



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“Actividad citotóxica del aceite esencial de *Boswellia serrata* Roxb. en células de hepatocarcinoma”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

Bióloga Experimental Diana Laura Torres Chacón

Directores:

Dr. Julio César Almanza Pérez

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Asesor externo:

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

Iztapalapa, Ciudad de México. Junio 2019

COMITÉ TUTORAL

Codirector

Dr. Julio César Almanza Pérez

Profesor-Investigador Titular C

Depto. Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa

jcap@xanum.uam.mx

Codirector

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Profesor-Investigador Titular C

Depto. Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa

legq@xanum.uam.mx

Asesor Externo

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

Profesor-Investigador Titular C

Facultad de Farmacia

Universidad Autónoma del Estado de Morelos

enoch@uaem.mx

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”

El presente trabajo fue realizado en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, en el laboratorio de Farmacología y en el laboratorio de Fisiología Celular, bajo la codirección del Dr. Julio César Almanza Pérez y el Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz con el apoyo proporcionado por el CONACyT a través de la beca otorgada a la alumna Diana Laura Torres Chacón con el número de beca 616048 y de CVU 796802.

Miembros de Jurado

Los miembros del jurado fueron designados por la comisión académica del posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa, los abajo firmantes aprobaron la tesis titulada “Actividad citotóxica del aceite esencial de *Boswellia serrata* Roxb. en células de hepatocarcinoma”, con fecha de presentación para obtener el grado de Maestría, el día de 2018.

Dedicatorias

Por ser un ejemplo y pilar en mi vida, por demostrarme que no existen límites cuando lo que se pretende es mejorar el mundo, por los desvelos, las risas, los consejos y los regaños, por soportarme en mis peores momentos y darme la mano en mis mayores fracasos, porque este trabajo también es tuyo,

para mi madre, Antonieta

Llegaste a mi vida en el momento menos esperado, y me hiciste ir más allá de mis capacidades, me demostraste que el amor verdadero si existe y crece dentro de uno, eres el motor de mi vida y un regalo de Dios, porque eres parte de mi inspiración,

para mi hijo, Dennis

“Cuando tengas que elegir entre dos caminos, pregúntate cuál de ellos tiene corazón.

Quien elige el camino del corazón, no se equivoca nunca.”

- Popol-Vuh

Agradecimientos

Al **Dr. Julio Almanza**, por el apoyo incondicional y los conocimientos, por ir siempre más allá del deber y ser también un amigo, porque su equipo de trabajo es una familia y por incluirme en ella para mejorar como investigadora, mil gracias.

Al **Dr. Luis Quiroz**, por la amabilidad al trabajar en su laboratorio, al compartir sus conocimientos, consejos y sugerencias. Por la pasión por su trabajo, gracias.

Al **Dr. Samuel Estrada**, por el apoyo, sus comentarios y consejos que enriquecieron este trabajo.

A la **Dra. Margarita Canales**, por el apoyo y recibimiento en su laboratorio, por ser parte de una gran familia de investigadores y por la pasión a su trabajo además de las observaciones finales a este trabajo.

Al **Dr. Francisco Alarcón** y la **Dra. Ángeles Fortis**, por su disponibilidad y tiempo enriqueciendo este trabajo a través de sus comentarios y consejos.

Al **laboratorio de Farmacología**, por ser una increíble familia, siempre dispuestos a brindar ayuda y conocimiento.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, **Abraham, Bety, Wendy y Jhovan**, porque son parte de mi crecimiento profesional y por los buenos momentos en el laboratorio que con el tiempo nos han hecho amigos.

A mis hermanas **Rebeca y Jessica**, por darme ánimos y soportarme en mis malos ratos, y ser siempre un ejemplo e inspiración.

A mi padre **Gustavo**, por el apoyo y la comprensión a pesar de nuestras diferencias.

A mi esposo **Carlos**, por cambiarme la vida y ser un gran apoyo para crecer en lo personal y lo profesional, te amo.

A mis amigos **Sharik y Jonathan** por las risas, las salidas, por crecer juntos en lo profesional y lo personal. A mis amigas **Gisela y Cinthia**, por estar siguiendo mi trabajo y ser amigas incondicionales desde la preparatoria. A mi gran amigo **Fernando** por ser UAMero y un gran apasionado por la ciencia, siempre apoyándome mil gracias. A **Julius, Deira y Monse**, porque con los años de una y otra manera continúan apoyándome.

Y a todos aquellos no mencionados, pero no por ello menos importantes que de alguna u otra manera fueron parte de este logro...gracias totales.

Resumen

El cáncer es considerado un conjunto de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento celular desregulado, invasión y propagación de células desdiferenciadas desde un sitio de origen a otros sitios del cuerpo, lo que se conoce también como metástasis. El hepatocarcinoma (HCC) es un tipo de cáncer que se genera por daño al ADN de manera acumulativa en los hepatocitos, lo que genera crecimiento desregulado hasta la formación de un tumor maligno, lo que desencadena falla hepática, entre otras complicaciones. El HCC ocupa el noveno lugar en incidencia y el cuarto en mortalidad. Existen varios tratamientos para el HCC, como la resección quirúrgica, el trasplante de hígado, la quimioterapia dirigida y los fármacos antineoplásicos. Sin embargo, su uso a menudo se restringe a estados avanzados de la enfermedad, ya que las primeras etapas son asintomáticas. Por tal motivo, se ha intensificado la búsqueda de terapéuticas que permitan un grado de éxito mayor aún en etapas avanzadas de HCC. Los productos naturales se han convertido en una fuente de investigación de agentes antitumorales. Entre las plantas investigadas se encuentra *Boswellia serrata*, una planta distribuida en la India y China, cuya resina es conocida como incienso. A partir de esta resina se obtienen diferentes preparados como aceites esenciales, los cuales tienen un gran potencial citotóxico y antiinflamatorio. Entre los principales compuestos de esta planta se encuentra el ácido acetil-11-ceto- β -boswélico (AKBA), al cual se le atribuye la actividad antiinflamatoria y el potencial efecto citotóxico de esta planta sobre algunos tipos de cáncer. El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto citotóxico del aceite esencial de *B. serrata* y AKBA sobre células de hepatocarcinoma en cultivos celulares.

El aceite esencial de *B. serrata* se obtuvo de la resina pulverizada la cual fue sometida a destilación por arrastre de vapor directo. La fracción destilada se particionó con cloroformo y el aceite esencial se concentró en rotavapor. El AKBA fue adquirido comercialmente (CaymanChem). Se realizaron curvas de proliferación de células Huh-7 (hepatocarcinoma) mediante el método CCK-8, y evaluando las concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 80 μM de AKBA y de 1, 2, 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$ del aceite esencial de *B. serrata*. Se llevó a cabo un ensayo de esferoides con 1 μM de AKBA y 1 $\mu\text{g/ml}$ de aceite esencial de *B. serrata*. Por último, se llevó a cabo un ensayo de western blot para evaluar las proteínas de ciclo celular (ciclina D1, CDK4 y p21), las proteínas de transición epitelio-mesénquima (E-cadherina, AFP y EpCAM) y las proteínas de muerte celular (Mcl-1 y Caspasa 3 activa).

Los resultados mostraron que el aceite esencial de *B. serrata* y AKBA tienen efecto sobre la proliferación celular, desde las 24 h y hasta las 72 h, disminuyendo la proliferación celular en un 80% para el aceite esencial (1, 2, 4 $\mu\text{g/ml}$) y un 90% para AKBA (5 y 10 μM). Además, tanto el aceite esencial como AKBA disminuyeron más del 50% el número y tamaño de los esferoides de Huh-7. En cuanto a los marcadores moleculares evaluados mediante WB, sólo se observaron cambios en la expresión de caspasa 3 activa, la cual está involucrada en la activación de la apoptosis, por lo que es probable que esta vía participe en la acción citotóxica de *B. serrata*.

Se puede concluir que el aceite esencial de *B. serrata* y AKBA tienen efecto citotóxico en células Huh-7, tanto en monocapa como en esferoides. Este efecto citotóxico está dado por activación de la apoptosis, el cual puede ser regulado por caspasa 3 activa.

Abstract

Cancer is considered a set of diseases that are characterized by the deregulated cell growth, invasion and spread of dedifferentiated cells from the origin site to other body sites, also known as metastasis. Hepatocellular carcinoma (HCC) is a type of cancer generated by accumulatively DNA damage in hepatocytes, which leads to deregulated growth until the formation of a malignant tumor, which triggers a liver failure, among other complications. The HCC ranks worldwide ninth in incidence and fourth in mortality. Currently, exists a variety of treatments for HCC that goes from surgical resection, liver transplantation, targeted chemotherapy to antineoplastic drugs. However, the first stages are asymptomatic and usually detected in advanced stages. Therefore, the search of therapies that allow a higher grade of success has intensified. Natural products have become a source of research of antitumor agents. Within the investigated plants is *Boswellia serrata*, a tree distributed in India and China whose resin is known as Frankincense. From this resin, different preparations are obtained as essential oils, and it has been observed that they have a cytotoxic and anti-inflammatory large potential. Within the main compounds of this plant is acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA), which attributes the anti-inflammatory activity and the cytotoxic potential effect of this plant on some types of cancer. The objective of the present investigation was determinate the cytotoxic effect of the essential oil of *B. serrata* and AKBA on hepatocellular carcinoma cells in cell cultures.

The essential oil of *B. serrata* was obtained from the macerated resin, which was subjected to direct steam distillation. The distilled fraction was partitioned with chloroform and concentrated in a rotary evaporator to obtain the essential oil. The AKBA was acquired commercially from CaymanChem. Proliferation curves of Huh-7 cells (hepatocellular carcinoma) were performed by the CCK-8 method, and were evaluated the concentrations of 5, 10, 20, 40 and 80 μM of AKBA and 1, 2, 4 and 8 $\mu\text{g/ml}$ of the *B. serrata* essential oil. A spheroid test was carried out with 1 μM of AKBA and 1 $\mu\text{g/ml}$ of *B. serrata* essential oil. Finally, a western blot assay was carried out to evaluate the cell cycle proteins, Cyclin D1, CDK4 and p21; the epithelium-mesenchyme transition proteins, E-cadherin, AFP and EpCAM; and finally, the cell death proteins Mcl-1 and Caspase 3 active, through WB.

The results showed that the essential oil of *B. serrata* and AKBA present effect on cell proliferation, from 24 h to 72 h, decreasing cell proliferation by 80% for the concentrations of 1, 2, 4 $\mu\text{g / ml}$ of the essential oil, and 90% for the 5 and 10 μM concentrations of AKBA. In addition, both the essential oil and AKBA decrease the number and size of Huh-7 spheroids by more than 50%. Concerning the molecular markers evaluated by WB, only were observed changes in the expression of active caspase 3, which is involved in the activation of apoptosis, so it's possible involved in the cytotoxic action of *B. serrata*.

It can be concluded that the *B. serrata* essential oil and AKBA have cytotoxic effect on Huh-7 cells, both monolayer and spheroids. This cytotoxic effect is given by activation of apoptosis, which can be regulated by active caspase 3.

Abreviaturas

ABA: Ácido acetil- β -boswélico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AFP: Alfa fetoproteína

AKBA: Ácido acetil-11-ceto- β -boswélico

A- α -BA: Ácido acetil- α -boswélico

CCK-8: Cell counting Kit 8

CDK: Cinasa dependiente de ciclina

DMSO: Dimetilsulfóxido

DOX: Doxirrubicina

EGFR: Receptor de factor de crecimiento epidérmico

Fzd-7: Receptor clase frizzled 7

GC-MS: Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

HCC: Hepatocarcinoma celular

IGFR: Receptor de factor de crecimiento similar a la insulina

KBA: Ácido 11-ceto- β -boswélico

LDLT: Trasplante de hígado de donante vivo

LT: Trasplante de hígado

MEC: Matroz extracelular

MET: Factor de crecimiento de hepatocitos

NAFLD: Enfermedad de hígado graso no alcohólica

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas

PDGFR: Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

RAR β : Receptor de ácido retinoico beta

RTK: Receptores tirosin cinasa

TACE: Quimioembolización transarterial

TRAP1: Proteína 1 asociada al receptor de TNF

VEGFR: Receptor de factor de crecimiento endotelio vascular

β -BA: Ácido β -boswélico

α -BA: Ácido α -boswélico

Índice de figuras

Figura 1. Características distintivas de las células cancerosas. Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011.

Figura 2. Representación esquemática de los lóbulos hepáticos. Modificado de Ozougwu, 2017.

Figura 3. Tasas de incidencia de cáncer en México (azul) y mortalidad (rojo) a nivel mundial A) y en México B) en el 2018 estandarizadas según la edad. Se tomaron en cuenta todas las edades y ambos sexos. GLOBOCAN, 2018.

Figura 4. Factores de riesgo y eventos moleculares presentes en el desarrollo del hepatocarcinoma. Modificado de Gomes *et al.*, 2013.

Figura 5. Tratamientos farmacológicos recomendados para el hepatocarcinoma, por la EASL según los niveles de evidencia y la fuerza de recomendación. Se resaltan como negativos los que no están aprobados o respaldados por las pautas internacionales, los débiles son aquellos que aún requieren evidencia y los positivos aquellos que ya están aprobados. *Otras terapias dirigidas molecularmente incluyen sunitinib, linifanib, brivanib, tivantinib, erlotinib y everolimus. Modificado de Llovet *et al.*, 2018.

Figura 6. Fotografía de ejemplar completo de A) *Boswellia serrata*, y sus B) flores, C) hojas y D) corteza. Tomado de Herbarium JCB, 2019.

Figura 7. Fotografía de *B. serrata* en zona rocosa y su resina. Fuente Roy *et al.*, 2016.

Figura 8. Ácidos boswélicos característicos de *B. serrata*. Modificado de Roy *et al.*, 2016.

Figura 9. Espectro de masas del aceite esencial de *B. serrata*, se resaltan los compuestos mayoritarios y su respectiva estructura.

Figura 10. Proliferación celular por CCK-8 en células Huh-7 tratadas por 72 horas con una única administración de las distintas concentraciones del aceite esencial de *B.*

serrata. Los datos se presentan en media \pm E.E.M. (n=4). *Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

Figura 11. Proliferación celular por CCK-8 en células Huh-7 tratadas por 72 horas con una sola administración de las distintas concentraciones de AKBA. Los datos se presentan en media \pm E.E.M. (n=4). *Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

Figura 12. Esferoides de células Huh-7 tratadas con la concentración seleccionada de aceite esencial de *B. serrata* y AKBA. Las flechas rojas resaltan los esferoides.

Figura 13. Comparación cuantitativa de esferoides en células Huh-7 tratadas con aceite esencial a 1 $\mu\text{g/ml}$ por 72 horas (n=5). *Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

Figura 14. Comparación cuantitativa de esferoides en células Huh-7 tratadas con AKBA a 1 μM por 72 horas (n=5). *Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

Figura 15. Efecto del aceite esencial de *B. serrata* y AKBA sobre marcadores del ciclo celular en células Huh-7. Los datos se presentan en media \pm E.E.M. (n=4). *Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

Figura 16. Efecto del aceite esencial de *B. serrata* y AKBA sobre marcadores transición epitelio mesénquima en células Huh-7. Los datos se presentan en media \pm E.E.M. (n=4). *Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

Figura 17. Efecto del aceite esencial de *B. serrata* y AKBA sobre marcadores de muerte celular en células Huh-7. Los datos se presentan en media \pm E.E.M. (n=4). *Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

Tabla de contenido

COMITÉ TUTORAL	II
Miembros de Jurado	V
Dedicatorias	VII
Agradecimientos	VIII
Resumen	X
Abstract	XII
Abreviaturas	XIV
Índice de figuras	XVI
1. Introducción	1
1.1 Clasificación	2
1.2. Estadísticas	2
1.1. El hígado	3
1.1.1. Histología del hígado	4
1.2. El hepatocarcinoma	5
1.2.1. Factores de riesgo	7
1.2.2. Mecanismos de hepatocarcinogénesis	8
Cambios moleculares del HCC	10
1.3. Diagnóstico	12
1.3.1. Grado y estadificación	14

Tratamientos actuales del HCC	16
1.4. Resistencia a fármacos	19
1.5. La herbolaria en el tratamiento de enfermedades	21
1.6. Medicina tradicional en el tratamiento del HCC	22
2. Antecedentes	24
2.1. Boswellia serrata Roxb.	24
2.1.1. Descripción morfológica	24
2.1.2. Clasificación taxonómica	25
2.1.3. Distribución	26
2.1.4. Usos tradicionales	27
2.2. Actividades biológicas en Boswellia serrata Roxb.	28
2.2.1. Actividad antimicrobiana	30
2.2.2. Actividad antiinflamatoria	31
2.2.3. Actividad citotóxica y antitumoral	31
3. Justificación	34
4. Hipótesis	35
5. Objetivo general	35
5.1. Objetivos particulares	35
6. Material y Métodos	36
6.1. Material vegetal	36
6.2. Modelos celulares	36

6.3.	Tratamientos	36
6.4.	Ensayos in vitro	37
6.5.	Extracción de proteína total	38
6.5.1.	Cuantificación de proteína	38
6.6.	Western blot	38
6.7.	Análisis estadístico	39
7.	Resultados	41
7.1.	Extracción del aceite esencial de <i>B. serrata</i>	41
7.2.	Análisis fitoquímico del aceite esencial de <i>B. serrata</i>	41
7.4.	Proliferación de células Huh-7	44
7.5.	Ensayos con esferoides	46
7.6.	Análisis de marcadores celulares relacionados con carcinogénesis	49
7.6.1.	Marcadores de ciclo celular	49
7.6.2.	Marcadores de transición epitelio mesénquima	50
7.6.3.	Marcadores de muerte celular	51
8.	Discusión	53
9.	Conclusiones	59
10.	Perspectivas	59
11.	Referencias	60

1. Introducción

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento celular desregulado, así como la invasión y propagación de las células desde el tejido de origen, o bien, tejido primario, a otros tejidos del cuerpo, fenómeno denominado metástasis (Lauren, 2012). Las células cancerosas presentan características particulares como resistencia a la muerte celular, aumento de señales proliferativas, evasión de supresores de crecimiento, entre otras englobadas en la Figura 1 (Hanahan y Weinberg, 2011).



Figura 1. Características distintivas de las células cancerosas.

Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011.

Al crecimiento desregulado de estas células se le conoce también como neoplasia (que por su etimología significa crecimiento nuevo) o bien, tumor. Un tumor se define como el crecimiento de una masa anormal de tejido corporal. Los tumores pueden clasificarse como benignos si las células que lo conforman mantienen cierta

diferenciación y crecen sólo en el tejido de origen sin invadir tejidos circundantes, generalmente no presentan un riesgo para la salud. Sin embargo, si el tumor oprime o daña alguna estructura puede llegar a ser fatal. Por otro lado, se encuentran los tumores malignos, resultado de crecimiento desregulado de células desdiferenciadas que invaden y destruyen tejidos circundantes, y tienen acceso al sistema circulatorio y linfático, además de su capacidad de desarrollar metástasis (Costa, 2019).

1.1 Clasificación

Además de la clasificación antes mencionada, los diferentes tipos de cáncer pueden clasificarse según el tejido de origen (Lauren, 2012). Los de origen epitelial llamados carcinomas, los de origen mesenquimal conocidos como sarcomas, y los de tejido glandular llamados adenocarcinomas, los que se originan de células sanguíneas llamados leucemias que se originan en los leucocitos (glóbulos blancos). También se considera en esta clasificación los de origen linfático (que se presentan en órganos linfoides como el bazo, la timo y los ganglios linfáticos) conocidos como linfomas. Por último, los derivados de melanocitos que se excluyen de los carcinomas y se nombran melanomas (Costa, 2019). Algunas clasificaciones consideran a los que se originan de células sanguíneas tumores líquidos y al resto tumores sólidos, aunque es una clasificación obsoleta pues por el significado etimológico de tumor, no se puede considerar que exista un tumor líquido (Brito *et al.*, 2016).

1.2. Estadísticas

En cuanto a las estadísticas, el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, en el 2018 se presentaron 18,078,957 nuevos casos y, de éstos

9,555,027 muertes. En general, el cáncer se presenta más en hombres que en mujeres, sin embargo, la diferencia no excede los 2,000,000 de casos a nivel mundial. En Latinoamérica se presentaron 1,412,732 nuevos casos y 672,758 muertes; en esta región geográfica el cáncer se presenta más en mujeres que en hombres. Tan solo en México se presentaron 105,051 nuevos casos en mujeres y 85,616 en hombres, mientras que el número de muertes fue de 42,967 y 40,509, respectivamente. Cabe resaltar que entre los primeros diez tipos de cáncer más comunes, tanto a nivel mundial como en México, se encuentra el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de próstata y el cáncer de hígado (Figura 3); este último, la razón de este trabajo, ya que a diferencia de otros tipos de cáncer, presenta poca prevalencia y una tasa de mortalidad cercana a la de incidencia (GLOBOCAN, 2018).

1.1. El hígado

El hígado es uno de los órganos vitales para el cuerpo humano, sus funciones principales se centran en el metabolismo de nutrientes y desechos, así como agentes xenobióticos, entre otros. Es considerado un paso importante entre la absorción intestinal y las sustancias liberadas al torrente sanguíneo. El hígado tiene como origen embrionario el endodermo y tiene diferentes estados de maduración desde antes de nacer hasta el fenotipo final en un adulto. Estos estados de maduración dependen de la adaptación a los distintos nutrientes a los que se encuentra expuesto el organismo. A medida que el organismo madura, se desarrolla un patrón de enzimas metabólicas características de un adulto (Ozougwu, 2017).

1.1.1. Histología del hígado

En cuanto a su histología, el lóbulo hepático se considera la unidad funcional básica, tiene una particular forma hexagonal y cada uno incluye un patrón de placas de hepatocitos que forman la mayor parte de cada lóbulo, una vena central, una triada portal en los bordes de cada hexágono (conformada por un vena, una arteria y un conducto biliar), sinusoides que conectan la vena central con la triada portal, canalículos biliares y la presencia de células del sistema inmunológico conocidas como células de Kupffer o bien macrófagos biliares (Figura 2) (Ozougwu, 2017).

Los hepatocitos representan aproximadamente el 60% de las células del hígado, y en gran medida son los responsables de las actividades sintéticas y metabólicas del hígado, a través del espacio de Disse son expuestas a nutrientes y xenobióticos de la sangre. Los hepatocitos contienen orgánulos más grandes y en mayor cantidad, principalmente retículo endoplasmático, aparatos de Golgi, mitocondrias, lisosomas y peroxisomas. Los hepatocitos participan principalmente en el metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas. Así mismo, son responsables de producir y secretar bilis, del metabolismo y excreción del colesterol. Su importancia radica en su papel para metabolizar y excretar nutrientes y xenobióticos (Ozougwu, 2017).

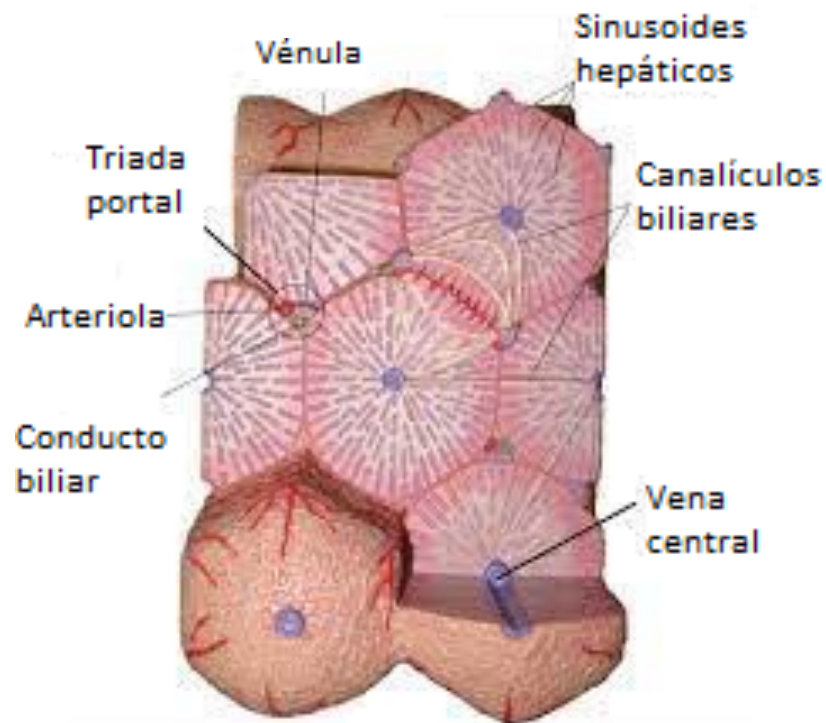


Figura 2. Representación esquemática de los lóbulos hepáticos. Modificado de Ozougwu, 2017.

1.2. El hepatocarcinoma

El hepatocarcinoma (HCC) es el resultado del daño progresivo y acumulativo en el ADN de los hepatocitos, que origina mutaciones genéticas, causando a su vez la alteración de las vías metabólicas, induciendo la proliferación celular de forma descontrolada hasta la formación de un tumor maligno (Brito *et al.*, 2016).

Las mutaciones genéticas pueden ser resultado de agentes externos o bien de fallas durante la replicación de los hepatocitos por daño al hígado. El HCC es uno de los cánceres más agresivos con una de las tasas de mortalidad más altas. Es el sexto tipo de cáncer más común a nivel mundial y la cuarta causa de muerte relacionada con cáncer. La incidencia de HCC varía de acuerdo con la edad, género, etnia y distribución

geográfica. En México es el noveno tipo de cáncer más común con el cuarto lugar de mortalidad por cáncer (Figura 3) (GLOBOCAN, 2018).

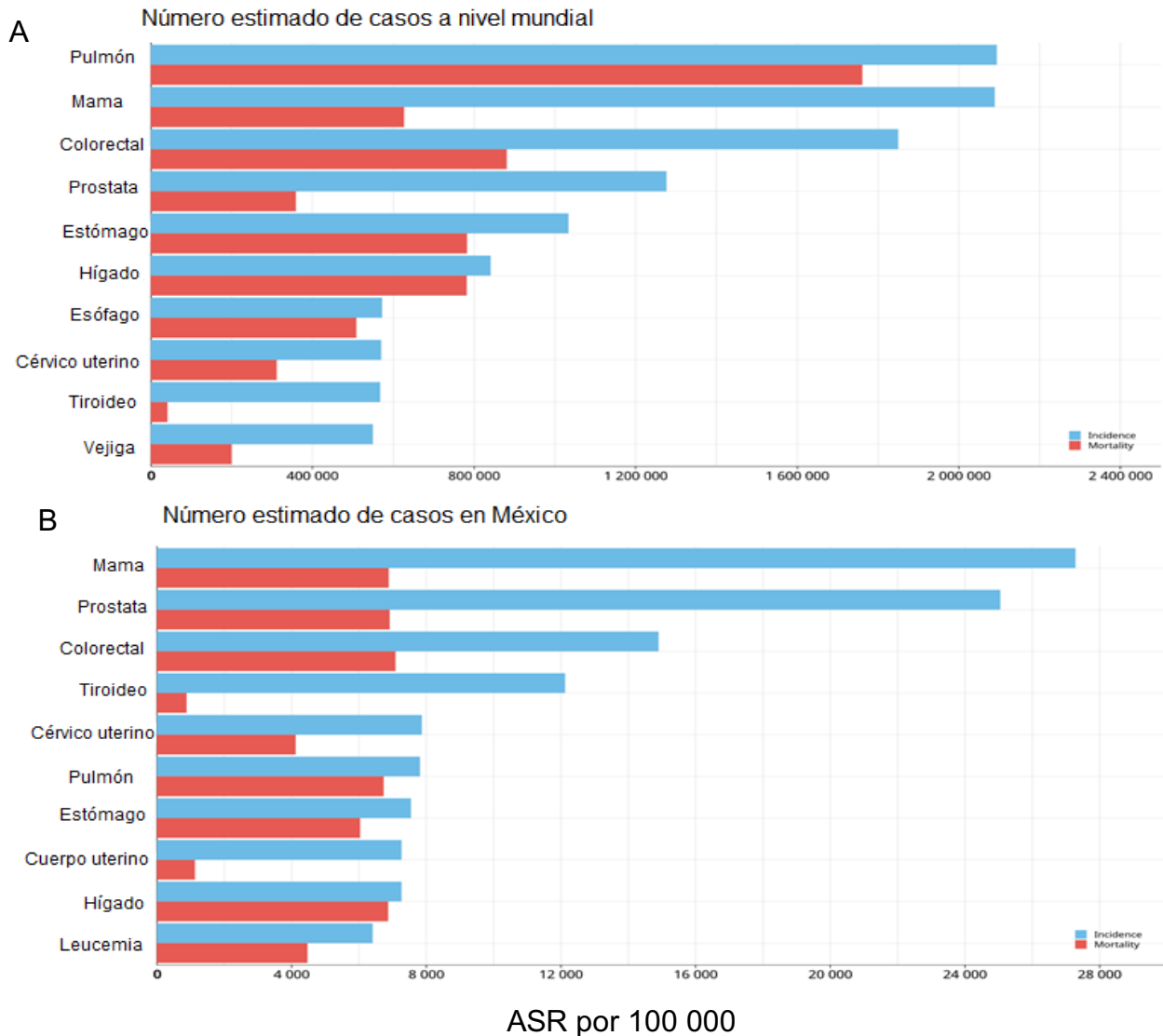


Figura 3. Tasas de incidencia de cáncer en México (azul) y mortalidad (rojo) a nivel mundial A) y en México B) en el 2018 estandarizadas según la edad. Se tomaron en cuenta todas las edades y ambos sexos. GLOBOCAN, 2018.

1.2.1. Factores de riesgo

Existe una gran cantidad de factores de riesgo que llevan al HCC, la distribución de ellos entre los pacientes que lo padecen depende en gran cantidad de la región geográfica, raza y grupo étnico. A pesar de ello, se han identificado los siguientes como los factores de riesgo más comunes:

- La hepatitis crónica causada por la infección del virus de hepatitis B o el virus de hepatitis C.
- El consumo excesivo de alcohol que puede llevar a desarrollar diferentes enfermedades del hígado.
- La exposición a aflatoxinas.
- El hígado graso no-alcohólico (NAFLD)

Algunos otros factores menos comunes son:

- La hemocromatosis hereditaria
- La deficiencia de alfa-1-antitripsina
- La hepatitis autoinmune
- Algunos tipos de porfiria
- La enfermedad de Wilson

Además, algunas enfermedades preexistentes pueden contribuir a su desarrollo, como la diabetes, la obesidad y el síndrome metabólico. También puede desarrollarse por el padecimiento de cirrosis o fibrosis, como una progresión de esas enfermedades (Figura 4) (Gomes *et al.*, 2013; Balogh *et al.*, 2016).

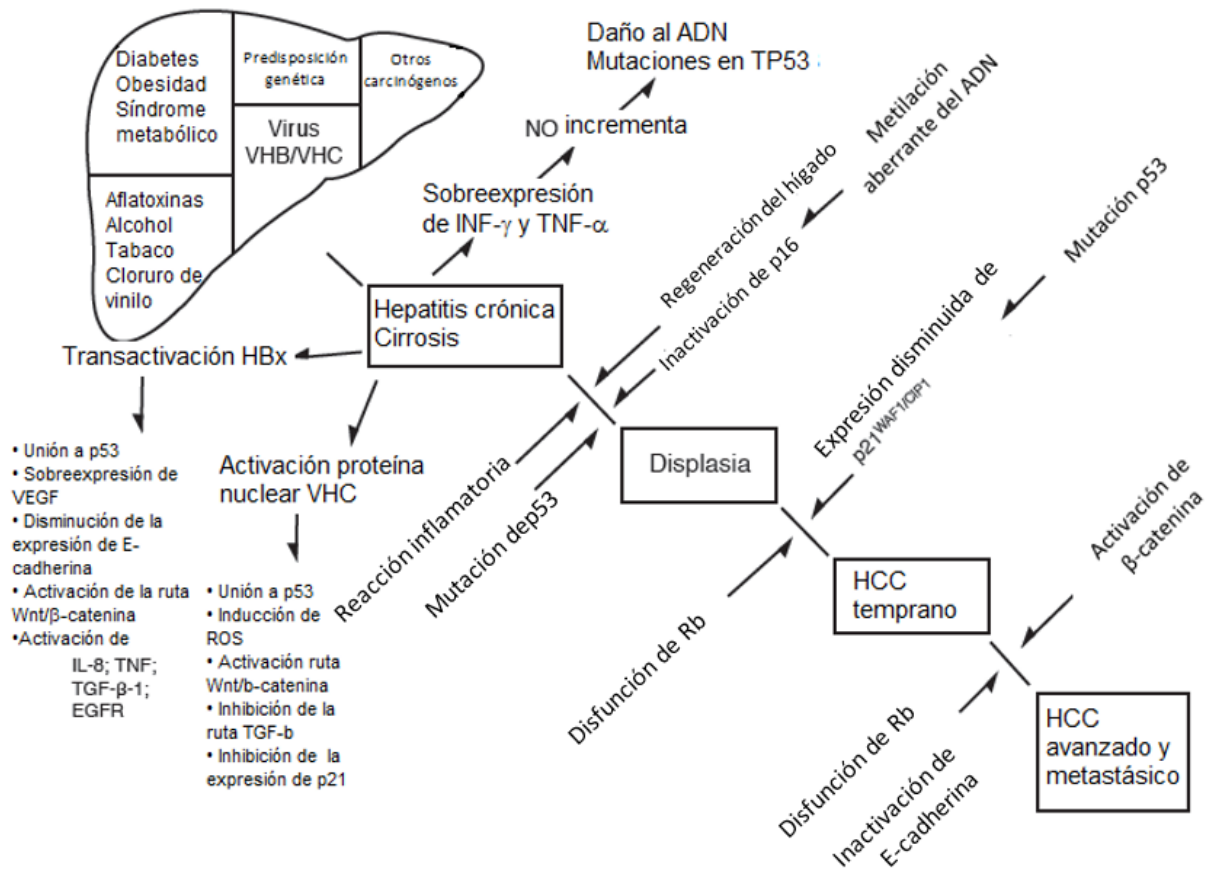


Figura 4. Factores de riesgo y eventos moleculares presentes en el desarrollo del hepatocarcinoma. Modificado de Gomes *et al.*, 2013.

1.2.2. Mecanismos de hepatocarcinogénesis

Los mecanismos de hepatocarcinogénesis incluyen diferentes vías de transducción de señales que alteran las funciones de las células. La infección crónica por virus de la hepatitis B alberga tres posibles mecanismos de hepatocarcinogénesis: el primero es por inestabilidad cromosómica inducida por la integración del genoma viral en el genoma del hospedero; el segundo es a través de múltiples mutaciones genéticas por inserción del genoma viral en sitios específicos, activando algunos genes como RARβ, ciclina A y TRAP1; el tercer mecanismo es la expresión de la proteína viral HBV X,

cuya acción puede transactivar y sobreexpresar una gran variedad de genes (Gomes *et al.*, 2013).

La ruta Wnt/ β -catenina es también una de las rutas alteradas; se ha observado que en más del 50% de los HCC hay una acumulación de β -catenina en el citoplasma y en el núcleo, evidencia de la mutación del gen. Como consecuencia se ha observado también la sobreexpresión del receptor Fzd-7, la inhibición de la expresión de E-cadherina o la activación de COX-2; también las interacciones de β -catenina en el núcleo llevan a la activación de Tcf/Lef, factores de transcripción que regulan la activación de la proliferación, la angiogénesis y la resistencia a la apoptosis (Berasain y Ávila, 2007).

La ruta ras/raf/MEK/ERK contribuye a la resistencia del tumor, alterando puntos de regulación del ciclo celular y activando oncogenes como *c-myc*, *c-jun* y *c-fos* que regulan la resistencia a la apoptosis, la resistencia a fármacos y la remodelación de la matriz extracelular (MEC). Además se aumenta la activación de receptores con actividad de tirosina cinasa (RTK) a partir de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGFR), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), el factor de crecimiento de hepatocitos (MET) y el factor de crecimiento de células madre (c-kit), cuyos genes blanco llevan a la inmortalización celular, a la angiogénesis y a metástasis. El receptor de EGF es uno de los más sobreexpresados en hepatocitos y algunos de sus ligandos, como TGF- α , HB-EGF o anfiregulina, que se presentan en gran cantidad en enfermedades preneoplásicas,

como la cirrosis. Todas estas moléculas son considerados como blancos terapéuticos y en la actualidad se investigan para ser regulados o inhibidos, y con ello disminuir la malignidad de las células tumorales, deteniendo su crecimiento y proliferación, e incluso inducir apoptosis (Gomes *et al.*, 2013; Berasain y Ávila, 2007).

Otra de las rutas más investigadas es la de p53 y retinoblastoma, pues se asocia a la resistencia a la apoptosis y fármacos quimioterapéuticos. Estos genes son considerados supresores de tumores; la alteración de esta vía está dada por la sobreexpresión de un regulador negativo que lleva a su degradación, conocido como gankirina, otro blanco terapéutico que al ser inhibido aumenta la apoptosis y disminuye la proliferación, exceptuando a los tumores que tiene p53 deletado, (Berasain y Ávila, 2007).

Por último, la ruta de PI3K/Akt/mTOR regula la proliferación, la apoptosis y el metabolismo celular, que a su vez resulta en la supervivencia celular. La ruta se ve estimulada por RTK, o bien al disminuir las fosfatasa PIP y PTEN, aunque la mayoría de los tratamientos a tumores que presentan estas alteraciones no se dirigen a los iniciadores sino a los ejecutores Akt y mTOR, buscando inhibidores directos o activadores de sus inhibidores por diferentes rutas (Berasain y Ávila, 2007).

Cambios moleculares del HCC

El HCC es el resultado de múltiples mutaciones que se resumirán a continuación para destacar los blancos terapéuticos. Las alteraciones genéticas se pueden clasificar por la vía celular afectada, teniendo entonces lo siguiente:

- Control del ciclo celular

Los puntos de control del ciclo celular son los reguladores de la proliferación, evitando que los hepatocitos proliferen de manera descontrolada y aberrante. La familia de Ink4 de inhibidores de Cdk conformada por p15, p16, p18 y p19 regulan la entrada al ciclo celular, uniéndose a las cinasas Cdk4/6, inhibiendo su unión a la Ciclina D. La familia de protein-cinasas Cip/Kip conformada por p21, p27 y p57 son capaces de inhibir e inactivar el avance del ciclo celular. Además, la proteína Rb es reguladora del factor de transcripción E2F a través de la vía p16/pRb. Las alteraciones por inactivación o mutación en cualquiera de estas proteínas alteran los puntos de control del ciclo celular y aumentan la malignidad del tumor (Singh, Kumar y Pandey, 2018).

➤ Control de la senescencia celular

En los hepatocitos el mecanismo de senescencia no está del todo claro, sin embargo, se ha descrito que en enfermedades crónicas severas del hígado la senescencia se presenta no sólo como un evento independiente al acortamiento de telómeros, sino más bien como resultado de radicales libres u oncogenes. Generalmente la activación de vías de señalización como ATM/Chk/p53 que lleva al arresto celular en G1, o bien a través de la vía antes mencionada p16/pRb. Anomalías en cualquiera de estas vías pueden llevar a la proliferación de células aberrantes por escape de la senescencia celular (Singh, Kumar y Pandey, 2018).

➤ Apoptosis

La muerte celular programada o apoptosis es un mecanismo de reparación y protección de los tejidos, la resistencia a ella provee malignidad a los tumores. Esta se ejecuta a través de las caspasas 3, 6 y 7 a través de los receptores de muerte y la vía

de Fas. En los tumores resistentes a la apoptosis los hepatocitos presentan una regulación negativa de las proteínas proapoptóticas, como Fas, el dominio de muerte asociado a Fas (FADD) y FLICE, Bax o Bcl-XS, o bien sobreexpresan las proteínas antiapoptóticas cFLIP, NF- κ B, Bcl-2, aumentando así su resistencia a la muerte celular (Singh, Kumar y Pandey, 2018).

➤ **Marcadores metabólicos**

Con el avanzado conocimiento sobre la biología de los tumores, los marcadores metabólicos que pueden medirse en sangre y tejido son indicadores de la presencia de un tumor. Entre ellos se destacan la alfa fetoproteína (AFP) una glicoproteína responsable del transporte de diversos compuestos como esteroides, bilirrubina, retinoide, ácidos grasos, flavonoides, metales pesados, fitoestrógenos y fármacos, entre otros. Se halla en grandes cantidades durante el desarrollo embrionario y disminuye al nacer, siendo detectable sólo en suero; un aumento inusual está relacionado con daño en el hígado y un aumento severo con la presencia de tumores. Algunos otros marcadores metabólicos son des- γ -carboxiprotrombina inducida por deficiencia de vitamina K, la proteína de Golgi 73, el antígeno de carcinoma de células escamosas, por mencionar algunos, que son menos específicos que AFP y requieren una validación antes de dar el diagnóstico, sin dejar de ser importantes (Singh, Kumar y Pandey, 2018).

1.3. *Diagnosis*

La diagnosis temprana en el HCC no suele ser común, las primeras etapas son asintomáticas, por lo que la mayoría de los casos se detectan en estados avanzados,

a menos que el HCC sea el resultado de una enfermedad crónica del hígado como la hepatitis o la cirrosis, donde el seguimiento de las enfermedades crónicas aumenta la posibilidad de diagnosticarlo en etapas tempranas (Balogh *et al.*, 2016).

El diagnóstico es a base de imagenología, aunque existen también pruebas sanguíneas en busca de marcadores de tumores y análisis patológico de biopsias, pero no siempre es posible llevarlas a cabo. En el caso de las biopsias, no pueden ser obtenidas si hay deficiencia de coagulación por insuficiencia hepática, es decir que el acceso al tumor sea difícil o nulo, o por el riesgo teórico de la diseminación del tumor a través del tejido por donde paso la aguja (Gomes *et al.*, 2013). En cuanto a las pruebas sanguíneas el marcador que se analiza comúnmente es AFP, un valor sérico mayor a 400 ng/ml se considera positivo a HCC, aunque se puede obtener un falso negativo, pues no siempre la presencia de un HCC aumenta el valor sérico de AFP (Balogh *et al.*, 2016).

Teniendo esto en cuenta, una combinación de técnicas de imagenología es la forma más común de diagnosis. Un hígado dañado forma nódulos que se observan fácilmente por ultrasonido con contraste, los nódulos que miden menos de 1 cm no pueden definirse como HCC y deben seguirse evaluando con una repetición del ultrasonido en 3 a 4 meses. Los nódulos de 1 a 2 cm requieren de una tomografía computarizada como análisis complementario, los nódulos mayores a 2 cm requieren además una resonancia magnética con contraste de fases para analizar los patrones vasculares típicos del HCC. Se considera positivo cuando aumenta el contraste en la fase arterial y disminuye en la fase venosa (Gomes *et al.*, 2013; Balogh *et al.*, 2016).

1.3.1. Grado y estadificación

Una vez que se lleva a cabo la diagnosis, es importante conocer el estado del tumor para seleccionar el tratamiento. Para ello se tiene la clasificación por grado y estadificación. El grado se refiere a la histología del tejido, es decir, el grado de diferenciación tisular y sus características que definen la malignidad del tumor y su posible evolución (Costa, 2019). Los sistemas de clasificación tienen variaciones según el tipo de cáncer, aunque en general los tumores se clasifican del 1 al 4, según las anomalías que se presentan y siguiendo la siguiente nomenclatura:

- GX: No se puede evaluar el grado
- G1: Bien diferenciado
- G2: Moderadamente diferenciado
- G3: Poco diferenciado
- G4: Desdiferenciado

Se considera que un tumor en G1 a G2 tiene un buen pronóstico, pues los tumores con estos grados suelen crecer y diseminarse lentamente. Sin embargo, los tumores en G3 o G4 se consideran sumamente agresivos y tienden a diseminarse con facilidad.

Por otro lado, la estadificación de un tumor se refiere al tamaño y diseminación del tumor, tanto en el tejido de origen como en otros sitios del cuerpo. En este caso existen dos sistemas de clasificación, el primero es el sistema TNM, donde la T se refiere al tamaño y extensión del tumor primario, la N se refiere al número de ganglios linfáticos invadidos y la M se refiere a la presencia o ausencia de metástasis, teniendo entonces la siguiente nomenclatura:

Tumor primario (T)

- TX: No se puede medir
- T0: No se encontró el tumor primario
- T1, T2, T3, T4: Se refiere al tamaño del tumor, entre mayor sea el número más grande e invasivo es el tumor.

Ganglios linfáticos regionales (N)

- NX: No se puede medir
- N0: No hay cáncer en los ganglios cercanos
- N1, N2, N3: Cuanto mayor es el número más ganglios linfáticos han sido invadidos.

Metástasis (M)

- MX: No se puede medir
- M0: No hay metástasis
- M1: Hay metástasis

La otra clasificación de estadificación es similar a la de grado, estableciendo la siguiente nomenclatura:

- Estado 0: se presentan células anormales, pero se mantienen en un solo lugar sin diseminarse, también conocido como *in situ* o CIS.
- Estado I, II y III: las células presentan desdiferenciación, y entre mayor sea el número más desdiferenciadas están y más invasivo será el cáncer.
- Estado IV: las células están completamente desdiferenciadas e invasivas y se presenta metástasis.

Una simplificación de esta clasificación que es utilizada principalmente para relación médico paciente es la siguiente:

- *In situ*: se presentan células anormales, pero se limitan al sitio de origen sin diseminarse.

- Localizado: el cáncer se limita al sitio de origen con un poco de invasión.
- Regional: el cáncer invade ganglios linfáticos y tejidos cercanos.
- Distante: el cáncer se ha diseminado a diferentes partes del cuerpo.
- Desconocido: la información es insuficiente para clasificarlo.

Todas las clasificaciones tienen un mismo propósito, conocer el estado actual del tumor para seleccionar la terapia más adecuada. En el caso del HCC en su mayoría los casos son detectados en grado y estado 3 a 4, con baja prognosis y alta malignidad, por lo que algunos tratamientos se ven descartados (National Cancer Institute, 2015).

Tratamientos actuales del HCC

El diagnóstico del HCC suele ser en estados avanzados, por lo cual los tratamientos actuales no siempre son viables. Se pueden clasificar en tres categorías, los tratamientos quirúrgicos, los agentes dirigidos y los agentes quimioterapéuticos.

En cuanto a los tratamientos quirúrgicos se encuentran el trasplante de hígado y la resección quirúrgica. Estas estrategias dependen de varios factores; como el estado general del paciente, un donador compatible y seguimiento del paciente, por lo menos durante seis meses, para detectar rechazo del órgano o reincidencia del cáncer, respectivamente (Raza y Sood, 2014).

Por otro lado, entre las técnicas con agentes dirigidos se destaca la quimioembolización transarterial (TACE, por sus siglas en inglés) y la radioembolización, ambas técnicas actúan en HCC en estado intermedio. En la radioembolización se implantan microesferas radioactivas de menos de 35 μm de diámetro que emiten radiación al tumor y el isótopo que se usa generalmente es Y^{90} , la TACE se basa en el mismo principio, pero con microesferas de 100-500 μm ,

teniendo como consecuencia isquemia del tumor, problema que se resuelve en la radioembolización (Raza y Sood, 2014).

Por último, otra de las terapias más utilizadas es la quimioterapia sistémica dirigida, la cual ataca las principales vías involucradas en el desarrollo del HCC, tratando de disminuir la toxicidad sistémica generalizada. Son múltiples las vías involucradas en el desarrollo del HCC, atacar todas a la vez sin dañar el resto del organismo no es un objetivo posible, sin embargo, la combinación de dos o más agentes dirigidos puede disminuir el tamaño del tumor, aumentando las posibilidades de éxito a través de una resección quirúrgica. Entre estos agentes se destacan la doxorubicina y el sorafenib. La doxorubicina es un antibiótico citotóxico de antraciclina aislado de *Streptomyces peucetius* (Tam, 2013), su mecanismo de acción aún no está del todo claro y los reportes muestran cierto grado de controversia, ya que por un lado se considera que su efecto está relacionado con la intercalación de nucleótidos, y por el otro, actúa sobre la topoisomerasa II durante el proceso de replicación, inhibiendo la unión de ambas hebras del ADN y deteniendo los procesos de replicación (Powis, 1987). También se ha sugerido que activa la unión de p53 con el ADN, permitiendo así la inducción de apoptosis, sin embargo aún no existe un acuerdo común (Stearns *et al.*, 2003).

El sorafenib es una bi-aril urea oral que inhibe múltiples cinasas, tanto en la superficie celular como corriente abajo en las cascadas de señalización que intervienen en la progresión del tumor. Entre las cinasas inhibidas se destaca VEGFR-1/2/3 y PDGFR- β , además inhibe la vía de ras/raf/MEK/ERK (Llovet *et al.*, 2018). Este agente ha sido probado tanto en América, como Europa y Asia, y actualmente es el más utilizado en

este tipo de terapias, aunque su mayor éxito se observa principalmente en pacientes con buena prognosis (Raza y Sood, 2014).

Todas estas terapias han sido probadas en más de un país y se han obtenido distintas respuestas, casi siempre dependientes del estado del paciente. La Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL, por sus siglas en inglés) ha establecido pautas a seguir en cuanto a la recomendación de estas terapias y según el nivel de evidencia (Figura 5) estos van desde trasplante ortotópico de hígado (LT), o de donante vivo (LDLT), a partir de los criterios Milán (los criterios de Milán para el trasplante de hígado son un solo tumor de ≤ 5 cm o tres nódulos de ≤ 3 cm de diámetro) hasta el uso de fármacos como sorafenib (Llovet *et al.*, 2018).

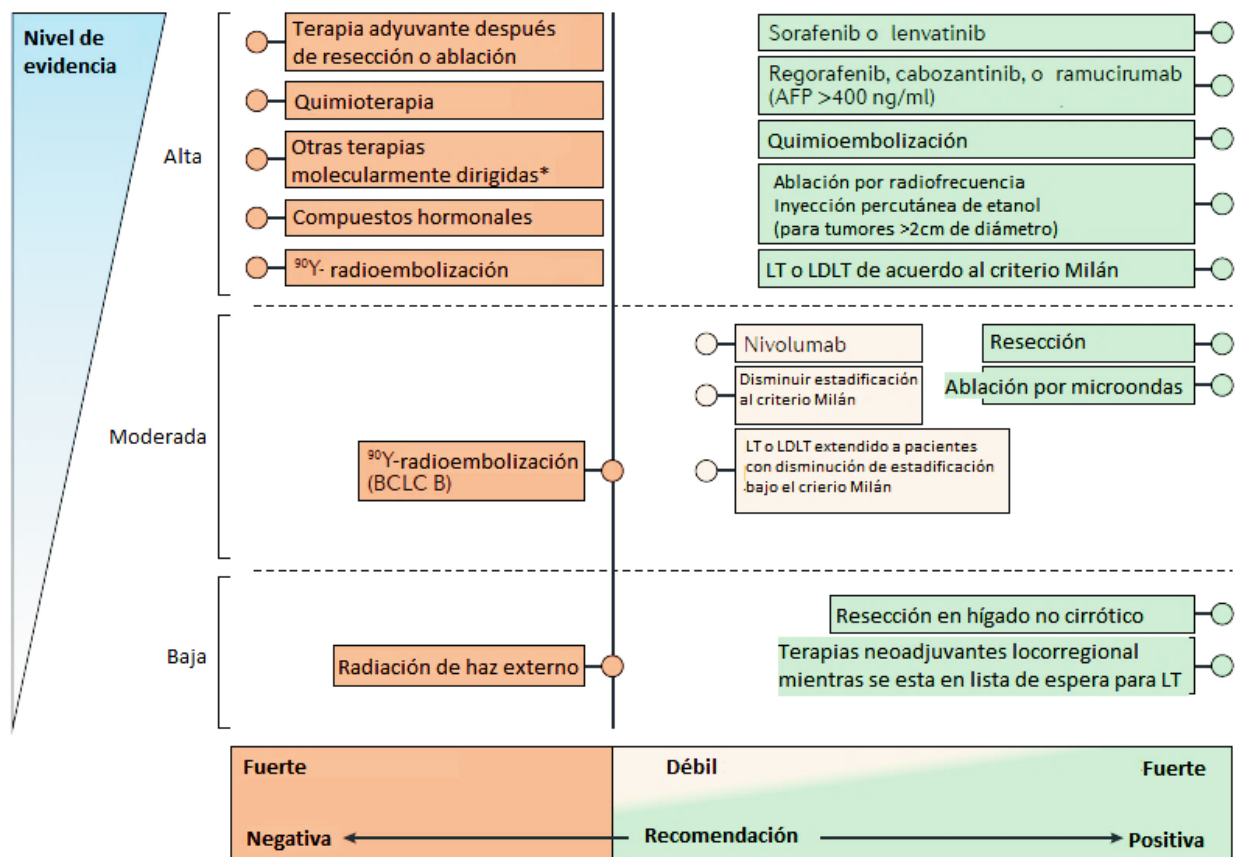


Figura 5. Tratamientos farmacológicos recomendados para el hepatocarcinoma, por la EASL según los niveles de evidencia y la fuerza de recomendación. Se resaltan como negativos los que no están aprobados o respaldados por las pautas internacionales, los débiles son aquellos que aún requieren evidencia y los positivos aquellos que ya están aprobados. *Otras terapias dirigidas molecularmente incluyen sunitinib, linifanib, brivanib, tivantinib, erlotinib y everolimus. Modificado de Llovet *et al.*, 2018.

1.4. Resistencia a fármacos

Las terapéuticas actuales dependen del estado general del paciente y de lo desarrollado que se encuentre el tumor. Además de esto, las terapias con fármacos se enfrentan a otro problema, la resistencia a fármacos. Existen algunas características propias del tumor a las cuales se les atribuye dicha resistencia, entre las principales

se halla la heterogeneidad del tumor, que está dada naturalmente por la inestabilidad genómica de las células, generando diferencias genéticas, epigenéticas, transcriptómicas y proteómicas. Además de sus características intracelulares, la heterogeneidad del tumor también puede darse por factores extrínsecos como el pH, la hipoxia y las señalizaciones paracrinas con el estroma y otras células tumorales. Por todos estos factores involucrados en un mismo tumor, pueden presentarse células senescentes, células con una alta tasa de proliferación, células stem y zonas necróticas con restos celulares. Por otro lado, el microambiente del tumor también contribuye a dicha resistencia. El microambiente se va a caracterizar por células normales del estroma y la matriz extracelular, que retroalimentan al tumor con citocinas y factores de crecimiento que aumentan las señales de crecimiento y supervivencia (Mansoori *et al.*, 2017).

La resistencia a fármacos puede categorizarse por los mecanismos que permiten de manera directa o indirecta promoverla. Entre los más estudiados se encuentran la inactivación del fármaco, el flujo de entrada y salida del fármaco, la alteración del metabolismo del fármaco, cambios epigenéticos, la reparación del daño al ADN, la inhibición de la muerte celular y la transición epitelio mesénquima (Housman *et al.*, 2014; Mansoori *et al.*, 2017). Todos ellos involucran una gran cantidad de cambios moleculares que aumentan la malignidad del tumor, por ello la búsqueda de nuevos agentes que actúen principalmente sobre las señales de crecimiento y supervivencia, se ha intensificado. Una de las fuentes más importantes para la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos, son las plantas medicinales, ya que han sido la fuente principal para la obtención de fármacos a lo largo del desarrollo de la humanidad.

1.5. La herbolaria en el tratamiento de enfermedades

La herbolaria hace referencia al uso empírico de productos naturales como hojas, semillas, flores y raíces en el tratamiento de enfermedades. Es la base de la farmacología actual y durante siglos se ha preservado, constituyendo parte de tradiciones y culturas. Se desconoce el porcentaje exacto que utiliza estos remedios actualmente, puesto que la mayoría niega su uso ante los médicos y los censos especializados. Sin embargo, se ha notado un incremento en el uso de estos productos naturales en todo el mundo, incluyendo países desarrollados y en vías de desarrollo (Firenzuoli y Gori, 2007). Además, en comparación con las poblaciones sanas, los pacientes con cáncer son quienes acuden con mayor frecuencia al uso de estos productos, algunos incluso los utilizan en conjunto con la quimioterapia y afirman que disminuyen el dolor, por lo cual este campo ha tomado gran relevancia en la investigación (Yeung, Gubili y Mao, 2018).

En México existen múltiples manuscritos procedentes de las culturas indígenas que describen el uso de plantas en el tratamiento de enfermedades, uno de los más representativos es el código de la Cruz-Badiano, una recopilación que ilustra el uso de plantas en la Nueva España (Valdivia-Correa *et al.*, 2016). La medicina tradicional mexicana utiliza combinaciones de diferentes plantas y considera que el uso de medicamentos es ineficiente por sus efectos indeseables, lo que ha permitido abstraer un concepto clásico de la farmacología, en donde el uso de los principales ingredientes de una planta, actúen en sinergia y con ello disminuir el uso de múltiples fármacos. Este nuevo concepto es conocido como fitofármaco (Rodríguez-Fragoso *et al.*, 2008).

El acceso a estos productos naturales no está limitado a las farmacias, pueden conseguirse en mercados, tiendas naturistas y supermercados, por lo cual suelen ser la fuente primaria para tratar malestares en la población. Estas plantas no están restringidas a especies mexicanas, entre las más utilizadas también se hayan plantas asiáticas y africanas principalmente, y su uso se reporta principalmente en Europa, América y Australia. Por tal motivo, se considera de suma importancia en la investigación de productos naturales, para determinar toxicidad, interacciones farmacológicas y evitar la auto medicación (Ekor, 2014).

1.6. Medicina tradicional en el tratamiento del HCC

En cuanto al HCC, existen muchas investigaciones con productos naturales para conocer sus efectos farmacológicos y su potencial uso terapéutico. Los productos naturales más populares en el tratamiento del HCC provienen de Asia y Latinoamérica. En las investigaciones científicas se prueban diferentes fórmulas de las plantas, desde la más simple, es decir, la preparación tradicional, hasta extracciones más elaboradas con solventes específicos o fracciones químicas características, acercándose cada vez más al principio activo y al mecanismos de acción (Li y Martin, 2011).

México es un país megadiverso, con una gran cantidad de especies vegetales y con un largo rastro histórico de la aplicación de éstas. Existe una gran variedad de plantas que tradicionalmente se aplican al cáncer, sin embargo, solo unas cuantas han sido estudiadas. Algunas de ellas son coadyuvantes en la terapia del cáncer, aliviando los síntomas producidos por la quimioterapia, mientras que otras tienen efecto directo sobre el tumor o células cancerosas según las pruebas preliminares. La actividad de

la mayoría de estas plantas está ligada a metabolitos secundarios como glicósidos, terpenos, lignanos, acetogeninas y flavonoides. Entre las plantas más investigadas se encuentran los géneros *Agave sp.*, *Annona sp.*, *Heliantella sp.*, *Roldana sp.*, *Bursera sp.*, *Ipomea sp.* Cabe destacar que se han aislado algunos compuestos a los que se les atribuye la actividad antitumoral, la mayoría de ellos terpenos (Alonso-Castro *et al.*, 2011).

Otro país megadiverso es China, de donde procede otra gran cantidad de plantas que se han probado en el tratamiento del HCC. Algunas investigaciones se han centrado incluso en destacar efectos preventivos de algunas plantas, es decir que su consumo regular puede disminuir la probabilidad de padecer HCC. En este ámbito destacan plantas como *Gardenia jasminoides* J. Ellis, *Prunella vulgaris* L. y *Hedyotis difusa* Willd., que por su contenido de ácido ursólico han demostrado prevenir el desarrollo de HCC inducido por dietilnitrosamina. Además de este compuesto, las plantas que contengan curcumina, berberina, quercitina o flavonoides en general, han mostrado cierta actividad citotóxica y antitumoral, así como hepatoprotectora (Hu *et al.*, 2016).

Además de las especies antes mencionadas, existen otros productos naturales evaluados en el HCC debido a su uso común alrededor del mundo. Por su efecto antioxidante, antiinflamatorio y en el tratamiento de NAFLD se destacan el resveratrol, el té verde y las bayas de Goji; por su efecto antiinflamatorio, antiproliferativo y citotóxico se han estudiado la berberina, el xantorrizol y extractos de *Alpinia officinarum* Hance. Además, por más de un efecto se han probado el jengibre, la vitamina C, el brócoli, silimarina, entre algunas otras (Abdel-Hamid *et al.*, 2018). Esto permite

establecer la basta investigación que se lleva a cabo en productos naturales para el tratamiento del HCC, desde preventiva a coadyuvante y finalmente curativa.

2. Antecedentes

Como ya se mencionó, el uso de productos naturales ha aumentado en los últimos años, permitiendo ser un recurso de primera instancia para el tratamiento de enfermedades. Por sus efectos coadyuvantes en la terapia del cáncer se han vuelto un foco de investigación y aunque es grande la cantidad de especies que pudiesen tener actividad antitumoral, es importante aterrizar las investigaciones actuales y tomar en cuenta el factor ecológico de las especies investigadas, desde su consumo hasta su recuperación, tratando de disminuir el impacto que generan al planeta. Entre las especies que cumplen con este factor y son ampliamente investigadas se encuentra el género *Boswellia* sp., y entre estas especies se destaca *Boswellia serrata* Roxb.

2.1. *Boswellia serrata* Roxb.

2.1.1. Descripción morfológica

Boswellia serrata Roxb.ex Colebr. (Burseraceae), es un árbol caducifolio considerado de tamaño mediano a grande, con una corona ligera y extendida, con ramas semi caídas. Presenta troncos cortos de 3 a 5 metros de longitud, si es cultivado en bosques bien abastecidos puede llegar a ser más largo. Suele alcanzar hasta 15 metros de alto y una circunferencia de hasta 1.8 metros. La corteza es delgada de color verde grisáceo, ceniza o rojiza, que se desprende en escamas papiráceas finas, con una capa inferior clorofílica. Sus hojas son alternas, imparipinadas, sésiles, lanceoladas u ovaladas apiñadas hacia los extremos de las ramas con 20 a 45 centímetros de

longitud, los foliolos opuestos de 17 a 31 centímetros. En cuanto a las flores son blancas y se presentan en racimos axilares de 10 a 20 centímetros de largo, con cáliz persistente con 5 a 7 dientes deltoides, con 5 a 7 pétalos libres de 0.5 centímetros de largo. Los frutos son trígonos de 1.3 centímetros de largo, con una semilla, alados junto con los márgenes (Figura 6) (Orwa *et al.*, 2009; Sultana *et al.*, 2013).

2.1.2. Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Espermatofita

Subdivisión: Angiosperma

Tribu: Rosopsida

Subtribu: Rosidae S, lat

Superclase: Rutanae

Clase: Anacardiales

Orden: Sapindales

Familia: Burseraceae

Género: *Boswellia*

Especie: *Boswellia serrata*

Sinonimia: *Boswellia balsamifera* Spreng., *Boswellia glabra* Roxb., *Boswellia thurifera* Roxb. ex Fleming, *Chloroxylon dupada* Buch.-Ham., *Libanotus asiaticus* Stackh., *Libanus thuriferus* Colebr.

Nombres comunes: Kundur (árabe, persa, unani, urdu), incienso indio (español, inglés), Salai (hindi, bengalí), Saambrani (tamil, telugu, malayalam), Kundara o Shallaki (sánscrito), Olibanum Indicum o Gummi Boswellii (Farmacopea).

Nombres comerciales: Salai, kundur luban, lobhan, salakhi, dupa, guggul, kaadar, salai guggul.

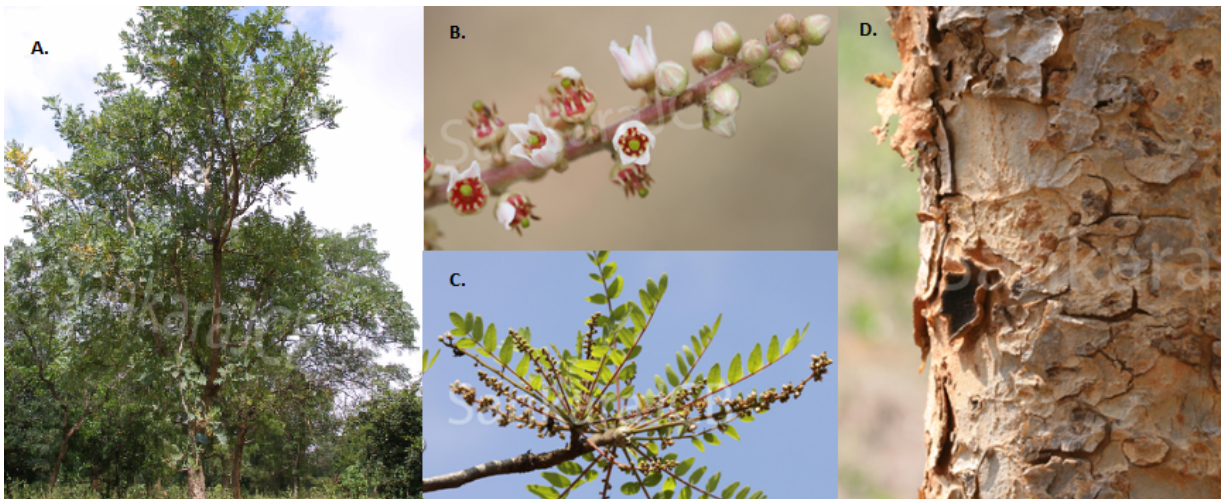


Figura 6. Fotografía de ejemplar completo de A) *Boswellia serrata*, y sus B) flores, C) hojas y D) corteza. Tomado de Herbarium JCB, 2019.

2.1.3. Distribución

Es nativa de la India y Pakistan, aunque también se encuentran pequeñas poblaciones en África del norte y el medio este. Las poblaciones bien definidas de *B. serrata* se distribuyen en los estados indios de Karnataka, Kerala, Tamil Nadu, Andhra Pradesh, Chattisgarh, Orissa, Bengala Occidental y Maharashtra. Generalmente pueden hallarse en crestas y pendientes rocosas, así como en terrenos planos (McCutcheon, 2018; Siddiqui, 2011).

2.1.4. Usos tradicionales

En la India una de las medicinas más antiguas es el Ayurveda. *B. serrata* es una de las plantas que forma parte de los inicios de esta medicina. La resina obtenida del árbol es lo que principalmente se utiliza (Figura 7). En los textos del Ayurveda como Astanga Samgraha y Astanga Hridaya (c.130-200 D.C.) se describe la actividad antirreumática de las resinas de estos árboles, llamadas “gugguls”. También se describe su uso como remedio para la diarrea, la disentería, la tiña, como antipirético, en enfermedades cardiovasculares, males de la garganta como bronquitis, asma o tos, para disminuir secreciones vaginales, la pérdida de cabello, hemorroides, ictericia, en la regulación de los periodos menstruales y como estimulante para el hígado. También se describe como diaforético, astringente, diurético y estimulante (Siddiqui, 2011). Su uso tradicional sugiere pulverizar la muestra e ingerirla en pequeñas porciones, o mezclarla con algún vehículo para colocarse tópicamente o para ingerirse, como la miel. También se puede quemar para aromatizar y absorberse en temazcales o baños de vapor (Sultana *et al.*, 2013).



Figura 7. Fotografía de *B. serrata* en zona rocosa y muestra cercana de la resina. Fuente Roy *et al.*, 2016.

En la actualidad, tanto en el área médica como en el campo de la farmacología se reconoce su potencial uso para el tratamiento de la artritis, así como antiinflamatorio, antihiperlipidémico, antiaterosclerótico, analgésico y hepatoprotector (Siddiqui, 2011).

2.2. Actividades biológicas en *Boswellia serrata* Roxb.

Por sus usos tradicionales *B. serrata* ha sido evaluado en diferentes patologías, desde su poder como agente antimicrobiano hasta sus efectos en diferentes tipos de cáncer. A pesar de que se utilizan preparaciones de sus hojas y frutos, la mayoría de las investigaciones tienen como foco de atención la resina (Hussain *et al.*, 2017).

La resina es un exudado de las plantas del género *Boswellia sp.*, aunque no queda clara su función en el árbol. Se extrae haciendo incisiones en el tronco del árbol, la resina es líquida en el momento en que se abre la incisión y se almacena en cestas de bambú que permiten que la resina se solidifique, lo cual tarda aproximadamente un mes. Esta resina se endurece en productos amorfos similares a lágrimas, con un aroma fuerte y agradable característico del género. Una vez endurecida se rompe en

pedazos pequeños con un mazo de madera o cortador, procurando eliminar las impurezas, como restos de corteza, etc. (Orwa *et al.*, 2009; Siddiqui, 2011). La resina obtenida se clasifica manualmente según su sabor, color, forma y tamaño, teniendo entonces cuatro calidades de venta en el mercado. La primera catalogada como extrafina se caracteriza por ser translúcida a amarillo claro y no presenta corteza ni impurezas; la resina de grado I es de color amarillo pardo libre de impurezas; la de grado II es amarillo pardo a ámbar, semi translúcida y puede contener algunas impurezas; y la de grado III es marrón oscuro, opaca y con impurezas (Sultana *et al.*, 2013).

Entre los diferentes componentes de la resina con actividad biológica son de interés particular los ácidos boswélicos, que son compuestos triterpénicos pentacíclicos, cuya estructura presenta un grupo α -carboxil o β -carboxil en el C-4. De todos los ácidos boswélicos presentes, se destacan el ácido β -boswélico (β -BA), el ácido acetil- β -boswélico (ABA), el ácido 11-ceto- β -boswélico (KBA), el ácido acetil-11-ceto- β -boswélico (AKBA), el ácido α -boswélico (α -BA) y el ácido acetil- α -boswélico (A- α -BA) (Figura 8) (Hussain *et al.*, 2017; Khan *et al.*, 2016). Estos compuestos se destacan porque han demostrado diversas actividades biológicas que incluyen antiinflamatorias, antivirales, hepatoprotectoras y antitumorales, lo que los hace un blanco importante en la investigación como agente terapéutico para el hepatocarcinoma (Sun *et al.*, 2006).

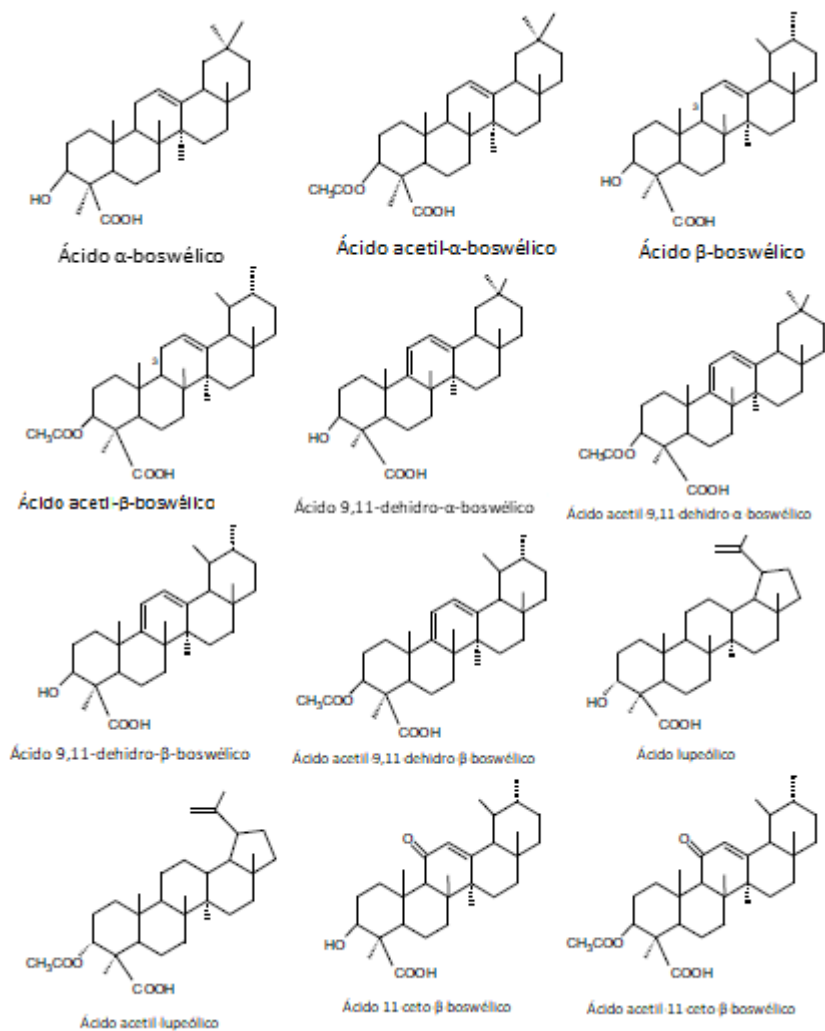


Figura 8. Ácidos boswélicos característicos de *B. serrata*. Modificado de Roy *et al.*, 2016.

2.2.1. Actividad antimicrobiana

La resistencia a antibióticos es un problema persistente en el tratamiento de infecciones. Las investigaciones más recientes buscan hacer uso de compuestos naturales como una fuente menos agresiva contra los huéspedes, disminuyendo la posibilidad de desarrollar resistencia. Las formulaciones como extractos, aceites

esenciales y péptidos obtenidos de plantas son las más investigadas. En el 2016 Sadhasivam y colaboradores probaron un aceite esencial comercial de *B. serrata* en combinación con los fármacos más utilizados en el tratamiento de infecciones fúngicas (como fluconazol, ketoconazol, terbinafina y butenafina) en la piel, uñas y cuero cabelludo, demostrando que *B. serrata* tiene un efecto sinérgico con los antibióticos que permite disminuir el número bacteriano (UFC), en comparación con el tratamiento exclusivo con fármacos, permitiendo concluir que tiene una alta actividad antimicrobiana (Sadhasivam, Palanivel y Ghosh, 2016).

2.2.2. Actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria es una de las más bastas en investigación, pues se relaciona con su uso tradicional sobre la artritis. La mayoría de las investigaciones infieren que AKBA es el principal responsable de esta actividad. Se ha reportado que AKBA inhibe la traslocación al núcleo de NF- κ B, además permite la fosforilación de la proteína I- κ B, deteniendo así la cascada de señalización. Estas mismas actividades se consideran importantes para su actividad antitumoral (Hussain *et al.*, 2017).

2.2.3. Actividad citotóxica y antitumoral

En cuanto a su actividad citotóxica y antitumoral, existe una gran cantidad de investigaciones en más de un tipo de cáncer, tanto *in vitro* como *in vivo*. En el 2002 Liu y colaboradores evaluaron los ácidos boswélicos KBA y AKBA en células HepG2, reportando disminución de la viabilidad celular y activación de la apoptosis mediada por caspasa 8, encontrando también que la actividad antiproliferativa y apoptótica es mayor en AKBA que en KBA (Liu *et al.*, 2002a).

En el 2012 Ni y colaboradores evaluaron la actividad antineoplásica del aceite esencial de *B. sacra* en un modelo murino de xenoinjerto, demostrando que todas las fracciones colectadas eran capaces de suprimir la viabilidad celular e inducir apoptosis en células humanas de cáncer pancreático, disminuyendo por ende el tamaño del tumor (Ni *et al.*, 2012).

En el 2014 Khan y colaboradores evaluaron el efecto de fracciones de extractos de *B. serrata* como monoterapia y en combinación con DOX sobre células HepG2 y su actividad apoptótica, demostrando que DOX y los compuestos de *B. serrata* presentan una sinergia y aumentan su actividad citotóxica, y a su vez *B. serrata* disminuye los efectos citotóxicos de DOX. Con los resultados obtenidos mostraron que esta actividad citotóxica sobre las células cancerosas se debe al incremento de la actividad de caspasa-3 y con ello a la activación de la apoptosis. Además, se mostró un incremento en la secreción de TNF- α e IL-6, lo que correlaciona con la activación de las caspasas, aunque aún queda por investigar si existe activación de otras vías no apoptóticas (Khan *et al.*, 2014).

En el 2015, Ahmed y colaboradores identificaron y exploraron el potencial anticancerígeno de dos extractos con solventes orgánicos de *B. serrata* (éter de petróleo y metanol), así como de fracciones del aceite esencial en células de hepatocarcinoma (HepG2) a concentraciones de 0, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ durante 48 horas. Los autores reportaron que los distintos extractos produjeron citotoxicidad significativa en las células HepG2, la cual fue aún mayor a la producida

por doxorrubicina (DOX), uno de los tantos agentes quimioterapéuticos utilizados actualmente para tratar el hepatocarcinoma (Ahmed *et al.*, 2015).

En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación se evaluaron concentraciones de 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ del aceite esencial de *B. serrata* sobre la viabilidad de células de la línea HepG2 y hepatocitos en cultivo primario. Se demostró que el aceite esencial tiene un efecto citotóxico para las células HepG2 y un efecto hepatoprotector en hepatocitos de ratón de la cepa C57BL/6 (Torres-Chacón *et al.*, 2016).

Es necesario continuar con los estudios correspondientes a la evaluación del aceite esencial de *B. serrata*, así como alguno de los componentes característicos de esta especie sobre las células cancerosas y las vías de señalización en las que participa, lo cual permitirá sentar las bases para el desarrollo de un fitomedicamento anticancerígeno, así como las bases para la síntesis de compuestos químicos con potencial anticancerígeno.

3. Justificación

En la actualidad el cáncer es un problema prioritario de salud a nivel mundial, la diagnosis tardía aumenta el número de casos con diagnóstico pobre y las terapias actuales no suelen tener éxito, éste es el caso de los pacientes que presentan hepatocarcinoma. Por tal motivo, las investigaciones actuales centran sus esfuerzos en conocer a detalle la fisiopatología de la enfermedad, así como la búsqueda de nuevos agentes con potencial terapéutico (Brito *et al.*, 2016).

Entre las distintas estrategias de tratamiento los compuestos fitoquímicos derivados de plantas son considerados fármacos potenciales, ya que apuntan a diferentes objetivos moleculares, entre los cuales se hallan reguladores de la inflamación o la muerte celular, por ello han aumentado en gran manera su importancia en la terapia del cáncer (Tuorkey, 2015).

Los ácidos boswélicos, principalmente AKBA, han mostrado efectos antiproliferativos y apoptóticos en células de cáncer de hígado (Liu *et al.*, 2002a). Además, se reconocen su potencial uso en el tratamiento de la artritis, como antiinflamatorio (Siddiqui, 2011). También se estudian sus actividades como antihiperlipidémico, antiaterosclerótico, analgésico y hepatoprotector (Sun *et al.*, 2006). A pesar de todas las investigaciones aun quedan como interrogantes el mecanismo de acción y su función en organismos vivos, este trabajo pretende dar un acercamiento a estas interrogantes.

4. Hipótesis

El aceite esencial de *B. serrata* y el compuesto AKBA tienen efecto citotóxico, alterando las vías de señalización que participan en la carcinogénesis.

5. Objetivo general

Determinar el efecto citotóxico del aceite esencial de *B. serrata* y AKBA sobre células de hepatocarcinoma en modelos *in vitro*.

5.1. Objetivos particulares

- Caracterizar el efecto citotóxico del aceite esencial *B. serrata* y AKBA en células derivadas de hepatocarcinoma humano Huh-7.
- Examinar el efecto citotóxico del aceite esencial de *B. serrata* y AKBA en un modelo de esferoides con células Huh-7
- Evaluar el efecto de *B. serrata* y AKBA en las vías de señalización relacionadas con el desarrollo de hepatocarcinoma.

6. Material y Métodos

6.1. Material vegetal

Se obtuvieron 8 kg de la resina de *B. serrata* del proveedor internacional 99 exports herbs (<http://99exports.com/>). Se procesó el material vegetal para obtener el aceite esencial a través de destilación por arrastre de vapor continua a 100°C, dos horas por cada 100 g de muestra. Una vez obtenidos los destilados se llevó a cabo una separación líquido/líquido con cloroformo y se concentró bajo presión en un rotavapor. El aceite esencial obtenido se almacenó en frío a -20°C para su posterior uso. Dicho aceite se sometió a un análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) para la identificación de los compuestos básicos en un aceite esencial. Para la CG-EM se usó hexano 3 a 1, con una inyección de 0.1 µl del aceite esencial de *B. serrata*. El compuesto puro AKBA fue adquirido en Caymanchem Co (CAS 67416-61-9).

6.2. Modelos celulares

La línea celular Huh-7 (ATCC) derivada de hepatocarcinoma humano proveniente de un tumor de un adulto masculino japonés de 57 años fue cultivada en medio Williams suplementado con 10% de SFB, en condiciones fisiológicas de 37°C y 5% de CO₂. Para los diferentes experimentos se cultivaron en monocapa.

6.3. Tratamientos

Las concentraciones de AKBA a utilizar se estandarizaron a través de una curva dosis respuesta, mediante el ensayo de funcionalidad celular con CCK8, iniciando con las concentraciones reportadas en la literatura que van de 50-200 µM. Con base en los

resultados, se seleccionaron cinco concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 80 μM . A partir de los resultados, se seleccionaron tres concentraciones para los ensayos con esferoides y western blot.

El aceite esencial se probó con concentraciones reportadas en la literatura de 1, 2, 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$. Por lo tanto, se organizaron los siguientes grupos de tratamiento; un cultivo sin tratamiento (control), un cultivo tratado con el aceite esencial (1 $\mu\text{g/ml}$), uno con AKBA (5 μM) y un control de disolvente con DMSO (Vehículo)

6.4. Ensayos *in vitro*

Se evaluó la viabilidad por CCK-8 (Dojindo, CK04-01), un ensayo colorimétrico basado en una sal de tetrazolio llamada WST-8, que se reduce por las actividades de deshidrogenasas en las células para dar un colorante de formazán de color amarillo-naranja. La cantidad de colorante de formazán generada por las actividades de las deshidrogenasas en las células es directamente proporcional al número de células vivas.

Además, se realizó un ensayo con esferoides. Éste consistió en cultivar las células Huh-7 en placas de baja adherencia con medio Williams a 37°C y 5% de CO₂. Después de 5 días en cultivo se agregaron los tratamientos y tras 48 horas se cuantificaron los esferoides por conteo manual a través de microscopia de luz inversa, lo que permitió cuantificar la tasa de supervivencia tras la exposición a un agente, en este caso citotóxico.

Con los datos arrojados en estos experimentos se seleccionaron una o dos concentraciones de aceite esencial de *B. serrata* y AKBA para los experimentos

correspondientes a la evaluación de marcadores clave en la vía de señalización. Para ello se contempló el siguiente criterio: que las células presentaran menos del 50% de viabilidad.

6.5. Extracción de proteína total

Se cultivaron células Huh-7 y se administraron los tratamientos teniendo los siguientes grupos: grupo no tratado o control, grupo control de disolvente con DMSO al 0.05%, grupo tratado con aceite esencial a 1 µg/ml y grupo tratado con AKBA a 1 µM. Después de 72 horas se extrajo proteína total utilizando un amortiguador de lisis a pH 8 (Millipore-Sigma. Darmstadt, Germany.), suplementado con 40% de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics). El homogenizado celular se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante celular se conservó y almacenó a – 80 °C para los posteriores experimentos.

6.5.1. Cuantificación de proteína

Para cuantificar la proteína se llevo a cabo el ensayo colorimétrico del kit BCA (Pierce Chemical) que se basa en la reducción de Cu^{2+} a Cu^{+} en condiciones alcalinas, y la posterior detección de éste, usando un reactivo que contiene ácido bicinconínico. La tinción resultante es de un color violeta y se mide a 565 nm, la absorbancia final se comparó con una curva estándar de albúmina.

6.6. Western blot

Las proteínas obtenidas se prepararon agregando un buffer constituido por Tris-HCl 0.1 M con pH 6.8, glicerol (J.T. Baker, México), dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20% (BioRad, EUA), 2--mercaptoetanol al 10% (BioRad, EUA) y azul de bromofenol al 1.0%

(BioRad, EUA). Las muestras se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min y se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente de 12% al 10% en presencia de SDS 0.1% en una cámara de electroforesis a 120 V durante 90 min. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (GE Healthcare Life Science) durante 120 minutos a 120 V en un sistema de transferencia húmeda. Después, se bloqueó la membrana con TBS-Tween suplementado con 5% de leche descremada durante 1 h en agitación constante. Para la detección de cada proteína, la membrana se incubó con anticuerpos específicos durante toda la noche en agitación constante a 4°C. Una vez terminada la incubación del anticuerpo primario se realizaron 3 lavados con TBS-Tween por 15 min y se incubó con el anticuerpo secundario por 1 h. Nuevamente se realizaron 3 lavados por 10 min con TBS-Tween. Finalmente se reveló usando un agente quimiolumincente compuesto por luminol y peróxido al 3%. Las bandas se cuantificaron por densitometría usando el programa ImageJ Studio. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-Ciclina D1 (SC753), anti-CDK4 (SC749), anti-p21 (SC756), anti-E-cadherina (SC21791), anti-EpCAM (2929S), anti-AFP (3903S), anti-Mcl-1 (Ab5714) y anti-fosfo-caspasa-3 (9661S). Se empleó actina como control de normalización de carga.

6.7. Análisis estadístico

Los datos se analizaron por ANOVA de una o dos vías, según los datos a analizar, con una prueba complementaria de comparaciones múltiples de Dunnett o Tukey-Kramer respectivamente, mediante PRISMA con un intervalo de confianza del 95% y una $p \leq 0.05$.

7. Resultados

7.1. Extracción del aceite esencial de *B. serrata*

Se llevó a cabo el procesamiento de la resina de *B. serrata* a través de la técnica de destilación por arrastre de vapor directo, el aceite esencial obtenido mostró las propiedades organolépticas presentes en la Tabla 1. El rendimiento que presentó el aceite esencial por esta técnica fue del 5%.

Color	Ámbar
Olor	Dulce-cítrico
Apariencia	Líquida-Viscosa
Textura	Grasosa

7.2. Análisis fitoquímico del aceite esencial de *B. serrata*

Para corroborar que el aceite esencial extraído de *B. serrata* cumplió con las características fitoquímicas de un aceite esencial, se sometió una muestra del aceite esencial a cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) con eluyente hexánico, obteniendo el cromatograma de la Figura 9. En un primer análisis se reportaban trazas de cloroformo de la extracción, por lo que se realizaron cambios en los tiempos de partición con cloroformo hasta que, en un siguiente análisis, ya no se observó.

Una vez que se eliminaron las trazas de disolvente, se obtuvieron como constituyentes del aceite esencial los compuestos enlistados en la Tabla 2. Se muestra que los compuestos mayoritarios son terpinen-4-ol, p-cimen-8-ol, α -terpineol, isoterpinoleno y terpinoleno.

Abundance

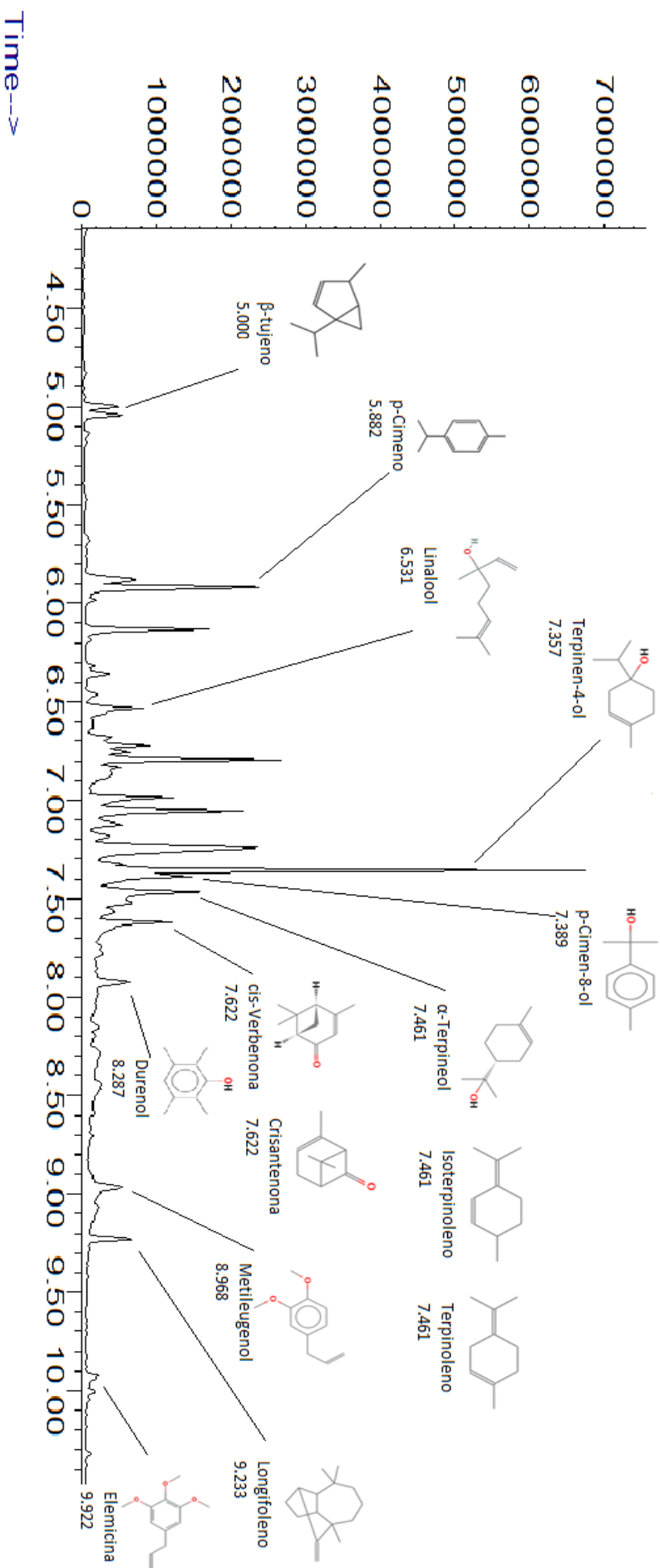


Figura 9. Espectro de masas del aceite esencial de *B. Serrata*. Se resaltan los compuestos mayoritarios y su respectiva estructura.

Tabla 2. Compuestos identificados por GC-MS, resaltando su respectivo número de pico y el porcentaje (%) de área que representan en el aceite esencial de *B. serrata*.

S. No	Tiempo de retención	Área (%)	Nombre del compuesto
1	5.0000	0.82	b-tujeno
3	5.882	1.42	p-Cimeno
7	6.531	1.55	Linalool
17	7.357	7.81	Terpinen-4-ol
18	7.389	2.00	p-Cimen-8-ol
19	7.461	2.96	α -Terpineol
19	7.461	2.96	Isoterpinoleno
19	7.461	2.96	Terpinoleno
21	7.622	1.49	cis-Verbenona
21	7.622	1.49	Crisantenona
23	8.287	0.66	Durenol
23	8.287	0.66	2-Hydroxy-5-methylacetophenone
23	8.287	0.66	2-ethyl-4,5-dimethylphenol
24	8.968	1.53	Metileugenol
26	9.233	0.82	Longifoleno
26	9.233	0.82	Valenceno
27	9.922	0.53	Elemicina

7.4. Proliferación de células Huh-7

Una vez que se corroboró que el aceite extraído de la resina de *B. serrata* cumplía con las características de un aceite esencial, se trataron las células Huh-7 y se probaron las concentraciones de 1, 2, 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$ del aceite esencial de *B. serrata* y de 5, 10, 20, 40 y 80 μM de AKBA. El aceite esencial (Figura 10) mostró mayor actividad en las concentraciones de 1 a 4 $\mu\text{g/ml}$; la concentración de 8 $\mu\text{g/ml}$ se mantuvo con pocas variaciones desde el número de células inicial hasta las 72 h; la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ mostró fuerte actividad desde las 24 h, llevando el número inicial de células casi a cero, con poca recuperación a las 72 h, por tal motivo se seleccionó como la concentración a utilizar en los siguientes experimentos. Cabe mencionar que el vehículo (DMSO) presentó cierto efecto, lo que podría indicar que no es del todo el mejor vehículo para los tratamientos.

Por otro lado, AKBA (Figura 11) mostró mayor actividad en las concentraciones de 5, 10 y 20 μM , la concentración de 40 μM no presentó variaciones y la de 80 μM se recuperó a las 72 h. Las concentraciones de 5 y 10 μM presentaron fuerte actividad desde las 24 h y hasta las 72 h, la de 5 μM llevó casi a cero el número de células, mostrando mayor actividad que el aceite esencial. Con estos resultados se decidió emplear la concentración de 5 μM para los posteriores experimentos. Es importante mencionar que en ambos experimentos sólo se administró una vez el tratamiento al tiempo 0.

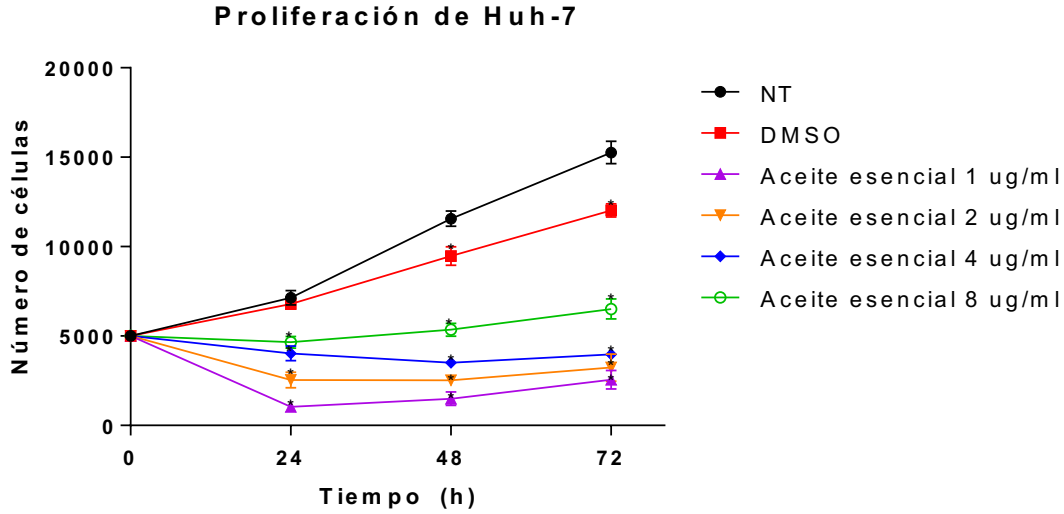


Figura 10. Proliferación celular por CCK-8 en células Huh-7 tratadas por 72 h con una única administración de las distintas concentraciones del aceite esencial de *B. serrata*. Los datos se presentan en media \pm E.E.M. (n=4). *Diferencia significativa con respecto al control (p<0.05).

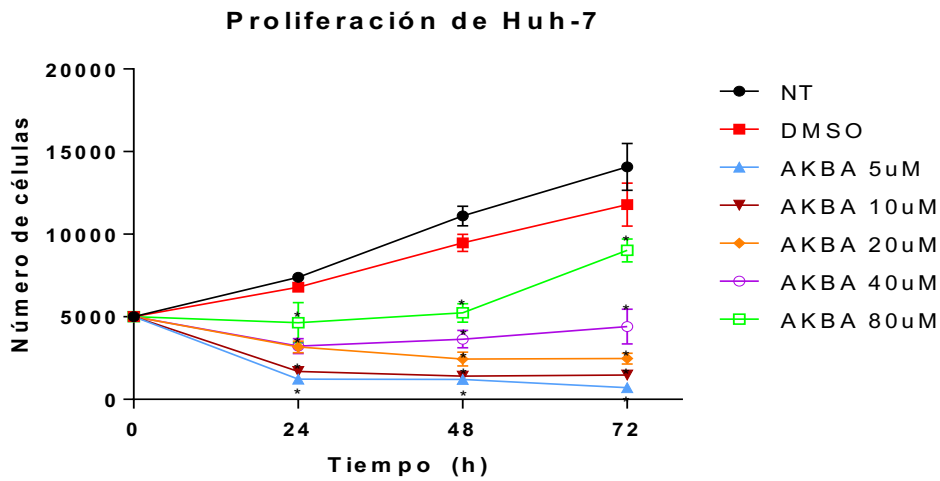


Figura 11. Proliferación celular por CCK-8 en células Huh-7 tratadas por 72 h con una sola administración de las distintas concentraciones de AKBA. Los datos se presentan en media \pm E.E.M. (n=4). *Diferencia significativa con respecto al control (p<0.05).

7.5. Ensayos con esferoides

En un ensayo preliminar se probaron las concentraciones de 1 µg/ml del aceite esencial de *B. serrata* y de 5 µM de AKBA en esferoides previamente formados durante 5 días. La concentración seleccionada de AKBA fue demasiado agresiva para el ensayo, pues después de las 48 h de tratamiento no se observaban esferoides ni células, por tal motivo se disminuyó la concentración hasta 1 µM, donde AKBA tuvo efecto menos agresivo.

Con los resultados anteriores se procedió a probar las concentraciones de 1 µg/ml en el caso del aceite esencial de *B. serrata* y de 1 µM en el caso AKBA en un modelo de esferoides. El aceite esencial disminuyó cerca de un 60% el número de esferoides (Figura 13) y el tamaño también disminuyó, aunque aún conservaban la forma de esferoides (Figura 12). Por otro lado, AKBA disminuyó cerca de un 80% el número de esferoides (Figura 14), lo que muestra nuevamente un mayor efecto en comparación al aceite esencial, además los esferoides se observaban un tanto disgregados y de menor tamaño (Figura 12). Para ilustrar los cambios en el campo visual en microscopía inversa de campo claro se muestra la Figura 12. Sin embargo, el vehículo DMSO nuevamente mostró una ligera actividad que, si bien no es significativa, puede señalar que no es el mejor vehículo para tratar esta línea celular.

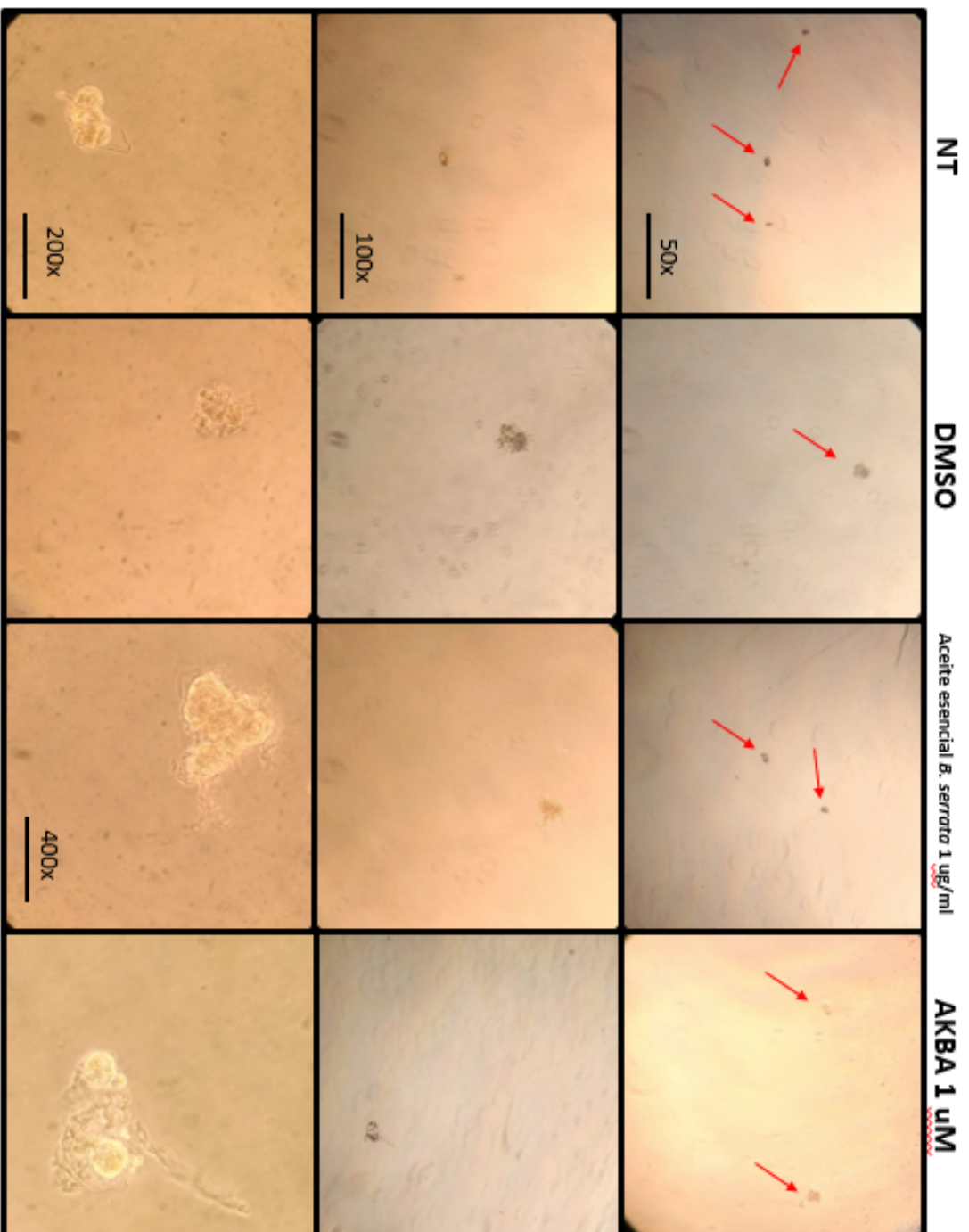


Figura 12. Esferoides de células Huh-7 tratadas con la concentración seleccionada de aceite esencial de *B. serrata* y AKBA. Las flechas rojas resaltan los esferoides.

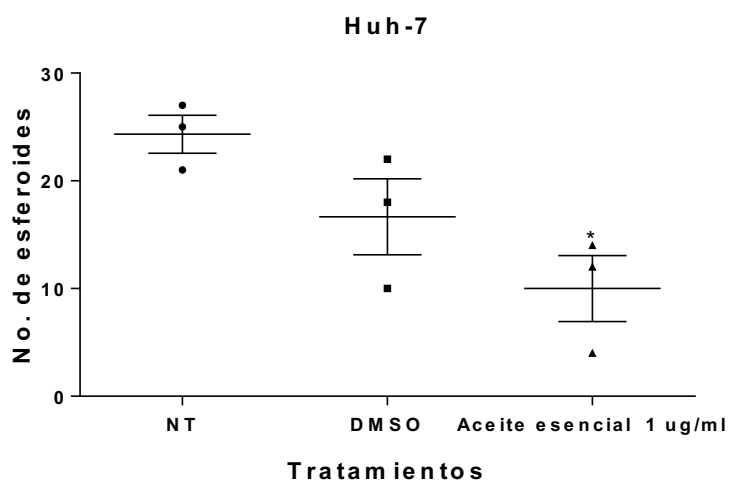


Figura 13. Comparación cuantitativa de esferoides en células Huh-7 tratadas con aceite esencial a 1 µg/ml por 72 h (n=5). *Diferencia significativa con respecto al control (p<0.05).

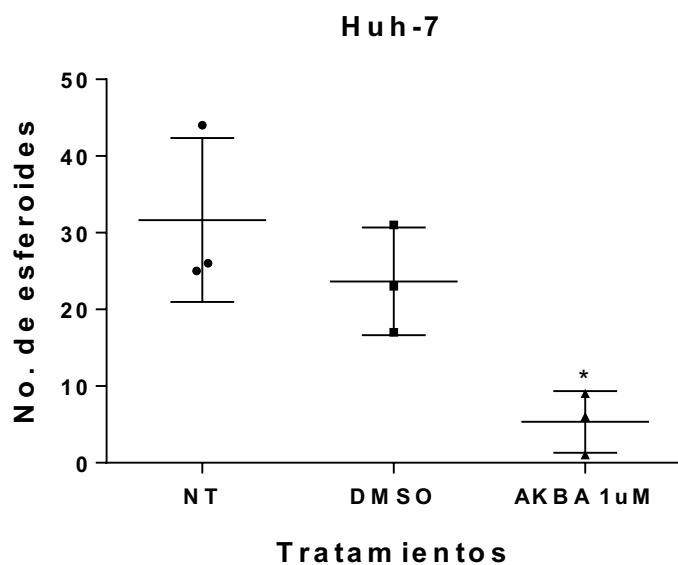


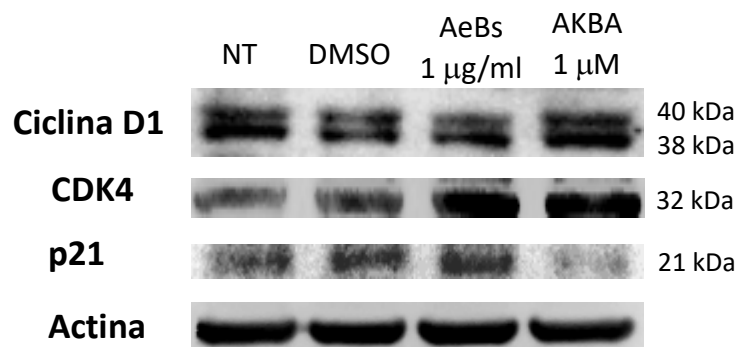
Figura 14. Comparación cuantitativa de esferoides en células Huh-7 tratadas con AKBA a 1 µM por 72 h (n=5). *Diferencia significativa con respecto al control (p<0.05).

7.6. Análisis de marcadores celulares relacionados con carcinogénesis

Tomando en cuenta que tanto el aceite esencial como el AKBA mostraron actividad inhibitoria en la proliferación celular, y considerando un posible acercamiento al mecanismo de acción, se evaluaron tres paneles de western blot con marcadores de ciclo celular, de transición epitelio mesénquima y de muerte celular.

7.6.1. Marcadores de ciclo celular

En este panel se incluyen a ciclina D1, una proteína reguladora del ciclo celular que actúa sobre CDK4, que también se incluye en el panel que regula el paso de G1/S y por ende inician el ciclo celular, aunque no hay diferencia significativa; tanto el aceite esencial como AKBA mostraron una tendencia a aumentar la ciclina D1, aunque también se observó que la CDK4 aumenta, lo cual podría ser una respuesta al daño en la célula cancerosa. Además, se cuantificó a p21, proteína inhibidora de CDKs, aunque no mostró cambios significativos.



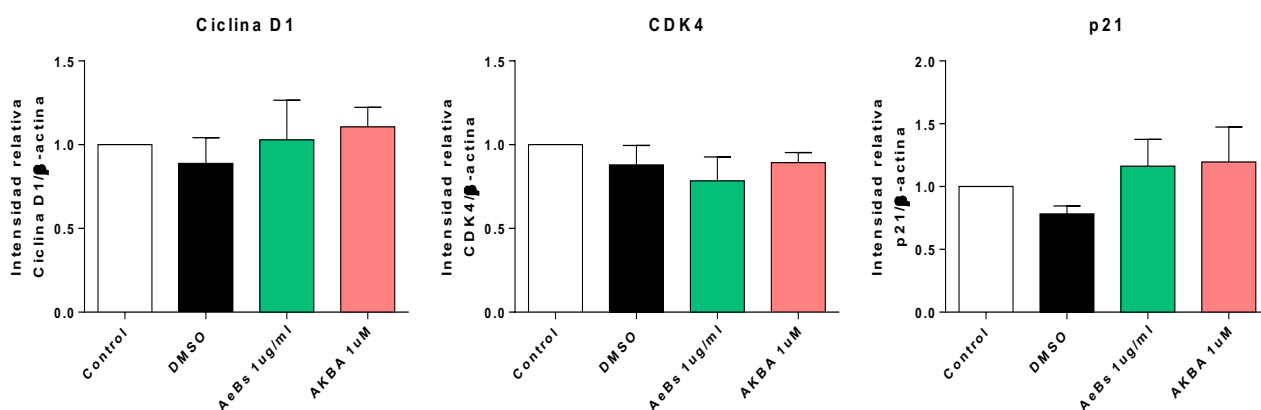


Figura 15. Efecto del aceite esencial de *B. serrata* y AKBA sobre marcadores del ciclo celular en células Huh-7. Los datos se presentan en media \pm E.E.M. (n=3). *Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

7.6.2. Marcadores de transición epitelio mesénquima

En este panel se incluyeron proteínas relacionadas con la adherencia celular como E-cadherina, una proteína de unión célula-célula que participa también en mantener la estructura del citoesqueleto y la señalización de β -catenina. Otra proteína de este tipo que se cuantificó fue EpCAM, una glicoproteína de adhesión relacionada con señalización molecular para migración, proliferación y diferenciación. Por último, se evaluó AFP, una proteína oncogénica que se presenta normalmente en estados embrionarios y está relacionada con la migración. Los tratamientos no afectaron estas proteínas, lo cual podría estar relacionado con la malignidad de la línea celular.

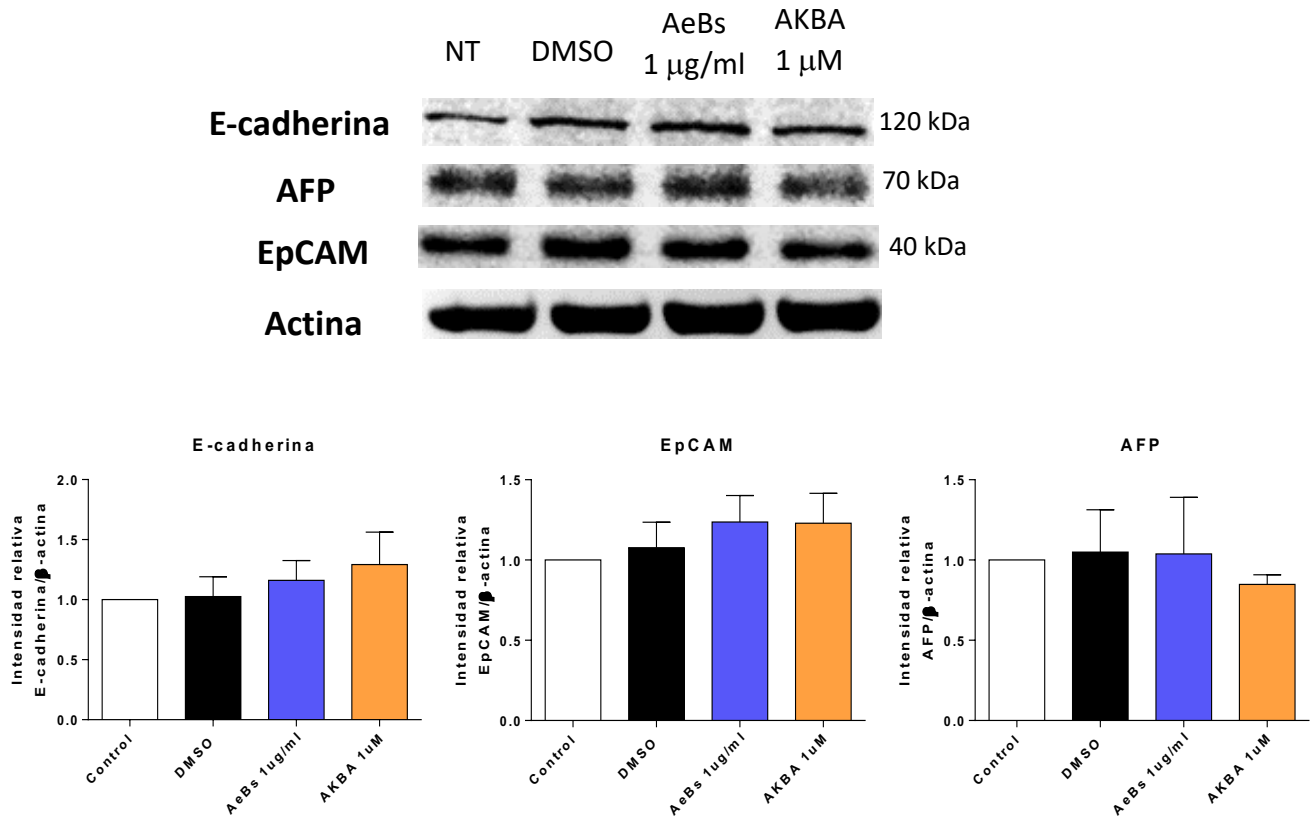


Figura 16. Efecto del aceite esencial de *B. serrata* y AKBA sobre marcadores transición epitelio mesénquima en células Huh-7. Los datos se presentan en media \pm E.E.M. (n=3). *Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

7.6.3. Marcadores de muerte celular

Se evaluaron también proteínas relacionadas con muerte celular, como Mcl-1, que pertenece a la familia Bcl-2 conocidas como proteínas antiapoptóticas. Ésta tiene dos isoformas que se forman por splicing alternativo, la primera o bien la más larga, es antiapoptótica, y la segunda, la corta, es proapoptótica. Además, se cuantificó caspasa 3 activa, que es la ejecutora de la apoptosis. La primera no mostró diferencia significativa; sin embargo, la caspasa 3-activa sí es afectada por los tratamientos y su activación se traduce directamente en la activación de la apoptosis.

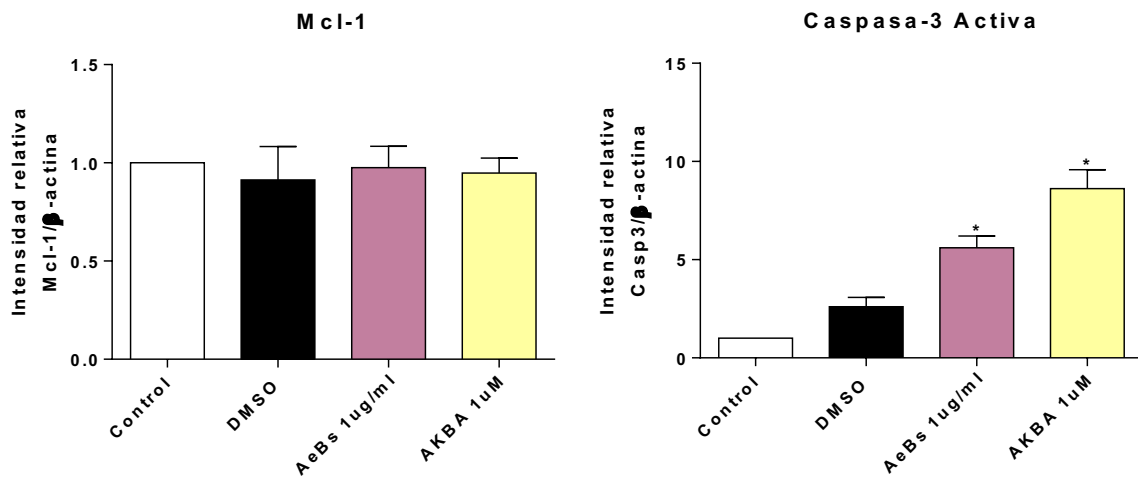
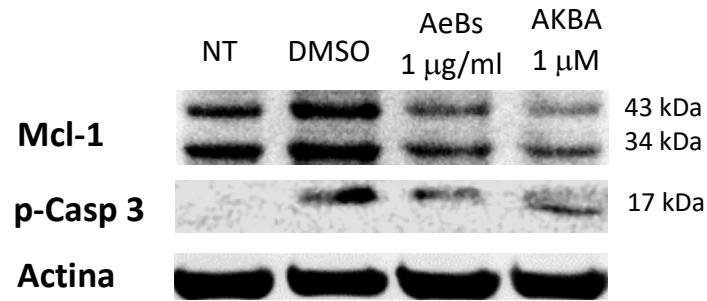


Figura 17. Efecto del aceite esencial de *B. serrata* y AKBA sobre marcadores de muerte celular en células Huh-7. Los datos se presentan en media \pm E.E.M. (n=3). *Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

8. Discusión

El hepatocarcinoma forma parte de los diez tipos de cáncer más comunes, con tasas de incidencia y mortalidad muy cercanas, lo que se traduce en una tasa de prevalencia baja. Esto como resultado de su pobre diagnóstico, ya que las primeras etapas suelen ser asintomáticas y la mayoría de los casos son detectados en estados avanzados (Ahmed *et al.*, 2015). Los agentes quimioterapéuticos que se usan actualmente presentan diversos efectos indeseables, además de la tendencia a desarrollar resistencia a fármacos.

Los productos naturales son una rica fuente de sesquiterpenos, flavonoides, alcaloides, diterpenoides y compuestos polifenólicos que han mostrado un alto potencial antitumoral (Christodoulou *et al.*, 2014). Los aceites esenciales forman parte de estos productos naturales de interés, debido a que son sustancias multifuncionales que se han usado durante miles de años para prevenir y tratar distintas enfermedades. Existe una gran variedad de aceites esenciales, en su mayoría se extraen de hojas y flores aromáticas, pero también pueden extraerse de raíces, cortezas, resinas y frutos, aunque no se puede obtener aceite esencial de cualquier planta. Al tener un uso tan diverso se han convertido en un foco de investigación en los últimos años, principalmente en países megadiversos como México, China e India (Rodríguez-Fragoso *et al.*, 2008; Blowman *et al.*, 2018a).

A lo largo de la historia del cáncer han existido varios fármacos para tratarlo, la mayoría de origen vegetal. Algunos de los más destacados son el paclitaxel o taxol, obtenido de la corteza de *Taxus brevifolia* Nutt., cuyo mecanismo de acción se basa en daño a

la tubulina del citoesqueleto, activando el arresto celular y la apoptosis. De manera similar actúan la colchicina y la vinblastina (Weaver, 2014), sin embargo la mayoría de estos compuestos suelen ser inespecíficos y atacan tanto a células sanas como cancerosas.

En investigaciones más recientes se han obtenido compuestos precursores de estos en aceites esenciales de las mismas especies, presentando una actividad farmacológica similar (Blowman *et al.*, 2018a). Por tal motivo, el género de *Boswellia* *sp.* se ha investigado en diversos tipos de cáncer, pues ha presentado una actividad antiinflamatoria potente, además de un característico efecto hepatoprotector. Entre las especies de este género se destaca *B. serrata* por la cantidad de ácidos boswélicos que contiene y por ser una de las especies más investigadas (Khan *et al.*, 2016; Roy *et al.*, 2016; Hussain *et al.*, 2017). En estudios previos de nuestro grupo de investigación se obtuvo el aceite esencial por arrastre de vapor directo y una fracción restante en agua, producto de la destilación; se probaron ambas partes en células de hepatocarcinoma HepG2 y se observaron cambios en la viabilidad, motivo por el cual se buscó profundizar en las características fitoquímicas del aceite esencial y su efecto sobre células de hepatocarcinoma (Torres-Chacón, *et al.*, 2016).

Los aceites esenciales tienen constituyentes generales que van de 20 a 60 compuestos, cuya concentración varía según la especie. Entre estos constituyentes destacan los monoterpenos como el linalool, el geraniol, el mentol, el cimeno, el α -terpineol, y el α/β -pineno, además de sesquiterpenos como el farnesol, el cariofileno, entre otros (Blowman *et al.*, 2018b; de Andrade Teles *et al.*, 2018), lo cual coincide con

los constituyentes del aceite esencial de *B. serrata* que se presentan en la Tabla 2. En este caso, los más abundantes son el terpinen-4-ol, el α -terpineol, el isoterpinoleno, el terpinoleno y el p-cimen-8-ol, lo que demuestra que el extracto final obtenido presenta características tanto físicas como fitoquímicas de un aceite esencial.

Las terapias actuales buscan ser eficaces tanto para prevenir como para combatir el cáncer. En este sentido, los ácidos boswélicos son objeto de estudio para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, con un plus especial para el hepatocarcinoma, pues se ha reportado que tiene efecto hepatoprotector (Roy *et al.*, 2016). Entre los ácidos boswélicos conocidos, el AKBA ha sido uno de los más destacados, ya que a este compuesto se le ha adjudicado un efecto antiinflamatorio y es considerado uno de los mayoritarios en el aceite esencial de *B. serrata*. Además, ha sido probado en otros tipos de cáncer como el de próstata, el de colón, por mencionar algunos, en donde ha demostrado tener actividad antitumoral y ser un buen agente quimiopreventivo (Khan *et al.*, 2016).

Se ha reportado que AKBA presenta actividad en concentraciones desde 5 hasta 200 μM . Liu y colaboradores probaron concentraciones de 50, 100, 150 y 200 μM en células HepG2 (también de carcinoma hepatocelular), donde la viabilidad celular se veía afectada desde la concentración de 100 μM (Liu *et al.*, 2002a). Por esta razón, se decidió realizar curvas de proliferación para seleccionar las concentraciones con las que se trabajarían en los siguientes experimentos. Para el aceite esencial se utilizaron 1, 2, 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$ y se usó como diluyente DMSO. Las concentraciones de 4, 2 y 1 $\mu\text{g/ml}$ presentaron mayor actividad desde las 24 a las 72 h, afectando la viabilidad; en cuanto

al AKBA las concentraciones utilizadas fueron de 5, 10, 20, 40 y 80 μM , también diluido con DMSO, las concentraciones de 5 y 10 μM afectaron la viabilidad desde las 24 hasta las 72 h. Cabe resaltar que el DMSO presentó cierto efecto sobre la proliferación celular, aunque no fue significativo, por lo que podría no ser el mejor vehículo para colocar los tratamientos, generalmente se recomienda usar menos del 1% de DMSO en los tratamientos, la concentración final utilizada en estos tratamientos fue de 0.8%, algunas investigaciones proponen utilizar menos del 0.5% o incluso del 0.1% pues arriba de esto suele reflejarse la toxicidad del DMSO en los resultados (Rodríguez-Burford et al., 2003; Timm et al., 2013), pudiendo ser este último el resultado que se ve reflejado en este trabajo. Considerando que tanto el aceite esencial como el AKBA tuvieron efectos importantes sobre la proliferación celular, el siguiente paso fue evaluar proteínas clave que permitieran hacer una aproximación de las vías de señalización que se ven afectadas por ambos tratamientos. Las vías de señalización más afectada en el HCC suelen ser las relacionadas con ciclo celular, muerte celular y metabolismo. De éstas, las proteínas que generalmente se ven afectadas son las ciclinas y CDKs, la protein-cinasas p21 y p27, la proteína Rb, las caspasas 3, 8, 9, la vía de Fas, NF- κB , por mencionar algunas, pues varían según el tipo de cáncer o línea celular (Singh, Kumar y Pandey, 2018).

Se ha reportado que los ácidos boswélicos ejercen actividad sobre factores de transcripción, enzimas, cinasas y otros reguladores del ciclo celular. En células HCT-116 de cáncer de colón los ácidos boswélicos disminuyen las ciclinas D, E, y las cinasas CDK2/4 arrojando el ciclo células en G1 por la activación de p21 (Liu, Huang y Hooi, 2006). En células HT29, también de cáncer de colón, se observó activación de

la caspasa-8 por una vía independiente de la interacción de Fas ligando y su receptor (Liu *et al.*, 2002b). En células HepG2 se probaron AKBA y otros ácidos boswélicos, donde todos presentaron actividad, inhibiendo la proliferación e induciendo apoptosis, además se mostró activación de la caspasa-3, desconociendo la vía de activación (Liu *et al.*, 2002a).

Para generar un acercamiento a las posibles vías de señalización afectadas por el aceite esencial y AKBA se evaluaron diferentes marcadores importantes en el hepatocarcinoma celular. El primer panel resalta los marcadores de ciclo celular (Figura 15), el cual contempla la ciclina D1, la cinasa CDK4 y p21; proteínas clave que regulan el ciclo celular y participan en la activación de mecanismos de reparación o de muerte celular, dependiendo del daño en la célula. Sin embargo, ninguna mostró un cambio significativo que nos provea un acercamiento al mecanismo de acción, aunque también se debe considerar que el ciclo celular tiene más de un punto de regulación y que los tratamientos utilizados podrían estar actuando sobre otras ciclinas o cinasas, o bien corriente arriba en la cascada de señalización. Además, se podría considerar anexar un control positivo que verifique la fidelidad del experimento como Flavopiridol que detiene el ciclo celular en G1, inhibiendo el complejo CDK4/CiclinaD1, o bien, aloisina A, indolocarbazoles, entre otros, que están relacionados con la inhibición de CDK4 (Balakrishnan *et al.*, 2016).

El siguiente panel (Figura 16) muestra marcadores de transición epitelio mesénquima, este panel se contempló debido a que la línea celular Huh-7 es de un hepatocarcinoma agresivo que presentan facilidad de invasión y propagación, detener la transición

epitelio mesénquima es importante para reducir la malignidad de un tumor y aumentar las posibilidades de tratamiento. En este sentido, se evaluaron proteínas de adhesión celular como E-cadherina y EpCAM además de la proteína AFP que también es un marcador de daño hepático *in vivo*. Sin embargo, tampoco se observaron cambios significativos de estas proteínas. Para validar mejor esta opción se propone analizar la vía MAPK/ERK proporcionaría más información, así como un control positivo inhibiendo esta vía con el fármaco PD90859, ya que tanto el aceite esencial como AKBA podrían estar actuando corriente abajo, ya que en las proteínas analizadas no se observan cambios (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2005).

Por último, se evaluó un panel de marcadores de muerte celular para demostrar que la muerte celular generada por el aceite esencial o el AKBA es por apoptosis y no por necrosis. Por ello se evaluó la proteína ejecutora de la apoptosis caspasa-3 activa, además de la proteína antiapoptótica Mcl-1. Ambos tratamientos aumentaron la caspasa-3 activa, lo cual afirma que la muerte celular es de tipo apoptótica, aunque se desconoce la vía por la que se activa. Esto concuerda con el reporte de Liu y colaboradores en el 2002, donde se probaron los ácidos boswélicos KBA y AKBA, mostrando que AKBA tenía mejor actividad y además activaba la vía de las caspasas en células HepG2 (Liu *et al.*, 2002b). La activación de la apoptosis es un requisito importante cuando se busca un nuevo agente contra el cáncer, puesto que si el agente produce necrosis, esto a su vez produciría inflamación y liberación de factores de crecimiento, interleucinas, metaloproteínas, así como otras moléculas que favorecerían el microambiente para la progresión del tumor e incluso la metástasis (Narang y Desai, 2017).

Las investigaciones más recientes muestran que algunos de los blancos moleculares de AKBA incluyen a factores de transcripción como NF- κ B y sus reguladores, así como algunas cinasas; PI3K/Akt, MAPK, y sobre factores de transcripción como VEGF, PDGF, que son importantes en la progresión del cáncer, además de algunas otras proteínas como Rb y p53, entre otras. Estas vías de señalización serían ahora el blanco de investigación para determinar el mecanismo de acción del aceite esencial de *B. serrata* y AKBA.

9. Conclusiones

- El aceite esencial de *B. serrata* y AKBA tienen efecto citotóxico sobre la línea celular Huh-7, tanto en monocapa como en esferoides.
- El efecto citotóxico está dado por la activación de la apoptosis, ya que se muestra la activación de la caspasa 3, que es la ejecutora de la apoptosis.
- El mecanismo de acción queda aún incierto, aunque por las investigaciones recientes que señalan a Nf- κ B como posible blanco, la vía de TNF α podría estar implicada.

10. Perspectivas

- Estandarizar el aceite esencial de *B. serrata* en función a los ácidos boswélicos más comunes.
- Determinar las vías de señalización sobre las que actúa el aceite esencial de *B. serrata* y AKBA
- Determinar el efecto antitumoral del aceite esencial de *B. serrata* y AKBA en un modelo *in vivo*.
- Determinar el efecto hepatoprotector en hepatocitos sanos.

11. Referencias

Abdel-Hamid, N.M., Abass, S.A., Mohamed, A.A. y Muneam Hamid, D., 2018. Herbal management of hepatocellular carcinoma through cutting the pathways of the common risk factors. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, [en línea] 107(June), pp.1246–1258. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.104>>.

Ahmed, H.H., Abd-Rabou, A.A., Hassan, A.Z. y Kotob, S.E., 2015. Phytochemical Analysis and Anti-cancer Investigation of *Boswellia serrata* Bioactive Constituents In Vitro. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, [en línea] 16(16), pp.7179–88. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26514509>> [Consultado 24 mar. 2018].

Alonso-Castro, A.J., Villarreal, M.L., Salazar-Olivo, L.A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F. y Garcia-Carranca, A., 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, [en línea] 133(3), pp.945–972. Disponible en: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.055>>.

de Andrade Teles, R.B., Picot, L., Coutinho, H.D.M., Gama e Silva, M., da Silva Almeida, J.R.G., de Menezes, I.R.A., de Oliveira, A.P., Leal, A.E.B.P., de Lavor, É.M., Fernandes, A.W.C., de Oliveira Júnior, R.G., de Moura Fontes Araújo, M.T. y Silva, J.C., 2018. Essential Oils and Their Major Compounds in the Treatment of Chronic Inflammation: A Review of Antioxidant Potential in Preclinical Studies and Molecular Mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, pp.1–23.

Balakrishnan, A., Vyas, A., Deshpande, K. y Vyas, D., 2016. Pharmacological cyclin

dependent kinase inhibitors: Implications for colorectal cancer. [en línea] Disponible en: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4734993/pdf/WJG-22-2159.pdf>> [Consultado 1 abr. 2019].

Balogh, J., Victor, D., Asham, E.H., Burroughs, S.G., Boktour, M., Saharia, A., Li, X., Ghobrial, M. y Monsour, H., 2016. Hepatocellular carcinoma: a review. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, [en línea] Volume 3, pp.41–53. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27785449>> [Consultado 24 mar. 2018].

Berasain, C. y Ávila, M.A., 2007. Mecanismos de hepatocarcinogenia: Identificación de nuevas dianas terapéuticas. *Gastroenterología y Hepatología Continuada*, 6(3), pp.133–138.

Blowman, K., Magalhães, M., Lemos, M.F.L., Cabral, C. y Pires, I.M., 2018a. Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, [en línea] 2018, pp.1–12. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29765461>> [Consultado 19 feb. 2019].

Blowman, K., Magalhães, M., Lemos, M.F.L., Cabral, C. y Pires, I.M., 2018b. Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.

Brito, A.F., Abrantes, A.M., Tralhão, J.G. y Botelho, M.F., 2016. Targeting hepatocellular carcinoma: what did we discover so far? *Oncology Reviews*, [en línea] 10(2), p.302. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27994769>> [Consultado 24 mar. 2018].

Christodoulou, M.-I., Kontos, C., Halabalaki, M., Skaltsounis, A.-L. y Scorilas, A., 2014. Nature Promises New Anticancer Agents: Interplay with the Apoptosis-related BCL2 Gene Family. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, [en línea] 14(3), pp.375–399.

Disponibile en:
<<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=14&issue=3&spage=375>> [Consultado 19 feb. 2019].

Costa, J., 2019. *Cancer*. [en línea] Encyclopaedia Britannica, Inc. Disponible en:
<<https://www.britannica.com/science/cancer-disease>>.

Dutta, R. y Mahato, R.I., 2017. Recent advances in hepatocellular carcinoma therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, [en línea] 173, pp.106–117. Disponible en:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28174094>> [Consultado 24 mar. 2018].

Ekor, M., 2014. The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Neurology*, 4 JAN(January), pp.1–10.

Firenzuoli, F. y Gori, L., 2007. Herbal medicine today: Clinical and research issues. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 4(SUPPL. 1), pp.37–40.

GLOBOCAN, 2018. *Cancer Fact Sheets*. [en línea] Data Cancer Sheets. Disponible en: <<http://gco.iarc.fr/today/home>>.

Gomes, M.A., Priolli, D.G., Tralhão, J.G. y Botelho, M.F., 2013. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. *Revista da Associação Médica Brasileira*, [en línea] 59(5), pp.514–524. Disponible en:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24041910>> [Consultado 24 mar. 2018].

Hanahan, D. y Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, [en línea] 144(5), pp.646–674. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>> [Consultado 24 mar. 2018].

Herbarium JCB, 2019. *Digital Flora of Karnataka*. [en línea] Disponible en: <<http://florakarnataka.ces.iisc.ac.in/hjcb2/herbsheet.php?id=953&cat=1>> [Consultado 24 ene. 2019].

Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N. y Sarkar, S., 2014. Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers*, 6(3), pp.1769–1792.

Hu, B., An, H.M., Wang, S.S., Chen, J.J. y Xu, L., 2016. Preventive and therapeutic effects of Chinese herbal compounds against hepatocellular carcinoma. *Molecules*, 21(2), pp.1–26.

Hussain, H., Al-Harrasi, A., Csuk, R., Shamraiz, U., Green, I.R., Ahmed, I., Khan, I.A. y Ali, Z., 2017. Therapeutic potential of boswellic acids: a patent review (1990-2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, [en línea] 27(1), pp.81–90. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27646163>> [Consultado 24 mar. 2018].

Khan, M.A., Ali, R., Parveen, R., Najmi, A.K. y Ahmad, S., 2016. Pharmacological evidences for cytotoxic and antitumor properties of Boswellic acids from *Boswellia serrata*. *Journal of Ethnopharmacology*, [en línea] 191, pp.315–323. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27346540>> [Consultado 24 mar. 2018].

Khan, M.A., Singh, M., Khan, M.S., Najmi, A.K. y Ahmad, S., 2014. Caspase Mediated

Synergistic Effect of *Boswellia serrata* Extract in Combination with Doxorubicin against Human Hepatocellular Carcinoma. *BioMed Research International*, [en línea] 2014, pp.1–11. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25177685>> [Consultado 24 mar. 2018].

Lauren, P., 2012. Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, targets, and therapeutics. *Oxford University Press*, [en línea] (Third Edition), pp.1–342. Disponible en: <https://www.google.com.mx/search?ei=tf62Wpf1CJGizwLz2qigDw&q=pecorino+molecular+biology+of+cancer+&oq=pecorino+molecular+biology+of+cancer+&gs_l=psy-ab.3..35i39k1j0i22i30k1i9.3133.3133.0.3527.1.1.0.0.0.153.153.0j1.1.0....0...1c.1.64.psy-ab..0.1.152....0> [Consultado 24 mar. 2018].

Li, Y. y Martin, R.C.G., 2011. Herbal medicine and hepatocellular carcinoma: Applications and challenges. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.

Liu, J.-J., Huang, B. y Hooi, S.C., 2006. Acetyl-keto- β -boswellic acid inhibits cellular proliferation through a p21-dependent pathway in colon cancer cells. *British Journal of Pharmacology*, [en línea] 148(8), pp.1099–1107. Disponible en: <<http://doi.wiley.com/10.1038/sj.bjp.0706817>> [Consultado 24 feb. 2019].

Liu, J.-J., Nilsson, A., Oredsson, S., Badmaev, V. y Duan, R.-D., 2002a. Keto- and acetyl-keto-boswellic acids inhibit proliferation and induce apoptosis in Hep G2 cells via a caspase-8 dependent pathway. *International journal of molecular medicine*, [en línea] 10(4), pp.501–5. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12239601>> [Consultado 24 mar. 2018].

Liu, J.-J., Nilsson, Å., Oredsson, S., Badmaev, V., Zhao, W.-Z. y Duan, R.-D., 2002b. Boswellic acids trigger apoptosis via a pathway dependent on caspase-8 activation but independent on Fas/Fas ligand interaction in colon cancer HT-29 cells. *Carcinogenesis*, [en línea] 23(12), pp.2087–2093. Disponible en: <<https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/23.12.2087>>

[Consultado 28 feb. 2019].

Llovet, J.M., Montal, R., Sia, D. y Finn, R.S., 2018. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*, [en línea] 15(10), pp.599–616. Disponible en: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41571-018-0073-4>>.

Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S. y Baradaran, B., 2017. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, [en línea] 7(3), pp.339–348. Disponible en: <<http://dx.doi.org/10.15171/apb.2017.041>>.

McCutcheon, A., 2018. *Boswellia serrata Adulteration*. [en línea] Disponible en: <www.botanicaladulterants.org> [Consultado 23 ene. 2019].

Narang, A.S. y Desai, D.S., 2017. *Anticancer Drug Development Unique Aspects of Pharmaceutical Development*. Disponible en: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Anticancer-Drug-Development-Unique-Aspects-of-Narang-Desai/a4f93af496938c365441e3ca29b4ddb04c311329>>

[Consultado 12 mar. 2019].

National Cancer Institute, 2015. *About Cancer*. [en línea] Diagnosis and staging. Disponible en: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>>.

Ni, X., Suhail, M.M., Yang, Q., Cao, A., Fung, K.-M., Postier, R.G., Woolley, C., Young, G., Zhang, J. y Lin, H.-K., 2012. Frankincense essential oil prepared from hydrodistillation of *Boswellia sacra* gum resins induces human pancreatic cancer cell death in cultures and in a xenograft murine model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, [en línea] 12(1), p.1212. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23237355>> [Consultado 24 mar. 2018].

Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R. y S, A., 2009. *Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0*. [en línea] Disponible en: <http://www.worldagroforestry.org/treedb/AFTPDFS/Boswellia_serrata.PDF> [Consultado 23 ene. 2019].

Ozougwu, J.C., 2017. Physiology of the liver. *The American Journal of Medicine*, 16(2), pp.256–271.

Powis, G., 1987. Metabolism and reactions of quinoid anticancer agents. *Pharmacology & therapeutics*, [en línea] 35(1–2), pp.57–162. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3321102>> [Consultado 24 mar. 2018].

Raza, A. y Sood, G.K., 2014. Hepatocellular carcinoma review: Current treatment, and evidence-based medicine. *World Journal of Gastroenterology*, [en línea] 20(15), p.4115. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24764650>> [Consultado 24 mar. 2018].

Rodríguez-Burford, C., Oelschlager, D.K., Talley, L.I., Barnes, M.N., Partridge, E.E. y Grizzle, W.E., 2003. The use of dimethylsulfoxide as a vehicle in cell culture experiments using ovarian carcinoma cell lines. *Biotechnic & Histochemistry*, [en línea]

78(1), pp.17–21. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10520290312120004> [Consultado 2 jun. 2019].

Rodriguez-Fragoso, L., Reyes-Esparza, J., Burchiel, S.W., Herrera-Ruiz, D. y Torres, E., 2008. Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. *Toxicology and applied pharmacology*, [en línea] 227(1), pp.125–35. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18037151> [Consultado 21 ene. 2019].

Roy, N.K., Deka, A., Bordoloi, D., Mishra, S., Kumar, A.P., Sethi, G. y Kunnumakkara, A.B., 2016. The potential role of boswellic acids in cancer prevention and treatment. *Cancer Letters*, [en línea] 377(1), pp.74–86. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27091399> [Consultado 24 mar. 2018].

Sadhasivam, S., Palanivel, S. y Ghosh, S., 2016. Synergistic antimicrobial activity of *Boswellia serrata* Roxb. ex Colebr. (Burseraceae) essential oil with various azoles against pathogens associated with skin, scalp and nail infections. *Letters in Applied Microbiology*, 63(6), pp.495–501.

Sánchez Sánchez, L., Hernández Vázquez, J.V. y López Marure, R., 2005. Papel de las cadherinas en la metástasis. *REB*, [en línea] 24(3), pp.97–103. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2005/03/i_97-103_Cadherinas.pdf [Consultado 1 abr. 2019].

Siddiqui, M.Z., 2011. *Boswellia serrata*, a potential antiinflammatory agent: an overview. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, [en línea] 73(3), pp.255–61. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22457547> [Consultado 24 mar.

2018].

Singh, A.K., Kumar, R. y Pandey, A.K., 2018. Hepatocellular Carcinoma: Causes, Mechanism of Progression and Biomarkers. *Current Chemical Genomics and Translational Medicine*, [en línea] 12(1), pp.9–26. Disponible en: <<http://benthamopen.com/FULLTEXT/CCGTM-12-9>>.

Stearns, V., Singh, B., Tsangaris, T., Crawford, J.G., Novielli, A., Ellis, M.J., Isaacs, C., Pennanen, M., Tibery, C., Farhad, A., Slack, R. y Hayes, D.F., 2003. A prospective randomized pilot study to evaluate predictors of response in serial core biopsies to single agent neoadjuvant doxorubicin or paclitaxel for patients with locally advanced breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, [en línea] 9(1), pp.124–33. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538460>> [Consultado 24 mar. 2018].

Sultana, A., Rahman, K.U., Padmaja, A.R. y Rahman, S.U., 2013. Boswellia serrata Roxb. a traditional herb with versatile pharmacological activity: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(6), p.2106.

Sun, H., Shuofang, W.- y Zhaowang, W.-, 2006. Structure-activity relationships of oleanane-and ursane- type triterpenoids. *Botanical Studies*, [en línea] 47, pp.339–368. Disponible en: <<https://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2006/4/Bot474-01.pdf>> [Consultado 24 mar. 2018].

Tam, K., 2013. The Roles of Doxorubicin in Hepatocellular Carcinoma. *ADMET & DMPK*, [en línea] 1(3), pp.29–44. Disponible en: <<http://pub.iapchem.org/ojs/index.php/admet/article/view/7>> [Consultado 24 mar.

2018].

Timm, M., Saaby, L., Moesby, L. y Hansen, E.W., 2013. Considerations regarding use of solvents in in vitro cell based assays. *Cytotechnology*, [en línea] 65(5), p.887. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23328992>> [Consultado 2 jun. 2019].

Torres-Chacón, D.L., Gómez-Quiroz, L.E. y Almanza-Pérez, J.C., 2016. *Actividad citotóxica del aceite esencial de Boswellia serrata en líneas celulares de carcinoma*. Universidad Autónoma Metropolitana.

Tuorkey, M.J., 2015. Cancer Therapy with Phytochemicals: Present and Future Perspectives. *Biomedical and environmental sciences : BES*, [en línea] 28(11), pp.808–19. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26695359>> [Consultado 24 mar. 2018].

Valdivia-Correa, B., Gómez-Gutiérrez, C., Uribe, M. y Méndez-Sánchez, N., 2016. Herbal medicine in Mexico: A cause of hepatotoxicity. A critical review. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2).

Weaver, B.A., 2014. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular biology of the cell*, [en línea] 25(18), pp.2677–81. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25213191>> [Consultado 1 mar. 2019].

Yeung, K.S., Gubili, J. y Mao, J.J., 2018. Herb-Drug Interactions in Cancer Care. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, [en línea] 32(10), pp.516–20. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30334243>> [Consultado 21 ene. 2019].

