



**Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional**

Departamento de Toxicología

“EFECTO ANTINEOPLÁSICO DE LA POLIQUIMIOTERAPIA CON
ÁCIDO 6-PENTADECIL SALICÍLICO Y OTROS ANTINEOPLÁSICOS
DE USO CLÍNICO”

TESIS

Que presenta:

M. en C. Jairo Galot Linaldi

Para obtener el grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE TOXICOLOGÍA

Directora de Tesis:
Dra. Libia Vega Loyo

Ciudad de México, Agosto 2021

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética e Inmunotoxicología del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Libia Vega Loyo y en las instalaciones de la UPEAL del CINVESTAV. Esta tesis se financió con el proyecto 21067 Ciencia de Frontera del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo económico del CONACyT a través de la beca de Doctorado No. 598073.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Libia Vega Loyo**, por brindarme la oportunidad de formar parte de su laboratorio, por ser un gran ejemplo y sobre todo una excelente persona.

A mi comité académico, **Dra. Irma Romero Álvarez, Dra. Andrea De Vizcaya Ruiz, Dra. Emma Calderón Aranda** y Dr. Alejandro García Carrancá, por cada una de las observaciones, enseñanzas y sobre todo el tiempo invertido en la revisión de esta tesis.

A la **M. En C. Elizabet Estrada Muñiz**, por su apoyo técnico, su invaluable colaboración en la realización de esta tesis y sobre todo su disposición.

A mis compañeros de laboratorio, **David, Dunia, Rosario, Adrian, Albina, Tamachtiani, Ignacio, Tania y Julieta**, por cada uno de los comentarios, observaciones y momentos compartidos dentro del laboratorio.

A la **M. en C. Laura Lopez Bañuelos**, por su apoyo técnico, comentarios y observaciones sobre mi trabajo y sobre todo por ser una gran amiga.

Al **cuerpo académico del Departamento de Toxicología**, gracias por cada uno de los conocimientos impartidos.

Al **personal del bioterio del CINVESTAV**, por el apoyo técnico brindado en el cuidado y manejo de los animales.

Por último y no menos importante, quiero agradecer a **CONACYT** por la beca otorgada para cumplir con este objetivo, así como al **CINVESTAV** por haberme brindado la oportunidad de estudiar en esta magnífica institución.

DEDICATORIA

A **mi familia**, por existir, por ser mi apoyo, mi fuerza, por ser inspiración para lograr cada uno de los objetivos planteados durante mi vida, son mi motivo para continuar, gracias por estar a cada momento sin importar las circunstancias.

A **mi esposa** por acompañarme en esta travesía que no ha sido fácil, gracias por las palabras de aliento y la confianza.

A **mis hijos** por ser el motor que me impulsa cada día, por ser inspiración y luz al final de camino.

RESUMEN

La quimioterapia es un tratamiento contra el cáncer que se basa en el uso de fármacos para inducir preferentemente la muerte de las células cancerosas. El 5-fluorouracilo (5-FU) y el carboplatino (CbPt) son quimioterapéuticos que se utilizan comúnmente en el tratamiento contra diferentes tipos de cáncer. Estos compuestos causan diversos efectos adversos como la mielosupresión y la leucopenia. El ácido 6-pentadecil salicílico (6SA) o (15:0) ácido anacárdico es un compuesto de origen natural que se encuentra en la corteza de *Amphipterygium adstringens* y que presenta actividad biológica variada, destacando su capacidad inmunomoduladora y antitumoral. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la poliquimioterapia con 6SA y CbPt o 5-FU en un modelo murino autólogo de cáncer de mama. Se inocularon ratones hembra Balb/c de 6 a 8 semanas de edad con 5×10^3 células 4T1 (cáncer de mama murino, estadio IV, triple negativo). Los ratones se trataron con 6SA, una mezcla de ácidos anacárdicos (AA) obtenida mediante cromatografía de la corteza de cuachalate, 5-FU, CbPt y los tratamientos combinados 6SA/5-FU, AA/5-FU y 6SA/CbPt. Durante el tratamiento se determinó la eficiencia en la reducción del volumen del tumor y después del sacrificio se evaluó el peso del tumor primario y la metástasis producida en el pulmón. Después de 21 días de tratamiento, se obtuvo la médula ósea y la sangre y se determinó la apoptosis en estos tejidos mediante citometría de flujo. Todos los tratamientos produjeron una disminución significativa del volumen y peso del tumor, sin embargo, la poliquimioterapia con 5-FU no produjo un efecto mayor al que causó el antineoplásico por sí solo, mientras que el tratamiento combinado con CbPt fue el que produjo el efecto mayor en la reducción de estos parámetros.

Todos los tratamientos redujeron la metástasis en el pulmón. Los tratamientos combinados con 5-FU produjeron un efecto menor al producido por las monoterapias, mientras que el tratamiento de 6SA/CbPt redujo la metástasis de manera más eficiente que en los grupos tratados con 6SA o CbPt solos. Los antineoplásicos clásicos redujeron el número de células y aumentaron la proporción de células apoptóticas en la médula ósea y la sangre, mientras que las poliquimioterapias con 6SA y AA redujeron la muerte celular inducida por los antineoplásicos. Finalmente, todos los tratamientos aumentaron la tasa de supervivencia de los animales en comparación con los animales sin tratamiento. Los tratamientos combinados aumentaron la sobrevivencia de los animales en comparación con los tratamientos con los antineoplásicos solos. En conclusión, el 6SA solo o en combinación presenta efectos antitumorales y antimetastásicos relevantes sin causar toxicidad en el organismo. Además, incrementa la eficiencia quimioterapéutica del CbPt, la tasa de supervivencia y protege al organismo de los efectos tóxicos causados por los agentes antineoplásicos 5-FU y CbPt, por lo que el 6SA representa una opción como agente antineoplásico en la clínica.

ABSTRACT

Chemotherapy is a cancer treatment that relies on the use of drugs to destroy cancer cells. 5-fluorouracil (5-FU) and carboplatin (CbPt) are chemotherapeutics commonly used in clinical treatments against different types of cancer. These compounds cause several adverse effects as myelosuppression and leukopenia. The 6-pentadecyl salicylic acid (6SA) or (15:0) anacardic acid is a compound of natural origin found in the bark of *Amphipterygium adstringens* with a variety of biological activities, highlighting its immunomodulatory and antitumor capacity. The aim of this study was to evaluate the effect of polychemotherapy with 6SA and CbPt or 5-FU in an autologous murine model of breast cancer. Six- to 8-week-old female Balb/c mice were inoculated with 5×10^3 4T1 cells (triple negative murine breast cancer, stage IV). The mice were treated with 6SA, a mixture of anacardic acids (AA), 5-FU, CbPt and the combined treatments 6SA/5-FU, AA/5-FU and 6SA/CbPt. The efficiency in reducing the volume and weight of the primary tumor and the metastasis produced in the lung was determined. After 21 days of treatment, bone marrow and blood were obtained and apoptosis in these tissues was determined by flow cytometry. All treatments produced a significant decrease in the volume and weight of the tumor, however, the polychemotherapy with 5-FU did not produce a greater effect than that caused by the antineoplastic alone, while the combined treatment with CbPt was the one that produced the greater effect in reducing these parameters.

All treatments reduced metastasis to the lung. The combined treatments with 5-FU produced less effect than that produced by the monotherapies, while the 6SA/CbPt treatment reduced metastasis more efficiently than in the groups treated with 6SA or CbPt alone. The classical antineoplastics reduced the number of cells and increased the proportion of apoptotic cells in the bone marrow and blood, while the combined therapies with 6SA and AA reduced the cell death induced by the antineoplastic agents. Finally, all the treatments increased the survival rate of the animals compared to the animals without treatment. The combined treatments increased the survival of the animals compared to the chemotherapy treatments alone. In conclusion, 6SA alone or in combination has relevant antitumor and antimetastatic effects without causing toxicity in the organism. In addition, it increases the chemotherapeutic efficiency of CbPt, the survival rate and protects the organism from the toxic effects caused by the antineoplastic agents 5-FU and CbPt, thus, 6SA represents an option as an antineoplastic agent in the clinic.

Lista de abreviaturas

AA	Mezcla de ácidos anacárdicos de la corteza del cuachalalate
6SA	Ácido 6-pentadecil salicílico
5-FU	5-Fluorouracilo
6-TG	6-tioguanina
ABC	Área bajo la curva
Ac-STAT3	Proteína STAT3 acetilada
ASB	Albúmina de suero bovino
CBP	Proteína de unión a CREB
CbPt	Carboplatino
CiPt	Cisplatino
DNMT1	ADN-metiltransferasa 1
FACS	Clasificación de células activadas por fluorescencia
FS	Fosfatidil serina
HATs	Histonas acetiltransferasas
HDAC	Histonas desacetilasas
HBSS	Solución salina balanceada de Hank
IARC	Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer
IP	Yoduro de propidio
MO	Médula ósea
NFATc1	Factor nuclear de células T activadas, citoplasmático 1
NK	Células asesinas naturales
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución salina amortiguadora por fosfatos
PCAF	Factor asociado a P300/ CBP
p-STAT3	Proteína STAT3 fosforilada
s.c.	Vía subcutánea
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
Tc	Células T citotóxicas
Th	Células T cooperadoras
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

ÍNDICE GENERAL	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cáncer	1
1.2. Tratamientos contra el cáncer	2
1.2.1. Carboplatino	4
1.2.1.1. Mecanismo de acción del carboplatino	5
1.2.1.2. Efectos adversos del carboplatino	6
1.2.2. 5-Fluorouracilo	7
1.2.2.1. Mecanismo de acción del 5-FU	8
1.2.2.2. Efectos adversos del 5-FU	9
1.3. El potencial antineoplásico de los productos naturales	9
1.3.1. Ácidos anacárdicos	10
1.3.1.1. Ácido 6-pentadecil salicílico (6SA)	11
1.3.1.2. Actividad biológica del 6SA	11
1.3.1.3. Efecto del 6SA sobre la actividad de las HATs	13
1.4. Poliquimioterapia	15
1.4.1. El 6SA y su uso en poliquimioterapia	18
1.5. Justificación	19
1.6. Hipótesis	19
1.7. Objetivos	20
1.7.1. Objetivo General	20
1.7.2. Objetivos Particulares	20
2. MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1. Diseño experimental in vivo	21
2.2. Línea Celular 4T1	22
2.2.1. Origen y características de la línea celular	22
2.2.2. Cultivo de la línea celular 4T1	22
2.3. Extracción y aislamiento de ácidos anacárdicos de <i>Amphipterygium adstringens</i>	22
2.4. Modelo animal Balb/c	25
2.4.2. Animales	25
2.4.3. Preparación de la línea celular 4T1 para la inoculación	25
2.4.4. Inoculación de la línea celular 4T1	25
2.4.5. Control del crecimiento tumoral	26
2.5. Tratamientos	27
2.6. Obtención de órganos y tejidos	27
2.7. Ensayo de metástasis	28
2.8. Conteo total y diferencial de leucocitos	29
2.9. Evaluación de la apoptosis en sangre y médula ósea	30
2.10. Análisis estadístico	32
3. RESULTADOS	33
3.1. Efecto antitumoral de los tratamientos	33
3.2. Reducción de la metástasis en el pulmón	35
3.3. Mielosupresión y leucopenia	35
3.4. Toxicidad sistémica de los tratamientos	39
4. DISCUSIÓN	42

5. CONCLUSIONES	46
6. PERSPECTIVAS	47
7. BIBLIOGRAFÍA	48
8. PRODUCTOS ACADÉMICOS DEL TRABAJO DE TESIS	55
8.1. Presentaciones en congresos	55
8.2. Artículo científico	55
APÉNDICE A	56
ANEXO A	57
Hoja de seguridad ácido anacárdico	57
Hoja de seguridad fluorouracilo	58
Hoja de seguridad carboplatino	59

Índice de tablas	Página
Tabla 1. Toxicidad y modo de acción de algunos agentes quimioterapéuticos	4
Tabla 2. Actividad biológica del 6SA	12
Tabla 3. El carboplatino y su utilidad en la poliquimioterapia	17
Tabla 4. El 5-FU en poliquimioterapia contra el cáncer	18
Tabla 5. Conteo diferencial de leucocitos y número de células en médula ósea y sangre de los animales	39
Tabla 6. Peso relativo de órganos y ganancia de peso corporal de los animales	40

Índice de figuras	Página
Figura 1. Casos de cáncer y muertes en diferentes áreas del mundo	2
Figura 2. Estructura del carboplatino	4
Figura 3. Mecanismo de acción del carboplatino	5
Figura 4. Estructura del 5-fluorouracilo	7
Figura 5. Mecanismo de acción del 5-FU	8
Figura 6. Molécula representativa de ácido anacárdico	11
Figura 7. Estructura del ácido 6-pentadecil salicílico	11
Figura 8. Mecanismo propuesto del efecto del 6SA sobre las HATs	15
Figura 9. Caracterización de ácidos anacárdicos	24
Figura 10. Desarrollo del crecimiento del tumor utilizando diferentes cantidades de células 4T1	27
Figura 11. Selección de la población celular para evaluar apoptosis	31
Figura 12. La poliquimioterapia 6SA/CbPt es más eficiente en inhibir el crecimiento del tumor	34
Figura 13. La poliquimioterapia con CbPt es el mejor tratamiento para disminuir la migración de células 4T1 al pulmón	36
Figura 14. Los ácidos anacárdicos disminuyen la leucopenia y la mielosupresión causada por los quimioterapéuticos	38
Figura 15. Los ácidos anacárdicos aumentan la sobrevivencia de los animales	41
Figura 16. Esquema que muestra los efectos de los ácidos anacárdicos en combinación con los quimioterapéuticos de uso clínico	45

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad multifactorial que constituye un problema de salud con importantes consecuencias sociales y económicas y representa la principal causa de muerte a nivel mundial. Una característica que define al cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso que se denomina metástasis. La aparición de este problema de salud está aumentando debido al crecimiento y envejecimiento de la población, así como a una creciente prevalencia de factores de riesgo como el tabaquismo, el sobrepeso, el sedentarismo y los cambios en los patrones reproductivos asociados con la urbanización y el desarrollo económico (Torre *et al.*, 2015).

El proyecto GLOBOCAN de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), tiene como objetivo proporcionar estimaciones contemporáneas de la incidencia, mortalidad y la prevalencia de los principales tipos de cáncer a nivel nacional en 185 países del mundo. Los resultados de este proyecto muestran que en el año 2020 se registraron 19.3 millones de nuevos casos de cáncer y 9.9 millones de muertes por este problema de salud a nivel mundial (Figura 1). Se estima que la mitad de todos los casos y el 58.3% de las muertes por cáncer ocurrieron en Asia en 2020, en donde reside el 59.5% de la población mundial. Europa representa el 22.8% del total de casos de cáncer y el 19.6% de las muertes por este problema de salud, aunque representa el 9.7% de la población mundial, seguida por el 20.9% de la incidencia en América y el 14.2% de la mortalidad en todo el mundo. A diferencia de otras regiones, la proporción de muertes por cáncer en Asia (58.3%) y África (7.2%) es más alta que la proporción de incidencia (49.3% y 5.7%, respectivamente) debido a la diferente distribución de los tipos de cáncer y tasas más altas de letalidad en estas regiones. El cáncer de pulmón, próstata, colorrectal y de mama son los tipos de cáncer que se diagnostican con mayor frecuencia y las principales causas de muerte por cáncer en hombres y mujeres, respectivamente. Otros tipos de cáncer con diagnóstico frecuente son los

de hígado y estómago en el caso de los hombres y cervical y de pulmón en el caso de las mujeres (Sung *et al.*, 2021).

El diagnóstico correcto del cáncer es esencial para prescribir un tratamiento adecuado y eficaz. El objetivo principal de cualquier tratamiento es curar el cáncer o prolongar la vida del paciente. Otro objetivo importante es mejorar la calidad de vida del enfermo, lo cual se puede lograr ofreciéndole cuidados paliativos y apoyo psicosocial.

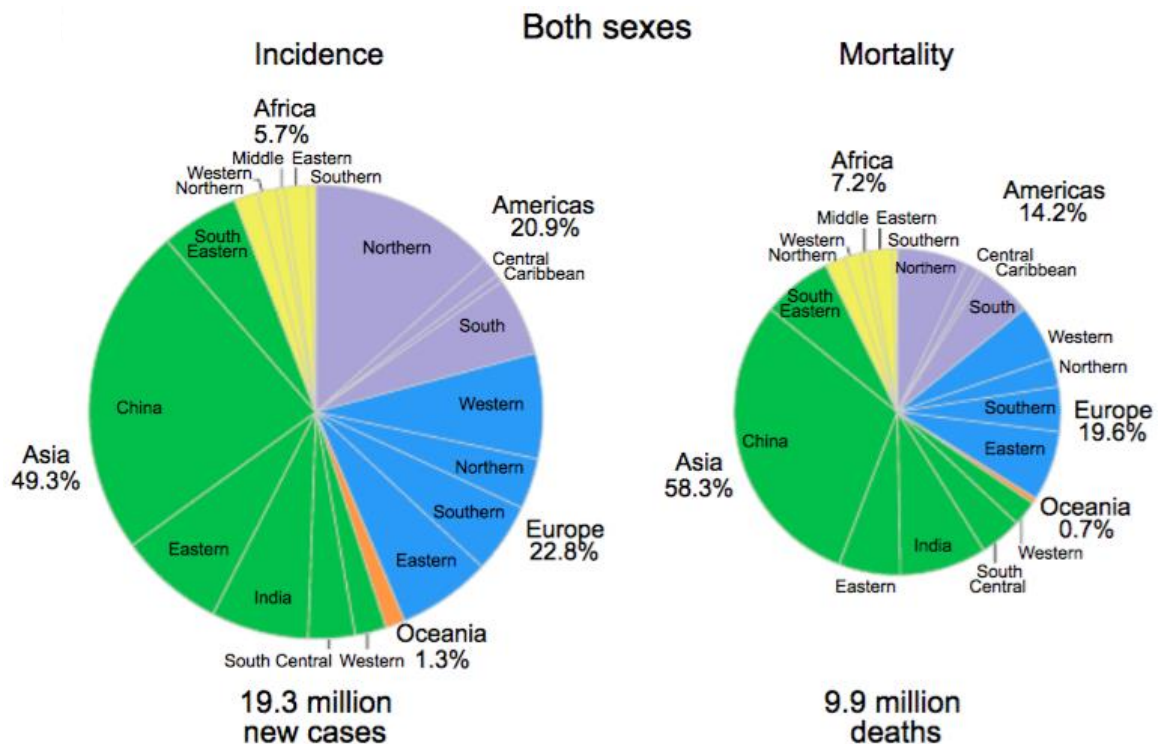


Figura 1. Incidencia y mortalidad de cáncer en diferentes áreas del mundo en 2020. (Tomado de Sung *et al.*, 2021).

1.2. Tratamientos contra el cáncer

Existen diversos tipos de tratamientos contra el cáncer pues dependen del tipo de cáncer y del estadio en el que se encuentre. Los principales tipos de tratamiento contra el cáncer son: cirugía, radioterapia, inmunoterapia, terapia dirigida, terapia antihormonal, trasplante de células madre y quimioterapia. En algunos casos solo se administra un tipo de tratamiento, sin embargo, la mayoría de los pacientes

reciben una combinación de tratamientos como cirugía con quimioterapia o radioterapia.

La quimioterapia utiliza fármacos para destruir las células cancerosas. La era de la quimioterapia inicio en los años 40 con el uso de los agentes mostaza de nitrógeno y los antifolatos; desde entonces, el desarrollo de fármacos contra el cáncer se ha transformado de forma radical. La quimioterapia ofrece la oportunidad de tratar aquellos casos de cáncer que se han propagado por todo el organismo (metástasis). La combinación de tratamientos antineoplásicos se estableció a través de una serie de investigaciones y ensayos clínicos, en donde se demostró que los fármacos eran más eficaces si se utilizaban en pacientes con tumores de menor tamaño y como terapias combinadas, e incluso aquellos fármacos poco eficaces mejoraban la supervivencia cuando se utilizaban como coadyuvantes. (Chabner y Roberts Jr, 2005).

En la actualidad existen más de 200 agentes quimioterapéuticos en uso, éstos pueden circular por todo el cuerpo afectando a las células sanas y normales del organismo, causando los denominados efectos secundarios, los cuales se asocian con el mecanismo de acción de cada compuesto (Tabla 1). Entre los principales efectos secundarios que se presentan a consecuencia del tratamiento con quimioterapéuticos se encuentran: anemia, cambios en el apetito, tendencia a presentar fácilmente moretones y sangrados, náuseas y vómitos, estreñimiento, caída del cabello, infección, diarrea, problemas en músculos y nervios, problemas renales, cambios de humor, cambios en el deseo y función sexual, problemas de fertilidad, problemas en la capacidad de concentración, cambios hormonales, debilidad del sistema inmune, cambios en piel y uñas y cansancio (Carr *et al.*, 2008). Los compuestos antineoplásicos no son fáciles de clasificar, históricamente se han categorizado como: agentes alquilantes, antimetabolitos, productos naturales, hormonas, antagonistas y otros. Los agentes alquilantes y los antimetabolitos representan a dos de los grupos de compuestos que se utilizan más para tratar el cáncer, entre los que destacan el carboplatino y el 5-fluorouracilo, respectivamente, ambos utilizados en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (NCBI:LiverTox, 2021).

Tabla 1. Toxicidad y modo de acción de algunos agentes quimioterapéuticos.

<i>Quimioterapéuticos</i>	<i>Modo de acción</i>	<i>Toxicidad</i>
Análogos de platino: Carboplatino, cisplatino	Inhibición de la síntesis del ADN	Mielosupresión, nefro/oto y neurotoxicidad
Taxanos: Docetaxel, paclitaxel	Inhibición de la mitosis	Neuropatía periférica, hipersensibilidad
Inhibidores de la topoisomerasa: Irinotecan, topotecan	Inhibición de la síntesis del ADN	Síndrome colinérgico agudo
Inmunomoduladores antiproliferativos: Azatioprina, micofenolato	Inmunosupresión	Mielosupresión
Inmunosupresores: Ciclosporina, tacrolimus	Inhibición de la calcineurina	Nefrotoxicidad, hiperplasia gingival, hipertensión, PRES*
Anticuerpos monoclonales: Bevacizumab	Inhibición de VEGF	Hemorragia mucocutánea, perforación gastrointestinal
Hormonas: Estrógenos	Citotoxicidad	Trombosis venosa y arterial
Antagonistas hormonales: Tamoxifen	Antagonista del receptor de estrógenos	Trombosis, derrames cerebrales
Otros antineoplásicos: Procarbazina	Formación de radicales libres	Mielosupresión, hipersensibilidad

* PRES = síndrome de encefalopatía posterior reversible VEGF= Factor de crecimiento endotelial vascular (Tomado de Carr *et al.*, 2008).

1.2.1. Carboplatino

El carboplatino (CbPt) o cis-diamino(ciclobutano-1,1-dicarboxilato-O,O')platino(II) por su nombre IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (Figura 2), es un organoplatino con actividad antineoplásica que se utiliza como agente quimioterapéutico en el tratamiento contra diferentes tipos de cáncer. Presenta un peso molecular de 373.272 g/mol con fórmula molecular C₆H₁₄N₂O₄Pt, es un sólido cristalino de color blanco, soluble en agua, etanol y metanol.

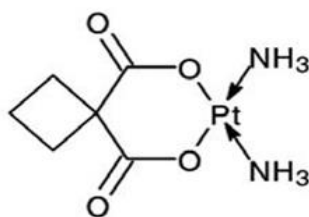


Figura 2. Estructura química del carboplatino.

El CbPt es uno de los principales agentes basados en platino que se utilizan como quimioterapéutico, presenta baja toxicidad en comparación con otros compuestos antitumorales, por lo que se utiliza en diferentes tipos de cáncer como: testículo, ovario, cabeza y cuello, esófago, mama y pulmón (Sousa *et al.*, 2014).

1.2.1.1. Mecanismo de acción del carboplatino

Para ejercer su efecto, el CbPt tiene que cruzar la membrana celular y activarse, para lo anterior, dentro de la célula la molécula sufre una hidrólisis quedando cargada positivamente. Posteriormente el CbPt interactúa con moléculas nucleofílicas dentro de la célula como ADN, ARN y proteínas, propiciando la formación de aductos de platino. Este proceso ocurre a través del enlace covalente del CbPt a el sitio N7 de las bases de purina formando interacciones ADN-proteínas o ADN-ADN (Figura 3) (Knox *et al.*, 1986; Sousa *et al.*, 2014).

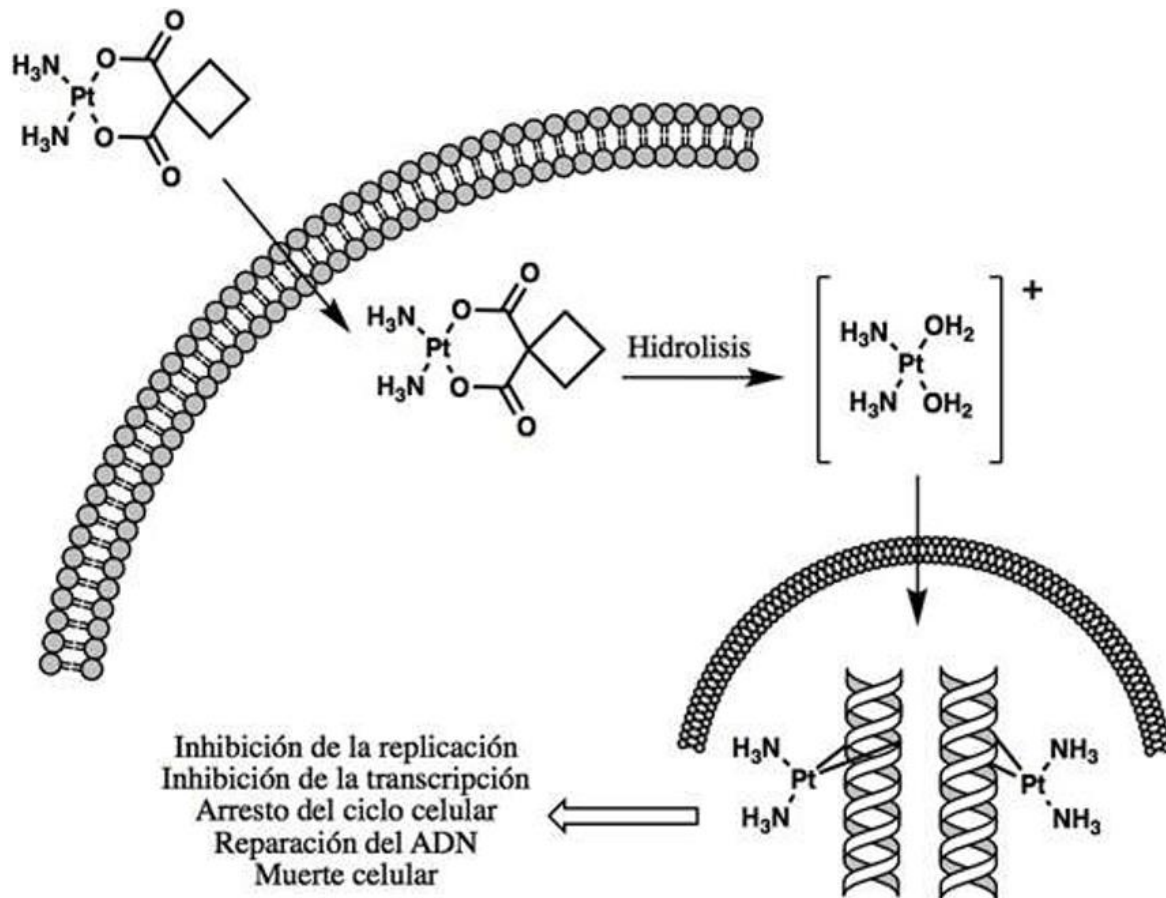


Figura 3. Mecanismo de acción del carboplatino.

El enlace formado entre el CbPt y ADN puede producir lesiones en esta biomolécula y además puede inhibir su replicación, causando la acumulación de células en fase G2/M y la inducción de la apoptosis. Debido a su farmacocinética, el CbPt tiene menos efectos secundarios que su precursor, el cisplatino, aunque es menos potente, lo cual podría deberse a diferencias en las tasas de formación de aductos con el ADN (Sousa *et al.*, 2014).

1.2.1.2. Efectos adversos del carboplatino

Al igual que otros compuestos quimioterapéuticos el CbPt produce una serie de efectos secundarios no deseados en los pacientes, entre los que se encuentran problemas gastrointestinales, pérdida del apetito, hipersensibilidad, cansancio, alopecia, problemas neurológicos y de visión, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad y el principal la mielosupresión. Los compuestos antineoplásicos con base de platino presentan serios efectos nefrotóxicos, sin embargo dentro de este grupo, el CbPt representa una alternativa para aquellos pacientes con deterioro de la función renal, ya que en comparación con el cisplatino es diez veces más soluble, por lo que puede ser eliminado más fácilmente por el riñón (Benedí y Gómez, 2006). Dentro de los efectos renales que provoca el CbPt se ha reportado que el 10% de los pacientes tratados con este antineoplásico presenta anormalidades en la creatinina sérica y un 22% de los pacientes presenta anormalidades en el nitrógeno ureico en sangre, además de alteraciones en los valores de aclaramiento de la creatinina (Mulder *et al.*, 1988; McDonald *et al.*, 1991).

Por otra parte, se han reportado efectos secundarios a nivel hepático y neurológico ocasionados por el CbPt. Los efectos a nivel hepático incluyen valores anormales en las pruebas de función hepática (bilirrubina total, fosfatasa alcalina, etc.), mientras que los efectos neurológicos comprenden neuropatías periféricas que se han reportado en el 6% de los pacientes en tratamiento con este antineoplásico. Dentro de los efectos hematológicos inducidos por el CbPt se encuentran trombocitopenia con recuentos plaquetarios inferiores a $50,000/\text{mm}^3$ en el 25-35% de los pacientes, neutropenia con conteos de granulocitos inferiores a $1,000/\text{mm}^3$

en el 16% de los pacientes y leucopenia con recuentos de glóbulos blancos inferiores a $2,000/\text{mm}^3$ en el 15-20% de los pacientes tratados con este antineoplásico. La supresión de la médula ósea o mielosupresión es la toxicidad, factor que limita la dosis del tratamiento con CbPt. Dicho problema suele ser más grave en pacientes con insuficiencia renal. Se han reportado casos de anemia con un recuento de hemoglobina inferior a 11 g/dl en el 71% de los pacientes que iniciaron el tratamiento con el antineoplásico con un valor basal por encima de ese valor. La incidencia de anemia aumenta de acuerdo con el tiempo de exposición. La mielosupresión puede ser más severa cuando el CbPt se combina con otros fármacos supresores de médula ósea o con radioterapia (Kerr *et al.*, 1990). Debido a su menor toxicidad con respecto al cisplatino y otros quimioterapéuticos, el CbPt ha sido utilizado en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer en asociación con otros compuestos anticancerígenos presentando resultados favorables en el 95% de los casos, lo cual demuestra que este fármaco posee buena respuesta a la terapia combinada o poliquimioterapia (Sousa *et al.*, 2014).

1.2.2. 5-fluorouracilo

El 5-fluorouracilo (5-FU) o 5-fluoro-1H-pirimidina-2,4-diona por su nombre de acuerdo a la IUPAC (Figura 4) es un análogo de las pirimidinas y se le clasifica como un “antimetabolito” dentro de los compuestos antineoplásicos. Se presenta en su forma física como un polvo blanco cristalino con un peso molecular de 130.078 g/mol, es soluble en agua y en solventes orgánicos como alcohol, metanol, cloroformo, éter y benceno (NCBI, 2017).

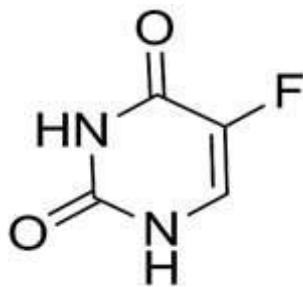


Figura 4. Estructura química del 5-fluorouracilo.

Es un compuesto utilizado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer entre los que se encuentran cáncer de colon y recto, mama, cánceres del aparato digestivo (anal, esofágico, pancreático y gástrico), cáncer de cabeza y cuello, hepatoma, cáncer ovárico y además es utilizado como crema o solución en el cáncer de piel de células basales y queratosis actínica (Chemocare, 2017 y NCBI, 2017).

1.2.2.1. Mecanismo de acción del 5-FU

En el organismo el 5-FU es convertido en tres principales metabolitos activos: fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) y fluorouridina trifosfato (FUTP). Tanto el compuesto padre como los metabolitos poseen diversos mecanismos de acción (Figura 5). El metabolito FdUMP inhibe a la enzima timidilato sintasa, resultando en la disminución del trifosfato de timidina, uno de los cuatro nucleótidos usados en la síntesis del ADN. El metabolito FdUTP es capaz de incorporarse en el ADN y ARN alterando el procesamiento y función de estas biomoléculas, finalmente el metabolito FUTP puede reemplazar al uracilo e incorporarse en el ARN inhibiendo su procesamiento, así como el crecimiento celular. Todos los mecanismos antes mencionados tienen como finalidad producir la muerte celular (Longley et al., 2003).

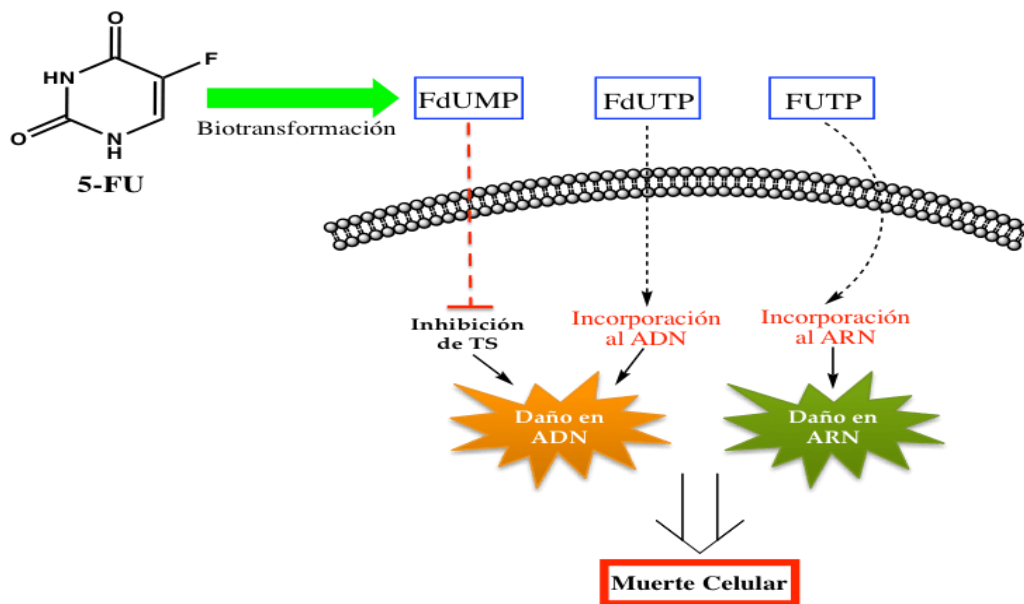


Figura 5. Mecanismo de acción del 5-FU.
TS=timidilato sintasa (Modificado de Longley et al. ,2003).

1.2.2.2. Efectos adversos del 5-FU

Los efectos adversos o secundarios del 5-FU son muy semejantes a los que causan los diversos compuestos quimioterapéuticos que existen, inclusive aquellos desarrollados por el CbPt. Entre los efectos más comunes se encuentran la mielosupresión, dolor bucal y de garganta, diarrea, vómito, pérdida del cabello, fotosensibilidad, anemia, hormigueo en manos y pies y pérdida del apetito, entre otros (UPMC, 2017).

1.3. El potencial antineoplásico de los productos naturales

Desde la edad antigua hasta nuestros tiempos, las plantas medicinales han jugado un papel esencial en la salud y bienestar de los humanos. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), un alto porcentaje de la población de países en desarrollo depende principalmente de plantas medicinales para tratar las necesidades básicas de la salud. Las plantas son consideradas como la principal fuente de compuestos con actividad biológica, se estima que alrededor del 50% de los fármacos prescritos en Europa y Estados Unidos son productos naturales o derivados de estos. Existen aproximadamente 250,000-500,000 especies de plantas en la tierra y solo el 1-10% han sido estudiadas química y farmacológicamente por su valor medicinal. Aún con el dominio reciente de la síntesis química como un método para el descubrimiento y producción de fármacos, el potencial bioactivo de las plantas o de sus extractos para proveer nuevos y novedosos productos para el tratamiento y prevención de diferentes enfermedades es aún un amplio campo de investigación (Talib y Mahasneh, 2010).

Los compuestos biológicamente activos derivados de plantas tienen un gran impacto en el área clínica en la cancerología. En 1956, Gordon Zubrod, quien había dirigido el desarrollo de agentes antimaláricos para el ejército de los Estados Unidos, asumió el liderazgo de la división de tratamiento del cáncer del Instituto Nacional del Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés). Zubrod, tenía un interés particular en los productos naturales y estableció un programa para recolectar y probar plantas y fuentes marinas que condujo en un periodo de tiempo relativamente corto al descubrimiento de compuestos utilizados en el tratamiento contra el cáncer

como: taxanos (paclitaxel y docetaxel), captotecinas, vinca alcaloides (vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina), podofilotoxina y sus derivados (topotecan e irinotecan) y antraciclinas (doxorrubicinas, daunorrubicina, epirubicina e idarrubicina) (Chabner y Roberts Jr, 2005; Safarzadeh *et al.*, 2014).

A partir de los descubrimientos impulsados por Zubrod en la década de los sesenta, se han descubierto una gran diversidad de productos con potencial antineoplásico. En la actualidad, existen más de 200 fármacos aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), que son utilizados en el tratamiento contra diferentes tipos de cáncer y en gran proporción son compuestos que derivan o tienen un origen natural (Yin *et al.*, 2013).

Actualmente, dentro de la investigación clínica, es necesaria la búsqueda de compuestos con actividad biológica que presenten alta toxicidad y selectividad hacia las células tumorales. Las plantas tienen una capacidad ilimitada de producir sustancias que atraen a los investigadores en la búsqueda de nuevos y novedosos quimioterapéuticos, diversos grupos con propiedades antitumorales son productos derivados de plantas entre los que se encuentran alcaloides, fenilpropanoides y terpenoides (Talib y Mahasneh, 2010). En los últimos años, los compuestos lipídicos fenólicos, metabolitos sintetizados principalmente por plantas, como los “ácidos anacárdicos”, han despertado un interés interdisciplinario importante, debido a la gran diversidad de actividades biológicas que presentan, representando una opción a futuro para ser utilizados en distintas áreas de la medicina (Stasiuk y Kozubek, 2010).

1.3.1. Ácidos anacárdicos

Los ácidos anacárdicos (AA) son compuestos secundarios de origen natural, que se han aislados a partir de diferentes plantas como: *Amphipterygium adstringens*, *Anacardium occidentale* y *Ozoroa insignis*. Químicamente los AA son una mezcla de diversos compuestos relacionados entre si que consisten de un ácido salicílico sustituido con una cadena alquílica de entre 15-19 carbonos que puede estar saturada o insaturada (Figura 6) (Hemshkhar *et al.*, 2011; Hamad y Mubofu, 2015).

Castillo-Juárez y colaboradores (2007), determinaron que en la mezcla de AA identificados en la corteza de *A. adstringens*, una planta endémica de México, conocida comúnmente como “Cuachalalate”, el ácido 6-pentadecil salicílico (6SA) representa el 46.8% del total de los AA encontrados en la corteza de la planta. Ésta planta es utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de numerosas condiciones entre las que se encuentran coleditiasis, fiebre, gastritis, úlceras gástricas, inflamación y cáncer gastrointestinal (Ortega *et al.*, 1999; Castillo-Juarez *et al.*, 2007).

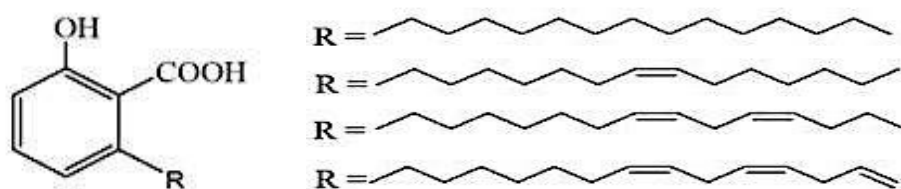


Figura 6. Molécula representativa de ácido anacárdico (Tomado de Hamad y Mubofu, 2015).

1.3.1.1. Ácido 6-pentadecil salicílico (6SA)

El 6SA o ácido 2-hidroxi-6-pentadecil benzonico (Figura 7) por su nombre de acuerdo a la IUPAC, es un compuesto lipídico fenólico, metabolito secundario de plantas, es sólido de color blanco con fórmula molecular $C_{22}H_{36}O_3$, tiene un peso molecular de 348.525 g/mol, un punto de ebullición de 92.5-93° C y un pKa de 4.8, es soluble en etanol, metanol, dimetilsulfoxido, diclorometano y acetato de etilo (Toyomizu *et al.*, 2002).

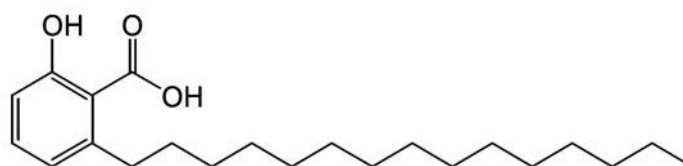


Figura 7. Estructura del ácido 6-pentadecil salicílico.

1.3.1.2. Actividad biológica del 6SA

Existen algunos estudios que muestran las diferentes actividades biológicas que presenta el 6SA y que se describen en la Tabla 2. Además de estas, el 6SA presenta

actividad antineoplásica, característica que ha hecho que éste compuesto reciba gran atención por parte de diversos grupos de investigación y de compañías farmacéuticas (Hemshekhar *et al.*, 2011).

Tabla 2. Actividad biológica del ácido 6-pentadecil salicílico (6SA).

<i>Actividad Biológica</i>	<i>Referencia</i>
Inhibición de la xantina oxidasa	(Masuoka y Kubo, 2004)
Antibacterial	(Kubo <i>et al.</i> , 1999; Castillo-Juárez <i>et al.</i> , 2007)
Inhibición de acetil transferasas	(Balasubramanyam <i>et al.</i> , 2003)
Activación de aurora quinasa A	(Kishore <i>et al.</i> , 2008)
Inhibición de tirosinasa	(Kubo y Kinsthori, 1994)
Inhibición de ureasa	(Kubo <i>et al.</i> , 1999)
Actividad anti-obesidad	(Toyomizu <i>et al.</i> , 2003)
Anticancerígeno	(Hemshekhar <i>et al.</i> , 2011)

Diversos estudios realizados en modelos in vitro muestran la capacidad citotóxica del 6SA. Kubo y colaboradores, en 1993, a través de un estudio en células de cáncer de mama (BT-20) y cáncer cervicouterino (HeLa) demostraron que el 6SA presenta actividad citotóxica contra éstas líneas celulares, al igual que otros compuestos análogos extraídos del fruto de la planta *A. occidentale*, éste fue uno de los primeros estudios en donde se demostró la capacidad antiproliferativa de dicho compuesto. Años más tarde, Tan y colaboradores, en 2012, con la finalidad de investigar el efecto del 6SA sobre las células de cáncer de próstata LNCaP, realizaron un estudio en donde observaron que el 6SA inhibe la proliferación celular, induce el arresto del ciclo celular y la apoptosis en estas células. Otro proceso celular importante que desencadena el 6SA es el estrés del retículo endoplásmico, lo anterior fue demostrado en células de carcinoma hepático (HepG2), mieloma (U266) y carcinoma de pulmón (A549), en donde también se observó autofagia (Huang *et al.*, 2014; Shin y Kim, 2014). De igual manera, el efecto antiproliferativo del 6SA ha sido demostrado en células de cáncer gástrico (AGS) y leucemia (K562). Un efecto importante reportado por Alam-Escamilla y colaboradores en 2015, es la capacidad que tiene el 6SA de no afectar la viabilidad de las células mononucleares de sangre

periférica (PBMCs), ésta interesante característica es la que se busca que presenten todos aquellos compuestos que puedan ser utilizados en un tratamiento antineoplásico.

Por otra parte, se han realizado algunos estudios en modelos murinos tratados con 6SA, en los cuales se reporta la capacidad de este compuesto de reducir el tamaño y peso del tumor, lo anterior en modelos con xenotrasplante y alotrasplante de células cancerígenas (Huang *et al.*, 2014 y Gnanaprakasam *et al.*, 2015). Asimismo, Wu y colaboradores, en 2011, observaron por primera vez, mediante un estudio en ratones, que el 6SA puede funcionar como un inhibidor de la angiogénesis, conduciendo a la supresión del tumor. Omanakuttan y colaboradores, en 2012, demostraron la capacidad del 6SA de inhibir la actividad catalítica de las metaloproteinasas de matriz 2 y 9, enzimas importantes durante el proceso de metástasis; además, mediante una serie de experimentos y modelos *in silico*, observaron que la cadena alifática de este compuesto es sumamente importante para producir su actividad biológica.

El mecanismo por el cual el 6SA ejerce su función antineoplásica se desconoce hasta ahora; sin embargo, ciertos autores lo relacionan con la capacidad de éste compuesto de inhibir la actividad de enzimas histonas acetil transferasas (HATs), ya que la disfunción de estas enzimas está asociada con la manifestación de numerosos desordenes fisiológicos, entre ellos el cáncer (Hamad y Mubofu, 2015).

1.3.1.3. Efecto del 6SA sobre la actividad de las HATs

Las HATs, son un grupo de enzimas que tienen una función importante en la regulación de la expresión genética. Éstas modifican covalentemente los residuos de lisina de la región N-terminal de las histonas a través de la adición de grupos acetilos a partir de la acetil-CoA (Hemshkhar *et al.*, 2011).

Estas enzimas se dividen en diferentes familias: GNAT (N-acetil transferasas relacionadas a GNC5), MYST (Moz, Ybf2/Sas3 y Tip60) y el complejo CBP (proteína de unión a CREB)/p300 (p300/CBP). El complejo CBP, es uno de los co-activadores transcripcionales más estudiados, ya que, desempeña una función importante en una variedad de procesos biológicos; además su disfunción está asociada con

diversas enfermedades que se presentan en el humano, como: cáncer, diabetes, infecciones virales y asma (Hamad y Mubofu, 2015). Mediante un estudio *in vitro* realizado por Balasubramanyam y colaboradores en 2003, utilizando una mezcla de AA extraídos de *A. occidentale*, se demostró que los AA inhiben la actividad acetil transferasa de p300 y del factor asociado a P300/ CBP (PCAF), también conocido como K acetil transferasa 2B (KAT2B) (Figura 8). Aunado a esto, se observó que los AA no afectan la transcripción de ADN directamente, pero si que la transcripción dependiente de HAT, de un templado de cromatina, fue fuertemente inhibida en presencia de la mezcla de compuesto. También se observó, que la presencia o no de insaturaciones en la cadena alifática de los AA de la mezcla no alteran la capacidad de inhibición sobre las HATs y que el 6SA presenta una capacidad inhibitoria similar a la de los otros compuestos.

De igual manera a lo observado sobre p300 y PCAF, el 6SA inhibe la actividad de la histona acetil transferasa Tip60 en diferentes tipos de líneas celulares y además sensibiliza las células tumorales a los efectos citotóxicos de la radiación ionizante e inhibe la vía de señalización de esta proteína, por esta última razón se asume que el 6SA es capaz de atravesar la membrana celular. Tip60 es una proteína miembro de la familia MYST y tiene un papel fundamental en la regulación de la respuesta celular a eventos genotóxicos. Esta proteína es activada por radiación ionizante y regula diversos procesos biológicos como: la activación de la proteína quinasa ATM, la respuesta apoptótica, la proteína p53 y la acetilación de histonas. La pérdida en la función de Tip60 inhibe la reparación efectiva del daño al ADN (Sun *et al.*, 2006). Por su actividad antes descrita, en los últimos años, el 6SA ha sido utilizado como una herramienta. De esta manera, Cui y colaboradores, en 2008, demostraron que el 6SA inhibe la actividad de PfGCN5 (Histona acetil transferasa) en *Plasmodium falciparum*, permitiéndoles demostrar la acetilación de lisinas en las histonas y su efecto en la transcripción en este organismo, como modelo experimental (Figura 8).

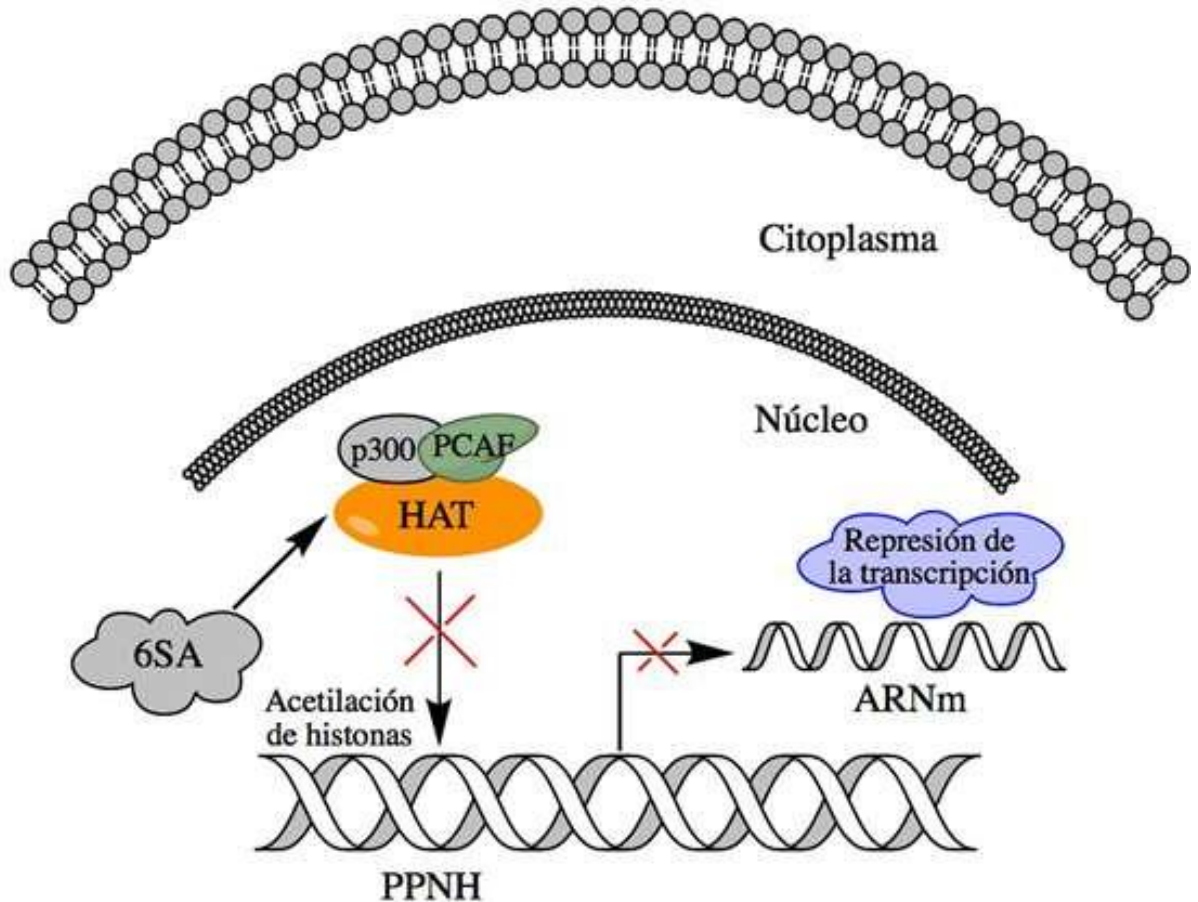


Figura 8. Mecanismo propuesto del efecto del 6SA sobre las HAT (Modificado de Hemshekhar *et al.*, 2011). *PPNH: promotor proximal de histonas nucleosomales.

El balance que existe entre la acetilación y desacetilación proteica es un mecanismo de modulación importante para diversas funciones celulares. Un grupo de proteínas importantes a nivel celular y que presentan la capacidad de ser modificadas pos-traduccionalmente por acetilación son las proteínas STAT (transductor de señal y activador de la transcripción). Se ha identificado que además de la fosforilación, la acetilación de éstas proteínas es esencial para el desarrollo de sus funciones moleculares (Zhuang, 2015).

1.4. Poliquimioterapia

La poliquimioterapia o terapia combinada se basa en el uso de compuestos antineoplásicos combinados para el tratamiento del cáncer, lo cual ha resultado ser más eficaz en comparación a la monoterapia o al tratamiento de cada agente por

separado dentro de un mismo protocolo de tratamiento. El objetivo principal de la poliquimioterapia es el de administrar fármacos que actúen mediante diversos mecanismos de acción, de manera que reduzcan la probabilidad de que las células cancerosas se vuelvan resistentes y sobrevivan.

En algunos tipos de cáncer, el mejor enfoque consiste en combinar cirugía, radioterapia y quimioterapia. La cirugía o la radioterapia tratan el cáncer localizado, mientras que la quimioterapia elimina también las células cancerosas que se han diseminado a lugares distantes del tumor. Algunas veces, se administra radioterapia o quimioterapia antes de la cirugía para reducir el tamaño del tumor, porque así aumenta la probabilidad de extirparlo por completo quirúrgicamente. En ocasiones, la poliquimioterapia es administrada no para curar, sino para aliviar los síntomas y prolongar la vida del paciente. La poliquimioterapia es eficaz cuando existe cáncer avanzado que no se puede someter a radioterapia o a cirugía (por ejemplo, carcinoma pulmonar no microcítico, cáncer de esófago o cáncer de vejiga que no se pueden extirpar quirúrgicamente por completo) (Manual MSD, 2017).

La poliquimioterapia aumenta la supervivencia sin recidiva y la supervivencia global de las mujeres con cáncer de mama. También disminuye significativamente el riesgo de recidiva y la muerte en comparación con la terapia no combinada. En un estudio realizado por Cole y colaboradores (2001), para las mujeres más jóvenes (menores de 50 años) la reducción del riesgo de recidiva fue del 35.3% y la reducción del riesgo relativo para la mortalidad fue del 27.3%. Mientras que para las mujeres de mayor edad (entre 50 y 69 años), las reducciones del riesgo relativo fueron menores, pero aun así significativas. A pesar de los valores estadísticamente significativos en los resultados obtenidos con la terapia combinada, es de importancia determinar si la magnitud de lo alcanzado con este tratamiento es justificable en relación con los efectos tóxicos de la quimioterapia y la disminución en la calidad de vida de pacientes quienes después de la cirugía primaria podrían disfrutar de algo totalmente inverso.

El CbPt y el 5-FU son compuestos antineoplásicos ampliamente utilizados en la clínica para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Estos compuestos son comúnmente administrados en esquemas de asociación o en combinación con otros

agentes quimioterapéuticos de uso común, lo anterior se realiza con la finalidad de lograr el objetivo de la poliquimioterapia, que es aumentar la eficiencia antineoplásica por medio de la combinación de diferentes mecanismos de acción de los compuestos a utilizar en la terapia. Existen en la bibliografía diversos estudios que se han enfocado en la evaluación de la poliquimioterapia con la finalidad de mejorar la eficiencia en el tratamiento contra el cáncer, en la Tabla 3 y 4 se muestran los resultados de diferentes estudios, en los que se ha evaluado el efecto quimioterapéutico del CbPt y del 5-FU cuando estos agentes son utilizados en combinación con otros agentes antitumorales para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. En la tabla 3 y 4, se resume la información relacionada con las poliquimioterapias en las que se han utilizado estos compuestos y se han obtenido resultados favorables, lo que hace a estos agentes antineoplásicos interesantes para ser evaluados en otras terapias combinadas.

Tabla 3. El carboplatino y su utilidad en la poliquimioterapia

Poliquimioterapia	Cáncer	Resultado Favorable	Referencia
Carboplatino/Paclitaxel	Ovario	SI	Kim <i>et al.</i> , (2009)
Carboplatino/Paclitaxel	Esófago	SI	Honing <i>et al.</i> , (2014)
Carboplatino/Paclitaxel	Pulmón	SI, pacientes en estadio IB con tumor ≥ 4 cm	Chang <i>et al.</i> , (2014)
Carboplatino/Paclitaxel	Cérvix	SI	Shoji <i>et al.</i> , (2012)
Carboplatino/Paclitaxel	Pulmón	SI, pacientes en estadio IB con tumor ≥ 4 cm	Strauss <i>et al.</i> , (2008)
Carboplatino/Paclitaxel	Cabeza y cuello	SI	Semrau <i>et al.</i> , (2011)
Carboplatino/Docetaxel	Cérvix	NO	Ukita <i>et al.</i> , (2013)
Carboplatino/Docetaxel	Mama	SI, pacientes con metástasis	Pérez <i>et al.</i> , (2005)
Carboplatino/Docetaxel	Pulmón	SI	Zhi <i>et al.</i> , (2013)
Carboplatino/Gemcitabina	Pulmón	SI	Lim <i>et al.</i> , (2013)
Carboplatino/Pemetrexed	Pulmón	SI	Zukin <i>et al.</i> , (2013)
Carboplatino/Docetaxel/Bevacizumab	Pulmón	SI	Takiguchi <i>et al.</i> , (2014)
Carboplatino/Vinorelbina	Pulmón	SI	Masters <i>et al.</i> , (2003)

Estadio IB= el tumor mide más de 3 cm, pero no más de 4 cm, y el cáncer no se diseminó a los ganglios linfáticos.

Tabla 4. El 5-FU en poliquimioterapia contra el cáncer

Poliquimioterapia	Cáncer	Favorable	Referencia
5-FU/Oxaliplatino	Colon	SI	Mathé <i>et al.</i> , (1989)
5-FU/Oxaliplatino	Gástrico	SI, tumor irresecable	
5-FU/Cisplatino/Leucovorina	Colon	SI, moderado en estadio avanzado	Shin <i>et al.</i> , (2005)
5-FU/Cisplatino/Leucovorina	Tracto Biliar	SI, pacientes con metástasis	Taïeb <i>et al.</i> , (2002)
5-FU/Cisplatino/Docetaxel	Gástrico	SI, tumor irresecable	Oh <i>et al.</i> , (2005)
5-FU/Metotrexato/Etoposido	Enfermedad trofoblastica gestacional	SI, pacientes de alto riesgo	Wang <i>et al.</i> , (2006)

1.4.1. El 6SA y su uso en poliquimioterapia

El 6SA, compuesto de origen natural con capacidad anticancerígena, también ha sido evaluado en combinación con otros compuestos antineoplásicos. Legut *et al.*, (2014), realizaron un estudio utilizando liposomas que contenían mitoxantrona, 6SA y vitamina C, con la finalidad de evaluar el efecto citotóxico de estos compuestos en líneas celulares de melanoma humano (A375 y Hs294T) y en fibroblastos dérmicos humanos normales. Los resultados del estudio mostraron que el 6SA aumentó la citotoxicidad de la mitoxantrona frente al melanoma en comparación con los liposomas que contenían sulfato de amonio y el antineoplásico. Además, se observó que la vitamina C y el 6SA protegen a las células normales (no transformadas) de los daños causados por el anticancerígeno. La formulación que combinó 6SA, vitamina C y mitoxantrona mostró resultados prometedores en términos de citotoxicidad y citoprotección, por lo tanto, la combinación de estos compuestos podría tener un potencial en el tratamiento contra el cáncer.

Recientemente Gnanaprakasam y colaboradores, en 2021, reportaron un estudio con la finalidad de observar el efecto antitumoral del 6SA en un modelo animal inmunocompetente. Para ello, se utilizaron ratones hembra Balb/c, los cuales fueron sometidos a un alotransplante con células de cáncer de mama 4T1. Los animales fueron administrados con 6SA (2 mg/kg, i.p.), taxol (0.2 mg/kg, i.p.) y un tratamiento combinado de ambos compuestos. Los resultados demostraron que el 6SA redujo el volumen y peso del tumor mediante apoptosis inducida por caspasa-8. Además,

el 6SA disminuyó la metástasis en pulmón e incrementó la proporción de células inmunes en sangre, en ganglios linfáticos y en médula ósea. Por otra parte, el taxol ocasionó una disminución en linfocitos causando inmunosupresión sistémica y mielosupresión en médula ósea. El tratamiento combinado redujo la citotoxicidad ocasionada por el taxol en sangre y médula ósea, aunque no disminuyó el volumen y peso del tumor en mayor proporción a lo realizado por las monoterapias.

1.5. Justificación

El cáncer es un problema social que representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial. La quimioterapia es uno de los principales tratamientos utilizados en la terapia contra el cáncer. El CbPt y el 5-FU son agentes quimioterapéuticos utilizados comúnmente en conjunto con otro antitumoral y tienen como principal efecto secundario producir mielosupresión. En la actualidad, múltiples de los fármacos que se utilizan en el tratamiento contra el cáncer proceden o derivan de una fuente natural. El 6SA, es un compuesto de origen natural con actividad antineoplásica que no produce toxicidad en células normales. La combinación de compuestos antineoplásicos se realiza con la finalidad de obtener un comportamiento sinérgico o sumatorio que aumente la potencia terapéutica de las sustancias en combinación en el tratamiento contra el cáncer. Por lo que la poliquimioterapia con 6SA y los antineoplásicos mencionados, podría resultar en una reducción más eficiente de tamaño de un tumor cancerígeno. Por otra parte, por efecto del 6SA, se disminuiría el efecto tóxico de los antitumorales sobre las células del sistema inmune disminuyendo los efectos adversos de la quimioterapia.

1.6. Hipótesis

La poliquimioterapia con 6SA y otros antineoplásicos provocará un efecto antitumoral mayor comparado con la terapia de cada compuesto por separado y mejorará la sobrevida.

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivo General

Evaluar si la poliquimioterapia con 6SA y CbPt o 5-FU provoca un efecto antitumoral mayor comparado con la monoterapia.

1.7.2. Objetivos Particulares

1.7.2.1. Cuantificar la reducción en el tamaño y volumen tumoral por la poliquimioterapia en comparación de la monoterapia en un modelo murino de cáncer de mama autólogo.

1.7.2.2. Evaluar el índice de metástasis en el pulmón mediante el ensayo con 6-TG.

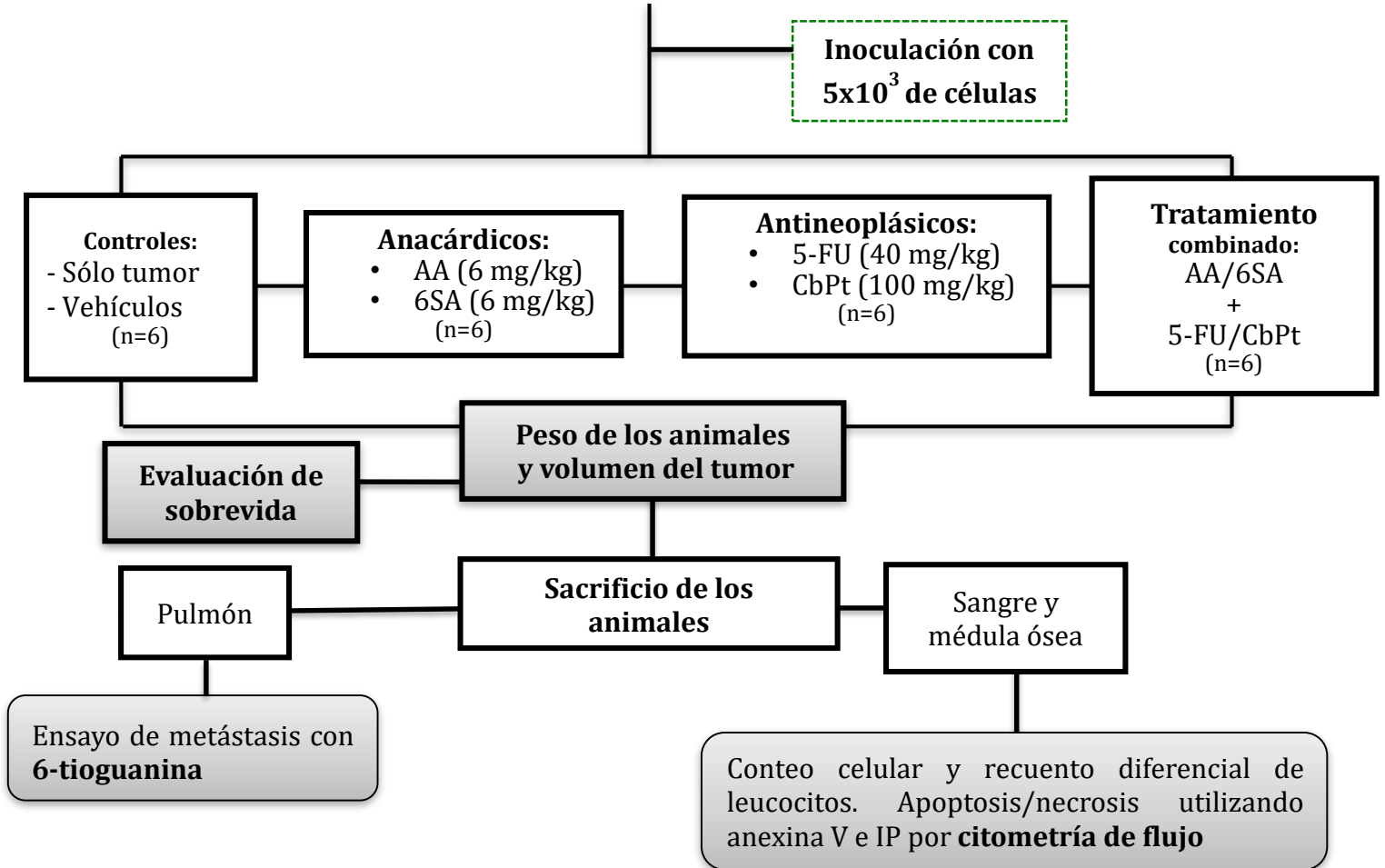
1.7.2.3. Determinar si el 6SA disminuye la mielosupresión y leucopenia producida por los diferentes tratamientos en un modelo murino de cáncer de mama autólogo.

1.7.2.4. Determinar la sobrevida de los animales inoculados con la línea celular tumoral 4T1 bajo en los diferentes tratamientos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño experimental

Ratones hembra Balb/c
6-8 semanas de edad



5-FU = 5-fluoruracilo

CbPt = carboplatino

AA = mezcla de ácidos anacárdicos

2.2. Línea celular 4T1

2.2.1. Origen y características de la línea celular

La línea celular 4T1 es una de las cuatro sublíneas aisladas de un tumor mamario que creció espontáneamente en un ratón hembra MMTV+ BALB/BfC3H. Esta línea celular fue seleccionada por su resistencia a 6-tioguanina, el tumor formado por las células 4T1 es altamente tumorigénico e invasivo y a diferencia de otros modelos tumorales presenta una alta incidencia de metástasis espontánea desde el tumor primario ubicado en la glándula mamaria hasta múltiples sitios distantes en el organismo incluyendo ganglios linfáticos, tejido sanguíneo, hígado, pulmón, cerebro y hueso (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 2001).

2.2.2. Cultivo de la línea celular 4T1

La línea celular criopreservada en nitrógeno líquido se descongelará a temperatura ambiente en 5 ml de medio RPMI-1640 complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de estreptomycin (100 U/ml), 1% de penicilina ($\mu\text{m}/\text{ml}$) y 100 nM de aminoácidos no esenciales. El cultivo celular se mantuvo a 37° C y en una atmósfera de 5% de CO₂. A las 4 h de incubación se cambió el medio de cultivo. Se examinaron a través del microscopio y cuando alcanzaron el 80% de confluencia se realizó un subcultivo para esto se lavarón las células dos veces con solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBS 10X; NaCl 80 g, KH₂PO₄ 2.4 g, Na₂HPO₄ 14.4 g y KCl 2 g, aforada a un litro de agua milliQ y pH 7.4), después se agregaron 300 μl de tripsina y se incubó de 2-3 min. Posteriormente, las células se suspendieron en medio RPMI para inactivar la tripsina para finalmente subcultivarse.

2.3. Extracción y aislamiento de AA de *Amphipterygium adstringens*

El material vegetal se obtuvo de la empresa Pacalli, como cuachalalate corteza 100%, en presentación de bolsas de 100g. Se maceraron 200 g de corteza de *A. adstringens* finamente molida a temperatura ambiente y se mantuvo durante una semana con hexano, el extracto se concentró a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio y se almacenó a 4 °C en la oscuridad hasta su uso. Se analizó la composición del extracto mediante cromatografía en capa fina (TLC, láminas

recubiertas de gel de sílice Merck 60F-254) con un sistema Hex: CH₂Cl₂: EtOAc (20:20:10) como eluyente y las capas finas fueron visualizadas bajo una lámpara UV o mediante revelado con molibdato de cerio o sulfato de cerio. A continuación, aplicamos 2.7 g del extracto hexánico a una columna de cromatografía (gel de sílice, malla Merck 230-400) con el mismo sistema de eluyente para obtener diferentes fracciones. Identificamos la composición de estas fracciones mediante la comparación del análisis de RMN 1H (Sistema de RMN de Varian a 600 MHz usando CDCl₃, Metanol-d₄ como solventes o una combinación) y el análisis de espectrometría de masas (espectrómetro de velocidad de Bruker AmaZon por electropulverización en masa) con datos publicados y por TLC con 6SA puro (C₁₅: 0) como referencia (Figura 9). Las fracciones 35 a 69 produjeron un sólido blanquecino amarillento, el análisis de RMN1H y espectrometría de masas (Figura 9 y Apéndice A) indicó una mezcla de ácidos fenólicos de cadena larga, que se conocen como AA, en la que el 6SA está altamente representado con patrones similares y consistentes con los previamente reportado en la literatura. Seleccionamos la fracción 68 para estudios farmacológicos adicionales, en particular debido a su mayor proporción de 6SA.

Se obtuvo el extracto hexánico de la corteza de *A. Adstringens* con un rendimiento de 3.5 g de un residuo aceitoso de color verde oscuro, el cual representó el 1.75% (w/w) del total de corteza utilizada. De acuerdo con Mata y colaboradores (1991) y Castillo-Juárez y colaboradores (2007), el método de extracción que se utilizó produce una mezcla de AA que contiene aproximadamente 50% de 6SA, ácido 6-hexadecil salicílico (6-7%), ácido 6-heptadecil salicílico (28-29%), ácido 6-nonadecil salicílico (7.5-8.5%) y un compuesto monoinsaturado con una cadena alquílica de 19 carbonos (6.5-8.6%) denominado ácido 6-[15'(Z)-nonadecenil]-salicílico. De igual manera, el análisis de masas exhibió un patrón de señales consistentes con los datos reportados con anterioridad (Déciga-Campos *et al.*, 2007; Castillo-Juárez *et al.*, 2007).

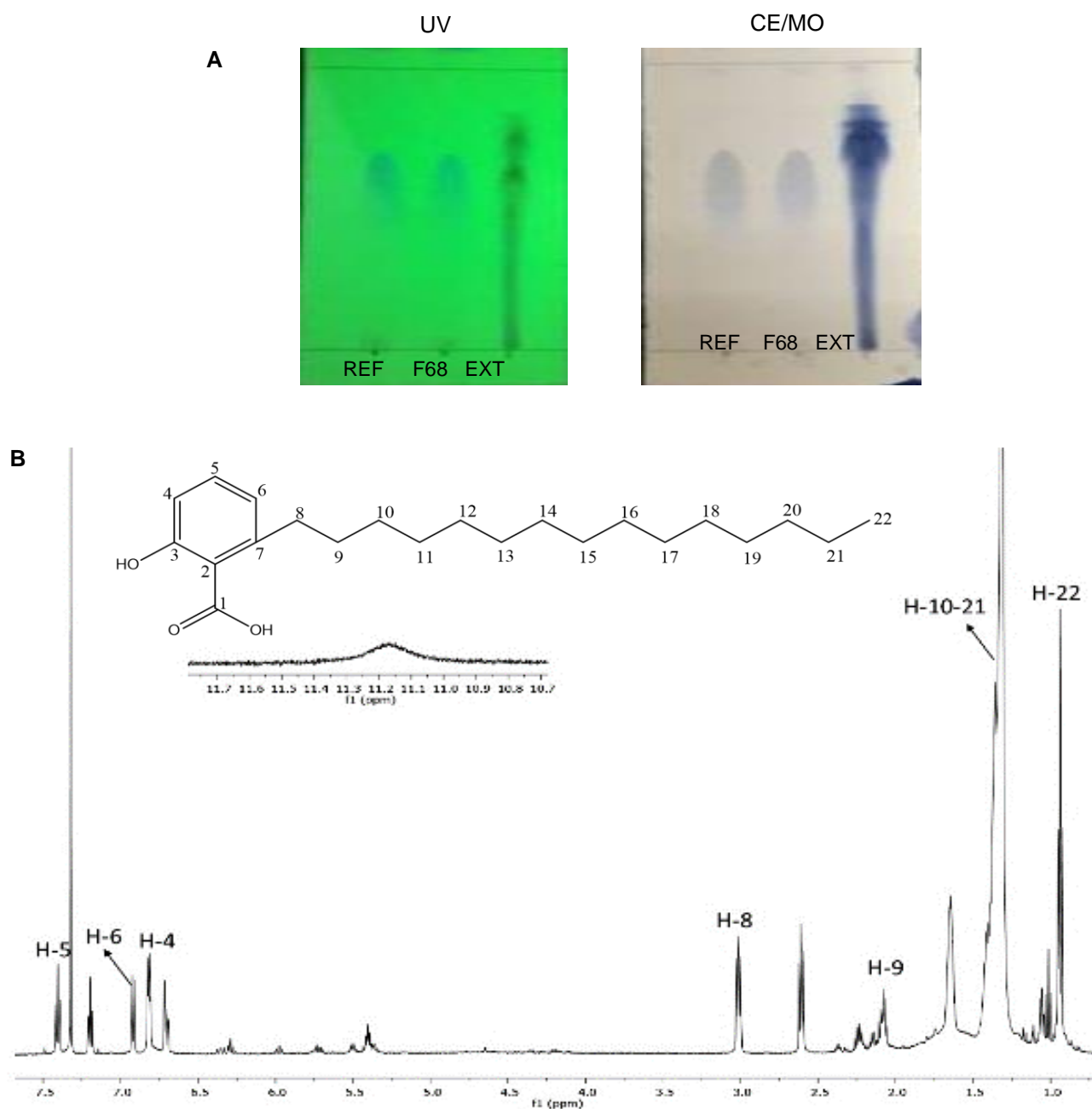


Figura 9. Caracterización de los ácidos anacárdicos. Cromatografía en capa fina de 6SA usada como referencia (REF), fracción 68 de la mezcla de AA (F68) y el extracto hexánico obtenido de la corteza de *A. adstringens* (EXT) observados bajo luz ultravioleta (UV) y el revelador Cerio/Molibdeno (CE/MO) (A). Espectro de ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) de la fracción 68 (B): (600 MHz, δ 7.25 (t, 1H, $J= 7.25$ Hz, H-5), 6.92 (dd, 1H, $J= 7.62, 4.01$ Hz, H-6), 6.48 (dd, 1H, $J=7.1, 3.8$ Hz, H-4), 2.82 (m, 2H, H-8), 1.6 (m, 2H, H-9), 1.28 (m, 26H, H-10-21), 0.89 (t, 3H, $J= 6.95,6.95$ Hz, H-22).

2.4. Modelo animal Balb/c

2.4.2. Animales

Como modelo animal se utilizaron ratones Balb/c hembra inmunocompetentes de 6 a 8 semanas de edad. Se emplearon 6 ratones por cada grupo experimental. Los animales tuvieron libre acceso a agua y alimento, se encontraron en condiciones controladas de temperatura (19-25° C) y humedad (40-70 %), con periodos de luz oscuridad de 12/12 h. Se realizó el monitoreo y registro de consumo de alimento, ingesta de agua y peso corporal de los animales durante los tratamientos. Los procedimientos se realizaron siguiendo la Norma Oficial Mexicana para el correcto uso de animales de experimentación (NOM-062-ZOO-1999) y el protocolo experimental aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Cinvestav (175-10 y 0082-14).

2.4.3. Preparación de la línea celular 4T1 para la inoculación

Se tomaron las células de la placa de medio de cultivo a una confluencia del 80%, se agregaron 5 ml de PBS después de la solución de tripsina y se incubaron las células durante 2 min. Posteriormente, se añadieron 5 ml de medio RPMI suplementado para inactivar la tripsina. La suspensión celular se transfirió a tubos cónicos de 15 ml y se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó y el sedimento celular se resuspendió en PBS. La densidad celular se determinó utilizando un hemocitómetro. Las células se diluyeron en medio libre de SFB y la densidad se ajustó al volumen de inyección de 10^4 células en 50 μ l. Las células se inyectaron inmediatamente para mantener la viabilidad celular (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 2001).

2.4.4. Inoculación de la línea celular 4T1

Las células en dilución se cargaron en una jeringa de tuberculina de 1 ml con una aguja hipodérmica de 18G. Se desalojaron las burbujas de aire dentro de la jeringa golpeando a un lado de la jeringa con el dedo índice. Se realizó un cambio de aguja por una de 27G para llevar a cabo la inoculación de las células tumorales. Los animales se sujetaron con una mano por detrás de las orejas utilizando el dedo

índice y el pulgar, posteriormente el cuerpo del ratón se estira a través de la mano con la finalidad de que la parte del abdomen quede totalmente despejada y visible. Las células tumorales 4T1 se inocularon por vía subcutánea (s.c.) en la glándula mamaria penetrando suavemente la piel con el bisel de la aguja hacia arriba.

Como primer paso para establecer el modelo tumoral evaluamos el efecto de la inoculación de diferentes cantidades de células 4T1 en el ratón Balb/c, esto se realizó con la finalidad de conocer la menor densidad celular eficiente para la formación del tumor en el 100% de los animales, además de poder aumentar la ventana de tratamiento de los diferentes grupos de experimentación y poder así evaluar de mejor forma algunos parámetros como la supervivencia. Observamos que utilizar una densidad de cinco mil células produce un cambio significativo en el volumen del tumor, así como en la ventana de tratamiento disponible para esos animales con respecto a nuestro grupo control (100,000 células). La desventaja que presentó este grupo está relacionada con la aparición del tumor, la cual no es precisa de una fecha y presenta una variación de entre 8-10 días para su palpación. Por otra parte, los animales inoculados con diez y veinte mil células no presentaron cambios significativos en el volumen del tumor con respecto al grupo control, estos grupos presentaron una curva de crecimiento tumoral similar, diferenciándose únicamente en el día y la precisión de la aparición o palpación del tumor (a los ocho y cinco días respectivamente), por lo mencionado con anterioridad, se decidió inocular a los animales con cinco mil células en los experimentos posteriores, ya que es la única densidad celular que nos brinda una ventaja o mejora en nuestro modelo (Figura 10).

2.4.5. Control del crecimiento tumoral

El control del crecimiento del tumor se realizó palpando diariamente el área de la inyección con el dedo índice y pulgar para detectar la presencia del tumor. Los tumores se midieron empleando un calibrador Vernier y el tamaño se calculó en milímetros usando la fórmula: $V = 0.5 \times A^2 \times L$, donde V es el volumen (en mm^3), A el diámetro corto y L el diámetro largo del tumor (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 2001).

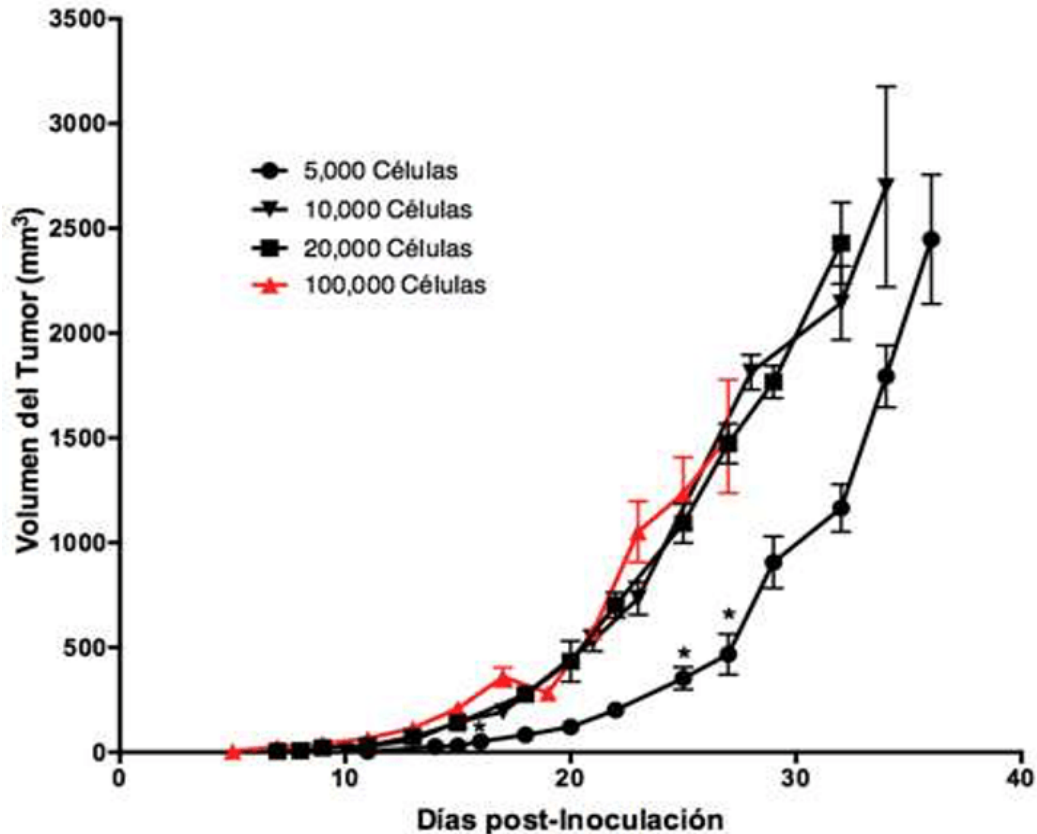


Figura 10. Desarrollo del crecimiento del tumor utilizando diferente densidad de células 4T1. Ratones hembra Balb/c inoculadas con 5,000, 10,000, 20,000 ó 100,000 células. Media \pm SEM. * $p < 0.05$ t de Student contra 100,000 células.

2.5. Tratamientos

Se trabajó 8 grupos de ratones inoculados con la línea celular 4T1 divididos de la siguiente manera: 1) control sólo tumor, 2) vehículo PBS:DMSO:Tween-20 (7.6:2:0.4), 3) vehículo solución salina, 4) 6 mg/kg de 6SA, 5) CbPt (100 mg/kg), 6) 5-FU (40 mg/kg), 7) poliquimioterapia de 2 mg/kg de 6SA más CbPt (100 mg/kg) y 8) poliquimioterapia de 2 mg/kg de 6SA más 5-FU (40 mg/kg). Los tratamientos se administraron por vía intravenosa (i.v.) 8 días después de la inoculación de las células 4T1, en una cantidad máxima de 50 μ l ajustados con PBS:DMSO:Tween-20 o solución salina durante tres ciclos de una administración cada 7 días.

2.6. Obtención de órganos y tejidos

Los ratones se sacrificaron utilizando isofluorano por vía respiratoria a los 28 días a partir de la inoculación. Se obtuvo la sangre punción cardiaca y se extrajeron los

pulmones para el ensayo de metástasis, además de la médula ósea y el tumor. La médula ósea se obtuvo a partir del fémur de ambas piernas del ratón, se cortaron los huesos por ambos extremos y se pasaron 2 ml de SFB a través del hueso utilizando una aguja de 25G. Las células se disgregaron pasándolas a través de la aguja y se resuspendieron a una densidad de 1×10^6 células para su tinción.

El tumor primario del tejido mamario se extrajo y se pesó, posteriormente se colocó sobre una caja petri de cultivo con 2 ml de medio RPMI frío para ser disgregado por métodos enzimáticos y mecánicos. Primero, el tumor se cortó finamente desde la periferia hasta el centro, liberando la mayor cantidad de células. En seguida, se añadieron 2 ml de una solución de colagenasa A (2.5 mg/ml/g de tejido) y se incubó a 37°C durante 1 h con agitación constante. La suspensión celular obtenida se filtró en una malla de 40 micras adicionando 5 ml de medio RPMI, por último, se tomaron 1×10^6 células para su tinción. Además, se extrajeron diferentes órganos como bazo, hígado y riñones para determinar el peso relativo de éstos respecto al peso corporal de los animales.

2.7. Ensayo de metástasis

2.7.1. Principio

Para la mayoría de los modelos tumorales la cuantificación de células metastásicas en órganos distantes es bastante complicado, ya que las células tumorales pueden estar dispersas e incrustadas dentro del tejido normal. Debido a que las células tumorales 4T1 son resistentes a la 6-tioguanina (6-TG), un compuesto con capacidad antineoplásica, las células metastásicas 4T1 pueden ser detectadas y cuantificadas en órganos explantados. El cultivo de células disociadas en medio suplementado con 6-TG y permite el conteo del número de células tumorales resistentes a dicho agente citotóxico. Este procedimiento proporciona un ensayo sensible y permite la monitorización cuantitativa del desarrollo de metástasis espontánea en múltiples sitios distantes al tumor primario (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 2001).

2.7.2. Procedimiento

Se realizó la extracción de los pulmones de cada uno de los animales y una parte de estos (1/3 del órgano) se destinaron para realizar el ensayo. La parte del pulmón se colocó en una caja de 6 pozos y se lavó con PBS para retirar el exceso de tejido sanguíneo. Posteriormente, se agregó una solución de colagenasa y se realizó la disgregación del órgano de manera mecánica utilizando tijeras o navaja. Después se incubó a 37 °C por 30 min. La muestra se filtró a través de un colador utilizando 5 ml de HBSS (solución salina balanceada de Hank). Del filtrado final se tomaron 5 µl para realizar el sembrado de células en cajas de cultivo tipo petri medianas utilizando medio RPMI suplementado que contiene 6-TG (60 mM). Los cultivos se incubaron durante 5 días, hasta observar el crecimiento de las colonias 4T1. Se realizó el conteo de colonias en cada una de las cajas de cultivo (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 2001; Kramer *et al.*, 2015).

2.8. Conteo total y diferencial de leucocitos

2.8.1. Principio

En la sangre circulan cinco tipos de células que se originan de tres series hematopoyéticas a saber: de la serie granulocítica, los polimorfonucleares neutrófilos, eosinófilos y basófilos, de la serie linfocítica, los linfocitos y de la serie monocítica, los monocitos. En el recuento de leucocitos manual sólo se analizan entre 100 y 200 células. Es importante tener en cuenta que el recuento diferencial de leucocitos por métodos manuales, además de las relacionadas con los problemas de preparación y coloración de los extendidos tiene otras fuentes de error como la distribución de las células, el reconocimiento de las células y los errores estadísticos de la muestra, debido a que sólo se analizan 100 células.

2.8.2. Procedimiento

El conteo diferencial de leucocitos se llevó al cabo a través de un frotis o extendido sanguíneo. La sangre se obtuvo de los animales por punción cardiaca utilizando heparina para evitar su coagulación y se utilizó para preparar el frotis. Para lo anterior se ocuparon dos portaobjetos y una pequeña gota de sangre (3-5 µl). Una

vez realizado el frotis este se dejó secar al aire. Posteriormente, se fijó la muestra con metanol por 3 min y los portaobjetos se sumergieron por 3 min en el colorante Wright-Giemsa, finalmente se lavaron con abundante agua destilada y se dejaron secar al aire para posteriormente observar las preparaciones en un microscopio de campo claro para evaluar el conteo diferencial de leucocitos. El conteo diferencial se realizó en 3 frotis diferentes por animal con la finalidad de disminuir el error metodológico antes mencionado.

2.9. Evaluación de la apoptosis en el tejido tumoral, sangre y médula ósea

2.9.1. Principio

La apoptosis es un proceso regulado de muerte celular que ocurre como parte normal del desarrollo. Este proceso de muerte participa en enfermedades diversas y se distingue de la necrosis por características morfológicas y cambios bioquímicos. En células normales la fosfatidilserina (FS) se localiza en la parte interna de la membrana plasmática, sin embargo, en las células apoptóticas la FS se trasloca a la parte externa de la membrana. La anexina V, un anticoagulante humano, es una proteína que se une a fosfolípidos dependiente de calcio con un peso molecular de 35-36 kDa y que presenta una afinidad alta por la FS. La anexina conjugada con un fluoróforo como el isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés) o con biotina que permite identificar a las células en apoptosis por unión a la FS expuesta en la parte externa de la membrana. Por otra parte, el yoduro de propidio (IP) es un agente fluorescente que se intercala en el ADN, las células vivas son impermeables al IP, y puede teñir a las células muertas pues cuando la célula entra en necrosis la membrana plasmática sufre daños de tal manera que el IP puede adentrarse e intercalarse al ADN y que atraviesa la membrana celular, con esta doble tinción es posible diferenciar mediante citometría de flujo entre las células viables, células en apoptosis y células necróticas (Invitrogen, 2010).

2.9.2. Procedimiento

Las células que se obtuvieron a partir del tumor se disgregaron y lavaron con solución defluorescencia activada de células (FACS, por sus siglas en inglés) (PBS

con 0.02% de azida de sodio y 5% de SFB). Los linfocitos infiltrados en el tumor se marcaron con 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anti-CD3-Brillante violeta y se incubaron durante 45 min en la oscuridad. Después del lavado con FACS, las células se resuspendieron en una solución con 2 μl de anexina V e IP por cada 1×10^6 células, posteriormente se incubaron por 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se evaluaron un total de 50,000 eventos por cada muestra por citometría de flujo (BD LSRFORTESSA). Los datos se analizaron utilizando el software Flow Jo (Tree Star, San Carlos, CA, USA) (Alam-Escamilla *et al.*, 2015). En la Figura 11, se muestra cómo se realizó la selección de la población y posteriormente la selección de las células individuales para finalmente determinar el porcentaje de apoptosis en el tejido en estudio.

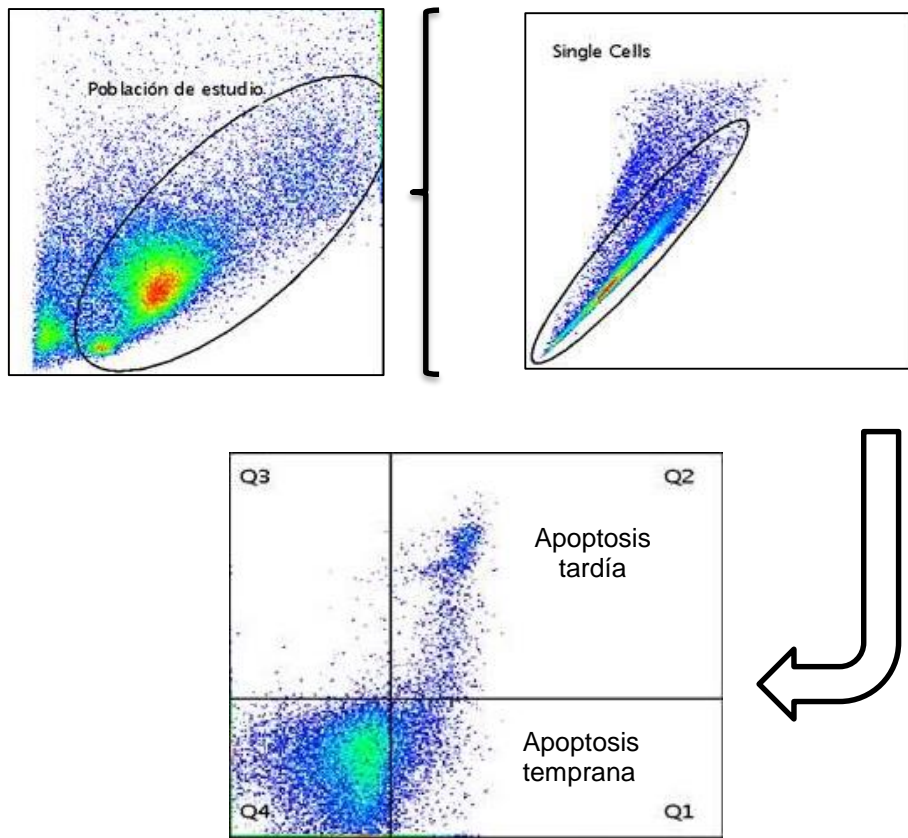


Figura 11. Selección de la población celular para evaluar apoptosis. Determinación de apoptosis utilizando Anexina V e IP.

2.10. Análisis estadístico

Se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la distribución de los datos, posteriormente se optó por realizar la prueba t de Student o U de Mann-Whitney, de acuerdo con el resultado de la prueba de distribución, con la finalidad de evaluar las diferencias de los diferentes grupos contra el grupo control. Además, para establecer diferencias significativas entre los diferentes grupos de tratamiento y los tiempos se estadístico se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba *post hoc* Bonferroni. Los datos se reportaron como media \pm desviación estándar (SD) o error estándar de la media (SEM) y se consideró una $p < 0.05$ como nivel de significancia.

3. RESULTADOS

3.1. Efecto antitumoral de los tratamientos

Evaluamos el efecto antineoplásico del CbPt y 5-FU en comparación con el 6SA y la mezcla de AA monitoreando el volumen tumoral cada tercer día durante 21 días de tratamiento y también por la obtención del peso del tumor después del sacrificio. Todos los tratamientos produjeron una disminución estadísticamente significativa en el volumen del tumor (Figura 12A). El 5-FU fue el agente antineoplásico que causó el mayor efecto sobre este parámetro, produciendo una disminución del 66.1% comparado con el grupo control. El 6SA y los AA produjeron una disminución significativa del volumen del tumor generando una disminución del 51.6% y 31.1%, respectivamente. Además, todos los tratamientos disminuyeron el peso del tumor y el 5-FU produjo el mayor efecto de todos los compuestos evaluados (Figura 12B). Debido a los resultados anteriores elegimos al 5-FU como primera opción para realizar la poliquimioterapia con 6SA y AA con la finalidad de obtener un efecto sinérgico o sumatorio entre los compuestos antineoplásicos, además de buscar un efecto protector del 6SA o los AA sobre los efectos secundarios producidos por el 5-FU.

La terapia combinada de 6SA o AA con 5-FU disminuyó el volumen del tumor en un 66.7% (6SA/5-FU) y en un 48% (AA/5-FU) comparado con el grupo control. El efecto antineoplásico de la poliquimioterapia con 5-FU fue mayor al obtenido con las monoterapias de 6SA y AA (Figura 12A y 12B). Sin embargo, el efecto observado fue similar al del tratamiento de 5-FU, lo que indica que no hay un sinergismo o efecto sumatorio entre los dos tratamientos, sugiriendo que los blancos moleculares de estos tratamientos pueden ser semejantes. Posteriormente se realizó la poliquimioterapia con 6SA y CbPt. Esta produjo una disminución significativa del volumen y del peso del tumor comparado con el grupo control y con las monoterapias (Figura 12C y 12D), y disminuyó el volumen del tumor en un 55% en comparación con la monoterapia con CbPt y en un 67% comparado con el grupo de 6SA. En este caso, se puede plantear que los blancos moleculares del 6SA y del CbPt son diferentes, por lo que se puede observar un efecto sumatorio de ambos tratamientos combinados en la reducción del tumor.

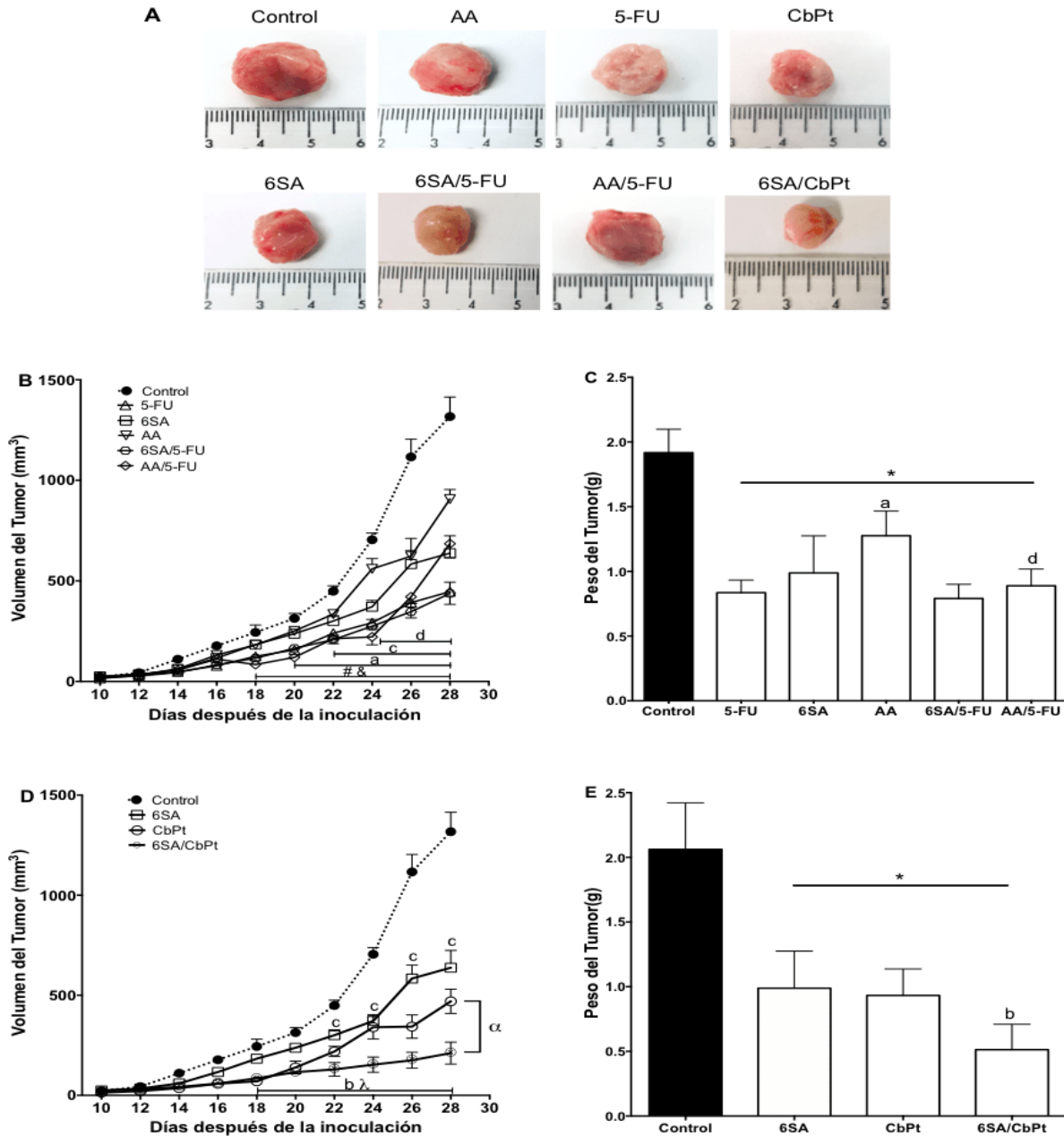


Figura 12. La poliquimioterapia 6SA/CbPt es más eficiente en inhibir el crecimiento tumoral. Ratonas Balb/c hembras inoculadas con 5×10^3 células 4T1 en 50 μ l, 8 días después de la implantación del tumor se administraron con 6SA (6 mg/kg), AA (6 mg/kg), 5-FU (40 mg/kg), CbPt (100 mg/kg), 6SA/5-FU (6+40 mg/kg), AA/5-FU (6 + 40 mg/kg) o 6SA/CbPt (6+100 mg/kg) por 21 días. Fotografías representativas de los tumores (A). Se determinó el volumen (B y D) y peso del tumor (C y E). Media \pm SEM (B y D) o \pm SD (C y E), n= 6. ^a5-FU, ^bCbPt, ^c6SA, ^dAA, [#]6SA/5-FU, [&]AA/5-FU, [^]6SA/CbPt p<0.05 ANOVA de dos vías *post-hoc* Bonferroni.

3.2. Reducción de la metástasis en el pulmón

Uno de los principales problemas del proceso canceroso es la migración de células a órganos distantes al tumor primario a través de un proceso denominado metástasis. Evaluamos la metástasis mediante el cultivo de las células del tejido pulmonar en presencia de 6-TG, lo que permite el crecimiento de las células 4T1, pero no de las células de tejido pulmonar, así se cuantificó la formación de focos cancerosos en órganos distantes al tumor primario como el pulmón (Figura 13A). Todos los tratamientos redujeron de forma significativa la metástasis al pulmón comparados con el control sin tratamiento. El tratamiento combinado con 5-FU (6SA/5-FU y AA/5-FU) causó una disminución significativa de la metástasis comparado con el control, sin embargo, no produjeron un efecto mayor al ocasionado por las monoterapias (6SA y 5-FU) (Figura 13B y 13C).

Por otra parte, la poliquimioterapia con 6SA/CbPt disminuyó de forma significativa la migración de las células 4T1 al pulmón comparado con el grupo control, 6SA y CbPt (Figura 13B y 13C), observando un efecto eficiente en la reducción de este parámetro, respuesta esperada en una terapia combinada.

3.3. Mielosupresión y leucopenia

Evaluamos la muerte celular por apoptosis/necrosis en células sanguíneas y de la médula ósea para determinar si el 6SA y los AA eran capaces de disminuir los efectos tóxicos producidos por el 5-FU y CbPt sobre estas células y por ende proteger al organismo de la mielosupresión y la leucopenia producida por los agentes antineoplásicos.

El tratamiento con 5-FU y CbPt causó un incremento importante en el porcentaje de células apoptóticas en la sangre circulante (Figura 14A) y en las células de la médula ósea (Figura 14B) comparado con el grupo control, mientras que el 6SA y los AA no produjeron ningún efecto tóxico sobre estos tejidos. En los tratamientos combinados observamos una disminución del porcentaje de células apoptóticas en comparación con los agentes antineoplásicos solos, indicando que tanto el 6SA como los AA disminuyen el efecto tóxico ocasionado por los quimioterapéuticos

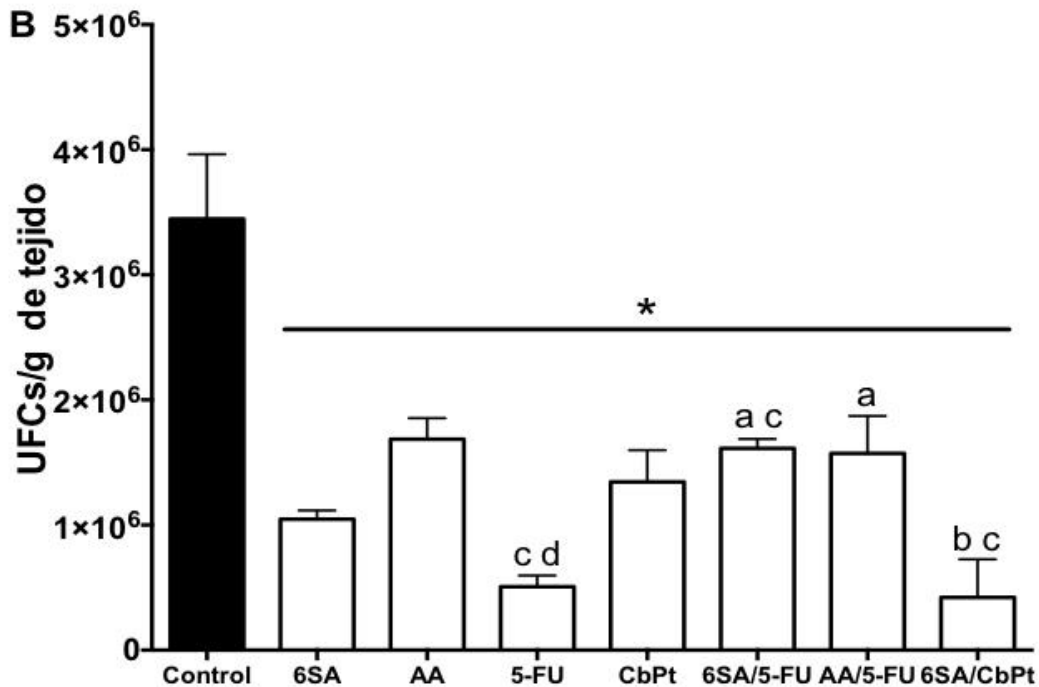
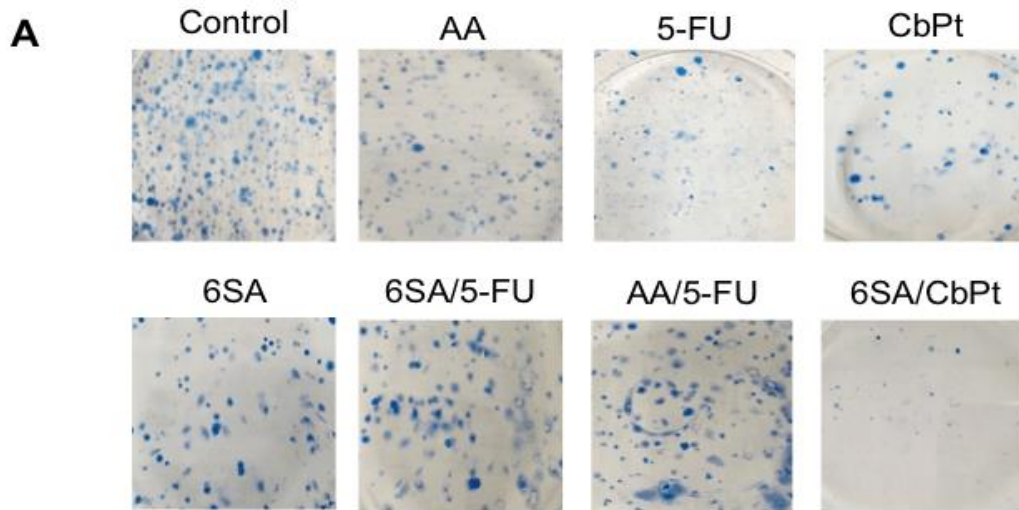


Figura 13. La poliquimioterapia con CbPt es el mejor tratamiento para disminuir la migración de las células 4T1 al pulmón. Ratones Balb/c hembras inoculadas con 5×10^3 células 4T1 en $50 \mu\text{l}$, 8 días después de la implantación del tumor se administraron con 6SA (6 mg/kg), AA (6 mg/kg), 5-FU (40 mg/kg), CbPt (100 mg/kg), 6SA/5-FU (6+40 mg/kg), AA/5-FU (6+40 mg/kg) o 6SA/CbPt (6+100 mg/kg) cada 7 días por 3 semanas. Fotografías representativas de las colonias de células 4T1 (A). Colonias 4T1 en el pulmón (B). Media \pm SD, $n=6$. * $p<0.05$ ANOVA de una vía *post-hoc* Bonferroni vs. control, ^avs. 5-FU, ^bvs. CbPt, ^cvs. 6SA y ^dvs. AA.

(Figura 14), aunque en los tratamientos combinados el porcentaje de apoptosis no se redujo al nivel del grupo control.

El conteo diferencial de leucocitos (Tabla 5), mostró en primera instancia un efecto adverso del 5-FU y CbPt sobre diferentes subpoblaciones celulares, estos compuestos disminuyeron el porcentaje de neutrófilos y aumentaron el porcentaje de células inmaduras en circulación, reflejando un esfuerzo por parte de la médula ósea para mantener las proporciones de las células de sangre periférica, lo anterior comparado con los resultados obtenidos para el grupo control. Por el contrario, el tratamiento con 6SA y los AA produjeron un incremento de linfocitos comparado con los grupos control y 5-FU, este evento no fue tan elevado como para alcanzar los valores normales en estas células en ratones Balb/c, los cuales oscilan entre un 60-70% de los glóbulos blancos (The Jackson Laboratory, 2007), pero contribuye a la restauración de los valores de linfocitos en sangre.

Observamos que los tratamientos combinados incrementaron el porcentaje de neutrófilos y linfocitos y disminuyeron la proporción de células inmaduras circulantes, esto indica que tanto el 6SA como los AA protegen a estas células de los efectos tóxicos producidos por los quimioterapéuticos.

Es de importancia mencionar que en nuestro modelo de cáncer las células 4T1 inducen granulocitosis severa, lo cual incrementa los valores normales de neutrófilos en estos animales (DuPré *et al.*, 2007).

Determinamos el número de células en la sangre y en la médula ósea para evaluar de forma fácil y rápida la mielosupresión causada por los quimioterapéuticos y además para remarcar el efecto protector que podría estar causando el 6SA ante los efectos tóxicos del 5-FU y el CbPt. En primera instancia, observamos que el tratamiento 5-FU causó una fuerte disminución del 96% en el número de células en sangre y del 73.5% en la médula ósea, mientras que el CbPt causó una disminución del 93% de las células de la sangre y del 58% en la médula ósea, estos efectos están vinculados con el incremento en la apoptosis producido por estos compuestos en dichos tejidos. El tratamiento con 6SA y los AA no redujeron el número de células circulantes en la sangre, sin embargo, causaron una disminución significativa de

este parámetro en la médula ósea, mostrando una ligera toxicidad que no es comparable a la producida por los antineoplásicos.

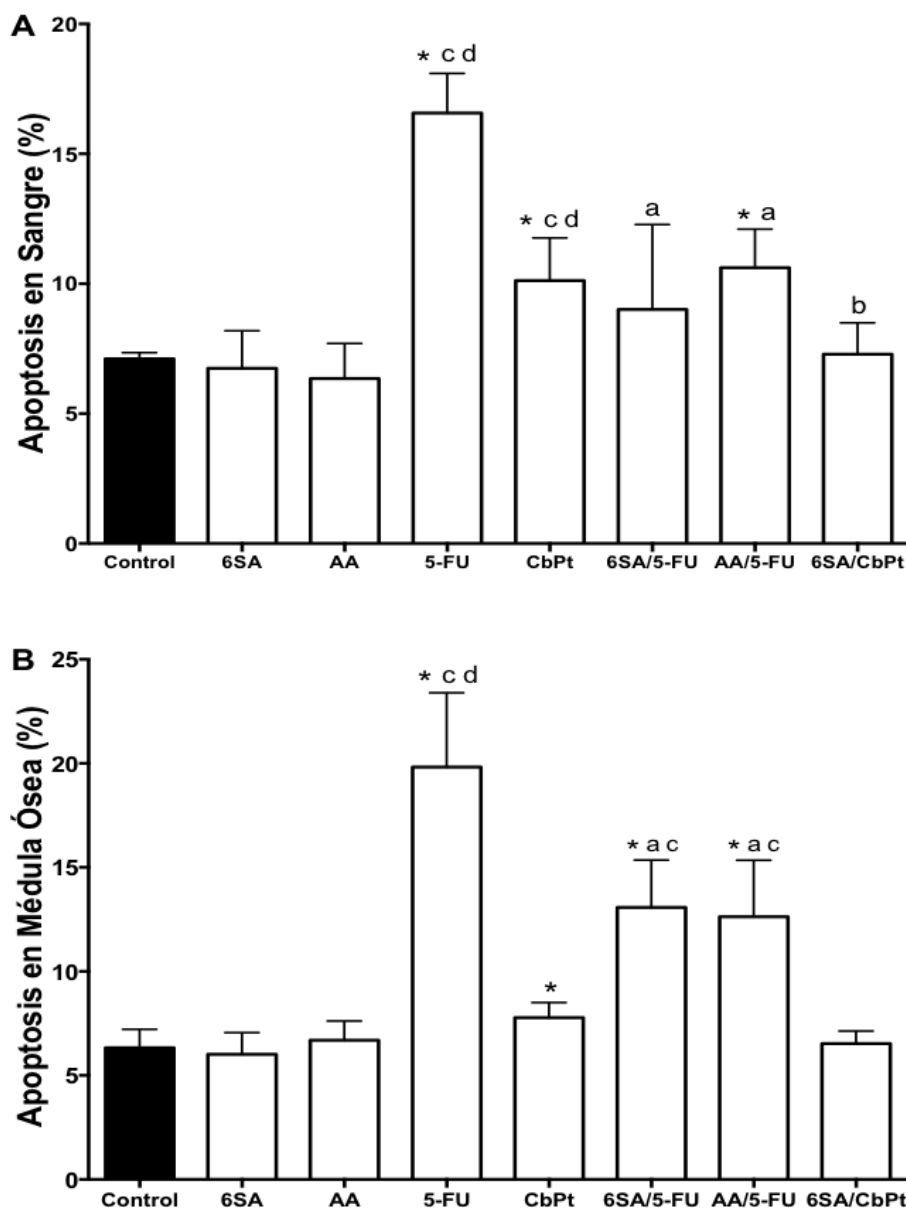


Figura 14. Los ácidos anacárdicos disminuyen la leucopenia y la mielosupresión causada por los quimioterapéuticos. Ratones Balb/c hembras inoculadas con 5×10^3 células 4T1 en $50 \mu\text{l}$, 8 días después de la implantación del tumor se administraron con 6SA (6 mg/kg), AA (6 mg/kg), 5-FU (40 mg/kg), CbPt (100 mg/kg), 6SA/5-FU (6+40 mg/kg), AA/5-FU (6+40 mg/kg) o 6SA/CbPt (6+100 mg/kg) cada 7 días por 3 semanas. Fotografías representativas de las colonias de células 4T1 (A). Colonias 4T1 en el pulmón (B). Media \pm SD, n=6. * $p < 0.05$ ANOVA de una vía *post-hoc* Bonferroni vs. control, ^avs. 5-FU, ^bvs. CbPt, ^cvs. 6SA y ^dvs. AA.

Tabla 5. Conteo diferencial de leucocitos y número de células en médula ósea y sangre de los animales.

Subpoblación	Control	6SA	AA	5-FU	CbPt	6SA/5-FU	AA/5-FU	6SA/CbPt
Neutrófilos	43.3±0.9	36.8±3.0	39.3±3.1	16.0±4.1 ^{*c d}	21.8±8.2 ^{*c d}	34.6±9.0 ^{*a}	36.8±1.5 ^a	26.0±3.6 ^{*c}
Banda	20.5±1.7	27.5±3.1 [*]	28.3±4.0 [*]	12.0±3.6 ^{*c d}	28.5±4.7 ^{*a}	19.3±4.2 ^c	22.8±2.6 ^a	14.6±1.5 ^{*b c}
Linfocitos	14.8±2.1	13.5±5.1 [*]	12.3±1.9 [*]	24.3±2.1 ^{*c d}	15.0±4.4 ^a	24.0±7.2 ^{*c}	23.7±1.7 ^{*d}	47.0±5.6 ^{*b c}
Monocitos	3.5±0.6	8.5±0.6 [*]	6.0±1.8 [*]	4.0±0.8 ^{c d}	4.3±1.7	8.0±2.0 ^{*a}	8.5±2.6 ^{*a}	6.3±1.5 [*]
Basófilos	0.5±1.0	1.8±1.3	0.8±1.3	0.0±0.0 ^c	1.3±0.9	1.3±1.1 ^a	0.0±0.0	0.0±0.0 ^c
Eosinófilos	1.8±1.3	1.8±1.3	0.0±0.0 [*]	0.8±0.5 ^d	1.0±0.8 ^d	1.3±1.1	0.3±0.5	1.0±0.0
Inmaduros	14.5±0.6	10.3±4.5	14.0±2.0	43.3±5.9 ^{*c d}	28.5±4.7 ^{*c d}	11.3±3.1 ^a	8.0±1.4 ^{*a d}	5.0±1.0 ^{*b}
Leucocitos cel/ml (10 ⁶)	7.7±1.1	6.1±2.0	7.9±1.4	3.0±1.0 ^{*c d}	5.4±0.7 ^{*c d}	5.0±1.4 ^{*a c}	3.9±1.1 ^{*d}	7.0±1.0 ^{*b c}
Médula ósea cel/ml (10 ⁶)	2.3±0.3	1.8±0.2	1.7±0.2	0.6±0.2 ^{*c d}	1.0±0.8 ^{*c d}	1.1±0.7 ^{*a c}	0.8±0.2 ^{*d}	1.4±0.0 ^{*b}

Ratones Balb/c hembras inoculadas con 5×10^3 células 4T1 en 50 μ l, 8 días después de la implantación del tumor se administraron con 6SA (6 mg/kg), AA (6 mg/kg), 5-FU (40 mg/kg), CbPt (100 mg/kg), 6SA/5-FU (6+40 mg/kg), AA/5-FU (6+40 mg/kg) o 6SA/CbPt (6+100 mg/kg) cada 7 días por 3 semanas. Media \pm SD, n=6. *p<0.05 ANOVA de una vía *post-hoc* Bonferroni vs. control, ^avs. 5-FU, ^bvs. CbPt, ^cvs. 6SA y ^dvs. AA.

Finalmente, el co-tratamiento 6SA/5-FU produjo un aumento en el número de células en sangre y en médula ósea, sugiriendo, de nuevo, un efecto protector del 6SA ante los efectos tóxicos causados por el 5-FU.

3.4. Toxicidad sistémica de los tratamientos

Para establecer si en respuesta a los diferentes tratamientos se presentaron cambios en los parámetros generales de toxicidad en los animales se monitoreó el peso de los animales para determinar la ganancia de peso corporal de cada uno. Además, se determinó el peso relativo de varios órganos como otro parámetro de toxicidad general.

En la Tabla 6 se observa que todos los tratamientos disminuyeron el peso relativo de los pulmones a valores cercanos a los de ratones sin tumor, esto se encuentra estrechamente relacionado con la reducción de focos metastásicos en este órgano. El 5-FU produjo el mayor efecto con una reducción del 58.3% del peso del pulmón comparado con el control sin tratamiento.

No observamos cambios en el peso relativo del hígado producidos por las monoterapias con respecto al grupo control, sin embargo, la poliquimioterapia

produce un incremento significativo del peso relativo de este órgano que puede estar relacionado con un aumento en el metabolismo de los animales.

Observamos un incremento importante en el peso relativo del bazo, denominado esplenomegalia, en el grupo control y en los tratamientos con 5-FU, 6SA y AA. La esplenomegalia es debida a la hiperplasia granulocítica inducida por las células 4T1. El peso relativo de los riñones no se modificó con las monoterapias, sin embargo sí se observa un cambio en el tratamiento con 6SA/CbPt.

Finalmente, los tratamientos con 5-FU y CbPt disminuyeron la ganancia de peso corporal en los ratones, el mismo efecto se observó en los co-tratamientos con 5-FU, poniendo de manifiesto el efecto tóxico del 5-FU a nivel sistémico. Sin embargo, el tratamiento combinado de 6SA con CbPt mantuvo un crecimiento en los animales pues obtuvieron una ganancia de peso al final del tratamiento.

Tabla 6. Peso relativo de órganos y ganancia de peso corporal de los animales.

Órgano	Naïve	Control	6SA	AA	5-FU	CbPt	6SA/5-FU	AA/5-FU	6SA/CbPt
Bazo	0.3±0.0	2.7±0.3	2.6±0.1	2.0±1.0*	2.7±0.4	1.3±0.1* ^c	1.1±0.1** ^c	1.4±0.5* ^a	1.7±0.1* ^c
Pulmones	0.8±0.0	2.5±0.3	1.0±0.1*	1.3±0.2*	1.0±1.1*	1.1±0.1*	1.1±0.2*	1.1±0.3*	1.0±0.1*
Hígado	5.1±0.1	5.7±0.1	5.3±0.3	5.6±0.6	6.1±0.4	5.6±0.5	6.4±0.4*	6.9±0.8* ^d	7.2±0.4* ^b ^c
Riñón	1.1±0.0	1.2±0.0	1.2±0.1	1.2±0.1	1.2±0.1	1.3±0.4	1.3±0.1	1.4±0.1	1.5±0.1* ^c
Ganancia de peso (g)	1.9±0.9	1.7±1.0	1.18±0.5	1.03±0.5	-1.2±0.7* ^c ^d	-1.1±0.7*	-0.80±0.3* ^c	-0.73±0.7* ^d	0.63±0.4 ^b

Ratones Balb/c hembras inoculadas con 5×10^3 células 4T1 en 50 μ l, 8 días después de la implantación del tumor se administraron con 6SA (6 mg/kg), AA (6 mg/kg), 5-FU (40 mg/kg), CbPt (100 mg/kg), 6SA/5-FU (6+40 mg/kg), AA/5-FU (6+40 mg/kg) o 6SA/CbPt (6+100 mg/kg) cada 7 días por 3 semanas. Animales Naïve no se implantaron con tumor. Media \pm SD, n=6. * $p < 0.05$ ANOVA de una vía *post-hoc* Bonferroni vs. control, ^avs. 5-FU, ^bvs. CbPt, ^cvs. 6SA y ^dvs. AA.

Uno de los objetivos finales de la quimioterapia es prolongar la vida de los pacientes y proporcionarles mayor calidad de vida, por lo que evaluamos la tasa de supervivencia de los animales después de tres semanas de tratamiento. Observamos que los animales que no recibieron tratamiento empezaron a morir al día 28 de la inoculación del tumor, mientras que la primera muerte registrada en los grupos con tratamiento ocurrió alrededor del día 32 en los grupos tratados con 5-FU y sus combinaciones (Figura 15). Mientras que el grupo tratado con los AA y con la combinación de 6SA y CbPt no registraron muertes espontáneas antes de

alcanzar el punto de corte del ensayo de 2 cm² de área del tumor. Cabe mencionar que los signos de toxicidad sistémica como tener el pelo erizado, disminuir la movilidad y el postramiento también se redujeron notablemente en estos dos grupos de animales, por lo que se sugiere que los tratamientos con poliquimioterapia de 6SA resultó en una tasa de sobrevivencia mayor comparado con el control y los grupos administrados con 5-FU o CbPt.

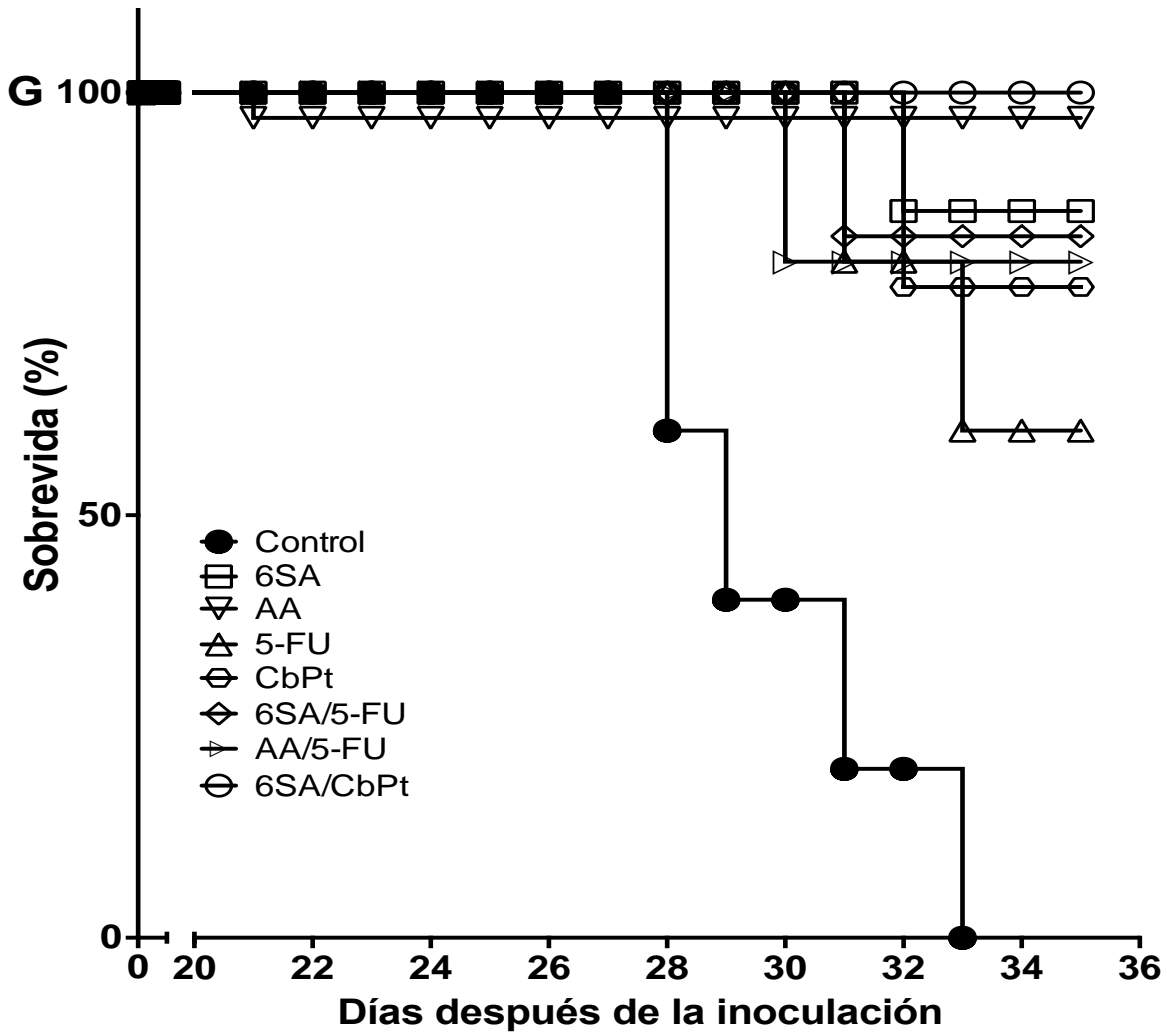


Figura 15. Los ácidos anacárdicos aumentan la sobrevivencia de los animales. Ratones Balb/c hembras inoculadas con 5×10^3 células 4T1 en 50 μ l, 8 días después de la implantación del tumor se administraron con 6SA (6 mg/kg), AA (6 mg/kg), 5-FU (40 mg/kg), CbPt (100 mg/kg), 6SA/5-FU (6+40 mg/kg), AA/5-FU (6+40 mg/kg) o 6SA/CbPt (6+100 mg/kg) cada 7 días por 3 semanas. Se registró la muerte espontánea o se sacrificaron al llegar al punto de corte del estudio de 2 cm² de área del tumor.

4. DISCUSIÓN

La corteza de *A. adstringens* ha sido utilizada en la medicina tradicional mexicana para tratar diversos padecimientos gastrointestinales como gastritis, úlceras y cáncer gástrico. Algunos reportes previos indican que el principio activo más relevante es el 6SA pues tiene un rango amplio de actividad biológica, destacando su actividad antitumoral (Huang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2011). Nosotros aislamos e identificamos una mezcla de AA con una alta proporción de 6SA a partir del extracto hexánico de la corteza de *A. adstringens* con características similares a lo reportado con anterioridad (Déciga-Campos *et al.*, 2007; Castillo-Juárez *et al.*, 2007).

En este estudio demostramos que el 6SA y la mezcla de AA reducen importantemente el volumen y el peso del tumor de células 4T1, de forma similar a lo que algunos compuestos antineoplásicos comunes producen. El efecto antitumoral del 6SA ha sido reportado en estudios previos en modelos tumorales de xenoinjertos, los cuales utilizan animales inmunocomprometidos para que el tumor no sea atacado por las células inmunes del huésped y las elimine. Tal es el caso de los estudios de Wu y colaboradores en 2011, donde la administración de 6SA (2 mg/kg/día por 30 días) en ratones con xenoinjertos de células de cáncer de próstata humano redujo el crecimiento tumoral en un 50%. También se observó la reducción del crecimiento del tumor por efecto del tratamiento con 6SA (2 mg/kg/día por 14 días) en ratones con tumores implantados de células hepáticas HepG2 (Huang *et al.*, 2014). Recientemente, Gnanaprakasam y colaboradores (2021), utilizando el mismo modelo murino singénico que el nuestro, mostraron que el tratamiento con 6SA reduce el volumen y tamaño del tumor por inducción de apoptosis a través de caspasa-8 y reduce la metástasis en el pulmón con una dosis de 2 mg/kg de 6SA cada tercer día por tres semanas.

El efecto antineoplásico del 6SA se ha explicado por su capacidad de disminuir la expresión de proteínas que participan en la proliferación y la sobrevivencia celular como Src, por inducir estrés de retículo endoplásmico y por su habilidad de inhibir a las histonas acetil transferasas (Balasubramanyam *et al.*, 2003; Ghizzoni *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2011). En nuestro estudio, la monoterapia con 6SA mostró una alta eficiencia antineoplásica que aumentó cuando se utilizó en

combinación con el CbPt, causando una reducción del tumor del 55% más en el volumen del tumor comparado con la monoterapia de cada compuesto por separado. Este efecto no lo observamos en el tratamiento combinado con 5-FU. Existen un amplio número de estudios que muestran el potencial de los productos naturales en el tratamiento contra el cáncer, así como el efecto sinérgico que éstos pueden tener cuando se utilizan en combinación con agentes antineoplásicos comunes (Hemalswarya y Doble, 2006). Por ejemplo, la cúrcuma, un inhibidor de histonas acetil transferasas, similar al 6SA, que se ha evaluado en combinación con 5-FU y CbPt en líneas celulares y en modelos de cáncer *in vivo*; el resveratrol, un inhibidor de histonas desacetilasas con efectos satisfactorios en combinación con 5-FU y doxorubicina (Lewandowska *et al.*, 2014). De acuerdo con los datos de nuestro estudio, donde no observamos un incremento de la efectividad de la combinación de 6SA con el 5-FU, creemos que el 5-FU puede estar causando inactivación o desregulación de los blancos terapéuticos del 6SA. Los principales blancos descritos del 6SA son las histonas acetil transferasas como p300, CBP y PCAF (Balasubramanyam *et al.*, 2003; Ghizzoni *et al.*, 2010), enzimas que juegan un papel importante en el desarrollo oncogénico (Demetriadou y Kirmizis, 2017). Algunos estudios con células de cáncer de colon muestran que el 5-FU induce la degradación de p300/CBP por degradación lisosomal (Demetriadou y Kirmizis, 2017), además de que disminuye la expresión de PCAF dependiente de la hipermetilación de la histona 3 (Liu *et al.*, 2019); estos efectos mejoran la resistencia al 5-FU y reducen la cantidad de moléculas blanco del 6SA. En otro estudio con células humanas de cáncer urotelial KK47 con “knockdown” de PCAF se observó una disminución en el crecimiento celular, en la invasión y la resistencia a cisplatino, pero no al 5-FU (Shiota *et al.*, 2010). Estos hechos apoyan la hipótesis de que el 5-FU puede afectar los blancos moleculares del 6SA y por lo tanto reducir su eficiencia antitumoral.

A pesar de que algunas terapias combinadas con 5-FU no tuvieron una eficiencia antitumoral mayor, se observó la reducción de la mielosupresión y la leucopenia del 5-FU cuando se administra también 6SA o AA, por lo que se plantea que los blancos moleculares que inducen la protección de las células inmunes contra la toxicidad

del 5-FU son diferentes a los que inducen apoptosis en las células tumorales. Esta idea se apoya en estudios previos que muestran que el 6SA induce una inmunoestimulación e inducen una proliferación celular de algunos grupos de células inmunes que se relaciona con la inducción de fosforilación muy temprana en proteínas como p-38, JNK y ERK en linfocitos, células asesinas naturales y monocitos, favoreciendo la polarización de éstos hacia un fenotipo inflamatorio que podría eliminar más eficientemente las células tumorales en el individuo (Gnanaprakasam *et al.*, 2015; 2019).

La metástasis implica la migración de las células cancerosas del tumor primario a tejidos y órganos distantes siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad. Se estima que la metástasis es la responsable de aproximadamente el 90% de las muertes por cáncer (Shiota *et al.*, 2010). En nuestro modelo experimental observamos disminución de la metástasis ocasionada por todos los tratamientos y un efecto mayor en la poliquimioterapia con CbPt comparada con la de 5-FU. Estos resultados sugieren que la terapia combinada con 6SA podría reducir la mortalidad por cáncer en los pacientes.

A nivel sistémico observamos el desarrollo de esplenomegalia, esto se ocasiona por las células 4T1 correspondientes al modelo animal experimental que se utilizó. Se ha reportado que el crecimiento *in vivo* de las células 4T1 produce una variedad de quimiocinas mieloides entre las que se encuentran MCP-1, KC RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β . Además, producen el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) que funciona como una quimiocina granulocítica. Estas quimiocinas derivadas del tumor pueden ser las responsables de las infiltraciones de células mieloides en diversos órganos, provocando en este caso la esplenomegalia, así como también explicaría el incremento de granulocitos que observamos en sangre periférica (DuPre *et al.*, 2007). De igual manera, el 6SA podría estar ocasionando un efecto hematopoyético estimulando el recambio de células sanguíneas, hecho que explicaría el porque en las poliquimioterapias observamos una recuperación celular en sangre y médula ósea.

Finalmente, el incremento en la tasa de sobrevivencia que se observó en los tratamientos con 6SA, AA y las poliquimioterapias refleja evidencia de las

propiedades antitumoral, anti metastásica e inmunomoduladora de los AA (Figura 16) que coadyuvan a que la vida del individuo con cáncer y sujeto a quimioterapia pueda ser más extensa y en mejores condiciones de salud al desarrollar menores efectos secundarios deletéreos.

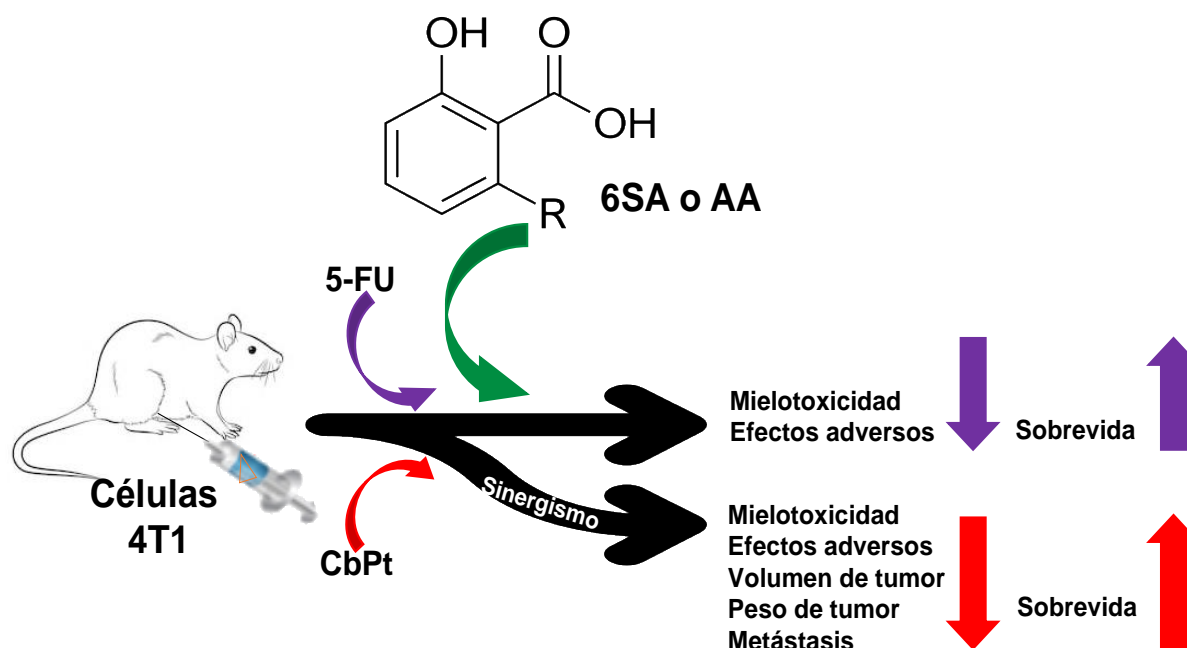


Figura 16. Esquema que muestra los efectos de los ácidos anacárdicos en combinación con los quimioterápicos de uso clínico. El CbPt y el 5-FU administrados en monoterapias producen efectos adversos graves entre los cuales destaca la mielotoxicidad, efecto reflejado en la apoptosis en sangre y médula ósea, así como también en el conteo total de células en estos tejidos. Sin embargo, aún con los efectos secundarios ocasionados, el CbPt y 5-FU causaron un aumento en la supervivencia de los animales en comparación con el grupo control. Por otra parte, en las poliquimioterapias de 6SA con CbPt o 5-FU se disminuyó la mielotoxicidad y se aumentó la supervivencia en comparación con el grupo control. Específicamente en el tratamiento 6SA/CbPt observamos el efecto mayor en la disminución del volumen y peso del tumor, así como también de la metástasis, demostrando el objetivo de la poliquimioterapia.

5. CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que los AA, y específicamente el 6SA, tiene el potencial para utilizarse como agente antineoplásico por sí mismo en algunos casos de cáncer de mama triple negativo (aquellos más difíciles de tratar) y que puede utilizarse en la clínica como coadyuvante en la quimioterapia con CbPt para aumentar el efecto antineoplásico.

Por otra parte, la administración de los AA en conjunto con antineoplásicos como el 5-FU y el CbPt reduce los efectos de toxicidad sistémica, mielosupresión y leucopenia que éstos producen, por lo que se sugiere que el 6SA puede ser utilizado como un agente terapéutico en la poliquimioterapia para el tratamiento de cáncer de mama.

Aunque los resultados actuales son prometedores, se necesita más estudios para proporcionar evidencia de los efectos sinérgicos del 6SA con otros regímenes quimioterapéuticos y en otros tipos de tumores.

6. PERSPECTIVAS

- Realizar el tratamiento combinado AA/CbPt para evaluar si existe o no sinergia en el efecto antineoplásico en el tratamiento combinado en comparación con las monoterapias.
- Evaluar el tratamiento combinado de 6SA/CbPt en otros tipos de tumores para determinar en qué tipos de tumores es más eficiente el tratamiento.
- Realizar estudios sobre la terapia combinada de 6SA con otros agentes antineoplásicos de primera línea para establecer la posibilidad de aumentar el efecto antineoplásico del tratamiento y detectar combinaciones no exitosas del 6SA con otros antineoplásicos de uso común.
- Elucidar el mecanismo de acción del 6SA en la terapia combinada para esclarecer cuáles son los blancos terapéuticos celulares del 6SA y conocer las vías de señalización en las que otros antineoplásicos puedan interferir al 6SA o *viceversa*. Este resultado nos ayudaría a seleccionar futuros esquemas de poliquimioterapia más eficientes y que reduzcan los efectos secundarios en los pacientes.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alam-Escamilla, D., Solís-Villegas, E., Estrada-Muñiz, E., Elizondo, G., Vega, L. 2015. Genotoxic and cytostatic effects of 6-pentadecyl salicylic anacardic acid in transformed cell lines and peripheral blood mononuclear cells. *Mutat. Res. Gen. Toxicol. Environ. Mutag.* 777, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.11.008>
- Balasubramanyam, K., Swaminathan, V., Ranganathan, A., Kundu, T.K. 2003. Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. *J. Biol. Chem.* 278, 19134–19140. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301580200>
- Benedí, J., Gómez, M.Á. 2006. Fármacos antineoplásicos (I). *Farm. Prof.* 20, 60–64.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer J. Clin.* 68, 394–424. doi: 10.3322/caac.21492
- Carr, C., Ng, J., Tim, W. 2008. The side effects of chemotherapeutic agents. *Curr. Anaesth. Crit. Care* 19, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.cacc.2008.01.004>
- Castillo-Juárez, I., Rivero-Cruz, F., Celis, H., Romero, I. 2007. Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *J. Ethnopharmacol.* 114, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.07.022>
- Chabner, B.A., Roberts Jr, T.G. 2005. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5, 65–72. <https://doi.org/10.1038/nrc1529>
- Chang, W.J., Sun, J.M., Lee, J.Y., Ahn, J.S., Ahn, M.J., Park, K. 2014. A retrospective comparison of adjuvant chemotherapeutic regimens for non-small cell lung cancer (NSCLC): paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin. *Lung Cancer* 84, 51–55. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.01.017
- Chemocare: Fluorouracil. <https://chemocare.com/chemotherapy/drug-info/fluorouracil-cream.aspx>. (Consultado el 03 de Mayo del 2017).
- Cole, B.F., Gelber, R.D., Gelber, S., Coates, A.S., Goldhirsch, A. 2001. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised clinical trials with quality-adjusted survival analysis. *Lancet* 358, 277–286.
- Cui, L., Miao, J., Furuya, T., Fan, Q., Li, X., Rathod, P.K., Su, X., Cui, Liwang. 2008. Histone Acetyltransferase Inhibitor Anacardic Acid Causes Changes in Global Gene Expression during In Vitro *Plasmodium falciparum* Development. *Eukaryot. Cell* 7, 1200–1210. <https://doi.org/10.1128/EC.00063-08>
- Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Angeles-López, G.E., Navarrete, A., Mata, R. 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 110, 334–342. doi: 10.1016/j.jep.2006.10.001

- Demetriadou, C., Kirmizis, A. 2017. Histone acetyltransferases in cancer: Guardians or Hazards? *Crit. Rev. Oncog.* 22, 195–218. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2017024506>
- DuPre', S.A., Hunter, K.W.Jr. 2007. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. *Exp. Mol. Pathol.* 82, 12-24. doi: 10.1016/j.yexmp.2006.06.007
- Ghizzoni, M., Boltjes, A., Graaf, C. De, Haisma, H.J., Dekker, F.J. 2010. Improved inhibition of the histone acetyltransferase PCAF by an anacardic acid derivative. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 5826–5834. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.06.089>
- Gnanaprakasam, J.N.R., Estrada-Muñiz, E., Vega, L. 2015. The anacardic 6-pentadecyl salicylic acid induces macrophage activation via the phosphorylation of ERK1/2, JNK, P38 kinases and NF-κB. *Int. Immunopharmacol.* 29, 808–817. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.08.038>
- Gnanaprakasam, J.N.R., Estrada-Muñiz, E., Vega, L. 2019. The antineoplastic agent anacardic 6-pentadecyl salicylic acid produces immunomodulation in vivo via the activation of MAPKs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 376, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.05.017>
- Gnanaprakasam, J.N.R., López-Bañuelos, L., Estrada-Muñiz, E., Vega, L. 2021. Anacardic 6-pentadecylsalicylic acid induces apoptosis in breast cancer tumor cells, immunostimulation in the host and decreases blood toxic effects of taxol in an animal model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 410, 115359. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115359>
- Hamad, F.B., Mubofu, E.B. 2015. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 8569–8590. <https://doi.org/10.3390/ijms16048569>
- Hemalswarya, S., Doble, M. 2006. Potential synergism of natural products in the treatment of cancer. *Phyther. Res.* 20, 239–249. <https://doi.org/10.1002/ptr.1841>
- Hemshekhhar, M., Santhosh, M.S., Kemparaju, K., Girish, K.S. 2011. Mini Review Emerging Roles of Anacardic Acid and Its Derivatives: A Pharmacological Overview. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 110, 122–132. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00833.x>
- Honing, J., Smit, J.K., Muijs, T.C., Burgerhof, J.G.M., de Groot, J.W., Paardekooper, G., Muller, K., Woutersen, D., Legdeur, M.J.C., Fiets, W.E., Slot, A., Beukema, J.C., Th, J., Plukker, M., Hospers, G.A.P. 2014. A comparison of carboplatin and paclitaxel with cisplatin and 5-fluorouracil in definitive chemoradiation in esophageal cancer patients. *Ann. Oncol.* 25, 638-643. doi: 10.1093/annonc/mdt589.
- Huang, H., Hua, X., Liu, N., Li, X., Liu, S., Chen, X., Zhao, C., Lan, X., Yang, C., Dou, Q.P., Liu, J. 2014. Anacardic acid induces cell apoptosis associated with

- induction of ATF4-dependent endoplasmic reticulum stress. *Toxicol. Lett.* 228, 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.05.012>
- Invitrogen. 2010. FITC Annexin V / Dead Cell Apoptosis Kit with FITC annexin V and PI, for Flow Cytometry. Willow Creek Road Eugene, OR, USA.
- Kerr, D.J., Lewis, C., Lawson, N., Blackie, R.G., Cox, J., Rankin, E.M., Kaye, S.B. 1990. The myelotoxicity of carboplatin is influenced by the time of its administration. *Hematol. Oncol.* 8, 59–63.
- Kim, H.S., Kim, M.K., Chung, H.H., Kim, J.W., Park, N.H., Song, Y.S., Kang, S.B. 2009. Genetic polymorphisms affecting clinical outcomes in epithelial ovarian cancer patients treated with taxanes and platinum compounds: a Korean population-based study. *Gynecol. Oncol.* 113, 264-269. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.01.002
- Kimura, Y., Okuda, H. 1999. Prevention by chitosan of myelotoxicity, gastrointestinal toxicity and immunocompetent organic toxicity induced by 5-fluorouracil without loss of antitumor activity in mice. *Japanese J. Cancer Res.* 90, 765–774. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1999.tb00813.x>
- Kishore, H., Agrawal, S., Kundu, T. 2008. Specific Small-Molecule Activator of Aurora Kinase A Induces Autophosphorylation in a cell-free system. *J. Med. Chem.* 51, 792–797.
- Knox, R.J., Friedlos, F., Lydall, D.A., Roberts, J.J. 1986. Mechanism of Cytotoxicity of Anticancer Platinum Drugs: Evidence and cis-Diammine Differ only in the Kinetics of their Interaction with DNA. *Cancer Res.* 46, 1972–1979.
- Kramer, M.G., Masner, M., Casales, E., Moreno, M., Smerdou, C., Chabalgoity, J.A. 2015. Neoadjuvant administration of Semliki Forest virus expressing interleukin-12 combined with attenuated *Salmonella* eradicates breast cancer metastasis and achieves long-term survival in immunocompetent mice. *BMC Cancer* 15, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1618-x>
- Kubo, I., Industry, A., Janeiro, R. De. 1993. Antitumor Agents from the Cashew. *J. Agric. Food Chem.* 8, 1012–1015.
- Kubo, I., Kinthori, I. 1994. Tyrosinase inhibitors from *Anacardium Occidentale* fruits. *J. Nat. Prod.* 57, 545–551.
- Kubo, J., Lee, J.R., Kubo, I. 1999. Anti-*Helicobacter pylori* agents from the cashew apple. *J. Agric. Food Chem.* 47, 533–537. <https://doi.org/10.1021/jf9808980>
- Legut, M., Lipka, D., Gubernator, J. 2014. Anacardic acid enhances the anticancer activity of liposomal mitoxantrone towards melanoma cell lines – in vitro studies. *Int. J. Nanomedicine* 9, 653–668.
- Lewandowska, U., Gorlach, S., Owczarek, K., Hrabec, E., Szewczyk, K. 2014. Synergistic interactions between anticancer chemotherapeutics and phenolic compounds and anticancer synergy between polyphenols. *Postepy, Hig. Med. Dosw.* 68, 528–540. <https://doi.org/10.5604/17322693.1102278>

- Lim, K.H., Lee, H.Y., Song, S.Y. 2013. Efficacy and feasibility of gemcitabine and carboplatin as first-line chemotherapy in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer. *Chin. Med. J. (Engl)* 126, 4644-4648.
- Liu, T., Wang, X., Hu, W., Fang, Z., Jin, Y., Fang, X., Miao, Q.R. 2019. Epigenetically Down-Regulated Acetyltransferase PCAF Increases the Resistance of Colorectal Cancer to 5-Fluorouracil. *Neoplasia (US)* 21, 557–570. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2019.03.011>
- Longley, D.B., Harkin, D.P., Johnston, P.G., 2003. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* 3, 330–338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>
- Masters, G.A., Hahn, E.A., Shevrin, D.H., Kies, M.S. 2003. Phase I/II trial of vinorelbine and divided-dose carboplatin in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 39, 221-226. doi: 10.1016/s0169-5002(02)00451-8
- Masuoka, N., Kubo, I. 2004. Characterization of xanthine oxidase inhibition by anacardic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1688, 245–249. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2003.12.010>
- Mathé, G., Kidani, Y., Segiguchi, M., Eriguchi, M., Fredj, G., Peytavin, G., Misset, J.L., Brienza, S., de Vassals, F., Chenu, E., Bourut, C.1989. Oxalato-platinum or 1-OHP, a third-generation platinum complex: an experimental and clinical appraisal and preliminary comparison with cis-platinum and carboplatinum, *Biomed. Pharmacother.* 43, 237-250, ISSN 0753-3322, [https://doi.org/10.1016/0753-3322\(89\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0753-3322(89)90003-6).
- Mcdonald, B.R., Kirmani, S., Vazquez, M., Mehta, R.L. 1991. Acute Renal Failure Associated with the Use of Intraperitoneal Carboplatin: A Report of Two Cases and Review of the Literature. *Am. J. Med.* 90, 386–391.
- MSD Manuals. <http://www.msdmanuals.com/es/hogar/cáncer/prevención-y-tratamiento-elcáncer/quimioterapia-combinada-poliquimioterapia> (Consultado el 11 de Julio del 2017)
- Mulder, P., Sleijfer, D., de Vries, E., Uges, D., Mulder, N.H. 1988. Papid communication Renal dysfunction following high-dose carboplatin treatment. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 114, 212–214.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=167551, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/167551>. (Consultado el 31 de mayo de 2017).
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=38904, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/38904>. (Consultado el 4 de julio de 2017).
- National Cancer Institute. Cancer Treatment. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment>. (Consultado el 03 de Mayo del 2017).
- LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Antineoplastic Agents. [Updated 2021 Apr 5]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548022/>

- Oh, D.Y., Kim, T.Y., Kwon, J.H., Lee, J.J., Joh, Y., Kim, D.W., Kim, T.Y., Heo, D.S., Bang, Y.J., Kim, N.K. 2005. Docetaxel + 5-fluorouracil + cisplatin 3-day combination chemotherapy as a first-line treatment in patients with unresectable gastric cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 35, 380-385. doi: 10.1093/jjco/hyi107
- Omanakuttan, A., Nambiar, J., Harris, R.M., Bose, C., Pandurangan, N., Varghese, R.K., Kumar, G.B., Tainer, J.A., Banerji, A., Perry, J.J.P., Nair, B.G. 2012. Anacardic Acid Inhibits the Catalytic Activity of Matrix Metalloproteinase-2 and Matrix Metalloproteinase-9. *Mol. Pharmacol.* 82, 614–622. <https://doi.org/10.1124/mol.112.079020>
- Ortega, A.G.O., Herna, M.S. 1999. Phytochemical study of cuachalalate (*Amphiptherygium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *J. Ethnopharmacol.* 68, 109–113.
- Perez, E.A., Suman, V.J., Fitch, T.R., Mailliard, J.A., Ingle, J.N., Cole, J.T., Veeder, M.H., Flynn, P.J., Walsh, D.J., Addo, F.K. 2005. A phase II trial of docetaxel and carboplatin as first-line chemotherapy for metastatic breast cancer: NCCTG study N9932. *Oncology* 69, 117-121. doi: 10.1159/000087813
- Pulaski, B., Ostrand-Rosenberg, S. 2001. Mouse 4T1 Breast Tumor Model, in: *Current Protocols in Immunology*. PubMed-NCBI, Baltimore, USA., pp. 1–16.
- Safarzadeh, E., Shotorbani, S.S., Baradaran, B. 2014. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. *Adv. Pharm. Bull.* 4, 421–427. <https://doi.org/10.5681/apb.2014.062>
- Semrau, R., Temming, S., Preuss, S.F., Klubmann, J.P., Guntinas-Lichius, O., Müller, R.P. 2011. Definitive radiochemotherapy of advanced head and neck cancer with carboplatin and paclitaxel : a phase II study. *Strahlenther Onkol.* 187, 645-650. doi: 10.1007/s00066-011-1111-7
- Shin, Y.S.P., Kim, G. 2014. Induction of the Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy in Human Lung Carcinoma A549 Cells by Anacardic Acid. *Cell Biochem Biophys* 68, 369–377. <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9717-2>
- Shin, Y.M., Han, H.S., Lim, S.W., Kim, B.C., Cheoi, K.S., Eum, Y.O., Kim, S.T., Lee, K.H. 2005. Combination chemotherapy of oxaliplatin, 5-fluorouracil and low dose leucovorin in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res. Treat.* 37, 284-289. doi:10.4143/crt.2005.37.5.284
- Shiota, M., Yokomizo, A., Tada, Y., Uchiumi, T., Inokuchi, J., Tatsugami, K., Kuroiwa, K., Yamamoto, K., Seki, N., Naito, S. 2010. P300/CBP-associated factor regulates Y-box binding protein-1 expression and promotes cancer cell growth, cancer invasion and drug resistance. *Cancer Sci.* <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01598.x>
- Shoji, T., Takatori, E., Saito, T., Omi, H., Kagabu, M., Miura, F., Takeuchi, S., Sugiyama, T. 2013. Neoadjuvant chemotherapy using platinum- and taxane-based regimens for bulky stage Ib2 to IIb non-squamous cell carcinoma of the

- uterine cervix. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 71, 657-662. doi: 10.1007/s00280-012-2052-2
- Sousa, G.F., Włodarczyk, S.R., Monteiro, G. 2014. Carboplatin: molecular mechanisms of action associated with chemoresistance. *Brazilian J. Pharm. Sci.* 50, 693–701.
- Stasiuk, M., Kozubek, A. 2010. Biological activity of phenolic lipids. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 841–860. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0193-1>
- Strauss, G.M., Herndon, J.E.2nd, Maddaus, M.A., Johnstone, D.W., Johnson, E.A., Harpole, D.H., Gillenwater, H.H., Watson, D.M., Sugarbaker, D.J., Schilsky, R.L., Vokes, E.E., Green, M.R. 2008. Adjuvant paclitaxel plus carboplatin compared with observation in stage IB non-small-cell lung cancer: CALGB 9633 with the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups. *J. Clin. Oncol.* 26, 5043-51. doi: 10.1200/JCO.2008.16.4855
- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Price, B.D. 2006. Inhibition of histone acetyltransferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation. *FEBS Lett.* 580, 4353–4356. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.06.092>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* 71, 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Taïeb, J., Mitry, E., Boige, V., Artru, P., Ezenfis, J., Lecomte, T., Clavero-Fabri, M.C., Vaillant, J.N., Rougier, P., Ducreux, M. 2002. Optimization of 5-fluorouracil (5-FU)/cisplatin combination chemotherapy with a new schedule of leucovorin, 5-FU and cisplatin (LV5FU2-P regimen) in patients with biliary tract carcinoma. *Ann. Oncol.* 13, 1192-1196. doi: 10.1093/annonc/mdf201. PMID: 12181241.
- Takiguchi, Y., Iwasawa, S., Minato, K., Miura, Y., Gemma, A., Noro, R., Yoshimori, K., Shingyoji, M., Hino, M., Ando, M., Okamoto, H. 2015. Phase II study of carboplatin, docetaxel and bevacizumab for chemotherapy-naïve patients with advanced non-squamous non-small cell lung cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* 20, 659-667. doi: 10.1007/s10147-014-0755-6
- Talib, W.H., Mahasneh, A.M. 2010. Antiproliferative Activity of Plant Extracts Used Against Cancer in Traditional Medicine. *Sci. Pharm.* 78, 33–45. <https://doi.org/10.3797/scipharm.0912-11>
- Tan, J., Chen, B., He, L., Tang, Y., Jiang, Z., Yin, G., Wang, J., Jiang, X. 2012. Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) induces apoptosis of prostate cancer cells through inhibition of androgen receptor and activation of p53 signaling. *Chinese J. Cancer Res.* 24, 275–283. <https://doi.org/10.1007/s11670-012-0264-y>

- Toyomizu, M., Okamoto, K., Akiba, Y., Nakatsu, T., Konishi, T. 2002. Anacardic acid-mediated changes in membrane potential and pH gradient across liposomal membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1558, 54–62.
- Tsutsumi, V., Nakamura, T., Ueno, T., Torimura, T., Aguirre-García, J. 2017. Structure and Ultrastructure of the Normal and Diseased Liver. *Liver Pathophysiol.* 23–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804274-8.00002-3>
- Ukita, Y., Tsubamoto, H., Kato, T., Suno, S., Shibahara, H. 2013. A case of primary metastatic glassy cell carcinoma of the uterine cervix that responded to combined docetaxel and carboplatin. *Gynecol. Oncol. Case Rep.* 6, 19-21. doi: 10.1016/j.gynor.2013.07.004
- UPMC, Hillman Cancer Center. 5-Fluorouracil. <https://hillman.upmc.com/patients/community-support/education/chemotherapy-drugs/5-fluorouracil> (Consultado el 04 de Mayo del 2017).
- Wang, S., An, R., Han, X., Zhu, K., Xue, Y. 2006. Combination chemotherapy with 5-fluorouracil, methotrexate and etoposide for patients with high-risk gestational trophoblastic tumors: a report based on our 11-year clinical experiences. *Gynecol. Oncol.* 103, 1105-1108. doi: 10.1016/j.ygyno.2006.06.031
- Wu, Y., He, L., Zhang, L., Chen, J., Yi, Z., Zhang, J., Liu, M. 2011. Anacardic Acid (6-Pentadecylsalicylic Acid) Inhibits Tumor Angiogenesis by Targeting Src / FAK / Rho GTPases Signaling Pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 339, 403–411. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.181891>.
- Yin, S., Wei, W., Jian, F., Yang, N. 2013. Therapeutic Applications of Herbal Medicines for Cancer Patients. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2013, 15.
- Zhi, X., Gao, W., Han, B., Yang, Y., Li, H., Liu, D., Wang, C., Min, G., Long, H., Rigas, J.R., Carey, M., Jahan, T., Sammann, A., Reza, J., Wang, D., Mann, M.J., Jablons, D.M., He, J. China Clinical Trials Consortium. 2013. VATS lobectomy facilitates the delivery of adjuvant docetaxel-carboplatin chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Dis.* 5, 578-584. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2012.02.05
- Zhuang, S. 2015. Regulation of STAT Signaling by Acetylation. *Cell Signal* 25, 1924–1931. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.05.007>.
- Zukin, M., Barrios, C.H., Pereira, J.R., Ribeiro, R.D.A., Beato, C.A.M., do Nascimento, J.N., Murad, A., Franke, F.A., Precivale, M., de Lima Araujo, L.H., Da Rocha Baldotto, C.S., Vieira, F.M., Small, I.A., Ferreira, C.G., Lilenbaum, R.C. 2013. Randomized phase III trial of single-agent pemetrexed versus carboplatin and pemetrexed in patients with advanced non-small-cell lung cancer and Eastern Cooperative Oncology Group performance status of 2. *J. Clin. Oncol.* 31, 2849-2853. doi: 10.1200/JCO.2012.48.1911

8. PRODUCTOS ACADÉMICOS DEL TRABAJO DE TESIS

8.1. Presentaciones en congresos

Galot Linaldi J, Estrada Muñiz E, Vega L. Efecto Antineoplásico y Mieloprotector de Ácidos Anacárdicos Extraídos de *Amphipterygium Adstringens*. XI Congreso Nacional de Toxicología, Septiembre 2019, San Luis Potosí, San Luis Potosí.

J. Galot-Linaldi, E. Estrada-Muñiz, L. Vega. 6-Pentadecyl Salicylic Acid Improves the Antineoplastic Effect and Decreases Myelosuppression Caused by Chemotherapeutic Drugs. Annual Meeting and ToxExpo Virtual Event. Society of Toxicology, Marzo 2021.

8.2. Artículo científico



Article

Anacardic Acids from *Amphipterygium adstringens* Confer Cytoprotection against 5-Fluorouracil and Carboplatin Induced Blood Cell Toxicity while Increasing Antitumoral Activity and Survival in an Animal Model of Breast Cancer.

APÉNDICE A

IPN
4/12/2019

File: M1-EVD2
Sample: M1-EVD2
Instrument: JEOL GCmate
Inlet: Direct Probe

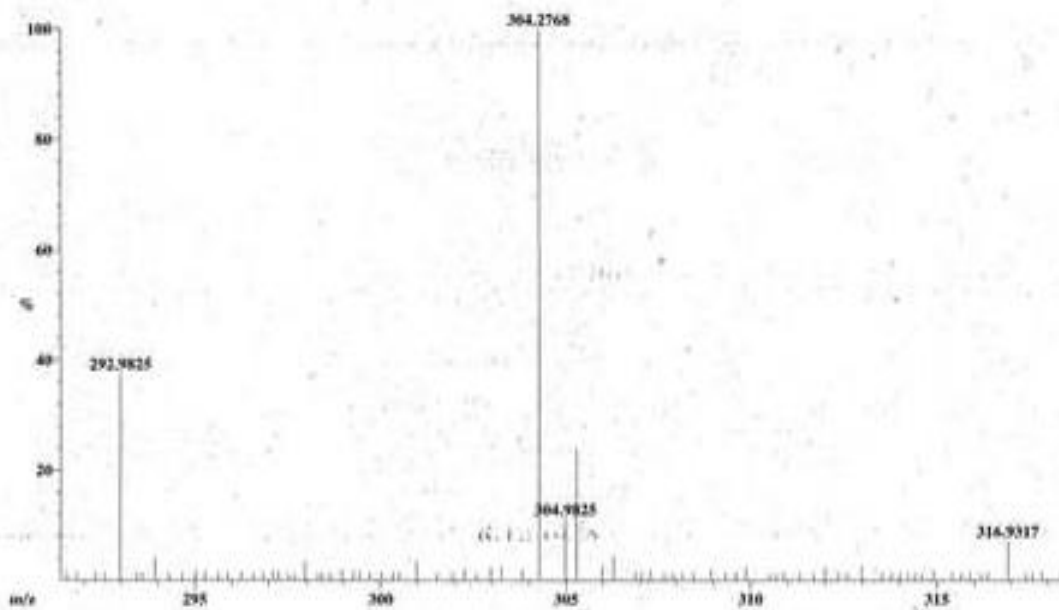
Date Run: 04-12-2019 (Time Run: 12:22:34)

Ionization mode: EI+

Scan: 769
Base: m/z 304; 4.6% FS TIC: 325408

R.T.: 10.28

#Ions: 201



Selected Isotopes : $H_{0.36}C_{0.21}O_{0.1}$

Error Limit : 5 ppm

<u>Measured</u> <u>Mass</u>	<u>% Base</u>	<u>Formula</u>	<u>Calculated</u> <u>Mass</u>	<u>Error</u>
304.2768	100.0%	$C_{21}H_{36}O$	304.2766	0.6

Anexo A. Caracterización de AA Espectro de masas (EI+) de la fracción 68.



SAFETY DATA SHEET

Anacardic Acid

Page: 1 of 6

Revision: 10/09/2014

according to Regulation (EC) No. 1907/2006 as amended by (EC) No. 1272/2008

Section 1. Identification of the Substance/Mixture and of the Company/Undertaking

- 1.1 Product Code:** 13144
Product Name: Anacardic Acid
Synonyms: 2-hydroxy-6-pentadecyl-benzoic acid; 6-pentadecyl Salicylic Acid;
- 1.2 Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against:**
Relevant identified uses: For research use only, not for human or veterinary use.
- 1.3 Details of the Supplier of the Safety Data Sheet:**
- Company Name:** Cayman Chemical Company
 1180 E. Ellsworth Rd.
 Ann Arbor, MI 48108
- Web site address:** www.caymandchem.com
- Information:** Cayman Chemical Company +1 (734)971-3335
- 1.4 Emergency telephone number:**
- Emergency Contact:** CHEMTREC Within USA and Canada: +1 (800)424-9300
 CHEMTREC Outside USA and Canada: +1 (703)527-3887

Section 2. Hazards Identification

- 2.1 Classification of the Substance or Mixture:**
- 2.1.1 Classification according to Regulation (EC) No 1272/2008 [CLP]:**
 Serious Eye Damage/Eye Irritation, Category 2
- 2.1.2 Classification according to Directive 1999/45/EC:**
 Xi: Irritant
 Risk Phrases: R36
 For full text of R- phrases: see SECTION 15.
- 2.2 Label Elements:**
- 2.2.1 Labeling according to Regulation (EC) No 1272/2008 [CLP]:**



GHS Signal Word: Warning

GHS Hazard Phrases:

H319: Causes serious eye irritation.

GHS Precaution Phrases:

P264: Wash (hands) thoroughly after handling.

P280: Wear (protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection).

GHS Response Phrases:

P305+351+338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337+313: If eye irritation persists, get medical advice/attention.

GHS Storage and Disposal Phrases:

Please refer to Section 7 for Storage and Section 13 for Disposal information.

Multi-region format

according to Regulation (EC) No. 1907/2006 as amended by (EC) No. 1272/2008

Section 1. Identification of the Substance/Mixture and of the Company/Undertaking

- 1.1 Product Code:** 14416
Product Name: Fluorouracil
Synonyms: 5-fluoro-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione; NSC 19893; Ro 2-9757; U-8953;
- 1.2 Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against:**
Relevant identified uses: For research use only, not for human or veterinary use.
- 1.3 Details of the Supplier of the Safety Data Sheet:**
Company Name: Cayman Chemical Company
 1180 E. Ellsworth Rd.
 Ann Arbor, MI 48108
Web site address: www.caymanchem.com
Information: Cayman Chemical Company +1 (734)971-3335
- 1.4 Emergency telephone number:**
Emergency Contact: CHEMTREC Within USA and Canada: +1 (800)424-9300
 CHEMTREC Outside USA and Canada: +1 (703)527-3887

Section 2. Hazards Identification

- 2.1 Classification of the Substance or Mixture:**
- 2.1.1 Classification according to Regulation (EC) No 1272/2008 [CLP]:**
Acute Toxicity: Oral, Category 3
Aquatic Toxicity (Chronic), Category 3
- 2.1.2 Classification according to Directive 1999/45/EC:**
Xn: Harmful
Risk Phrases: R20/21/22, R36/37/38, R63, R68
For full text of R- phrases: see SECTION 15.
- 2.2 Label Elements:**
- 2.2.1 Labeling according to Regulation (EC) No 1272/2008 [CLP]:**



GHS Signal Word: Danger

GHS Hazard Phrases:

H301: Toxic if swallowed.
 H412: Harmful to aquatic life with long lasting effects.

GHS Precaution Phrases:

P264: Wash (hands) thoroughly after handling.
 P273: Avoid release to the environment.

GHS Response Phrases:

P301+310: IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.
 P330: Rinse mouth.

GHS Storage and Disposal Phrases:

Please refer to Section 7 for Storage and Section 13 for Disposal information.

Multi-region format



SAFETY DATA SHEET

Carboplatin

Page: 1 of 6

Revision: 04/03/2018
Supersedes Revision: 10/09/2014

according to Regulation (EC) No. 1907/2006 as amended by (EC) No. 1272/2008

Section 1. Identification of the Substance/Mixture and of the Company/Undertaking

- 1.1 Product Code:** 13112
Product Name: Carboplatin
Synonyms: (SP-4-2)-diammine[1,1-cyclobutanedicarboxylato(2-)-kappa.O.,kappa.O']-platinum; NSC 201345; NSC 241240; Paraplatin®; Ribocarbo-L;
- 1.2 Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against:**
Relevant identified uses: For research use only, not for human or veterinary use.
- 1.3 Details of the Supplier of the Safety Data Sheet:**
Company Name: Cayman Chemical Company
1180 E. Ellsworth Rd.
Ann Arbor, MI 48108
Web site address: www.caymanchem.com
Information: Cayman Chemical Company +1 (734)971-3335
- 1.4 Emergency telephone number:**
Emergency Contact: CHEMTREC Within USA and Canada: +1 (800)424-9300
CHEMTREC Outside USA and Canada: +1 (703)527-3887

Section 2. Hazards Identification

- 2.1 Classification of the Substance or Mixture:**
Acute Toxicity: Inhalation, Category 4
Acute Toxicity: Oral, Category 4
Acute Toxicity: Skin, Category 4
Respiratory Sensitization, Category 1
Skin Sensitization, Category 1
Germ Cell Mutagenicity, Category 1B
Toxic To Reproduction, Category 1B
- 2.2 Label Elements:**



GHS Signal Word: Danger

GHS Hazard Phrases:

H302: Harmful if swallowed.

H312: Harmful in contact with skin.

H317: May cause an allergic skin reaction.

H332: Harmful if inhaled.

H334: May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled.

H340: May cause genetic defects.

H360: May damage fertility or the unborn child.