643: 1-13.
22. Bishayee A, Ahmed S, Brankov N, Perloff M. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Front Biosci (Landmark Ed).* **2011**;16:980-996.
23. Richardson PM, Harborne JB. Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. Second Edition. *Brittonia.* **1990**;42:115.
24. Bouvier F, Rahier A, Camara B. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog Lipid Res.* **2005**;44(6):357-429.
25. Phillipson JD. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry.* 2001;56:237-243.
26. Thoppil RJ, Bishayee A. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. *World J Hepatol.* **2011**;3(9):228-249.
27. Patlolla JMR, Rao C V. Triterpenoids for Cancer Prevention and Treatment: Current Status and Future Prospects. *Curr Pharm Biotechnol.* **2012**;13(1):147-155.
28. Liby KT, Yore MM, Sporn MB. Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. *Nat Rev Cancer.* **2007**;7(5):357-369.

29. Yadav VR, Prasad S, Sung B, Kannappan R, Aggarwal BB. Targeting inflammatory pathways by triterpenoids for prevention and treatment of cancer. *Toxins (Basel)*. **2010**;2(10):2428-2466.
30. Setzer W, Setzer M. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini Rev Med Chem*. **2003**:540-556.
31. Murakami C, Ishijima K, Hirota M. Novel anti-inflammatory compounds from *Rubus sieboldii*, triterpenoids, are inhibitors of mammalian DNA polymerases. *Biochim Biophys Acta*. **2002**;1596(1):193-200.
32. Ganguly A, Das B, Roy A, et al. Betulinic acid, a catalytic inhibitor of topoisomerase I, inhibits reactive oxygen species-mediated apoptotic topoisomerase I-DNA cleavable complex formation in prostate cancer cells but does not affect the process of cell death. *Cancer Res*. **2007**;67(24):11848-11858.
33. Mizushina Y, Iida A, Ohta K, Sugawara F, Sakaguchi K. Novel triterpenoids inhibit both DNA polymerase and DNA topoisomerase. *Biochem J*. **2000**;350:757-763.
34. Sørensen P, Iacob R, Fritzsche M, Engen JR, Briehner WM, Charras G and Eggert US. The natural product cucurbitacin E inhibits depolymerization of actin filaments. *ACS Chem Biol*. **2012**;7(9):1502-1508.
35. Liu J. Review article Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **1995**;49:57-68.

36. Hostanska K, Daum G, Saller R. Cytostatic and apoptosis-inducing activity of boswellic acids toward malignant cell lines in vitro. *Anticancer Res.* **2002**;22(5):2853-2862.
37. McDermott-Lancaster R, Ito T. The nude mouse characteristics, breeding and husbandary. *Int J Lepr.* **1987**;55(4).
38. Rygaard J, Poulsen CO. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "nude" mice. *Acta Pathol Microbiol Scand.* **1969**;77(4):758-760.
39. Sundberg JP. Handbook of Mouse Mutations with Skin and Hair Abnormalities: Animal Models and Biomedical Tools. CRC Press; **1994**:560.
40. Greenberg NM, DeMayo F, Finegold MJ, et al. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci.* **1995**;92(April):3439-3443.
41. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* **1965**;37(3):614-636.
42. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2007**;8(September):729-740.
43. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* **1961**;25(3):585-621.
44. Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* **1995**;92(20):9363-9367.

45. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. **1997**;88(5):593-602.
46. Narita M, Narita M, Krizhanovsky V, et al. A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell*. **2006**;126(3):503-514.
47. Courtois-Cox S, Jones SL, Cichowski K. Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene*. **2008**;27(20):2801-2809.
48. Collado M, Blasco M a, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*. **2007**;130(2):223-233.
49. Wei S, Wei W, Sedivy JM. Expression of Catalytically Active Telomerase Does Not Prevent Premature Senescence Caused by Overexpression of Oncogenic Ha-Ras in Normal Human Fibroblasts. *Cancer Res*. **1999**;59(7):1539-1543.
50. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*. **2006**;444(7119):638-642.
51. Zhang Y, Yang J. The impact of cellular senescence in cancer therapy: is it true or not? *Acta Pharmacol Sin*. **2011**;32(10):1199-1207.
52. Hayward RL, Macpherson JS, Cummings J, Monia BP, Smyth JF, Jodrell DI. Antisense Bcl-xl Down-Regulation Switches the Response to Topoisomerase I Inhibition from Senescence to Apoptosis in Colorectal Cancer Cells, Enhancing Global Cytotoxicity. *Clin Cancer Res*. **2003**;9(7):2856-2865.

53. Elmore LW, Rehder CW, Di X, et al. Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction. *J Biol Chem.* **2002**;277(38):35509-35515.
54. Chang B, Xuan Y, Broude E V, et al. Induced in Human Tumor Cells By Chemotherapeutic Drugs. **1999**;(July):4808-4818.
55. Mirzayans R, Scott A, Cameron M, Murray D. Induction of Accelerated Senescence by γ Radiation in Human Solid Tumor-Derived Cell Lines Expressing Wild-Type TP53. *Radiat Res.* **2005**;163:53-62.
56. Schwarze SR, Fu VX, Desotelle JA, Kenowski ML, Jarrard DF. The Identification of Senescence-Specific Genes during the Induction of Senescence in Prostate Cancer Cells. *Neoplasia.* **2005**;7(9):816-823.
57. Ota H, Tokunaga E, Chang K, et al. Sirt1 inhibitor, Sirtinol, induces senescence-like growth arrest with attenuated Ras-MAPK signaling in human cancer cells. *Oncogene.* **2006**;25(2):176-185.
58. Chang UM, Li CH, Lin LI, Huang CP, Kan LS, Lin SB. Ganoderiol F, a ganoderma triterpene, induces senescence in hepatoma HepG2 cells. *Life Sci.* **2006**;79:1129-1139.
59. Michaloglou C, Vredeveld LCW, Soengas MS, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature.* **2005**;436(7051):720-724.
60. Ewald J, Desotelle J, Almassi N, Jarrard D. Drug-induced senescence bystander proliferation in prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Br J Cancer.* **2008**;98(7):1244-1249.

61. Wang, G., Hazra, T.K., Mitra, S., Lee, H. M., & Englander, E.W. Mitochondrial DNA damage and a Hypoxic response are induced by CoCl₂ in rat neuronal PC12 cells. *Nucleic Acids Research*. 2000;28(10):2135-40.
62. Paunesku, T., Mittal, S., Protić, M., Oryhon, J., Korolev, S. V, Joachimiak, a, & Woloschak, G. E. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *International Journal of Radiation Biology*. **2001**;77(10):1007–1021.
63. Shivji, M. K., Ferrari, E., Ball, K., Hubscher, U., & Wood, R. D. Resistance of human nucleotide excision repair synthesis in vitro to p21Cdn1. *Oncogene*. **1998**;17(22):2827–2838.
64. Cayrol, C., Knibiehler, M., & Ducommun, B. p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene*. **1998**;16(3):311–320.
65. Chang, B.-D., Swift, M. E., Shen, M., Fang, J., Broude, E. V, & Roninson, I. B. Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2002**;99(1):389–394.
66. Dotto, G. P. p21^{WAF1/Cip1}: more than a break to the cell cycle? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. **2000**;1471(1):M43–M56.
67. Parra-Delgado, H. Obtención de compuestos citotóxicos a partir de triterpenos del tipo cicloartano. **2006**. Tesis Doctoral. Programa de maestría y Doctorado en Ciencias Químicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

68. Rodríguez-Hanh L, Romo de Vivar A, Ortega A, Aguilar M, Romo J. Determinación de las estructuras de las argentatins A, B y C del guayule. *Rev Lat Quim* **1970**;1:24-38.
69. Schloman WW, McIntyre D, Siler DJ, Stumpf DK, Hoffmann JJ. Semisynthetic guayule latex with reduced allergenicity. *Ind Crops Prod.* **1997**;7:27-36.
70. Komoroski RA, Gregg EC, Shockcor JP, Geckle JM. Identification of guayule triterpenes by two-dimensional and multipulse NMR techniques. *Magn Reson Chem.* **1986**;24(6):534-543.
71. Pineda-Herrera M. Modificaciones moleculares de los triterpenos aislados del *Parthenium argentatum* y su evaluación como agentes antiinflamatorios. **1999**. Tesis de Maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
72. Calzada L, Salazar EI, Téllez J, Martínez-Vázquez M, Martínez R. Effect of tetracyclic triterpenes (argentatins A, B and D) on the estradiol receptor of hormone-dependent tumours of human breast. *Medical Science Research.* **1995**;23: 815-816.
73. Parra-Delgado H, García-Pillado F. Evaluation of the cytotoxicity, cytostaticity and genotoxicity of argentatins A and B from *Parthenium argentatum* (Gray). *Life Sci.* **2005**;77(22):2855-2865.
74. Cowan M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* **1999**;12:564-582.
75. Gao, W.; Su, X.; Dong, X.; Chen, Y.; Zhou, C.; Xin, P.; Yu C. Wei, T. Cycloartan-24-ene-1 α ,2 α ,3 β -triol, a cycloartane-type triterpenoid from the

- resinous exudates of *Commiphora myrrha*, induces apoptosis in human prostatic cancer PC-3 cells. *Oncol. Rep.* **2015**;33:1107–1114.
76. Shen T, Wan W, Yuan H, et al. Secondary metabolites from *Commiphora opobalsamum* and their antiproliferative effect on human prostate cancer cells. *Phytochemistry.* **2007**;68(9):1331-1337.
77. Tian, Z.; Xu, L.; Chen, S.; Zhou, L.; Yang, M.; Chen, S.; Xiao, P.; Wu, E. Cytotoxic activity of schisandrolid and isoschisandrolid acids involves induction of apoptosis. *Chemotherapy* **2007**;53:257–262.
78. Wong, Y.; Kadir, H.A.; Ling, S. Bioassay-guided isolation of cytotoxic cycloartane triterpenoid glycosides from the traditionally used medicinal plant *Leea indica*. *Evid.-Based Complement. Alternat. Med.* **2012**;2012: 1–12. doi.org/10.1155/2012/164689
79. Bae, S.; Lim, K.M.; Cha, H.J.; An, I.S.; Lee, J.P.; Lee, K.S.; Lee, G.T.; Lee, K.K.; Jung, H.J.; Ahn, K.J.; et al. Arctiin blocks hydrogen peroxide-induced senescence and cell death through microRNA expression changes in human dermal papilla cells. *Biol. Res.* **2014**;47:50, doi:10.1186/0717-6287-47-50.
80. Luo, H.; Yang, A.; Schulte, B.; Wargovich, M.; Wang, G. Resveratrol induces premature senescence in lung cancer cells via ROS-mediated DNA damage. *PLoS ONE.* **2013**;8:1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0060065
81. Yang, Q.; Wang, B.; Zang, W.; Wang, X.; Liu, Z.; Li, W.; Jia, J. Resveratrol inhibits the growth of gastric cancer by inducing G1 phase arrest and senescence in a Sirt1-dependent manner. *PLoS ONE* **2013**. doi.org/10.1371/journal.pone.0070627
82. Xiong, Y.; Hannon, G.J.; Zhang, H.; Casso, D.; Kobayashi, R.; Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **1993**, 16, 701–704.

83. Polyak, K.; Lee, M.H.; Erdjument-Bromage, H.; Koff, A.; Roberts, J.M.; Tempst, P.; Massague, J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*. **1994**;78:59–66.
84. Wang, J.J.; Lee, J.Y.; Chen, Y.C.; Chern, Y.T.; Chi, C.W. The antitumor effect of a novel differentiation inducer, 2, 2-Bis (4-(4-amino-3-hydroxyphenoxy) phenyl) adamantane (DPA), in combinatory therapy on human colon cancer. *Int. J. Oncol.* **2006**;28:1003–1012.
85. Grosch, S.; Tegeder, I.; Niederberger, E.; Brautigam, L.; Geisslinger, G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J.* **2001**;15:2742–2744
86. Saretzki G. Cellular senescence in the development and treatment of cancer. *Curr Pharm Des.* **2010**;16:79-100.
87. Roninson, I.B.; Broude E, V.; Chang, B.D. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist. Updat.* **2001**;4:303–313.
88. Shay, J.W.; Roninson, I.B. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene.* **2004**;23:2919–2933.
89. Blagosklonny, M.V.; Fojo, T. Molecular effects of paclitaxel: Myths and reality (a critical review). *Int. J. Cancer.* **1999**;83:151–156.
90. Schmitt C A. Cellular senescence and cancer treatment. *Biochim Biophys Acta.* **2007**;1775:5-20.

APÉNDICE

Article

Argentatin B Inhibits Proliferation of Prostate and Colon Cancer Cells by Inducing Cell Senescence

Ela Alcántara-Flores ^{1,2}, Alicia Enriqueta Brechú-Franco ³, Patricia García-López ⁴, Leticia Rocha-Zavaleta ⁵, Rebeca López-Marure ⁶ and Mariano Martínez-Vázquez ^{1,*}

Received: 2 September 2015; Accepted: 17 November 2015; Published: 27 November 2015

Academic Editor: Isabel C. F. R. Ferreira

¹ Instituto de Química, Departamento de Productos Naturales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510, México D.F., Mexico; elaalf@hotmail.com

² Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria 3000, Coyoacán, C.P. 04510, México D.F., Mexico

³ Facultad de Ciencias, Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, C.P. 04510, México D.F., Mexico; aliciae@ciencias.unam.mx

⁴ Instituto Nacional de Cancerología, Subdirección de Investigación Básica, Tlalpan, C.P. 14080, México D.F., Mexico; pgarcia_lopez@yahoo.com.mx

⁵ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Escolar s/n, Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F., Mexico; lrochaz@biomedicas.unam.mx

⁶ Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, Departamento de Biología Celular, Juan Badiano No. 1, Colonia Sección 16, Tlalpan, C.P. 14080, México D.F., Mexico; rmarure@yahoo.com.mx

* Correspondence: marvaz@unam.com; Tel.: +5255-5622-4403; Fax: +5255-5616-2203

Abstract: Argentatin B has been shown to inhibit the growth of colon HCT-15, and prostate PC-3 cancer cells. However, the mechanism by which argentatin B inhibits cell proliferation is still unknown. We aimed to investigate the mechanism by which argentatin B inhibits cell proliferation. The cell cycle was studied by flow cytometry. Apoptosis was evaluated by Annexin-V-Fluor, and Hoechst 33342 dye staining. Cell senescence was evaluated by proliferation tests, and staining for SA- β -galactosidase. Senescence-related proteins (PCNA, p21, and p27) were analyzed by Western blotting. Potential toxicity of argentatin B was evaluated in CD-1 mice. Its effect on tumor growth was tested in a HCT-15 and PC-3 xenograft model. Argentatin B induced an increment of cells in sub G1, but did not produce apoptosis. Proliferation of both cell lines was inhibited by argentatin B. Forty-three percent HCT-15, and 66% PC-3 cells showed positive SA- β -galactosidase staining. The expression of PCNA was decreased, p21 expression was increased in both cell lines, but p27 expression increased only in PC-3 cells after treatment. Administration of argentatin B to healthy mice did not produce treatment-associated pathologies. However, it restricted the growth of HCT-15 and PC-3 tumors. These results indicate that treatment with argentatin B induces cell senescence.

Keywords: argentatin B; colon cancer; prostate cancer; cell senescence; xenografts

1. Introduction

It is known that natural compounds have been an important source of several clinically useful anti-cancer agents. In 2012, approximately 42% of compounds in clinical trials as antitumor agents were natural products, compounds derived from secondary metabolites, or designed from a natural product pharmacophore [1]. Some of the most important natural anti-cancer compounds include vinblastine, vincristine, camptothecin derivatives topotecan and irinotecan, etoposide, derived from epipodophyllotoxin, and paclitaxel. Furthermore, there are several kinds of natural products that are

in preclinical development. At present, intensive efforts to identify new natural antitumor agents are in progress [2]. One important group of natural products is constituted of triterpenes. Some of these secondary metabolites have shown important anti-inflammatory and antitumor activities [3]. It has been reported that some triterpenoids inhibit proliferation of tumor cells [4] by different mechanisms. They can interfere with DNA replication by inhibiting DNA polymerase [5], topoisomerase I [6], and topoisomerase II [7]. Other cytotoxic triterpenoids induce modifications of the cytoskeleton by depolymerizing actin fibers [8], or changing the expression of cytoskeleton proteins [9]. Argentatin B is a cycloartane-type triterpene derived from the resin of *Parthenium argentatum* Gray (guayule), an endemic plant from Northern Mexico and Southwestern USA. This species has been used as a source of natural rubber [10–12]. In a former work, we demonstrated that it is a non-competitive inhibitor of 3H-estradiol binding to receptors on human, hormone-dependent breast tumors [13]. We also found that argentatin B inhibits, in a dose-dependent manner, the edema induced by the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). Furthermore, we observed that argentatin B can inhibit the growth of human colon carcinoma (HCT-15) and human prostate cancer (PC-3) cell lines [14]. Interestingly, argentatin B did not produce cytotoxic or genotoxic effects on lymphocytes from healthy human donors [15]. However, the mechanism by which argentatin B inhibits cell proliferation is still unknown. Thus, in the present work we aimed to investigate the mechanism by which argentatin B mediates inhibition of tumor cells proliferation. We also aimed to evaluate the effect of argentatin B in healthy mice, and on a human xenograft model, using the PC-3 and HCT-15 cell lines.

2. Results and Discussion

2.1. Isolation of Argentatin B

Argentatin B was isolated from *P. argentatum* as previously reported and purified at 99% by conventional procedures [10,11]. It was identified by comparison of physical and spectroscopic constants (melting point, ^1H , and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance) with those reported in the literature [12]. The structure of argentatin B, (16 β ,24R-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-one), is shown in Figure 1.

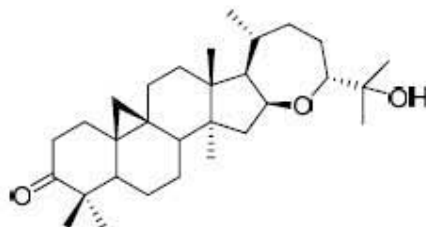


Figure 1. Chemical structure of argentatin B (16 β , 24R-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-one).

2.2. Argentatin B Induces Changes on Cell-Cycle Progression

We first determined the concentrations of argentatin B and cisplatin leading to 50% inhibition of cell proliferation (IC_{50}) for each cell line. Argentatin B IC_{50} was 24 μM for HCT-15 and 34 μM for PC-3. Meanwhile, cisplatin IC_{50} was determined to be 14 μM for both cell lines. To investigate whether argentatin B inhibits DNA replication we analyzed cell-cycle progression of cells treated with the determined argentatin B IC_{50} . As a control, cells treated with the cisplatin IC_{50} were analyzed. As seen in Figure 2A, no significant changes in cell cycle phases were observed in HCT-15 cells after 48 h of treatment. However, cells treated with argentatin B for 72 h showed a tendency to increase the proportion of cells in sub G1, along with a reduction of the number of cells in G2/M, but the proportion of cells in S phase remained unchanged. As expected, 72 h treatment with

cisplatin produced a significant increase of the proportion of cells in sub G1 phase. It also reduced the proportion of cells in S and G2/M phases, although this reduction was not significant. On the other hand, changes in PC-3 cell cycle after 48 h were only observed when the cells were incubated with cisplatin (Figure 2B). Nevertheless, treatment with argentatin B for 72 h induced a significant increment in the proportion of cells in sub G1, along with a reduction of cells in G0/G1. In addition an unexpectedly, marginally significant increase of cells in S phase was observed. Again, the number of cells in G2/M phase was not disturbed by argentatin B. In contrast, cisplatin produced a highly significant increment of cells in sub G1, along with the reduction of cells in G0/G1, S, and G2/M phases (Figure 2B). These observations seem to suggest that argentatin B does not inhibit DNA replication, neither has a negative effect on cell mitosis.

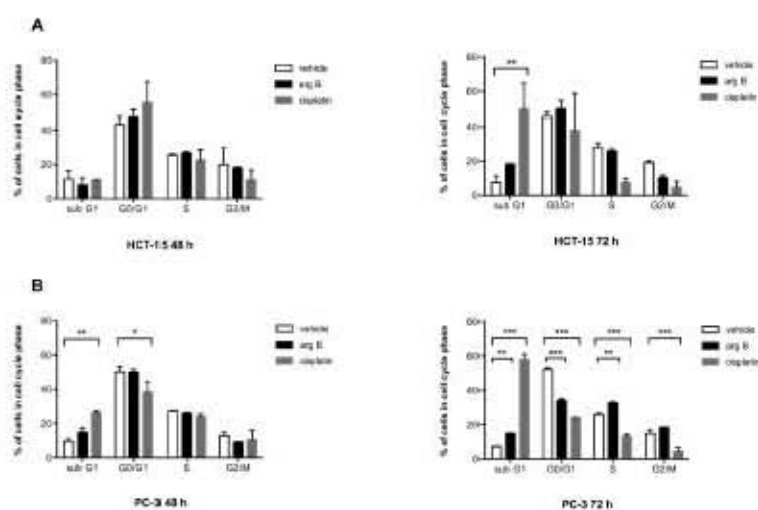


Figure 2. Effect of argentatin B on cell cycle progression. HCT-15 (A) and PC-3 (B) cells were incubated with 24 μ M or 34 μ M argentatin B, respectively, for 48 and 72 h. As a positive control cells were treated with cisplatin 14 μ M. Negative control cultures received the carrier solvent (0.2% DMSO). The cells were stained with propidium iodide, and the cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry using the BD CellQuest Pro Software. Data represent the average of three independent assays. Error bars indicate the standard error of the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, and *** $p < 0.0001$ vs. vehicle (one-way ANOVA test, and Tukey-Kramer post-test).

2.3. Argentatin B Inhibits Cell Proliferation by Inducing Cdl Senescence

Since argentatin B induced an increase of cells in sub G1, we next investigated whether argentatin B can induce apoptotic cell death. After incubation of HCT-15 and PC-3 cells with argentatin B for 48 and 72 h, cell death was evaluated by staining with annexin V and propidium iodide. As shown in Figure 3, argentatin B induced a modest increment of apoptotic (7.1%), and necrotic cells (1.5%) after 72 h incubation. Likewise, after 72 h incubation, a slight increment of apoptotic (4.3%), and necrotic (6.1%) PC-3 cells was observed (Figure 3). These observations indicate that argentatin B is unable to induce a cytotoxic effect. However, we had previously demonstrated that argentatin B inhibits cell proliferation. Therefore, in an attempt to explain the observation mentioned above, we tested the cells for the presence of senescence. As seen in Figure 4A, after incubation with argentatin B for 72 h, both cell lines exhibited phenotypic changes that resemble those observed in cells undergoing senescence, such as flattened morphology and enlarged cell size. When tested for senescence associated- β -galactosidase activity, a proportion of 43% HCT-15, and 66% PC-3 cells

showed a positive staining, compared with 2% of untreated controls. These findings suggest that argentatin B inhibits cell proliferation by inducing senescence.

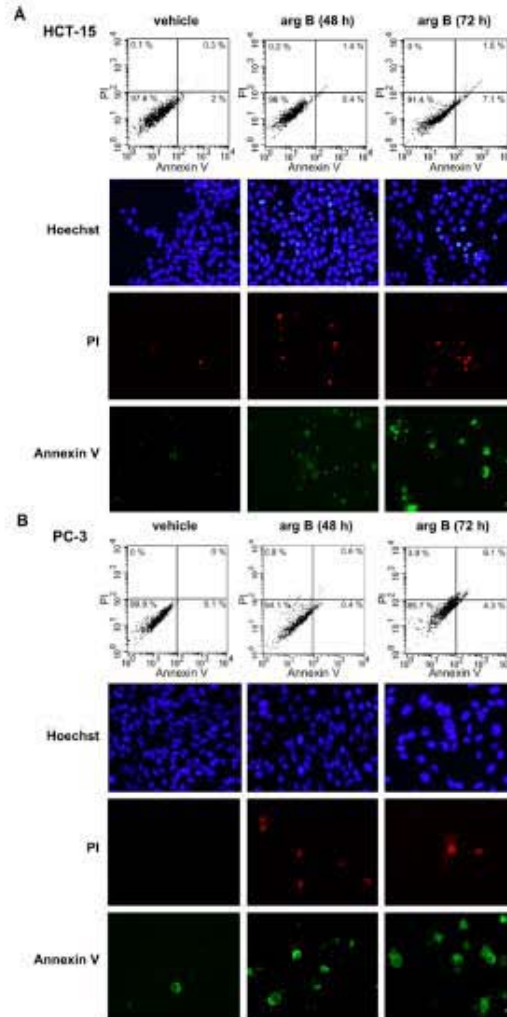


Figure 3. Effect of argentatin B on cell death. HCT-15 (A); and PC-3 (B) cells were incubated with argentatin B (arg B) for 48 h and 72 h. Cell death was analyzed by labelling with Annexin V and Propidium Iodide (PI). The number of apoptotic and necrotic cells was evaluated by flow cytometry (upper panel). The proportion of viable cells, showing negative annexin and PI staining is depicted in the left lower quadrant. Apoptotic cells, positive annexin, are shown in the right lower quadrant. Necrotic cells, positive annexin and PI staining, are presented in the right upper quadrant. Results are representative figures from three independent tests. Cells stained with Annexin, PI, and Hoechst were also analyzed by fluorescence microscopy (lower panel). Figures are representative micrographs from three independent experiments.

Figure 5, argentatin B induced a reduction of cell proliferation in a dose-dependent manner in both, HCT-15 (Figure 5A), and PC-3 (Figure 5B) cells. A significant reduction in the number of cells was observed from 30 to 100 μM of argentatin B for HCT-15, and from 10 to 100 μM of argentatin B for PC-3 cells. However, they were never significantly smaller than the initial number of cells seeded, supporting the observation that argentatin B induces the inhibition of proliferation rather than cell death. Accordingly, Western blot analysis of PCNA showed that the expression of this cell division-associated protein decreased when the cells were incubated with argentatin B (Figure 5C). It is accepted that senescence is promoted by a number of anti-proliferative mechanisms. Classical negative cell cycle regulators, such as p21, and p27, have been associated with the senescent phenotype. Therefore, we next analyzed the expression of p21 and p27 in cell cultures treated with argentatin B. HCT-15 and PC-3 cells were incubated with 24 μM or 34 μM argentatin B, respectively. The expression of p21 and p27 was evaluated at 24, 48, and 72 h by Western blotting. As seen in Figure 5D, treatment with argentatin B induced an increment of both, p21 and p27 in PC-3 cells after 48 h incubation, and it was persistent for at least 72 h after treatment. In the case of HCT-15, an increment of p21 expression was observed after 48 h treatment and it was persistent until 72 h of argentatin B treatment. In contrast, the level of p27 was not changed in HCT-15 after 24–48 h argentatin B treatment, and a reduction of p27 expression was observed at 72 h of treatment. Taken together, these results indicate that treatment with argentatin B induces the cells to undergo senescence.

2.4. Argentatin B Reduces Tumor Growth *in Vivo*

To further examine the antiproliferative effect of argentatin B, *in vivo* xenografts using HCT-15 and PC-3 cells were established in mice. Animals were treated with three different concentrations of argentatin B or vehicle (sesame oil). Treatment with cisplatin was used as a positive control. As shown in Figure 6, the growth of HCT-15 tumors was significantly reduced after treatment with 125 mg/kg ($p < 0.001$), 250 mg/kg ($p < 0.001$), and 500 mg/kg argentatin B ($p < 0.0001$), by day 21 (Figure 6A). As expected, growing of HCT-15 tumors was also inhibited by cisplatin (Figure 6A). As seen in Figure 2B, growing of PC-3 tumors was significantly reduced by treatment with cisplatin ($p < 0.0001$), 500 mg/kg ($p < 0.0001$), 250 mg/kg ($p < 0.001$), and 125 mg/kg argentatin B ($p < 0.05$) at the end of the experiment (day 21). The toxicity of treatments is shown in the Figure 6C, no change in weight was observed, indicating no systemic toxicity with any of the treatments. Our results suggest that argentatin B restricts HCT-15 and PC-3 cells proliferation *in vivo* as efficiently as cisplatin. We next examined the potential systemic toxicity of argentatin B in healthy mice. All animals survived the treatment with argentatin B. No significant differences in general appearance, depression of activity, respiratory difficulty, abnormal aggressive behavior, and in mean daily food and water consumption between the experimental groups and the untreated controls were observed. Histopathological analysis showed no evidence of treatment-related pathology. Besides, no significant differences in body weight after and before treatment were observed (Figure 6D), suggesting that argentatin B is not toxic at the concentrations tested.

2.5. Discussion

Here we have presented evidence that argentatin B inhibits proliferation of HCT-15 and PC-3 cells by inducing senescence. The cytotoxic effect of some cycloartane-type triterpenoids has been associated with a strong pro-apoptotic activity [16]. Some cycloartane-type triterpenoids have been isolated and tested against cancer cells. Their cytotoxic effect has been reported to be mediated by some potential mechanisms. There is evidence suggesting that triterpenoids inhibit cell proliferation by interfering with DNA replication [5–7]. Interestingly, a cycloartane-type triterpenoid isolated from *Commiphora opobalsamum* showed a moderate antiproliferative effect on human prostate cancer cells. However, it was able to inhibit the expression of androgen receptors in the cells [17], suggesting that triterpenoids may modulate some mechanisms involved in the regulation of cell proliferation.

Tian *et al.* [18] reported that schisandrolid and isoschisandrolid acids exerted their cytotoxic effect via G0/G1 arrest and subsequent apoptosis. There is evidence showing that cycloartane-type triterpenoids may induce both, cytostatic and cytotoxic effects, increasing the number of cells in sub G1, and arresting cells in S and G2/M phases [19]. Accordingly, we observed that treatment with argentin B induced a significant increment in the proportion of cells in sub G1. Accumulation of cells in sub G1, has also been documented to occur as a cellular response to powerful reactive oxygen species, causing oxidative stress that leads the cell to develop a condition of senescence [20].

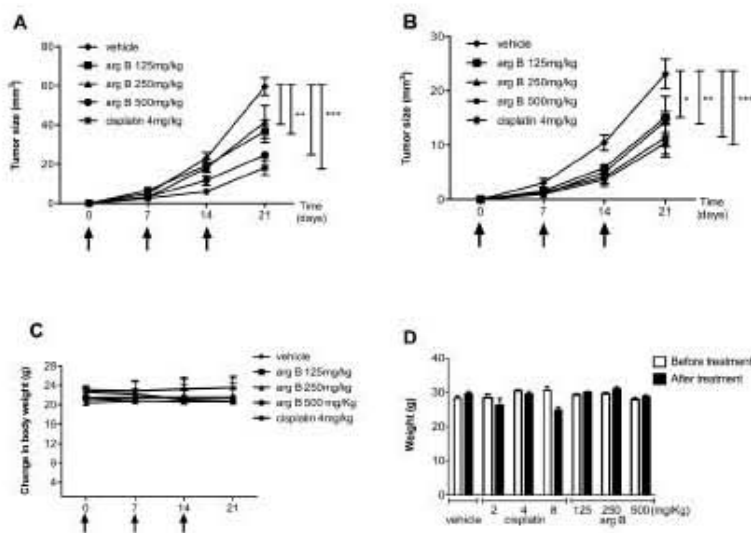


Figure 6. Evaluation of effects of argentin B *in vivo*. Antitumor activity of argentin B was evaluated in *nu/nu* mice implanted with HCT-15 (A) and PC3 (B) cells. Mice received the indicated concentrations of argentin B, cisplatin or sesame oil (vehicle) at days 0, 7, and 14. Each point represents the average \pm SEM of six animals. Significant differences of * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, and *** $p < 0.0001$ vs. vehicle are shown (one-way ANOVA test, and Tukey-Kramer post-test); (C) Evaluation of body weight change in *nu/nu* mice; (D) The toxicity of argentin B was tested in groups of three CD-1 mice. The indicated doses of argentin B, cisplatin or vehicle were administered intraperitoneally every week. The weight of the mice was recorded every other day. Error bars indicate the standard error of the mean.

It has been shown that tumor growth-inhibitory effects exhibited by natural compounds, such as resveratrol, can be attributed to the induction of cell senescence [21,22]. Here we observed that cells treated with argentin B presented phenotypic changes that resembled those detected in cells undergoing senescence, such as flattened morphology and enlarged cell size. In fact, only after 48 h these changes are evident and at 72 h treatment 66% PC-3, and 43% HCT-15 cells were positive for senescence associated- β -galactosidase activity. Cellular senescence is a complex, multifactorial condition of arrested growth. Senescence-associated signaling pathways activate important cell cycle negative regulators, like p21 which is a strong inhibitor of cyclin-dependent kinases [23], and p27 which is a negative regulator of G1 progression [24]. Accordingly, the expression of p27 was elevated in PC-3 cells as a response to argentin B treatment. However, the level of p27 in HCT-15 remained unchanged during the first 48 h of treatment, and decreased at 72 h. In contrast, a clear elevation of p21 levels was detected in both PC-3, and HCT-15 cells. In accordance with our results, previous reports have demonstrated that inhibitors of proliferation, such as adamantane derivatives [25], and

celecoxib [26], consistently induce an increment of p21 expression in different colon cancer-derived cell lines. Nevertheless, adamantane derivative DPA produced no change, or even a reduction of p27 in colon cancer-derived Colo 205 and HT-29 cell lines [25], while celecoxib induced a decrease of p27 levels at short times incubation (0–5 to 8 h), followed by an increasing expression of p27 at 24 h in HCT-15, HCT-29, and Caco-2 cell lines [26].

Our results showed that argentatin B inhibited cell proliferation, decreased the expression of PCNA (proliferation-related marker), and also induced an increment of p21 expression in HCT-15 and PC-3 cells. It will very interesting to determine if argentatin B affects other proteins involved with cellular senescence such as p16, p53 or proinflammatory molecules.

Since this protein has been associated with a full senescence state, these observations provide evidence to support the fact that argentatin B induces senescence. Cellular senescence is currently considered an important target for cancer treatment, inasmuch as it leads to an irreversible obstruction of the cellular division capacity. Moreover, tumor cells activate senescence mechanisms as a response to chemotherapy and radiotherapy [27].

Cellular senescence induced by stress is known as premature senescence [27]. It occurs within a week of exposure to sub lethal stresses. Senescent PC-3 and HCT-15 cells were observed three days after argentatin B treatment, suggesting the induction of premature senescence. There is evidence showing that other triterpenoids can induce senescence. For instance, Chang *et al.* [28] reported that ganoderiol E, a tetracyclic triterpene isolated from *Ganoderma ambotense*, induces senescence after 18 days of continuous treatment of HepG2. Similarly, administration of 20–50 μM resveratrol has been reported to produce senescence in lung cancer cells after 10 to 12 days incubation [21]. In sharp contrast, concentrations of 24 and 34 μM argentatin B can induce senescence in confluent cell cultures in only 48–72 h. Interestingly, commonly used chemotherapeutic drugs, such as cisplatin, doxorubicin, etoposide and other topoisomerase inhibitors are capable of inducing senescence of cancer cells when they used in very low concentrations [29,30].

In the present study we observed that argentatin B can inhibit the growth of human colon carcinoma (HCT-15, IC_{50} 24.14 ± 5.58) and human prostate cancer (PC-3, IC_{50} 34.14 ± 3.71 μM) cell lines. We know that triterpenes such ursolic acid and acetyl-boswellic acid with low cytotoxic activities showed an effective antitumor effect in mice xenograft model. With this in mind, we decide to evaluate the antitumor activity of argentatin B in a xenograft mice model using PC-3 and HCT-15 human cell lines.

Our results suggest that argentatin B restricts HCT-15 and PC-3 cells proliferation *in vitro* as efficiently as cisplatin. Frequently, *in vivo* testing of new antitumor agents is carried out using daily administrations of the drug for 15-days periods. We also demonstrated that three weekly administrations of argentatin-B were enough to induce a significant decrease of tumor growth, and produced no toxic effects on the experimental animals. It has become clear that tumor cells can undergo senescence in response to chemotherapy. Mitotic arrest is normally not tolerated by cells, and it is resolved by cell death. Thus, cytostatic activity can be followed by cell death. In fact, many cytotoxic agents are primarily cytostatic [31]. Thus, stimulation of this response is nowadays considered a rational approach to cancer treatment. In this work, we have shown that argentatin B can inhibit cell proliferation by inducing cellular senescence. However, the demonstration of cytostasis or cytotoxicity depends on experimental conditions, so it would be important to test argentatin B under a wide range of doses and times schedules, both *in vitro* and *in vivo* to evaluate its potential pharmaceutical usefulness.

3. Experimental Section

3.1. Drugs and Reagents

Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640) was obtained from Caisson Laboratories INC, USA. FBS (fetal bovine serum), EDTA, amphotericin B and L-glutamine were obtained from

Gibco, BRL (Grand Island, NY, USA). Trypsin, DMSO, Propidium iodide, Hoechst 33342 and cisplatin (*trans*-Diammineplatinum (II) dichloride) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Annexin-V-Fluos staining kit was from Roche Diagnostics (GmbH, Mannheim, Germany), and Senescence β -Galactosidase Staining Kit was obtained from Cell Signaling Technology (Denver, MA, USA). High-quality water employed to prepare solutions was obtained through a Milli-Q Reagent Water System (Continental Water Systems; El Paso, TX, USA).

Solutions

Stock solutions of cisplatin were prepared in saline solution (1 mg/mL) for *in vivo* studies, and in DMSO (20 mM) for *in vitro* assays. Argentatin B (40 mg/mL) was dissolved in extra virgin sesame oil. Stock solutions of argentatin B (20 mM) were prepared in DMSO for *in vitro* assays, and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2. Isolation of Argentatin B

Argentatin B was isolated from *Parthenium argentatum* as previously reported [10,11].

3.3. Cell Cultures

The human colon cancer HCT-15 and prostate cancer PC3 cell lines used in this study were purchased from ATCC (HCT-15 CCL-225TM and PC-3 CRL-1435TM) (Rockville, MD, USA). The cells were routinely maintained as a monolayer in RPMI supplemented with 10% inactivated FBS, 250 U/mL streptomycin sulfate, 100 IU/mL penicillin, 0.25 mg/mL amphotericin B and 2 mM L-glutamine, and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a 5% CO_2 atmosphere at high humidity. Cells were harvested with 0.025% Trypsin and 1 mM EDTA. 5×10^3 cells were seeded in 96-well plates, and incubated for 2 h. The cells were treated with increasing concentrations (1 to 100 μM) of argentatin B or 14 μM cisplatin, diluted in 0.2% DMSO, for 48 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. After discarding the medium, the cells were fixed by adding 50 μL of cold, 50% trichloroacetic acid, and then incubated with 0.4% sulforhodamine (SRB, Sigma Chemicals) for 30 min at room temperature. After washing three times with 1% acetic acid the plates were air-dried, and the protein-bound SRB was dissolved with TRIZMA base 10 mM. Optical density was measured on an ELISA plate reader (EL \times 800, BioTek, Winooski, VT, USA) at 515 nm. The argentatin B, or cisplatin concentration producing a 50% inhibition of cell proliferation (IC_{50}) was determined for each cell lines.

3.3.1. Flow Cytometric Detection of Cell Cycle

Cell cycle was determined by flowcytometric assays. 1.5×10^5 cells were seeded in 6-well plates and incubated with argentatin B, control cultures received the carrier solvent (0.2% DMSO) for 48 and 72 h. Cells were harvested by trypsinization, washed with PBS and resuspended in 70% ethanol at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for at least 10 min. Thereafter, cells were washed with PBS and incubated for 60 min in a solution containing 50 U/mL RNase in PBS at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. The cells were washed with PBS and stained with a solution of 20 μL /mL propidium iodide in PBS (50 μg /mL), for 2 min. The cell cycle distribution was analyzed with a flow cytometer FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). 10,000 cells were analyzed with the BD CellQuest Pro Software (Becton Dickinson).

3.3.2. Flow Cytometric Detection of Apoptotic Cells

Treated and control, 48 and 72 h, HCT-15 and PC-3 cells were harvested by trypsin release and washed twice with ice-cold PBS. Apoptotic cell death was determined using the Annexin-V-Fluos staining kit, according to the manufacturer's instructions. Cell samples were analyzed on the flowcytometer FACSCalibur (Becton Dickinson). 10,000 cells were analyzed with BD CellQuest Pro Software.

3.3.3. Detection of apoptotic cells by HOECHST 33342 Dye

Cells were seeded in 24-well plates and incubated for 48 and 72 h with argentatin B. Thereafter, cells were fixed in 3.7% formaldehyde solution for 10 min and washed for 10 min with PBS, subsequently the cells were washed with deionized water and stained with Hoechst 33,342 diluted 1:1000 in PBS for 15 min at 37 °C. Cells were then observed in a microscope Nikon Optiphot-2. Cells with condensed and fragmented nuclei were judged to be apoptotic.

3.3.4. Cytochemical Staining for SA- β -Galactosidase

7.5×10^3 cells were seeded in 24-well plates and incubated with argentatin B. Cytochemical staining for SA- β -galactosidase was performed using a Senescence β -Galactosidase Staining Kit at pH 6.0. Cells were rinsed with PBS, and the percentages of SA- β -galactosidase positive (blue) cells were determined after scoring 300 cells for each sample using a bright-field microscope Nikon Optiphot-2. All the experiments were repeated three times.

3.3.5. Proliferation Assay and Western Blot Analysis

To evaluate cell proliferation, 5×10^3 HCT-15 or PC-3 cells were seeded in 96-well plates, and incubated in the presence of 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, and 100 μ M argentatin B diluted in 0.2% DMSO for 48 h. Proliferation was evaluated by the colorimetric MTT assay. For Western blot analysis the cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% NP40; 0.25% sodium deoxycholate), containing 100 μ L/mL complete protease inhibitors cocktail (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) and 10 μ L/mL phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). Total protein content was determined using the DC protein assay kit (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). A total of 30 μ g of protein was resolved by 10% SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were incubated at 4 °C, overnight with specific antibodies diluted 1:1000 and then washed and incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies diluted 1:5000 (Zymed Laboratories, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Primary antibodies used were, rabbit-monoclonal anti-human PCNA (GeneTex Inc., Irving, CA, USA, USA), mouse-monoclonal anti-human p21, and mouse-monoclonal anti-human p27 (both from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, USA). Proteins were detected by chemiluminescence using the Amersham ECL plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA). As an internal control, a rabbit anti-GAPDH (GeneTex Inc.) was included.

3.4. Tumor Xenografts

Male, 6–8-week-old *nu/nu* mice were provided by the Animal House of the National Institute for Nutrition “Salvador Zubirán” (México D.F, Mexico), they were kept in a pathogen-free environment and fed *ad libitum*. Experimental procedures were carried out in accordance with the Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals of the National Cancerology Institute (México D.F, Mexico). Groups of six animals were implanted with 1.5×10^6 HCT-15 and PC3 cells. Cells were inoculated subcutaneously in the right flank of the mice, once tumors had reached approximately 50 mm³, the animals were pair-matched into treatment and control groups and the treatments were initiated. Then, mice received either 125, 250 or 500 mg/kg argentatin B diluted in sesame oil at days 0, 7, and 14. Control animals received only the vehicle (sesame oil) administered intraperitoneally as negative control and cisplatin as a positive control at the dose of 4 mg/kg. Mice were weighed periodically. Tumor size was measured by using a calliper twice a week. Tumor volume was determined by using the following relation: $V \text{ (mm}^3\text{)} = \pi/4 \times [\text{large diameter} \times (\text{short diameter})^2]$. The relative tumor volume was calculated using the formula: $(\text{Volume on the evaluation day} / \text{volume on day 0}) \times 100$. After each drug administration, mice were weighed and the tumor volume was calculated, as

previously described (every three days). The experiment was conducted during twenty-one days, at the end of which time all animals were weighed and euthanized.

Evaluation of Argentatin B Toxicity

The toxicity of argentatin B was tested in groups of three female, 6-week-old CD-1 mice. Three doses of 125, 250, and 500 mg/kg argentatin B were administered intraperitoneally once a week for 3 weeks, and compared with the effect of 2, 4, and 8 mg/kg of cisplatin. The weight and behavior of the mice was recorded every other day throughout the treatment and observation time (7 days after the last injection). Mice were sacrificed at day 22. The heart, lung, liver, kidney, intestine, spleen, stomach and ovaries were removed, fixed in 10% formalin, paraffin-embedded, and cut into 4 μ m sections. The sections were deparaffinised in xylene, and rehydrated in graded concentrations of ethanol. Tissue sections were stained with Hematoxylin-Eosin for histopathologic analysis.

3.5. Data Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Comparisons between treated groups and untreated controls were carried out using one-way ANOVA test, and Tukey-Kramer post-test. Data were expressed as means \pm SEM. The tests considered a basic significance level of $p < 0.05$.

4. Conclusions

The present work provides evidence that argentatin B inhibits the proliferation of HCT-5 and PC-3 cells, both *in vitro* and in a xenograft nude mice model. The efficiency of argentatin B was comparable with that of cisplatin. Argentatin B exhibited a rather weak apoptotic effect. However, it was able to inhibit cell proliferation by inducing cellular senescence. Induction of cell senescence has been considered a rational approach for the designing of new anti-tumor drugs. Thus, further research is in progress to evaluate argentatin B potential pharmacological value.

Acknowledgments: Financial support from CONACYT Grant 152650 is acknowledged. This paper constitutes a partial fulfilment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico (UNAM). Ela Alcántara-Flores acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACYT, Reg. Number: 317580), and UNAM. The authors thank Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, UNAM for academical support. We thank M. en C. Ma. Teresa O. Ramírez Apar, M. en C. Antonio Nieto Camacho (Instituto de Química, UNAM), M. en C. Ma. Cecilia Aguilar Zacarías and Miguel Tapia Rodríguez (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) for technical assistance.

Author Contributions: All authors conceived and designed the structure of the paper and contributed to write the manuscript. Ela Alcántara-Flores performed all experimental work. Mariano Martínez-Vázquez participated in the isolation of argentatin B. Alicia Enriqueta Brechú-Franco participated in the evaluation of argentatin B toxicity in CD-1 mice. Patricia García-López participated in the development of the tumor xenografts in nude mice. Leticia Rocha-Zavaleta participated in the work involving cell cultures, detection of apoptotic cells by Hoechst dye and staining for SA- β -Galactosidase. Rebeca López-Marure participated in the flow cytometric detection of cell cycle and apoptotic cell death. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Connolly, J.D.; Hill, R.A. Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 79–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Reyes-Zurita, F.J.; Rufino-Palomares, E.E.; Lupiáñez, J.A.; Cascante, M. Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Lett.* **2009**, *273*, 44–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Bolaños-Carrillo, M.; Ventura-Gallegos, J.L.; Saldivar-Jiménez, A.D.; Zentella-Dehesa, A.; Martínez-Vázquez, M. Effect of Sterols Isolated from *Mytilocactus geometrizans* on Growth Inhibition of Colon and Breast Cancer Cells. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2015**, *2015*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Murakami, C.; Ishijima, K.; Hirota, M.; Sakaguchi, K.; Yoshida, H.; Mizushima, Y. Novel anti-inflammatory compounds from *Rubus sieboldii*, triterpenoids, are inhibitors of mammalian DNA polymerases. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1596*, 193–200. [[CrossRef](#)]
6. Ganguly, A.; Das, B.; Roy, A.; Sen, N.; Dasgupta, S.B.; Mukhopadhyay, S.; Majumder, H.K. Betulinic acid, a catalytic inhibitor of topoisomerase I, inhibits reactive oxygen species-mediated apoptotic topoisomerase I-DNA cleavable complex formation in prostate cancer cells but does not affect the process of cell death. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 11848–11858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Mizushima, Y.; Iida, A.; Ohta, K.; Sugawara, F.; Sakaguchi, K. Novel triterpenoids inhibit both DNA polymerase and DNA topoisomerase. *Biochem. J.* **2000**, *350*, 757–763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Sörensen, P.; Jacob, R.; Fritzsche, M.; Engen, J.R.; Brieher, W.M.; Charras, G.; Eggert, U. The natural product cucurbitacin E inhibits depolymerization of actin filaments. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1502–1508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Rufino-Palomares, E.E.; Reyes-Zurita, F.J.; Garcia-Salguero, L.; Mokhtari, K.; Medina, P.P.; Lupiañez, J.A.; Peragon, J. Maslinic acid, a triterpenic anti-tumoural agent, interferes with cytoskeleton protein expression in HT29 human colon-cancer cells. *J. Proteom.* **2013**, *83*, 15–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Martínez, R.; Martínez-Vázquez, M.; Zamorano-Macias, O. Electron impact mass spectrometry of triterpenoids from guayule. *J. Mass Spectrom.* **1990**, *25*, 237–238. [[CrossRef](#)]
11. Rodríguez-Hahn, L.; Romo de Vivar, A.; Ortega, A.; Aguilar, M.; Romo, J. Determinación de las estructuras de las argentatinas A, B y C del guayule. *Rev. Latinoam. Quim.* **1970**, *1*, 24–38.
12. Komoroski, R.A.; Gregg, E.C.; Shockcor, J.P.; Geckle, J.M. Identification of guayule triterpenes by two-dimensional and multipulse NMR techniques. *Magn. Reson. Chem.* **1986**, *24*, 534–543. [[CrossRef](#)]
13. Calzada, L.; Salazar, E.L.; Téllez, J.; Martínez-Vázquez, M.; Martínez, R. Effect of tetracyclic triterpenes (argentatins A, B and D) on the estradiol receptor of hormone-dependent tumours of human breast. *Med. Sci. Res.* **1995**, *23*, 815–816.
14. Parra-Delgado, H.; Ramírez-Apan, T.; Martínez-Vázquez, M. Synthesis of argentatin A derivatives as growth inhibitors of human cancer cell lines *in vitro*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1005–1008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Parra-Delgado, H.; Garcia-Pillado, F.; Sordo, M.; Ramírez-Apan, T.; Martínez-Vázquez, M.; Ostrosky-Wegman, P. Evaluation of the cytotoxicity, cytostaticity and genotoxicity of argentatins A and B from *Parthenium argentatum* (Gray). *Life Sci.* **2005**, *77*, 2855–2865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Gao, W.; Su, X.; Dong, X.; Chen, Y.; Zhou, C.; Xin, P.; Yu C. Wei, T. Cycloartan-24-ene-1 α ,2 α ,3 β -triol, a cycloartane-type triterpenoid from the resinous exudates of *Commiphora myrrha*, induces apoptosis in human prostatic cancer PC-3 cells. *Oncol. Rep.* **2015**, *33*, 1107–1114. [[PubMed](#)]
17. Shen, T.; Wan, W.; Yuan, H.; Kong, F.; Guo, H.; Fan, P.; Lou, H. Secondary metabolites from *Commiphora opobalsamum* and their antiproliferative effect on human prostate cancer cells. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1331–1337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Tian, Z.; Xu, L.; Chen, S.; Zhou, L.; Yang, M.; Chen, S.; Xiao, P.; Wu, E. Cytotoxic activity of schisandrol and isoschisandrol acids involves induction of apoptosis. *Chemotherapy* **2007**, *53*, 257–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Wong, Y.; Kadir, H.A.; Ling, S. Bioassay-guided isolation of cytotoxic cycloartane triterpenoid glycosides from the traditionally used medicinal plant *Leea indica*. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2012**, *2012*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Bae, S.; Lim, K.M.; Cha, H.J.; An, I.S.; Lee, J.P.; Lee, K.S.; Lee, G.T.; Lee, K.K.; Jung, H.J.; Ahn, K.J.; *et al.* Arctiin blocks hydrogen peroxide-induced senescence and cell death through microRNA expression changes in human dermal papilla cells. *Biol. Res.* **2014**, *47*, 50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Luo, H.; Yang, A.; Schulte, B.; Wargovich, M.; Wang, G. Resveratrol induces premature senescence in lung cancer cells via ROS-mediated DNA damage. *PLoS ONE* **2013**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Yang, Q.; Wang, B.; Zang, W.; Wang, X.; Liu, Z.; Li, W.; Jia, J. Resveratrol inhibits the growth of gastric cancer by inducing G1 phase arrest and senescence in a Sirt1-dependent manner. *PLoS ONE* **2013**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Xiong, Y.; Hannon, G.J.; Zhang, H.; Casso, D.; Kobayashi, R.; Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **1993**, *16*, 701–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Polyak, K.; Lee, M.H.; Erdjument-Bromage, H.; Koff, A.; Roberts, J.M.; Tempst, P.; Massague, J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* **1994**, *78*, 59–66. [[CrossRef](#)]
25. Wang, J.J.; Lee, J.Y.; Chen, Y.C.; Chern, Y.T.; Chi, C.W. The antitumor effect of a novel differentiation inducer, 2,2-Bis(4-(4-amino-3-hydroxyphenoxy)phenyl) adamantane (DPA), in combinatory therapy on human colon cancer. *Int. J. Oncol.* **2006**, *28*, 1003–1012. [[PubMed](#)]
26. Grosch, S.; Tegeder, I.; Niederberger, E.; Brautigam, L.; Geisslinger, G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J.* **2001**, *15*, 2742–2744. [[PubMed](#)]
27. Saretzki, G. Cellular senescence in the development and treatment of cancer. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 79–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Chang, U.M.; Li, C.H.; Lin, L.I.; Huang, C.P.; Kan, L.S.; Lin, S.B. Ganoderiol F, a ganoderma triterpene, induces senescence in hepatoma HepG2 cells. *Life Sci.* **2006**, *79*, 1129–1139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Roninson, I.B.; Broude, E.V.; Chang, B.D. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist. Updates* **2001**, *4*, 303–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Shay, J.W.; Roninson, I.B. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* **2004**, *23*, 2919–2933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Blagosklonny, M.V.; Fojo, T. Molecular effects of paclitaxel: Myths and reality (a critical review). *Int. J. Cancer* **1999**, *83*, 151–156. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Samples of the argentinin B are available from the authors.



© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).