

Efecto anti-tumoral de dos triterpenos aislados de una planta medicinal

Sánchez-Monroy María. Beatriz¹, Zentella-Dehesa Alejandro², Nieto-Camacho Antonio¹,
Jacobó-Herrera Nadia J.², Ramírez Apan María Teresa¹, Martínez-Vázquez Mariano¹

¹Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Química. Circuito Exterior.
Ciudad Universitaria. Coyoacán. México, D.F. CP 04510.

²Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
Vasco de Quiroga 15. Sección XVI. México, D.F. CP 1400.

beatriz.sanchez@ciencias.unam.mx

Fecha de aceptación: 13 de agosto de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

RESUMEN

Los ácidos masticadienónico (**1**) y 3 α -OH masticadienoico (**2**) son los principales metabolitos secundarios aislados de la corteza de *Amphipterygium adstringens*. En trabajos previos se han investigado las propiedades biológicas de estos ácidos. Inicialmente, se demostró la actividad anti-inflamatoria en dos modelos de inflamación aguda, carragenina y TPA (12-O-tetradecanoilphorbol-13-acetato) (Oviedo, 2004). Por otro lado, se demostró que estos compuestos inhiben la proliferación de las líneas celulares de cáncer humano (Oviedo, 2005). Respecto al mecanismo anti-tumoral recientemente se informó el efecto de **2** sobre las funciones bioenergéticas y la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Dalla, 2012). Sin embargo, no se ha investigado su actividad anti-tumoral *in vivo*. En este trabajo se investigó el efecto de **1** y **2** sobre el crecimiento tumoral en un modelo murino. Los resultados de esta investigación demuestran que los ácidos **1** y **2** tienen un efecto anti-tumoral en xenotransplantes de carcinoma prostático.

Palabras clave: ácido masticadienónico, ácido 3 α -OH masticadienoico, xenotransplantes.

ABSTRACT

The masticadienonic acid (**1**) and 3 α -OH masticadienoic acid (**2**) are the main secondary metabolites of the bark from *Amphipterygium adstringens* (Navarrete, 2006). In previous works, were investigated the biological properties of these acids. First, was demonstrated their anti-inflammatory activity by TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) and carrageenan inflammatory acute models. Also, has been demonstrated that **1** and **2** compounds inhibit the proliferation of the human cancer cell lines, HCT-15 (colon), MCF-7 (breast), U-251 (CNS), PC-3 (prostate), K-562 (leukaemia), (Oviedo, 2005). Respect to the anti-tumor mechanism recently was informed the effect of **2** on bioenergetics functions and permeability of mitochondrial membrane (Dalla, 2012). However, there are no studies about anti-tumor activity of **1** and **2** *in vivo*. In this work we investigated the effect of **1** and **2** on growth tumor in a murine model. The results of this research showed that acids **1** and **2** have anti-tumor effect in xenografts of prostatic carcinoma.

Key words: masticadienonic acid, 3 α -OH masticadienoic acid, xenografts.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata (CaP) es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres, con un estimado de 27, 540 muertes a nivel mundial, en 2015 (Siegel, 2015). En México CaP es la primera causa de muerte por cáncer en varones, un estudio hecho en sujetos de diferentes edades demuestra que la mayor incidencia de estos tumores es en pacientes mayores de 70 años (Gómez, 2009). El tratamiento estándar incluye cirugía, radiación, vigilancia activa y terapia anti-androgénica. Aunque, estos enfoques inicialmente son efectivos 25 al 40% de los pacientes progresan a una etapa avanzada. La mayoría de los pacientes en esta etapa recibe quimioterapia (50 a 70%) recibe quimioterapia, resultando en un aumento de la sobrevivencia, sin embargo, el tratamiento no es curativo (Heidenreich, 2008; Patel, 2013; Masters, 2015). Actualmente, surge la necesidad de investigar tratamientos más efectivos dirigidos a este grupo de pacientes.

En el área de cáncer, las plantas son fuentes importantes de compuestos anti-tumorales, en un periodo de tiempo desde 1981 a 2010 48.6% de los fármacos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) son productos naturales o derivados éstos (Newman, 2012). De los compuestos estudiados en la fase preclínica, se ha demostrado que algunos triterpenos inhiben la proliferación de líneas celulares de cáncer humano e *in vivo* inhiben el crecimiento de xenotransplantes en modelos murinos (Zhang, 2014; Yadav, 2012).

Los ácidos masticadienónico (**1**) y 3 α -OH masticadienoico (**2**) son los principales triterpenos aislados de *Amphipterygium adstringens* Schiede Schlecht (Cuachalalate), un árbol con propiedades medicinales entre las que destacan como parte del tratamiento en cáncer gastrointestinal y úlceras gástricas (Olivera, 1999). Se han hecho diferentes investigaciones para dilucidar las propiedades anti-tumorales de los ácidos **1** y **2** en estudios *in vitro*. En base a estos antecedentes, en este trabajo se analizó el efecto anti-tumoral *in vivo* de **1** y **2** en xenotransplantes de carcinoma de próstata.

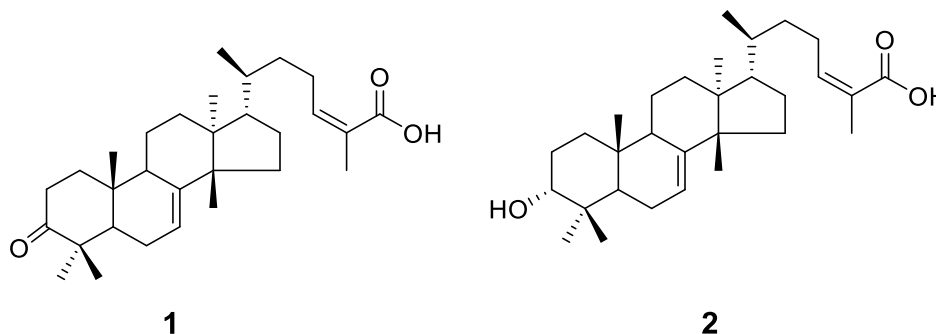


Figura 1. Estructuras de los ácidos masticadienónico (**1**) y 3 α -OH masticadienoico (**2**).

METODOLOGÍA

Aislamiento de los ácidos masticadienónico y 3 α -hidroxi masticadienoico.

El material vegetal (corteza de *A. adstringens*) se colectó en el estado de Morelos, en el mes de enero 2012. La corteza se cortó en pedazos pequeños, las cuales se colocaron en 5 matraces y se realizó la maceración con hexano de 3 a 4 veces con ciclos de 48 horas cada uno, a temperatura ambiente. La extracción con acetato de etilo se obtuvo en las mismas condiciones de temperatura, y se realizó después de secar el material vegetal una vez concluida la extracción con hexano. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida para obtener los extractos crudos. Los extractos de hexano (residuo aceitoso color miel) y acetato de etilo (residuo verde oscuro) se separaron por Cromatografía en Columna (CC) a presión reducida, utilizando gel de sílice 60 (mesh 230-400 ASTM) de Merck® en una columna de vidrio. El proceso de purificación se monitoreo por CCF en placas de gel de sílice con indicador de luz UV y como revelador una disolución de sulfato cérico. Se reunieron las muestras con comportamiento similar en CCF y se obtuvieron cinco fracciones principales (F1-F5). La fracción F2 se purificó por recristalización mediante la técnica de disolventes pares, el sólido se filtró a presión reducida y se lavó con una mezcla hexano-acetato de etilo (9:1) para obtener el compuesto **1** como un polvo blanco amorfo. Las fracciones de la F3 a F4 se purificaron igualmente por recristalización seguida de la filtración y el filtrado se lavó con una mezcla hexano-acetato de etilo (4:1), obteniendo el compuesto **2** como un sólido blanco amorfo. La pureza de los triterpenos fue determinada por análisis de Cromatografía de Líquidos de alta Resolución (HPLC) bajo las siguientes condiciones; una columna Zorbax Eclipse Plus C-18, fase móvil MeOH/Agua (4:1), el tiempo de corrida 15 minutos a un flujo de flujo 0.2 mL/min., la medición de UV fue a 240 nm.

Ensayo de xenotransplantes de células PC-3 en ratones desnudos (nu/nu).

El ensayo de xenotransplantes se desarrolló como lo describió (Estrada, *et al.*, 2010) con algunas modificaciones. Se utilizaron 30 ratones machos de la cepa nu/nu, de 4 a 6 semanas de edad, cuyo peso fue de 20 a 25 g. Los animales se inocularon con 3×10^6 células/100 μ L de medio blanco, por vía subcutánea. Entre una y dos semanas después, cuando los tumores alcanzaron un volumen tumoral entre 40-100 mm³, los ratones se aleatorizaron en cinco grupos con 6 ratones cada uno. Los grupos de tratamiento se organizaron de la siguiente forma: el control negativo fue administrado sólo con el vehículo. El control positivo, con el fármaco de referencia (*cis*-diaminodichloro platino II, 4 mg/kg), los dos grupos restantes con ácido masticadienónico (60 mg/kg) y 3 α -OH masticadienoico (60 mg/kg). El esquema de tratamiento fue una sola dosis cada semana, por vía intraperitoneal. Se monitorearon los diámetros menores y mayores del tumor y el peso de los animales durante tres semanas. Al término del ensayo, los ratones se sacrificaron y se extrajeron los tumores los cuales se conservaron a -70°C en dos condiciones: una muestra en solución reguladora de lisis más inhibidor de proteasas y otra en trizol®. Adicionalmente, una muestra se conserva en formol al 10% en PBS (solución reguladora de fosfatos).

Análisis estadístico.

Los volúmenes tumorales y pesos corporales se reportan como el promedio \pm EE (error estándar). Las comparaciones entre los grupos tratados y el control (sin tratamiento) se hizo mediante las siguientes pruebas estadísticas: Kolmogorov-Sminnov para determinar la distribución de los datos; como los datos mostraron una distribución normal se analizaron por un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de comparación múltiple (Tukey) para determinar las diferencias estadísticas, los grupos se consideraron diferentes cuando los valores de $p < 0.05$. Los datos del peso corporal se analizaron mediante la prueba de Friedman y no se observaron diferencias desde el inicio del tratamiento respecto a los diferentes tiempos (semana 1, 2 y 3).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de nuestro estudio fue investigar el efecto anti-tumoral de los ácidos **1** y **2** en xenotransplantes de células PC-3 (carcinoma prostático). Los resultados demuestran que los ácidos después de ser administrados en ratones nu/nu con tumores pre-establecidos inhiben el crecimiento tumoral (Tabla 1). En estas condiciones de trabajo, los compuestos mostraron un efecto similar al cisplatino (*cis*-diaminodicloro platino II, 4 mg/kg), el ácido masticadienónico (**1**) inhibió el 89% del crecimiento tumoral mientras que el cisplatino 90. El ácido 3 α -OH masticadienoico (**2**) inhibió al 80% el crecimiento de los tumores.

El efecto anti-tumoral respecto al tiempo también mostró diferencias, el compuesto **1** tuvo un efecto independiente del tiempo, sin embargo resultó ser tan efectivo como el cisplatino. El compuesto **2** aumenta su efecto inhibitorio mientras transcurre el tiempo, es decir a la primera de tratamiento inhibe 56% mientras que a la tercera semana inhibió 80%. Las diferencias en el comportamiento farmacológico de los ácidos **1** y **2** probablemente están relacionadas con la diferencia funcional en el C3 **1** tiene una cetona mientras dos un grupo hidroxilo.

El peso corporal de los animales fue monitoreado y no se observaron cambios significativos durante el tiempo del estudio (Figura 2).

Tabla 1. Actividad anti-tumoral de los compuestos **1** y **2**

Tratamiento	VT (mm ³) Semana 1	VT (mm ³) Semana 2	VT (mm ³) Semana 3
Vehículo	276.70 \pm 61.65	1014.40 \pm 217.30	2995.52 \pm 440.60
Cisplatino (4 mg/kg)	82.23 \pm 4.10 (70%)	146.50 \pm 6.40 (86%)	307.50 \pm 67.80 (90%)
1 (60 mg/kg)	45.81 \pm 6.15 (88%)	161.92 \pm 40.40 (84%)	336.73 \pm 82.90 (89%)
2 (60 mg/kg)	121.12 \pm 13.80 (56%)	378.10 \pm 63.70 (63%)	610.60 \pm 21.80 (80%)

Nota: todos los tratamientos iniciaron con un volumen tumoral entre 40 a 100 mm³

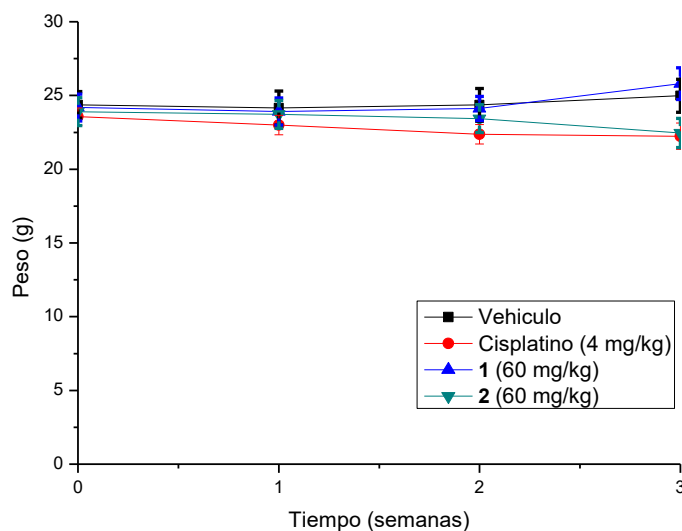


Figura 2. Peso de los ratones durante el tiempo de tratamiento. Los resultados se muestran como el promedio del peso corporal \pm EE.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación demuestran que el compuesto **1** es tan buen inhibidor del crecimiento tumoral como el cisplatino y **2** resultó ser menos efectivo que el cisplatino a las dosis probadas. Sin embargo, los dos compuestos son mejor tolerados que el cisplatino; ya que no se observaron efectos tóxicos después de realizar la administración sub-crónica en ratones nu/nu.

REFERENCIAS

- Aydee C. Estrada, *et al.* (2010). Tirucallic Acids Are Novel Pleckstrin Homology Domain-Dependent Akt Inhibitors Inducing Apoptosis in Prostate Cancer Cells, *Mol Pharmacol.* 77: 378–387.
- Dalla Via L. *et al.* (2012). 3 α -Hydroxymasticadienonic Acid As an Antiproliferative Agent That Impairs Mitochondrial Functions. *J. Nat. Prod.* 75: 557–562.
- Heidenreich Axel, *et al.* (2008). EAU Guidelines on Prostate Cancer. *European Urology.* 53: 68-80.
- L. Siegel Rebecca, *et al.* (2015). Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 65: 5-29.
- Masters Gregory A., *et al.* (2015). Clinical Cancer Advances 2015: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.* 33: 1-24.
- Newman DJ and Cragg GM. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, *J Nat Prod.*, 75: 311-35.
- Olivera Ortega A. G., *et al.* (1999). Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *J. of Ethnopharm.* 68: 109–113.
- Oviedo-Chávez I. *et al.* (2004). Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*, 11: 436-445

Oviedo-Chávez I. *et al.* (2005). Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes. *J. Pharmacy and Pharmacology*. 57: 1087-1091.

Patel, Jyoti D., *et al.* (2013). Clinical Cancer Advances 2013: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.* 31: 1-33.

Yadav Vivek R. *et al.* (2012). Boswellic acid inhibits growth and metastasis of human colorectal cancer in orthotopic mouse model by downregulating inflammatory, proliferative, invasive and angiogenic biomarkers. *Int. J. Cancer*, 130: 2176–2184.

Zhang Weisan and Men X. (2014). Review on anti-tumor effect of triterpene acid compounds. *J. of Cancer Res. and Therap.* 10: C14-C19.