UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

"PARTICIPACIÓN DEL NO Y EL H_2S EN LOS EFECTOS VASODILATADOR Y ANTIPROLIFERATIVO DE LOS TRITERPENOS: ÁCIDO URSÓLICO Y UVAOL"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

MARIANA SOLÍS GUTIÉRREZ

DIRIGIDA POR

Dr. CÉSAR IBARRA ALVARADO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO
CENTRO UNIVERSITARIO
AGOSTO, 2015

REPOSITORIO INSTITUCIONAL DGBSDI-UAQ

La presente obra está bajo la licencia:
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es

CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .

SinDerivadas — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad, o derechos morales pueden limitar la forma en que utilice el material.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

"PARTICIPACIÓN DEL NO Y EL H_2S EN LOS EFECTOS VASODILATADOR Y ANTIPROLIFERATIVO DE LOS TITERPENOS: ÁCIDO URSÓLICO Y UVAOL"

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA
QFB Mariana Solís Gutiérrez

DIRIGIDA POR
Dr. César Ibarra Alvarado

Dr. César Ibarra Alvarado
PRESIDENTE

Dra. Laura C. Berumen Segura
SECRETARIO

Dra. Alejandra Rojas Molina
VOCAL

Dr. Juan Carlos Solís Sainz
SUPLENTE

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas
SUPLENTE

Alejandra Rojas M.

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Agosto, 2015
México

RESUMEN

Las enfermedades no transmisibles constituyen la principal causa de muerte en nuestro país y en el mundo. Dentro de este grupo se encuentran las enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión, y el cáncer, como la leucemia. La Organización Mundial de la Salud promueve la investigación científica de la medicina tradicional propia de cada país, con el fin de encontrar alternativas terapéuticas para el tratamiento y la prevención de estas enfermedades. La medicina tradicional en México se ha utilizado desde tiempos prehispánicos, en parte, gracias a la biodiversidad vegetal propia del país. Una de las especies vegetales comúnmente utilizada con estos fines es *Prunus serotina*, la cual ha sido estudiada desde un punto de vista químico y farmacológico por nuestro grupo de investigación. Recientemente, se encontró que algunos de los compuestos mayoritarios, presentes en el fruto de *P. serotina*, responsables del efecto vasodilatador, son los triterpenos pentacíclicos: ácido ursólico y uvaol. Posteriormente, se determinó que dicho efecto farmacológico era producido por la activación de las vías bioquímicas de los trasmisores gaseosos NO/cGMP y H_2S/CvK^+. De manera adicional, existen estudios que indican que los triterpenos presentan un efecto citotóxico en distintos tipos celulares neoplásicos; sin embargo no se ha estudiado si el efecto antineoplásico del ácido ursólico y el uvaol involucra la activación de las vías de los transmisores gaseosos. En la presente investigación, se determinó la participación de los transmisores gaseosos en los efectos vasodilatador en aorta de rata y antiproliferativo en cultivos celulares de linfocitos T, producidos por triterpenos, mediante la cuantificación de la activación enzimática de NOS y CSE, enzimas responsables de la biosíntesis del NO y el H_2S, respectivamente. Los resultados obtenidos indican que ambos transmisores gaseosos están involucrados en el efecto vasodilatador del ácido ursólico y del uvaol en la aorta de rata, ya que estos compuestos incrementan significativamente la activación de la NOS y la CSE. Por otro lado, se observó una notable disminución en la proliferación y viabilidad de los linfocitos T en presencia tanto del ácido ursólico como del uvaol; dicho efecto es dependiente de la concentración y del tiempo que los linfocitos están en contacto con cada uno de los triterpenos. Finalmente, los ensayos de activación enzimática indicaron que el NO y el H_2S contribuyen al efecto citotóxico producido por ambos triterpenos. Sin embargo, estos resultados no excluyen la participación de vías bioquímicas alternativas que involucran la activación de procesos proapoptóticos. En conclusión, los triterpenos ácido ursólico y uvaol constituyen prototipos estructurales que pueden ser desarrollados como fármacos alternativos en el tratamiento de patologías de gran prevalencia mundial como la hipertensión y la leucemia.

Palabras clave: Triterpenos, óxido nítrico (NO), sulfuro de hidrógeno (H_2S), hipertensión, leucemia

ABSTRACT

Non-communicable diseases are *the leading cause of death* in our country and the world. Within this group are cardiovascular diseases as hypertension and cancer as leukemia. The World Health Organization promotes scientific investigation of traditional medicine of each country, in order to find new therapeutic approaches for the treatment and prevention of these diseases. Traditional medicine in Mexico has been used since pre-hispanic times partly due to the great plant biodiversity of our country. *Prunus serotina* is one of many species commonly used to this purpose, which has been extensively studied from a chemical and pharmacological point of view by our research group. Recently, it was found that some of the major compounds responsible for the bioactive effect in the cardiovascular system, present in the fruit of *P. serotine*, are the pentacyclic triterpenes: ursolic acid and uvaol. Later, it was shown that this pharmacological effect was produced by the activation of the gasotransmitter pathways: NO/cGMP and H_2S/CvK^+. Additionally, other studies indicate that triterpenes induce a cytotoxic effect on different cancer cell types. Nevertheless, it has not been still studied whether the anti-cancer effect of ursolic acid and uvaol involve the activation of gasotransmitter pathways. In the present study, it was assessed the participation of gasotransmitters in vasodilator activity in rat aorta and anti-proliferative effect in T lymphocytes cell cultures induced by triterpenes by quantifying NOS and CSE activation, enzymes responsible of the biosynthesis of NO and H_2S, respectively. Results indicated that both gasotransmitters are involved in the vasorelaxant effect produced by ursolic acid and uvaol on isolated rat aortic tissue, since both triterpenes activate NOS and CSE enzymes in a concentration dependent manner. On the other hand, treatment of T lymphocytes with ursolic acid and uvaol reduced cell proliferation and viability in a concentration and time dependent manner. Finally, enzyme activation assays indicated that NO and H_2S contribute to the cytotoxic effect induced by both studied triterpenes. However, these results do not rule out the participation of alterative pathways that activate pro-apoptotic signaling cascades. In conclusion, the triterpenes ursolic acid and uvaol are structural prototypes, which can be developed as alternative drugs useful in the treatment of worldwide spread diseases such as hypertension and leukemia

Key words: Triterpenes, nitric oxide (NO), hydrogen sulfide (H_2S), hypertension, leukemia

AGRADECIMIENTOS

Reconozco las facilidades otorgadas por la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro para mi formación y agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo a través del Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACyT - Gobierno del Estado de Querétaro (FOMIX-QRO) convocatoria 2014-3, No. QRO-2014-CO3-250289.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Enfermedades no transmisibles	2
2.1.1 Hipertensión	4
2.1.1.1 Fisiopatología de la hipertensión	5
2.1.1.1.1 Transmisores gaseosos en el sistema cardiovascular	5
2.1.1.1.1.1 NO	6
2.1.1.1.1.2 H_2S	8
2.1.1.1.2. Sinergia entre las vías de los transmisores gaseosos NO y H_2S	10
2.1.2 Leucemia	11
2.1.2.1 Fisiopatología de la leucemia	12
2.2 Estrategia global para la prevención y control de las ENT	12
2.3 Plantas medicinales y sus metabolitos bioactivos	13
2.4 Triterpenos	15
2.4.1 Efecto vasodilatador de triterpenos	16
2.4.2 Efecto citotóxico de triterpenos	20
2.4.2.1 Efecto citotóxico producido por transmisores gaseosos en células del sistema inmune	23
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo General	27
4.2 Objetivos Específicos	27

5. METODOLOGÍA 28
5.1 Materiales 28
5.1.1 Material biológico 28
5.1.1.1 Animales 28
5.1.1.2 Aorta aislada de rata 28
5.1.1.3 Células Jurkat E6-1 28
5.1.2 Compuestos químicos y solventes 29
5.1.3 Solución fisiológica de Krebs-Henseleit 29
5.2 Métodos 29
5.2.1 Actividad de la eNOS en arteria 29
5.2.1.1 Preparación de la muestra de arteria 29
5.2.1.2 Medición de la actividad enzimática de la eNOS en arteria 30
5.2.2 Actividad de la CSE en arteria 30
5.2.2.1 Preparación de la muestra de arteria 30
5.2.2.2 Medición de la actividad enzimática de la CSE en arteria 31
5.2.3 Cultivos celulares de linfocitos T de la línea Jurkat E6-1 32
5.2.3.1 Ensayos de duplicación celular 32
5.2.3.2 Efecto de los triterpenos ácido ursólico y uvaol en la tasa de proliferación de células Jurkat E6-1 32
5.2.3.3 Actividad de la iNOS en cultivos de linfocitos T 33
5.2.3.3.1 Preparación de la muestra de linfocitos T 33
5.2.3.3.2 Medición de la actividad enzimática de la iNOS en cultivos de linfocitos T 33
5.2.3.4 Actividad de la CSE en cultivos de linfocitos T 33
5.2.3.4.1 Preparación de la muestra de linfocitos T 34
5.2.3.4.2 Medición de la actividad enzimática de la CSE en cultivos de linfocitos T 34
5.3 Análisis estadístico 34
6. RESULTADOS 35
6.1 Efecto de los triterpenos sobre la actividad enzimática de la eNOS

en arteria 35
6.2 Efecto de los triterpenos sobre la actividad enzimática de la CSE en arteria 37
6.3 Efecto de los triterpenos ácido ursólico y uvaol sobre la tasa de proliferacion de linfocitos T 39
6.4 Efecto de los triterpenos sobre la actividad enzimática de la iNOS en cultivos de linfocitos T 44
6.5 Efecto de los triterpenos sobre la actividad enzimática de la CSE en cultivos de linfocitos T 46
7. DISCUSIÓN 49
8. CONCLUSIONES 56
9. BIBLIOGRAFÍA 57
10. SIGLAS Y ACRÓNIMOS 65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Descripción de las tres isoformas de la NOS en humano	12
2	Valores de la concentración efectiva media (CE_{50}) y el efecto máximo (E_{max}) del efecto vasodilatador de los triterpenos objeto de estudio	19
3	Valores de la concentración de nitritos por estimulación con la CE_{50} de triterpenos y controles evaluados en aorta	36
4	Valores de concentración de H_2S por estimulación con la CE_{50} de triterpenos y controles evaluados en aorta	38
5	Número de células viables en función del tiempo en cultivos de linfocitos T tratados con triterpenos	40
6	Porcentaje de viabilidad celular de linfocitos T 48 horas después de la adición de diferentes compuestos	43
7	Valores de la concentración de nitritos por estimulación con la CE_{50} de triterpenos y controles evaluados en cultivos de linfocitos T	45
8	Valores de concentración de H_2S por estimulación con la CE_{50} de triterpenos y controles evaluados en cultivos de linfocitos T	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Síntesis y mecanismo de acción del NO y el H_2S que induce la vasodilatación	9
2	Interacción entre las vías del NO/cGMP y la vía del H_2S/CvK^+	11
3	Proporción estimada de la presencia de metabolitos secundarios mayoritarios de las plantas medicinales	14
4	Blancos celulares farmacológicos para metabolitos secundarios de plantas	15
5	Estructuras químicas y nombres de los triterpenos elegidos para estudios farmacológicos	18
6	Curvas concentración respuesta del efecto vasodilatador producido por triterpenos	19
7	Estructuras químicas de triterpenos con efecto inmunomodulador	21
8	Escualeno, precursor estructural del colesterol en células animales y de los triterpenos en células vegetales	22
9	Síntesis y mecanismo de acción del NO y el H_2S en los linfocitos T	25
10	Caja de cultivo para la curva de duplicación de células Jurkat E6-1	32
11	Curva de calibración de NO_2^- y su ecuación de regresión lineal correspondiente	35
12	Representación en gráfica de barras de la concentración de nitritos ante la estimulación de cada uno de los compuestos evaluados	36
13	Curva de calibración de NaHS y su ecuación de regresión lineal correspondiente	37

14 Representación en gráfica de barras de la concentración de H_2S ante la estimulación de cada uno de los compuestos evaluados 38
15 Efecto del DMSO en la proliferación de linfocitos T 39
16 CCR de la tasa de proliferación en linfocitos T tratados con ácido ursólico a las 24 y 48 h 41
17 CCR de la tasa de proliferación en linfocitos T tratados con uvaol a las 24 y 48 h 42
18 CCR del porcentaje de viabilidad celular con concentraciones crecientes del ácido ursólico, el uvaol y 1% de DMSO 42
19 Representación en gráfica de barras del porcentaje de viabilidad celular de los linfocitos T 48 horas después de la adición de diferentes compuestos 44
20 Curva de calibración de NO_2^- y su ecuación de regresión lineal correspondiente 45
21 Representación en gráfica de barras de la concentración de nitritos ante la estimulación de cada uno de los compuestos evaluados en cultivos de linfocitos T 46
22 Curva de calibración de NaHS y su ecuación de regresión lineal correspondiente 47
23 Representación en gráfica de barras de la concentración de H_2S ante la estimulación de cada uno de los compuestos evaluados en cultivos de linfocitos T 48

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades no transmisibles son un grupo de patologías que se presentan con gran prevalencia a nivel mundial. Dentro de este grupo se encuentran las enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión, y el cáncer, como la leucemia (OMS, 2014). Por la gran prevalencia de estas enfermedades, particularmente en países con economías en desarrollo como México, es importante la búsqueda de alternativas terapéuticas para su tratamiento y su prevención. El estudio de los mecanismos intracelulares desencadenados por metabolitos secundarios de origen vegetal, como los triterpenos, permite el reconocimiento del potencial terapéutico de estos principios bioactivos. Recientemente, se demostró el potencial vasodilatador que poseen triterpenos como el ácido ursólico y el uvaol; además estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo sugieren que dicho efecto involucra la activación de las vías de dos transmisores gaseosos: la vía del óxido nítrico/guanosín monofosfato cíclico (NO/cGMP) y la vía del sulfuro de hidrógeno/canales de potasio (H_2S/CvK^+) (Luna-Vázquez, 2009; Solis-Gutierrez, 2013). Sin embargo, aún no se determina con certeza el mecanismo de acción vasodilatador de los triterpenos y cómo participan las enzimas responsables de la biosíntesis de los transmisores gaseosos en este mecanismo. Adicionalmente, se sabe que algunos compuestos triterpénicos disminuyen la tasa de proliferación y supervivencia celular de linfocitos T (Checker *et al*., 2012; Napoli *et al*., 2013) y se ha reportado la relación entre dichos efectos y la presencia de los transmisores gaseosos (Hammami *et al*., 2012; Nathan, 2014); no obstante, es necesaria la recopilación de evidencia científica que corrobore lo anterior. En la presente investigación se planteó como objetivo determinar si el efecto dilatador en aorta de rata y el efecto citotóxico en linfocitos T producido por los triterpenos, ácido ursólico y uvaol, involucran la activación de las enzimas óxido nítrico sintasa (NOS), principal enzima productora de NO, y cistationina-γ-liasa (CSE), enzima responsable de la síntesis del transmisor gaseoso H_2S. Los

resultados obtenidos demuestran que el ácido ursólico y el uvaol inducen un efecto vasodilatador mediante la activación de las vías del NO/cGMP y del H_2S/CvK$^+$. Por otro lado, los mismos triterpenos disminuyen la proliferación y la viabilidad celular en cultivos de linfocitos T, mediante un mecanismo que involucra el NO y el H_2S, sin embargo estos resultados no excluyen la participación de otros mecanismos citotóxicos alternativos. Con base en estos antecedentes, es evidente la importancia de profundizar en el estudio farmacológico de los triterpenos y en el papel que tienen como activadores de distintas vías de señalización que resultan en efectos bioactivos de gran intéres terapéutico como la vasodilatación y la citotoxicidad. En este trabajo se propone al ácido ursólico y al uvaol como prototipos estructurales para el desarrollo de fármacos alternativos para el tratamiento de enfermedades de gran prevalencia en nuestro país como son la hipertensión y la leucemia.

2. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedades no transmisibles

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades no transmisibles (ENT) son aquellas que no son transmitidas de persona a persona, que son de larga duración, por lo general evolucionan lentamente, no tienen cura definitiva y, por lo tanto, son crónicas y degenerativas (OMS, 2011).

Los cuatro tipos principales de enfermedades no transmisibles son, las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas y la diabetes (OMS, 2011). Estas enfermedades afectan desproporcionadamente a los países de ingresos bajos y medios, donde el 80% de las muertes registradas es por alguna de estas 4 enfermedades. Tan solo en 2008, 63% de las muertes a nivel mundial, están directamente relacionadas a alguna de las cuatro ENT (OMS, 2011).

Dentro de las enfermedades cardiovasculares, una de las que presenta mayor prevalencia es la hipertensión. Tan solo en nuestro país se calcula que alrededor del 37% de la población mexicana padece esta enfermedad. La hipertensión es una patología íntimamente relacionada con hábitos cotidianos, por ejemplo: el consumo de alimentos que contienen demasiada sal y de cantidades insuficientes de frutas y verduras, el uso irresponsable del alcohol, el sedentarismo y la falta de ejercicio físico, el tabaquismo y el mal manejo del estrés. Estos comportamientos riesgosos junto con un pequeño, pero importante, grado de susceptibilidad genética, aumentan las probabilidades de presentar esta patología (INEGI, 2014).

El cáncer es una enfermedad compleja que comienza cuando una sola célula normal se transforma en una célula tumoral. Es un proceso multifásico que consiste en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Las

alteraciones al metabolismo de la célula son resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres diferentes factores ambientales externos (Lokody, 2014). El cáncer puede afectar cualquier célula del cuerpo, incluyendo las células sanguíneas; el tipo de cáncer que afecta a los linfocitos, tanto tipo T como tipo B, se denomina leucemia. Esta enfermedad se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células anormales, las cuales se extienden más allá de sus límites normales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y propagarse a otros órganos. Este proceso se denomina “metástasis” y es la causa principal de muerte por cáncer (Smith *et al*., 2014).

2.1.1 Hipertensión

La hipertensión, un problema de salud pública mundial, representa una de las principales causas de mortalidad y discapacidad prematura, sobre todo en poblaciones de países con ingresos bajos y medios (OMS, 2013).

Un estudio epidemiológico sobre la prevalencia, conciencia, percepción y control de la hipertensión en la población de distintos países, entre ellos México, encontró una prevalencia mayor de dicha enfermedad en aquellas poblaciones cuyo ingreso económico es de medio a bajo, como es el caso de nuestro país (Lloyd-Sherlock *et al*., 2014).

Se observó que el 58.2% de los mexicanos que participaron en dicho estudio tiene la presión arterial elevada, de los cuales el 55.2% corresponden a la población masculina y el 60.9% a la población femenina, en donde los grupos de edad más avanzada (75-80 años) presentaron mayor incidencia.

De manera particular para el estado de Querétaro de Arteaga, el INEGI reporta que el 28% de muertes anuales están directamente relacionadas a presión arterial elevada (INEGI, 2014).

2.1.1.1 Fisiopatología de la hipertensión

En los vasos sanguíneos se transporta la sangre, la cual a su vez lleva los nutrientes y el oxígeno a todos los tejidos. Los vasos sanguíneos están constituidos por tres capas de células ordenadas de manera concéntrica. La capa más interna es un revestimiento de células endoteliales que están en contacto directo con la sangre, ellas biosintetizan a los factores vasoactivos derivados del endotelio. Dichos factores vasoactivos llevan a cabo su función reguladora en la capa de células intermedias o células de músculo liso, principales responsables de llevar a cabo los cambios que ocurren en el tono vascular. Finalmente, la capa más externa de células está constituida principalmente por fibroblastos y colágeno que proporcionan estabilidad a los vasos sanguíneos (Giles *et al*., 2012).

La hipertensión está asociada a la biosíntesis irregular o nula de factores vasoactivos derivados del endotelio, específicamente aquellos responsables de la vasodilatación como los transmisores gaseosos: NO, H_2S y monóxido de carbono (CO), cuyo mecanismo de acción hiperpolariza las células de músculo liso resultando en una vasodilatación (Giles *et al*., 2012).

2.1.1.1.1 Transmisores gaseosos en el sistema cardiovascular

La transmisión de señales constituye el primer método de comunicación intercelular. Las moléculas responsables de dicha comunicación pueden ser desde grandes proteínas, lípidos y hormonas, hasta pequeñas moléculas gaseosas. Algunas de estas fueron identificadas recientemente: NO, CO y H_2S y demostraron su capacidad de transmitir información entre varios tipos celulares (Asif *et al*., 2009; Gadalla y Snyder, 2010).

El descubrimiento de estos tres transmisores gaseosos revolucionó los conceptos de comunicación intracelular conocidos hasta el momento, ya que presentan varias diferencias con relación a los transmisores clásicos. Por

ejemplo, los gases no son almacenados en estructuras vesiculares, sino que deben ser sintetizados al momento de la demanda biológica, lo cual exige que las enzimas que los biosintetizan tengan un sistema de regulación preciso y eficaz; mientras que los transmisores de naturaleza no gaseosa son almacenados en vesículas y liberados por exocitosis; además, los transmisores clásicos interactúan con sus receptores en membranas plasmáticas que, al ser activados, desencadenan cascadas de señalización hacia el interior de la célula, mientras que los transmisores gaseosos tienen la capacidad de atravesar las membranas celulares para modificar proteínas intracelulares y afectar el metabolismo de la célula de una forma más eficiente e inmediata (Asif *et al*., 2009).

2.1.1.1.1.1 NO

El papel del NO, como transmisor gaseoso, fue descubierto a principios de los 80 por Robert Furchgott, durante estudios sobre la capacidad vasodilatadora de la ACh. Furchgott observó que dicho efecto no ocurría por una acción directa de los receptores colinérgicos sobre el músculo liso, sino que la ACh requería de una sustancia vasoactiva producida en el endotelio que influyera sobre el estado contráctil del músculo liso, provocando su relajación (Furchgott y Sawadzki, 1980). Posteriormente, este factor relajante derivado del endotelio (EDRF) fue reconocido como el NO, primer transmisor gaseoso identificado (Förstermann y Sessa, 2012).

Existen 3 diferentes isoformas de esta enzima: la NOS neuronal (NOS-1 o nNOS), la NOS inducible (NOS-2 o iNOS) y la NOS endotelial (NOS-3 o eNOS) (Tabla 1). Cada isoforma está codificada en un cromosoma diferente, y presentan entre sí una homología del 50-60%; todas las isoformas pueden ser inhibidas inespecíficamente por el éster metílico de L-arginina (L-NAME). El NO es sintetizado en un solo paso por las diferentes isoformas de la NOS. La eNOS y la nNOS son estimuladas por la formación del complejo calcio-calmodulina

(CaM-Ca^{2+}) (Murad, 2006; Asif *et al*., 2009; Förstermann y Sessa, 2012).

Tabla 1. Descripción de las tres isoformas de la NOS en humano

Isoforma	Descripción
NOS-1/nNOS (155 kD; cromosoma 12)	Se encuentra principalmente en neuronas periféricas y centrales de tipo no adrenérgicas y no colinérgicas, en el endometrio y músculo esquelético.
NOS-2/iNOS (125 kD; cromosoma 17)	Se encuentra principalmente en los macrófagos, hígado, músculo liso, endotelio y corazón.
NOS-3/eNOS (125 kD; cromosoma 7)	Se encuentra principalmente en el endotelio capilar, cerebro y corazón.

El sustrato de la NOS es el aminoácido L-arginina, el cual es oxidado para dar lugar a la formación de NO y citrulina. Específicamente en el sistema cardiovascular, una vez que el NO es sintetizado en el endotelio por la eNOS, su tamaño y gran capacidad de difusión, le permiten atravesar con facilidad las membranas celulares y penetrar al músculo liso de la vasculatura (Lundberg *et al*., 2008).

Cuando el NO alcanza las células del músculo liso puede interactuar con metales, especialmente con el hierro presente en el grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble (sGC), por lo que esta enzima es su principal blanco molecular. La activación de esta enzima incrementa la producción del segundo mensajero cGMP que, a su vez, activa a la enzima proteínquinasa tipo G (PKG) (Lundberg *et al*., 2008).

En los vasos sanguíneos el aumento en la concentración de cGMP y, por lo tanto, la activación de la PKG resultan en la fosforilación de diferentes proteínas. Unas de ellas son los CvK^{+}, que al ser activados incrementan la salida del ión

potasio e indirectamente se impide la entrada del Ca^{2+}, provocando una disminución en la capacidad de contracción de la célula. Otro mecanismo de la PKG es la fosforilación de la proteínfosfatasa (PPT), que desfosforila a la cadena ligera de la miosina (CLM), lo que contribuye también a la relajación del músculo liso arterial (Figura 1) (Heinrich *et al*., 2013).

2.1.1.1.1.2 H_2S

El transmisor gaseoso, H_2S ha emergido como una importante molécula señalizadora junto con el NO y el CO. El H_2S actúa como relajante del músculo liso y, por lo tanto, como un vasodilatador (Wang, 2012).

El estudio de la fisiopatología, diferentes mecanismos de señalización y metabolismo del H_2S son actualmente áreas de gran interés científico, ya que identificar las implicaciones biológicas de este transmisor gaseoso podría potencialmente clarificar el entendimiento que tenemos hasta ahora de distintas patologías, así como sugerir alternativas terapéuticas (Kolluru *et al*., 2013).

El H_2S, a nivel biológico, es producido por 3 enzimas: la CSE, la cistationina-β-sintasa (CBS) y la 3-mercaptopiruvato sulfurotransferasa (3-MST); su presencia ha sido reportada en diferentes órganos con predominancias específicas. Por ejemplo, la CSE se encuentra expresada mayormente en la vasculatura, en el hígado y en células del sistema inmunológico, mientras que la CBS se ha detectado en el cerebro y el sistema nervioso y la 3-MST está presente en el cerebro y la vasculatura periférica (Calvert *et al*., 2010).

En el endotelio vascular, la CSE produce H_2S a partir de L-cisteina (Asif *et al*., 2009; Gadalla y Snyder, 2010). Esta molécula producida y liberada por el endotelio (Calvert *et al*., 2010; Gadalla y Snyder, 2010), produce su efecto vasodilatador mediante 2 mecanismos: 1) la activación de canales de K^+, principalmente los dependientes de ATP, aunque existe evidencia que sugiere

que también están involucrados los CvK^+ y los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca}); este proceso genera la hiperpolarización de la célula muscular lisa; y 2) el H_2S también actúa inhibiendo la fosfodiesterasa (PDE), incrementando de esta manera los niveles del segundo mensajero, cGMP (Figura 1) (Calvert *et al.*, 2010; Gadalla y Snyder, 2010; Wang, 2012; Paul y Snyder, 2012).

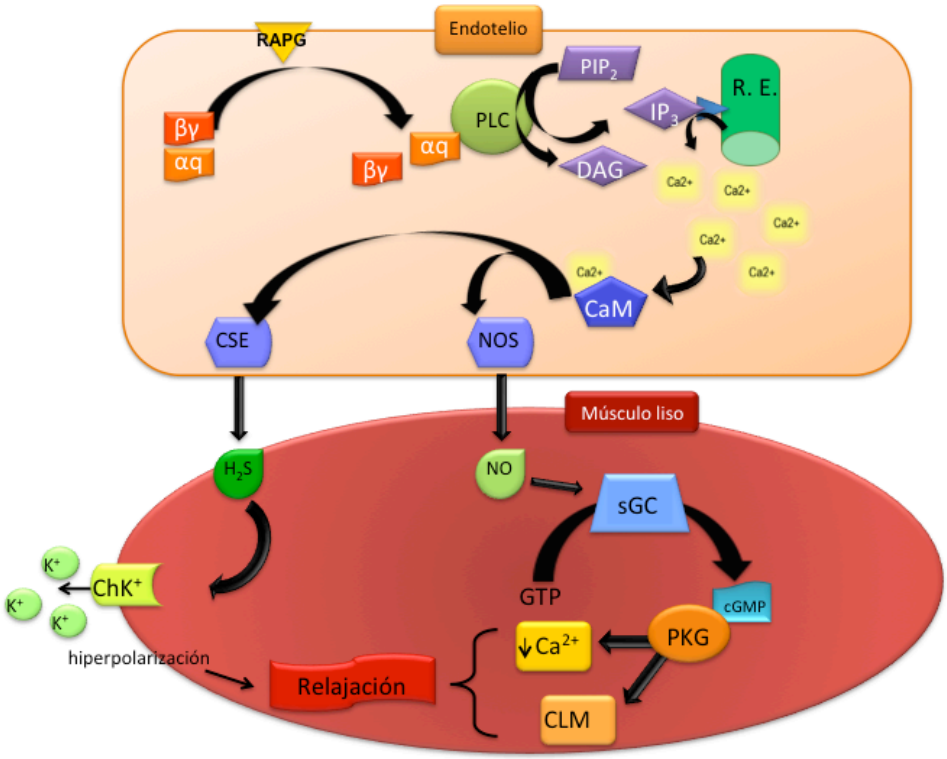


Figura 1. Síntesis y mecanismo de acción del NO y el H_2S que induce la vasodilatación. RAPG, receptor acoplado a proteína G; PLC, fosfolipasa C; PIP_2, fosfatidilinositol difosfato; IP_3, inositol trifosfato; DAG, diacilglicerol; R.E., retículo endoplásmico; CaM, calmodulina; sGC, guanilato ciclasa soluble; GTP, guanosín trifosfato; cGMP, guanosín monofosfato cíclico; PKG, proteínquinasa G; CLM, cadena ligera de la miosina

La disminución de la síntesis y biodisponibilidad del NO y del H_2S representan una pérdida de homeostasis cardiovascular. El desequilibrio entre los factores vasoconstrictores y vasodilatadores constituye un fenómeno temprano que es

indicador de disfunción endotelial. Esto representa el comienzo de alteraciones vasculares importantes que anteceden patologías de prevalencia mundial como la hipertensión (Snyder y Ferris, 2000).

2.1.1.1.2 Sinergia entre las vías de los transmisores gaseosos NO y H_2S

La NOS y la CSE son activadas por la presencia del complejo CaM-Ca^{2+}, el cual se forma una vez que aumentan los niveles intracelulares de Ca^{2+} por el efecto que tiene el IP_3 en el RE. El IP_3 es uno de los subproductos de la degradación de PIP_2 por la PLC, el otro subproducto es el DAG. La PLC es activada por la subunidad αq de la proteina G, a la cual está acoplado el receptor membranal (Figura 1). Dicho receptor una vez que es activado por un ligando, inicia la cascada de señalización descrita (Heinrich *et al*., 2013).

Está reportado que entre los transmisores gaseosos existe una actividad sinérgica que mejora su producción o disminuye la degradación de segundos mensajeros, de manera que las vías bioquímicas permanecen activadas (Lee y Yen, 2008; Wang, 2012; Polhemus *et al*., 2014).

En estudios realizados en aorta de rata, se vio que el NO activa la sGC para generar cGMP, mientras que el H_2S es capaz de inhibir a la enzima PDE, lo cual disminuye la degradación del cGMP y así aumenta la actividad de la vía inducida por el NO (Figura 2) (Colleta *et al*., 2012; Wang, 2012; Heinrich et al., 2013).

Adicionalmente, se ha reportado que la activación de varias quinasas por el H_2S induce la fosforilación de la NOS en la ser 1177 o ser 1179. Se ha postulado que la vía anteriormente descrita, produce una activación mayor de la enzima, responsable de la biosíntesis del NO, que el complejo CaM-Ca^{2+} (Altaany *et al*., 2013).

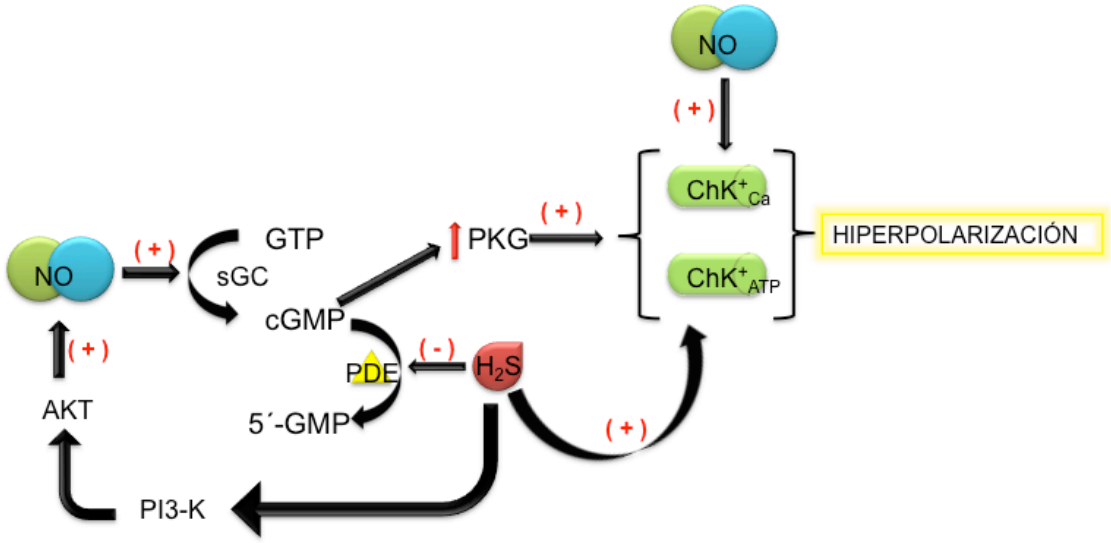


Figura 2. Interacción entre las vías del NO/cGMP y la vía del H_2S/CvK^+

2.1.2 Leucemia

Datos estadísticos de la OMS revelan que, en 2012, alrededor de 2 millones de muertes en el mundo fueron causadas por leucemia. De manera particular, tan solo en 2014 más de 10 mil muertes se relacionaron directamente con esta patología en nuestro país (OMS, 2014; INEGI, 2014).

A nivel mundial, el tipo de cáncer más común entre la población infantil (0-12 años de edad) es la leucemia linfoblástica aguda (LLA). Tres de cada cuatro casos de cáncer infantil es diagnosticado como LLA (American Cancer Society, 2014).

La mortalidad reportada relacionada con la LLA en nuestro país es de 851 niños (68.8%) y 386 niñas (31.2%) cada año. México presenta la mayor incidencia de esta enfermedad en Latinoamérica (Curado *et al*., 2011). En Querétaro, un estudio del Sistema Nacional de Vigilancia y Epidemiología reportó 114 muertes por LLA entre 2004-2011 (Secretaría de Salud, 2011).

2.1.2.1 Fisiopatología de la leucemia

La leucemia es un tipo de cáncer de células sanguíneas, específicamente los linfocitos, tanto tipo T como tipo B. Se conoce poco sobre la etiología de la leucemia, pero se sabe que existe un grado importante de susceptibilidad genética que incluyen mutaciones a los genes de receptores a citocinas y de la señalización de Ras (Zhang *et al*., 2012).

La leucemia se caracteriza por una producción descontrolada de células precursoras linfoides, cuyo DNA tiene una lesión adquirida o congénita. Esto a su vez incrementa de manera desproporcionada los niveles de linfocitos inmaduros en la circulación sanguínea (Zhang *et al*., 2012; Ward *et al*., 2014).

2.2 Estrategia global para la prevención y control de las ENT

Considerando la elevada prevalencia de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, la OMS lanzó un “Plan de Acción 2008-2013”. El cual promueve y motiva a la comunidad internacional a adoptar nuevas medidas para la prevención y control de las ENT.

Este plan consiste esencialmente en 6 objetivos (OMS, 2008):

1. Elevar la prioridad a las ENT en el desarrollo de programas de salud a nivel nacional e internacional, e integrar la prevención y el control de tales enfermedades en las políticas públicas.
2. Crear y fortalecer políticas y planes nacionales para la prevención y el control de las ENT.
3. Promover la reducción y modificación de hábitos que constituyen un factor de riesgo para las ENT: el consumo de tabaco, dietas insalubres, inactividad física y uso nocivo del alcohol.
4. Promover la investigación científica para la prevención y el control de las ENT.
5. Promover la formación de asociaciones que promuevan la prevención y el

control de las ENT.

6. Monitorear las ENT, sus determinantes y evaluar los avances a nivel regional, nacional y mundial.

En el punto número cuatro se habla sobre la promoción de la investigación científica. El documento especifica la importancia de evaluar la eficiencia, eficacia y bioseguridad de tratamientos utilizados en la medicina tradicional de cada país. Y promueve la creación de nuevos medicamentos más accesibles para la población de bajos recursos, así como la mejora de los tratamientos farmacológicos comerciales ya existentes (OMS, 2008).

2.3 Plantas medicinales y sus metabolitos bioactivos

México posee una rica tradición en el empleo de plantas medicinales. Se calcula que la flora medicinal mexicana contiene entre 3,000 y 5,000 plantas que tienen potencial terapéutico; de las cuales menos del 1% han sido estudiadas desde un punto de vista farmacológico (Esquivel-Gutiérrez *et al*., 2012).

Una característica que distingue a las plantas es su metabolismo secundario, mediante el cual biosintetizan una amplia variedad de compuestos que, a su vez, les atribuyen particularidades distintivas como: su color, su olor, su toxicidad o sus propiedades medicinales.

Las plantas medicinales son utilizadas para tratar una amplia variedad de afecciones, como: enfermedades cardiacas, estreñimiento, diarrea, úlceras, cólicos menstruales, fiebre, cefaleas, dermatitis, neuralgias, así como usos oftálmicos, antiinflamatorios, antitusivos, antitumorales, entre otros (Savithramma *et al*., 2011).

Los metabolitos secundarios biosintetizados en plantas pueden clasificarse según su estructura química en: alcaloides, flavonoides, terpenoides

(monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos) y aminoácidos no peptídicos, entre otros (Figura 3) (Savithramma *et al*., 2011).

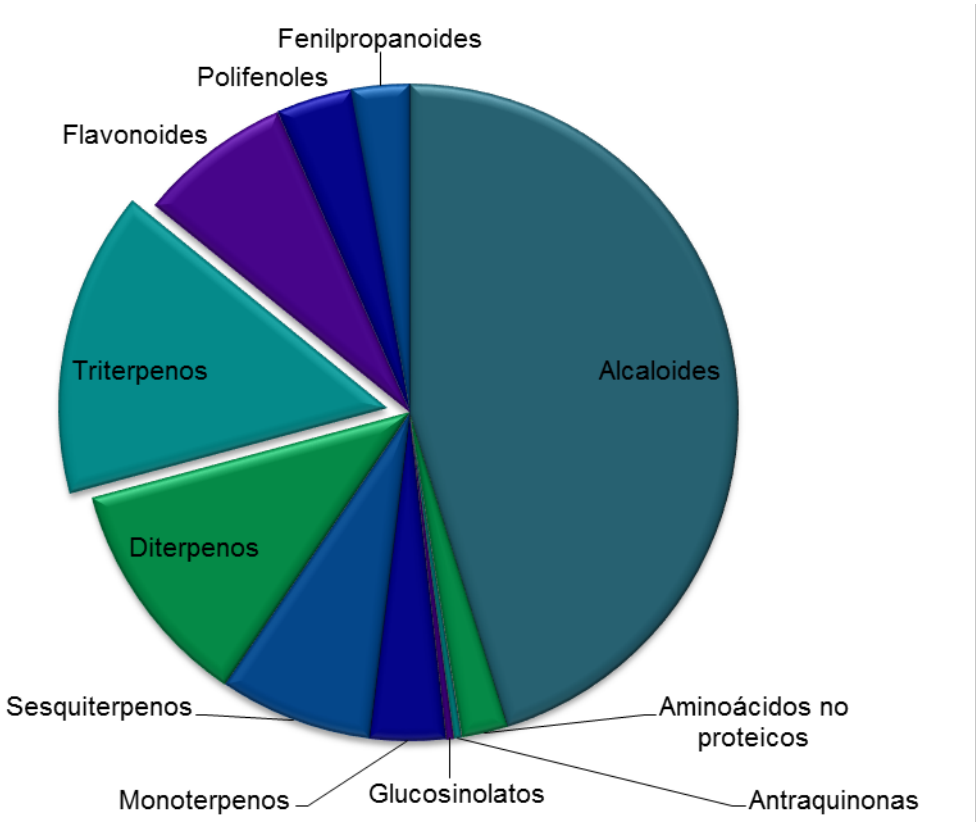


Figura 3. Proporción estimada de la presencia de metabolitos secundarios mayoritarios de las plantas medicinales (Acamovic y Brooker, 2005)

Así mismo, los metabolitos secundarios pueden ser clasificados según el efecto bioactivo que tienen, el cual dependerá de su blanco molecular. El estudio realizado por Acamovic y Brooker en 2005, esquematiza todos los posibles blancos farmacológicos que podrían tener los distintos metabolitos secundarios de origen vegetal en una célula animal (Figura 4).

Los triterpenos son metabolitos secundarios provenientes de especies vegetales, algunos de los cuales son utilizadas en la medicina tradicional para tratar la

hipertensión (Aguirre-Crespo *et al*., 2006; Rodriguez-Rodriguez *et al*., 2006). De igual manera, varios estudios corroboran el efecto citotóxico de los triterpenos en líneas celulares neoplásicas (Wang *et al*., 2013).

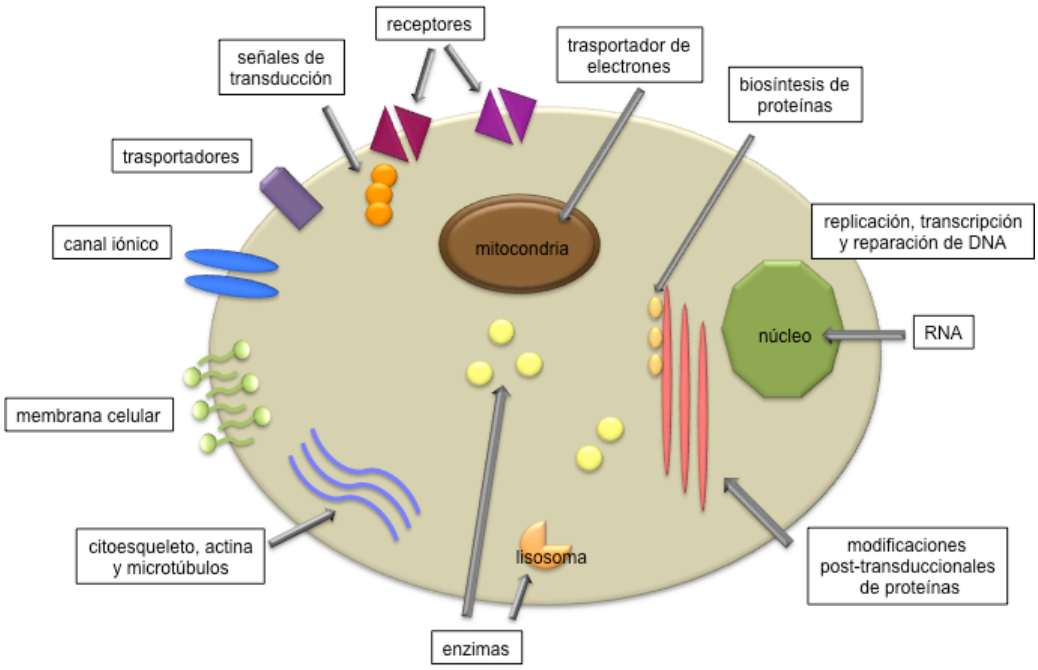


Figura 4. Blancos celulares farmacológicos para metabolitos secundarios de plantas (modificación de Acamovic y Brooker, 2005)

2.4 Triterpenos

Los triterpenos son metabolitos secundarios biosintetizados en una gran variedad de especies vegetales, mediante la vía del acetato-mevalonato (Chappell, 2002).

Estos compuestos poseen una amplia distribución en la naturaleza y producen una amplia variedad de efectos farmacológicos entre los que destacan sus efectos vasodilatador y antineoplásico. Por esta razón, estos metabolitos presentan un elevado potencial en el tratamiento de diversas enfermedades

(Somova *et al*., 2003; Siddique y Saleem, 2011; Gao *et al*., 2011; Gao *et al*., 2012; Uto *et al*., 2013).

2.4.1 Efecto vasodilatador de triterpenos

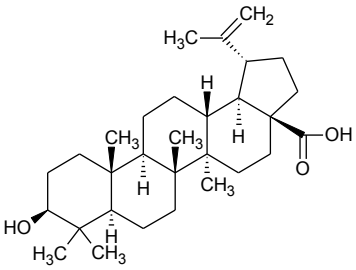
En un estudio realizado en 2009 por nuestro grupo de investigación, se encontró que el ácido ursólico es el compuesto mayoritario presente en un extracto apolar del fruto de *Prunus serotina*, comúnmente conocido como capulín. Mediante el ensayo de aorta aislada de rata, se demostró que el ácido ursólico posee un efecto vasodilatador dependiente de endotelio; el efecto máximo (E_{max}) de este triterpeno fue significativamente mayor al inducido por la acetilcolina (ACh), utilizada como control positivo (Luna-Vázquez, 2009).

Sin embargo, a la fecha no se conoce con precisión el mecanismo de acción, mediante el cual los triterpenos ejercen su efecto vasodilatador. Por esta razón, se realizó un sondeo farmacológico en dónde se evaluó la participación de los transmisores gaseosos NO, monóxido de carbono (CO) y H_2S en la generación del mecanismo de acción vasodilatador de seis triterpenos: ácido betulínico, ácido ursólico, ácido oleanólico, friedelina, uvaol y lupeol (Figura 5). Se utilizaron inhibidores de las enzimas productoras de estos tres transmisores gaseosos: éster metílico de L-arginina (L-NAME) para la inhibición de la NOS, enzima productora de NO; la mesoporfirina-IX (meso-IX) para inhibir la hemooxigenasa-II (HO-II), enzima productora del CO; y la propargilglicina (PPG) para inhibir a la CSE, enzima responsable de la producción de H_2S.

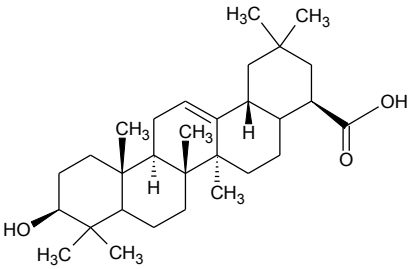
Su efecto vasodilatador depende de la presencia de células endoteliales. Todos los triterpenos evaluados presentaron un efecto vasodilatador dependiente de su concentración. Sin embargo, solo el ácido ursólico y el uvaol tuvieron un efecto vasodilatador significativamente mayor al de la ACh. El resto de los compuestos evaluados presentaron una vasodilatación menor al 70%, de los cuales el lupeol presentó el E_{max} más bajo (Figura 6) (Tabla 2). El uvaol fue aproximadamente 2

veces más potente que la ACh y 5 veces más potente que el ácido ursólico. El resto de los compuestos evaluados presentaron un E_{max} menor al del control positivo (Solís-Gutiérrez, 2013).

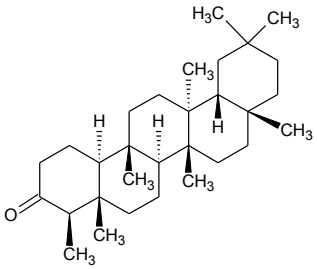
Nuestros experimentos también indicaron que los tres transmisores gaseosos contribuyen al efecto vasodilatador producido por los triterpenos estudiados. La vía bioquímica que participa en mayor media al efecto vasodilatador de los triterpenos es la vía del NO/cGMP, seguida de la vía del H_2S/CvK^+. Mientras que la vía del CO/cGMP no participó de manera significativa en la generación del efecto vasodilatador de cada uno de los triterpenos seleccionado para este estudio (Solís-Gutiérrez, 2013).



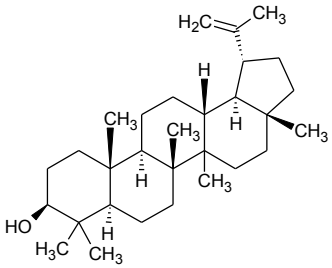
Ácido betulínico



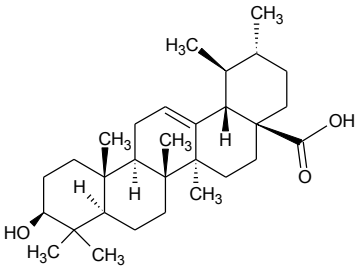
Ácido oleanólico



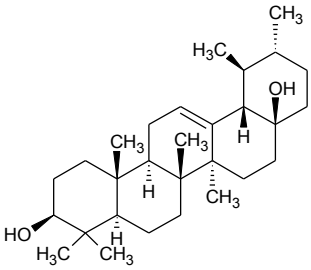
Friedelina



Lupeol



Ácido ursólico



Uvaol

Figura 5. Estructuras químicas y nombres de los triterpenos elegidos para estudios farmacológicos

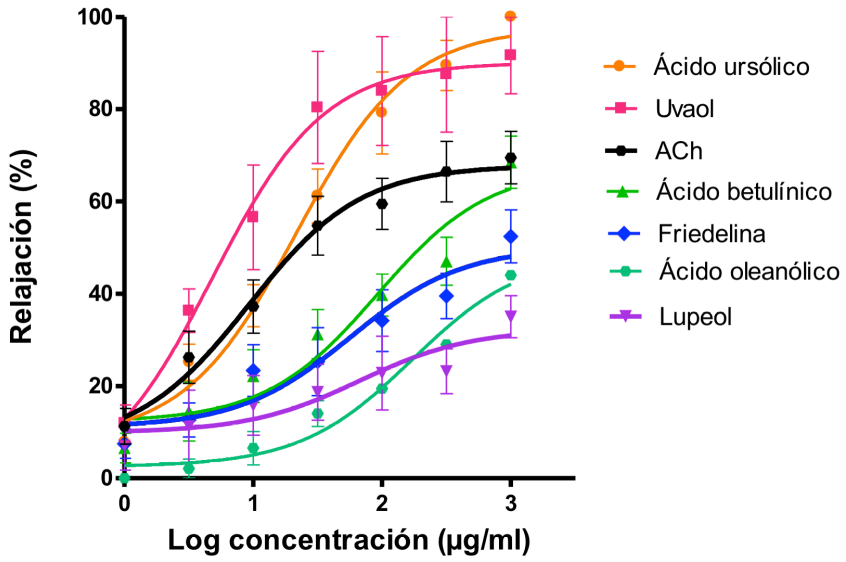


Figura 6. Curvas concentración respuesta del efecto vasodilatador producido por triterpenos (Solís-Gutiérrez, 2013)

Tabla 2. Valores de la concentración efectiva media (CE_{50}) y el efecto máximo (E_{max}) del efecto vasodilatador de los triterpenos objeto de estudio (Solís-Gutiérrez, 2013)

	CE_{50} (µg/ml)	**E_{max} (%)**	**Potencia**
Ácido ursólico	21.6 ± 1.2	97.7 ± 3.9	0.4
Uvaol	4.8 ± 1.1	90.1 ± 5.5	1.8
ACh	8.7 ± 0.8	69.5 ± 5.7	1
Ácido betulínico	91.7 ± 32.6	67.4 ± 6.8	0.09
Friedelina	56.8 ± 2.2	50.2 ± 5.9	0.15
Ácido oleanólico	140.7 ± 19.8	47.2 ± 4.9	0.06
Lupeol	66.7 ± 16.9	32.4 ± 6.5	0.13

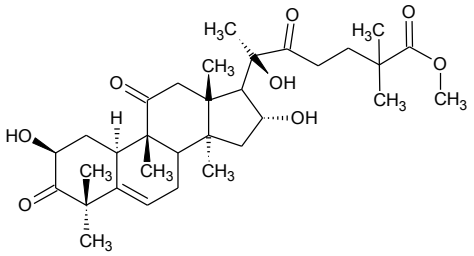
2.4.2 Efecto citotóxico de triterpenos

Estudios anteriores han sugerido que el ácido brionólico y la dihidrocucurbitacina B tienen un efecto antiinflamatorio mediante la disminución de citocinas proinflamatorias como: la IL-1β, la IL-4 y el TNF-α. Las cuales son esenciales en el proceso de reclutamiento, activación y supervivencia de células inmunes (Figura 7) (Rios, 2010).

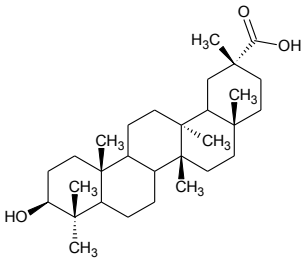
En 2013, Wang *et al*. comprobaron que el triterpeno ácido ursólico disminuye la proliferación, inhibe la migración e induce apoptosis, en células de cáncer de colon, mediante la activación de varias vías intracelulares de manera simultánea. Este triterpeno disminuye la expresión de la E-cadherina1, afectando procesos de migración celular. Así mismo, este compuesto inhibe la fosforilación de la quinasa Akt y la proteína ERK, que están íntimamente involucradas en procesos de proliferación celular.

Adicionalmente, el ácido ursólico actúa como un potente antitumorigénico, mediante la modulación de la activación del NF-κβ. Este efecto es producido por varios mecanismos: 1) la inhibición de la quinasa IK (IKK), así disminuye la fosforilación del factor inhibidor de κβ (IκB) en la Ser 32 y Ser 36; 2) inhibición de la degradación de IκB por proteasomas, mediante el bloqueo de la ubiquitinación de la Lys 21 y la Lys 22 y 3) inhibición de la fosforilación de p65 para la translocación al núcleo del heterodímero p65-p50 que constituye NF-κβ. Los mecanismos antes mencionados llevan a la disminución en la expresión de genes necesarios para la supervivencia y proliferación celular. Adicionalmente, en la línea celular Jurkat E6-1, el efecto inmunomodulador del ácido ursólico disminuye su capacidad de biosintetizar citocinas e interleucinas, reduciendo así la respuesta inflamatoria, principio fisiopatológico de muchas enfermedades (Shishodia *et al*., 2003; Checker *et al*., 2012; Prasad *et al*., 2012;).

El efecto proapoptótico del ácido ursólico se demostró también en cultivos de células leucémicas, el cual fue inducido mediante la activación de quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Gao *et al*., 2012). Por otro lado, aunque no se han estudiado con profundidad los mecanismos intracelulares, por medio de los cuales actúa el uvaol, también se ha visto que dicho análogo estructural del ácido ursólico influye negativamente en la proliferación y supervivencia de células cancerígenas (Ovesná *et al*., 2006; Uto *et al*., 2013).



Dihidrocucurbitacina B



Ácido brionolico

Figura 7. Estructuras químicas de triterpenos con efecto inmunomodulador

Las estructuras químicas de los triterpenos y las hormonas esteroideas (andrógenos, progestágenos y derivados de ambos) son similares, ya que tienen su origen biosintético en el escualeno, molécula de 30 átomos de carbono, que en células animales, da lugar al pentanoperhidrofenantreno, precursor del

colesterol y las hormonas esteroideas, mientras que el escualeno en células vegetales es precursor de todos los triterpenos (Figura 8) (Thimmappa *et al*., 2014).

Los receptores canónicos de las hormonas esteroideas son intracelulares. Estos receptores, al ser activados por sus ligandos naturales, se traslocan a núcleo induciendo la transcripción de diferentes genes (Levin, 2015). Sin embargo, se han encontrado receptores membranales acoplados a proteínas G para estrógeno, testosterona y otros andrógenos. La activación de estos receptores no es específica. Estos ligandos esteroideos interactúan con una región conservada de reconocimiento al colesterol (CRAC, *Cholesterol Recognition/Interaction Aminoacid Consensus Sequence*, por sus siglas en inglés), presente en estos receptores (Wang *et al*., 2014).

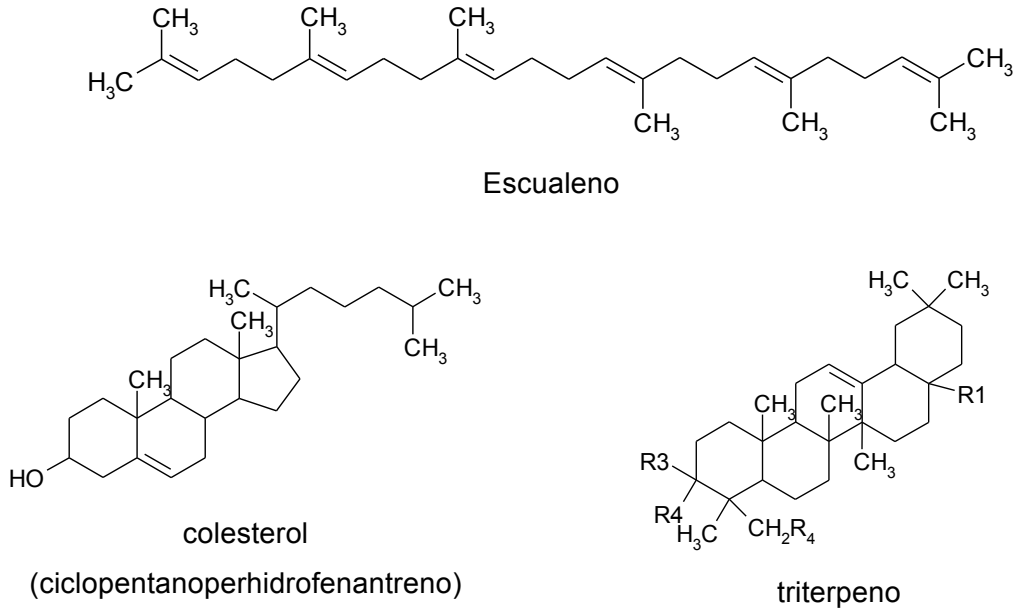


Figura 8. Escualeno, precursor estructural del colesterol en células animales y de los triterpenos en células vegetales

Específicamente, se ha reportado la presencia de receptores membranales específicos para hormonas esteroideas en linfocitos T (Dosiou *et al*., 2008), como es el caso del receptor membranal a progesterona (mPGR), el cual es un RAPG, cuya activación resulta en una disminución del segundo mensajero adenosina monofosfato cíclico (cAMP) y, por lo tanto, de la proteínquinasa tipo A (PKA) (Zhu *et al*., 2003 a; Zhu *et al*., 2003 b). La activación de dichos receptores resulta en una notable disminución en la supervivencia y proliferación de los linfocitos T (Ndiaye *et al*., 2012).

2.4.2.1 Efecto citotóxico producido por transmisores gaseosos en células del sistema inmune

La biosíntesis de NO y de H_2S se lleva a cabo de manera similar en todos los tipos celulares. En células del sistema inmunológico se activa la iNOS para producir NO y la CSE para aumentar las concentraciones de H_2S. Así mismo, el mecanismo de acción y el efecto fisiológico que tienen los transmisores gaseosos cambia según el tipo celular.

En el caso de macrófagos y linfocitos, cuya interacción con patógenos forma parte de la respuesta coordinada del sistema inmunológico ante un proceso infeccioso, se ha visto que aumenta la producción del transmisor gaseoso NO, cuando estas células se encuentran activadas; el NO se oxida rápidamente a nitritos y nitratos. Dichos subproductos del NO son altamente tóxicos para los microorganismos, combatiendo así el proceso infeccioso. Las especies reactivas de nitrógeno (RNS) son igualmente nocivas para el metabolismo celular que las especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo que se puede considerar al NO como un importante factor antimicrobiano (Nathan, 2014).

Sin embargo, el estrés nitrosativo, producido por un aumento de RNS, afecta no solo el metabolismo de los microorganismos, sino que también puede interferir en procesos de proliferación de las células hospederas en una manera

dependiente de la concentración. Estudios anteriores han demostrado que concentraciones bajas (picomolares y nanomolares) de NO favorecen procesos de crecimiento, proliferación y supervivencia celular; mientras que concentraciones micromolares o mayores inducen arresto en la fase G1 del ciclo celular e incluso apoptosis (Hammami *et al*., 2012; Napoli *et al*., 2013). Este fenómeno se sustenta en la modificación posttransduccional más común que el NO tiene sobre las proteínas, la S-nitrosilación (Hammami *et al*., 2012).

Por otro lado, la modificación posttransduccional más importante del H_2S sobre las proteínas es la S-sulfhidración de proteínas en sus residuos de Cys (Paul y Snyder, 2012; Yang, 2014). Lo anterior da lugar a una cascada de señalización de MAPK que resulta en una doble fosforilación en el motivo Thr-Gly-Tyr de la quinasa p38, a la cual activa (Altaany *et al*., 2013).

Cambios en el ciclo celular de adipocitos, neuronas y varios subtipos de células del sistema inmunológico como macrófagos y linfocitos T, han sido relacionados a la activación de p38. La actividad quinasa de p38 inhibe a CDC25a, fosfatasa responsable de eliminar el grupo fosfato del sitio inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK), específicamente de CDK-4 y CDK-6 que interactúan con la ciclina-D para iniciar la fase de crecimiento G1 del ciclo celular; y con la CDK-2 que se une específicamente a la ciclina-E para iniciar la fase de síntesis o replicación del DNA. La fosforilación de CDC25a impide la continuación del ciclo celular normal, inhibiendo así la proliferación y supervivencia de las células afectadas (Figura 9) (Thorthon y Rincon, 2009).

La importancia de los transmisores gaseosos como mediadores de la respuesta celular en diversas enfermedades los han hecho el punto central de muchas investigaciones. La participación del NO y el H_2S en el mecanismo de acción de algunos triterpenos, permite ampliar la comprensión actual de las vías bioquímicas involucradas por estos metabolitos secundarios. Adicionalmente,

estos metabolitos secundarios constituyen valiosos prototipos estructurales potencialmente útiles en el desarrollo de fármacos para la prevención y el tratamiento de enfermedades de gran prevalencia mundial como la hipertensión y la LLA.

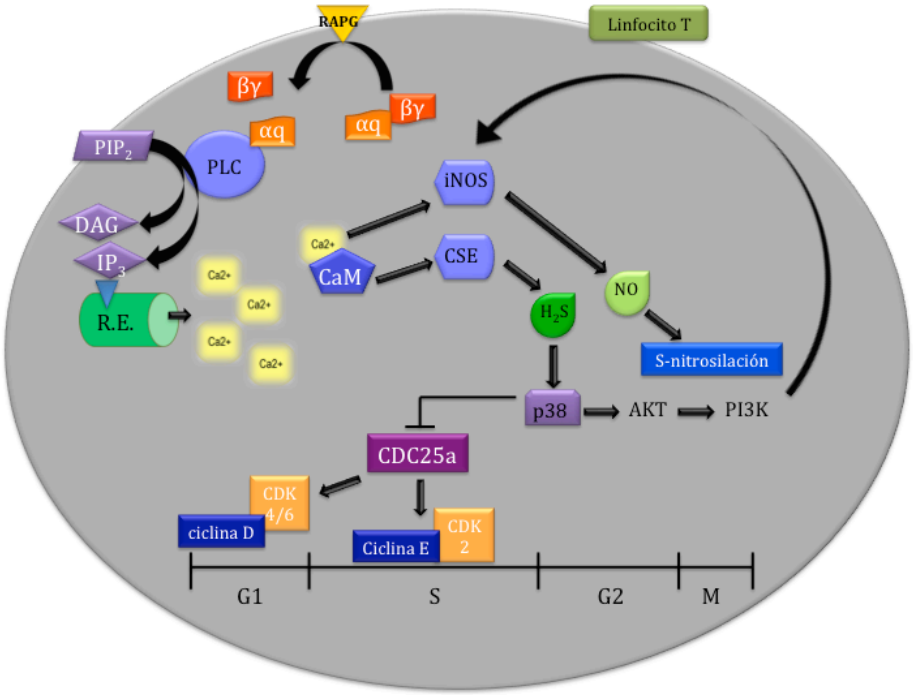


Figura 9. Síntesis y mecanismo de acción del NO y el H_2S en los linfocitos T. RAPG, receptor acoplado a proteína G; PLC, fosfolipasa C; PIP_2, fosfatidilinositol difosfato; IP_3, inositol trifosfato; DAG, diacilglicerol; R.E., retículo endoplásmico; CaM, calmodulina; p38, proteína 38; PI3K, fosfoinositol-3-quinasa; CDC25a, proteína de división del ciclo celular tipo 25 homologo a (serina-treonina fosfatasa); CDK, quinasa dependiente de ciclina; G1, fase de crecimiento 1 del ciclo celular; S, fase de síntesis de DNA; G2, fase de crecimiento 2; M, mitosis

3. HIPÓTESIS

El ácido ursólico y el uvaol inducen vasodilatación y reducen la proliferación de células jurkat mediante el incremento en los niveles de NO y H_2S.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar la participación de los transmisores gaseosos NO y H_2S en el efecto vasodilatador y la proliferación de linfocitos T producidos por el ácido ursólico y el uvaol.

4.2 Objetivos Específicos

- Cuantificar el aumento en los niveles de NO y H_2S en aorta de rata producido por el ácido ursólico y uvaol, utilizando ensayos bioquímicos de actividad enzimática.

- Determinar el efecto sobre la tasa de proliferación de cultivos celulares de linfocitos T producido por el ácido ursólico y uvaol.

- Cuantificar el aumento en los niveles de NO y H_2S en cultivos de linfocitos T previamente tratados con los triterpenos ácido ursólico y uvaol, mediante ensayos bioquímicos de actividad enzimática.

5. METODOLOGÍA

5.1 Materiales

5.1.1 Material biológico

5.1.1.1 Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (250-300 g) proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Su cuidado y mantenimiento se llevó a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio; y lo indicado por el International Counsil for Laboratory Animal Science (ICLAS).

5.1.1.2 Aorta aislada de rata

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación después de ser anestesiadas dentro de una cámara hermética con dióxido de carbono (CO_2) (NOM-062-ZOO-1999). La aorta se extrajo con cuidado y se colocó en una solución fría de Krebs-Henseleit burbujeada con una mezcla de oxígeno-dióxido de carbono (O_2-CO_2) en una proporción de 95:5, respectivamente. El vaso sanguíneo se limpió de todo el tejido graso y conectivo; posteriormente, la aorta fue segmentada en anillos de 3-4 mm de largo, cada uno de los cuales fue preparado para su uso, según la técnica experimental para la cual estaban destinados.

5.1.1.3 Células Jurkat E6-1

Las células de la línea de linfocitos T humanos (Jurkat, ATCC. No. TIB 152), fueron donadas por la Dra. Elvira Núñez de la Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo.

5.1.2 Compuestos químicos y solventes

Todas las sales, reactivos, solventes y medio de cultivo RPMI, se obtuvieron de Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA).

5.1.3 Solución fisiológica de Krebs-Henseleit

Solución de Krebs-Henseleit para aorta: pH 7.4; NaCl 126.8 mM, KCl 5.9 mM, $CaCl_2$ 2.5 mM, $MgCl_2$ 1.2 mM, $NaHCO_3$ 30 mM, NaH_2PO_4 1.2 mM y D-glucosa 5 mM en agua destilada (Forstermann *et al*., 1994; Feelisch *et al*., 1999).

5.2 Métodos

5.2.1 Actividad de la eNOS en arteria

El ensayo de Griess se llevó a cabo para cuantificar los nitritos (NO_2^-) que se generan de manera natural a partir del proceso de oxidación del NO, por lo que un incremento en la concentración de NO_2^- corresponde a un incremento en la producción de NO por la NOS, de tal manera que se midió la actividad enzimática por la cuantificación de sus subproductos.

5.2.1.1 Preparación de la muestra de arteria

Cada uno de los anillos fue colocado en un tubo Eppendorf de 2 ml con 1000 µl de solución de Krebs-Henseleit previamente oxigenada, durante 10 minutos en agitación leve a 37ºC. Una vez transcurrido este tiempo, se desecharon los 1000 µl de solución fisiológica y se renovaron por 950 µl de la misma, adicionalmente se agregaron 50 µl de los reactivos de prueba: ACh ($1x10^{-4}$ M) como control positivo, ácido ursólico (47 µM) y uvaol (11 µM); al control negativo se agregaron 50 µl de solución de Krebs. Las muestras se dejaron reposando durante 30 minutos en agitación constante a 37ºC.

5.2.1.2 Medición de la actividad enzimática de la eNOS en arteria

Se colocaron 150 µl del sobrenadante en una microplaca, se adicionaron 130 µl de solución de Krebs-Henseleit a temperatura ambiente y en cada pozo, se agregaron 20 µL del reactivo de Griess (10 µl de ácido sulfanílico al 1% en ácido fosfórico (H_3PO_4) al 5% y 10 µl de N-naftiletilendiamina en H_3PO_4 al 5%).

El orden de adición de estos reactivos es crucial para el éxito del ensayo, por lo que primero se agregó el ácido sulfanílico y 3 minutos después se agregó el volumen correspondiente de N-naftiletilendiamina para llevar a cabo la formación del compuesto *azo*, responsable de la coloración en la reacción. Por último, se llevó a cabo la medición colorimétrica en un espectrofotómetro a 548 nm.

La curva de calibración se preparó de manera similar, utilizando estándares de NO_2^- en concentraciones de 0 a 125 µM.

5.2.2 Actividad de la CSE en arteria

Este ensayo enzimático se llevó a cabo para cuantificar por un método colorimétrico la concentración de H_2S. Este gas fue sometido a una serie de reacciones para dar lugar a la formación de una “trampa de zinc”, de manera que fue posible medir la actividad de la CSE por la cuantificación de su producto, el transmisor gaseoso H_2S.

5.2.2.1 Preparación de la muestra de arteria

Cada segmento de aorta se pesó y se homogenizó. Se utilizó solución amortiguadora de Tris-HCl 20 mM a un pH ajustado de 7.5, el cual contenía un coctel inhibidor de proteasas; la solución amortiguadora se mantuvo en hielo. Para llevar a cabo la homogenización del tejido, se agregaron 300 µl de la solución amortiguadora helada al tejido. Durante dicho tratamiento se hicieron otras dos adiciones de 300 µl de la solución amortiguadora hasta alcanzar un

volumen total de 900 µl del homogenado. Todo el procedimiento se llevó a cabo en frío.

El homogenado resultante de cada aorta se transfirió a un tubo eppendorf, el cual fue agitado por 2 horas a 4ºC. Transcurrido este tiempo se centrifugó por 15 minutos a 12,000 rpm, se separó el sobrenadante de la pastilla y se conservaron ambos hasta el final del proceso experimental.

5.2.2.2 Medición de la actividad enzimática de CSE en arteria

En tubos eppendorf de 2 ml en un baño de hielo, se agregaron 50 µl del sobrenadante, 50 µl de la molécula a evaluar en una concentración de acuerdo a su CE_{50} previamente determinada (ACh, $1x10^{-4}$ M como control positivo; ácido ursólico, 47 µM; y uvaol 11 µM). Se agregaron 20 µl de piridoxal-5´-fosfato (2 mM), 20 µl de L-cisteína (10 mM) y 30 µl de solución de Krebs; la mezcla se dejó en reposo durante 30 minutos en un baño con agitación a 37ºC.

Transcurrido este tiempo se adicionaron 250 µL de acetato de zinc (ZnAc) (1%) para formar la trampa del H_2S, 250 µL de ácido tricloroacético (TCA) (10%), seguido de 133 µL de sulfato de N,N-dietil-p-fenilendiamina (DPD) (20 mM) diluido en ácido clorhídrico (HCl) (7.2 M) y por último 133 µL de tricloruro de hierro ($FeCl_3$) (30 mM) diluido en HCl (1.2 M).

Se dejó reposar la reacción a temperatura ambiente por 20 minutos y por último se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 650 nm.

La curva de calibración se preparó con estándares de hidrosulfuro de sodio (NaHS) en concentraciones de 3-250 µM y se les dio a los estándares el mismo tratamiento que a las muestras (Bucci *et al*., 2010; Coletta *et al*., 2012; Kolluru *et al*., 2013).

5.2.3 Cultivos celulares de linfocitos T de la línea Jurkat E6-1

5.2.3.1 Ensayos de duplicación celular

Las células Jurkat E6-1 se sembraron en cajas Petri adecuadas para cultivos celulares, con medio de cultivo RPMI adicionado con los antibióticos: penicilina, estreptomicina y fungizona, así como suero fetal bovino al 20%. Se mantuvieron en condiciones ideales de temperatura a 37ºC y una concentración de O_2:CO_2 de 95:5.

En una caja de 12 pozos, se sembraron 2.5 x 10^5 células/ml por pozo, como se muestra en la Figura 10, y se mantuvieron en las condiciones ideales de incubación para realizar conteos celulares a las 12, 24, 48 y 72 horas posteriores a la siembra, con el fin de conocer la tasa de duplicación de dicha línea celular en las condiciones descritas anteriormente.

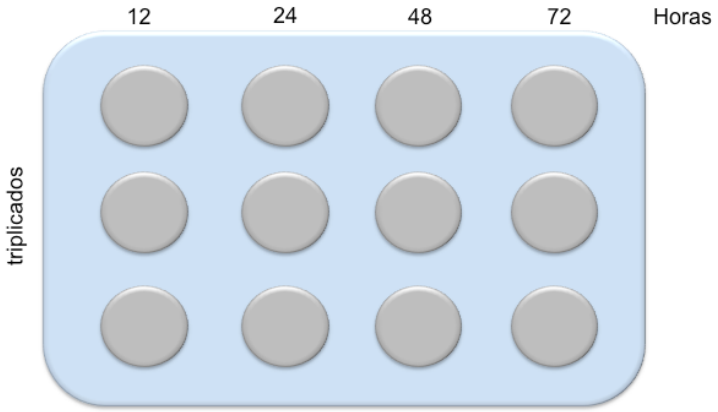


Figura 10. Caja de cultivo para la curva de duplicación de células Jurkat E6-1

5.2.3.2 Efecto de los triterpenos ácido ursólico y uvaol en la tasa de proliferación de células Jurkat E6-1

Para calcular el E_{max} y la CE_{50} de cada uno de los triterpenos estudiados, se probaron diferentes concentraciones (1 a 251.2 μM), tanto del ácido ursólico como del uvaol en diferentes pozos que contenían un total de 1 x 10^6 células/ml.

Posteriormente, se llevaron a cabo conteos celulares por triplicado para cada concentración, 24 y 48 horas después de la siembra con el tratamiento.

Una vez que se obtuvo la CE_{50}, se utilizó para estudiar el efecto de los transmisores gaseosos, NO y H_2S, sobre la proliferación inducida por los triterpenos.

5.2.3.3 Actividad de la iNOS en cultivos de linfocitos T

La cuantificación de NO_2^-, generado en los cultivos de linfocitos T a partir de la adición de ácido ursólico y uvaol, permitió conocer el incremento en la actividad de la enzima NOS.

5.2.3.3.1 Preparación de la muestra de linfocitos T

Se utilizaron un total de 0.5 x 10^6 células/ml para llevar a cabo el tratamiento necesario para los ensayos de actividad enzimática con los triterpenos, un control sin tratamiento y nitroprusiato de sodio (SNP) 1 mM, como donador de NO (Chen *et al*., 2011). Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

5.2.3.3.2 Medición de la actividad enzimática de la iNOS en cultivos de linfocitos T

La cuantificación de NO producido en los cultivos de linfocitos T posterior a la estimulación con los triterpenos y con el SNP, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita anteriormente en el punto 5.2.1.2.

5.2.3.4 Actividad de la CSE en cultivos de linfocitos T

Se cuantificó por un método colorimétrico la concentración del gas H_2S producido en los cultivos celulares de linfocitos T. Se realizó mediante la preparación de una “trampa de zinc”, para así medir indirectamente la actividad de la enzima CSE en dichas células ante la estimulación con los triterpenos ácido ursólico y uvaol.

5.2.3.4.1 Preparación de la muestra de linfocitos T

Se sembraron aproximadamente 0.5 x 10^6 células/ml para llevar a cabo el tratamiento necesario para los ensayos de actividad enzimática, tanto con los triterpenos así como con un control sin tratamiento y el donador de H_2S, NaHS 10 mM (Ryazantseva *et al*., 2011; Kanno *et al*., 2013). Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

5.2.3.4.2 Medición de la actividad enzimática de la CSE en cultivos de linfocitos T

La cuantificación de H_2S, producido en los cultivos de linfocitos T posterior a la estimulación con los triterpenos y con el NaHS, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita anteriormente en el punto 5.2.2.2.

5.3 Análisis estadístico

Las curvas concentración-respuesta (CCR) se construyeron utilizando el programa estadístico PRISMA 5.0 y se calculó el E_{max} y la CE_{50}. Todos los resultados obtenidos fueron analizados utilizando una ANOVA de una vía y prueba *post-hoc* de Tukey, y fueron expresadas como la media ± SEM. Aquellos resultados cuya $p < 0.05$ denotan diferencia estadísticamente significativa.

6. RESULTADOS

6.1 Efecto de los triterpenos sobre la actividad enzimática de la eNOS en arteria

Mediante la utilización de la técnica de Griess, se determinó que los triterpenos, ácido ursólico y uvaol, incrementaron los niveles de nitritos en los anillos de aorta de rata. La cantidad de nitritos cuantificada mediante este ensayo es directamente proporcional a la cantidad de NO biosintetizado por la enzima NOS (Coneski y Schoenfisch, 2012).

Los valores de la concentración de NO en arteria estimulada con los triterpenos, se calcularon utilizando la ecuación de regresión lineal obtenida a partir de una curva de calibración (Figura 11).

$$y = 0.0163x + 0.1086$$

$$r^2 = 0.9934$$

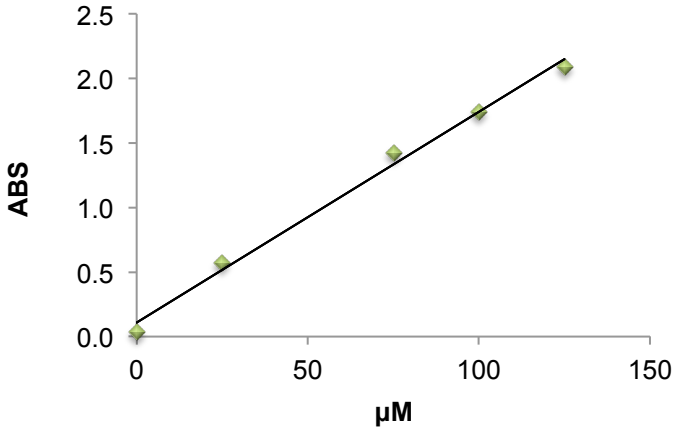


Figura 11. Curva de calibración de NO_2^- y su ecuación de regresión lineal correspondiente

El ácido ursólico indujo la mayor producción de NO (43.61 ± 1.67 µM) en aorta de rata, seguido del uvaol (31.63 ± 0.72 µM); ambos triterpenos indujeron una

mayor producción de NO que la ACh (24.88 ± 1.22 μM), la cual fue utilizada como control positivo. Si tomamos el control negativo como las condiciones de normalidad en el tejido arterial, se puede observar que el ácido ursólico aumentó 10 veces más la producción de NO y el uvaol lo hizo 7 veces más que en condiciones normales (Tabla 3; Figura 12).

Tabla 3. Valores de concentración de nitritos por estimulación con la CE_{50} de triterpenos y controles evaluados en aorta

Compuesto evaluado	Concentración de nitritos (μM)	Producción de nitritos comparado con el control
Ácido ursólico	43.61 ± 3.74	10
Uvaol	31.63 ± 1.63	7
ACh	24.88 ± 2.75	6
Control	4.26 ± 0.26	1

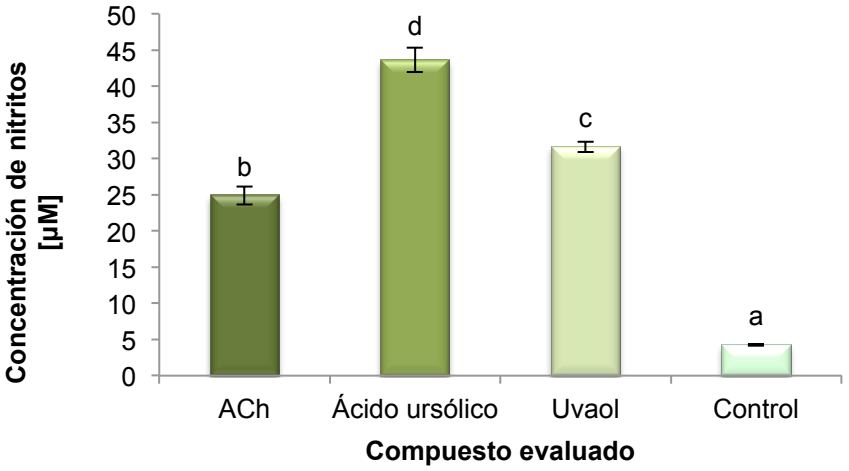


Figura 12. Representación en gráfica de barras de la concentración de nitritos ante la estimulación de cada uno de los compuestos evaluados. Todos los datos se presentan como la media ± SEM, calculada con la prueba de Tukey al 95%. Diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa

6.2 Efecto de los triterpenos sobre la actividad enzimática de la CSE en arteria

Los triterpenos, ácido ursólico y uvaol, incrementaron notablemente los niveles del transmisor gaseoso H_2S.

Utilizando una curva de calibración de NaHS en concentraciones crecientes, se obtuvo una ecuación de regresión lineal, con la cual se calcularon las concentraciones correspondientes de H_2S en las muestras (Figura 13).

$$y = 0.0001x + 0.0497$$

$$r^2 = 0.9938$$

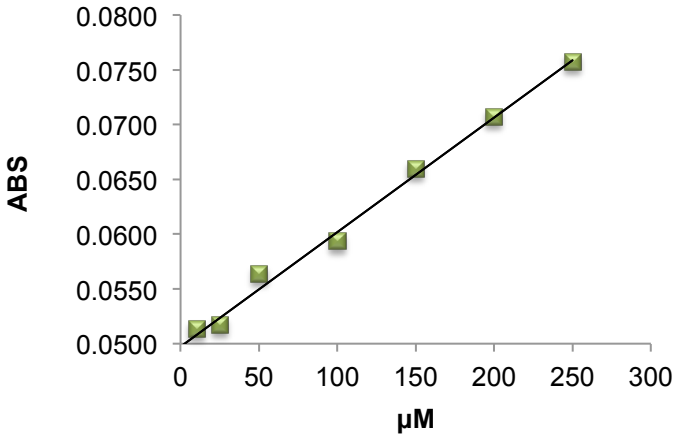


Figura 13. Curva de calibración de NaHS y su ecuación de regresión lineal correspondiente

Contrario a los resultados obtenidos con relación a los niveles de NO, la estimulación con el uvaol (4098 ± 61.19 µM) produjo la mayor concentración de H_2S, seguido del ácido ursólico (2570.5 ± 137.07 µM). Ambos triterpenos, también en este caso, indujeron mayor producción de H_2S que la ACh. La producción de H_2S en tejido vascular aumentó 9 veces más, cuando éste es

estimulado con uvaol, 6 veces más ante la presencia de ácido ursólico y sólo 3 veces más con el control positivo, la ACh (Tabla 4; Figura 14).

Tabla 4. Valores de concentración de H_2S por estimulación con la CE_{50} de triterpenos y controles evaluados en aorta

Compuesto evaluado	Concentración de H_2S (μM)	Producción de H_2S comparado con el control
Ácido ursólico	2570.5 ± 137.07	6
Uvaol	4098 ± 61.19	9
ACh	1394.7 ± 57.7	3
Control	424.7 ± 70.5	1

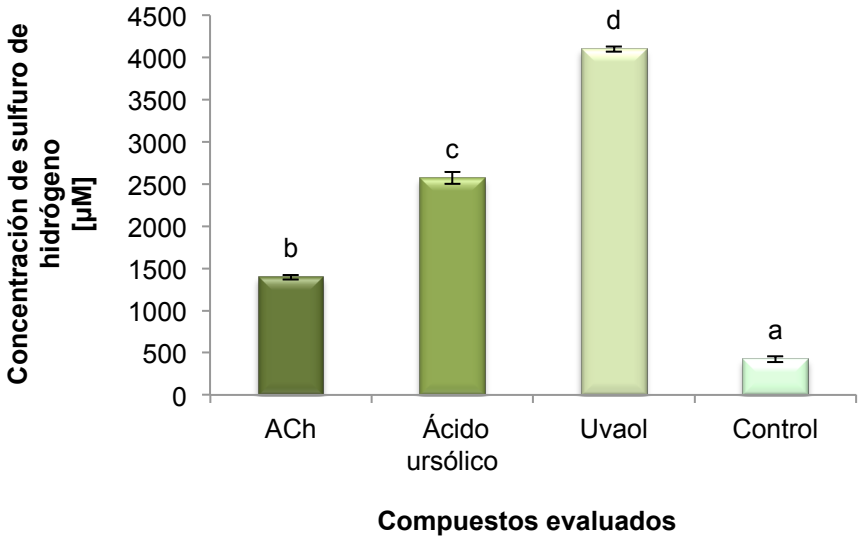


Figura 14. Representación en gráfica de barras de la concentración de H_2S ante la estimulación de cada uno de los compuestos evaluados. Todos los datos se presentan como la media ± SEM, calculada con la prueba de Tukey al 95%. Diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa

6.3 Efecto de los triterpenos ácido ursólico y uvaol sobre la tasa de proliferación de linfocitos T

El número de linfocitos T sin tratamiento (3,150,000 ± 184,000 células viables) no presenta diferencia estadísticamente significativa con las células sembradas con el vehículo utilizado para la dilución de los triterpenos, el DMSO (3,270,000 ± 169,000 células viables) (Figura 15).

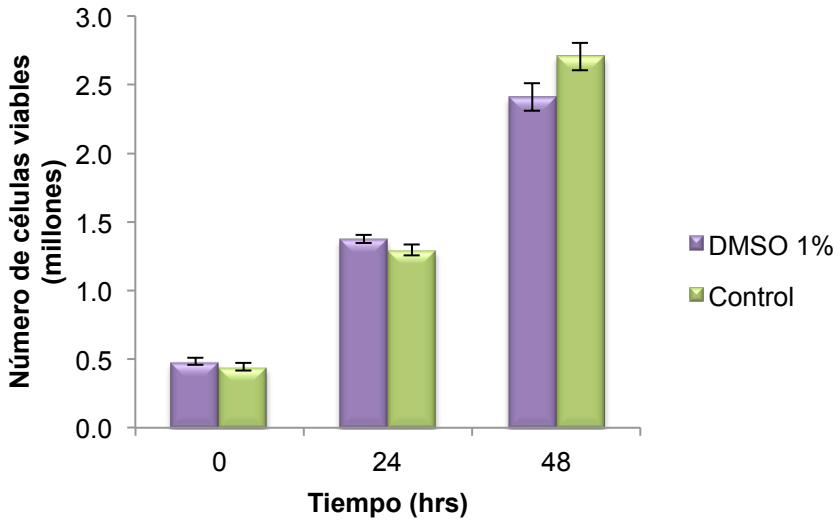


Figura 15. Efecto del DMSO en la proliferación de linfocitos T. Todos los datos se presentan como la media ±SEM calculada con la prueba de Tukey al 95%

Los cultivos celulares tratados con concentraciones crecientes de ácido ursólico disminuyen la capacidad proliferativa de los linfocitos T y también la cantidad de células viables presentes en los cultivos.

El tratamiento con este triterpeno alteró la viabilidad de manera significativa desde el tiempo 0 y continuó hasta las 24 y 48 horas. La mayor disminución de la proliferación celular se observó en la CCR correspondiente a las 48 horas posteriores a la adición de la concentración más alta de ácido ursólico (251.2

μM); se cuantificaron 152,000 ± 32,000 células viables contra un control de proliferación de 2,857,200 ± 124,000 células viables (Tabla 5) (Figura 16).

Tabla 5. Número de células viables en función del tiempo en cultivos de linfocitos T tratados con triterpenos

		Número de células viables a la concentración máxima de los compuestos evaluados ($x10^4$)
DMSO	0 h	70.71 ± 6.51^a
	24 h	125.47 ± 9.92^b
	48 h	285.72 ± 12.4^c
Ácido ursólico	0 h	62.4 ± 2.9^a
	24 h	34.9 ± 4.7^d
	48 h	15.2 ± 3.2^e
Uvaol	0 h	65.55 ± 6.7^a
	24 h	33.46 ± 7.9^d
	48 h	15.7 ± 7.9^e

^{a,b,c,d,e} Diferentes letras en los superíndices indican diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$)

Los cultivos que fueron tratados con uvaol presentaron un comportamiento similar a aquéllos que recibieron el tratamiento con ácido ursólico; la disminución en la proliferación y la viabilidad celular de los linfocitos T ocurrió en función del tiempo de tratamiento, así como de la concentración del mismo. Los cambios que ocurren 24 horas después de la adición del tratamiento no tienen diferencia significativa con aquellos observados después de 48 h (Figura 17).

La concentración más alta de uvaol redujo significativamente la proliferación celular (157,000 ± 79,000 células viables) 48 horas después de la adición del

triterpeno en comparación con el control de proliferación (3,270,100 ± 38,080 células viables) (Tabla 5).

La viabilidad de las células también disminuyó en presencia de ambos triterpenos en función de la concentración y del tiempo de tratamiento. Mientras que el control de viabilidad celular 48 horas posteriores a la siembra es de 94.5%, el ácido ursólico disminuyó dicho parámetro a 35.1% y el uvaol a 30.2% de viabilidad celular (Figura 18).

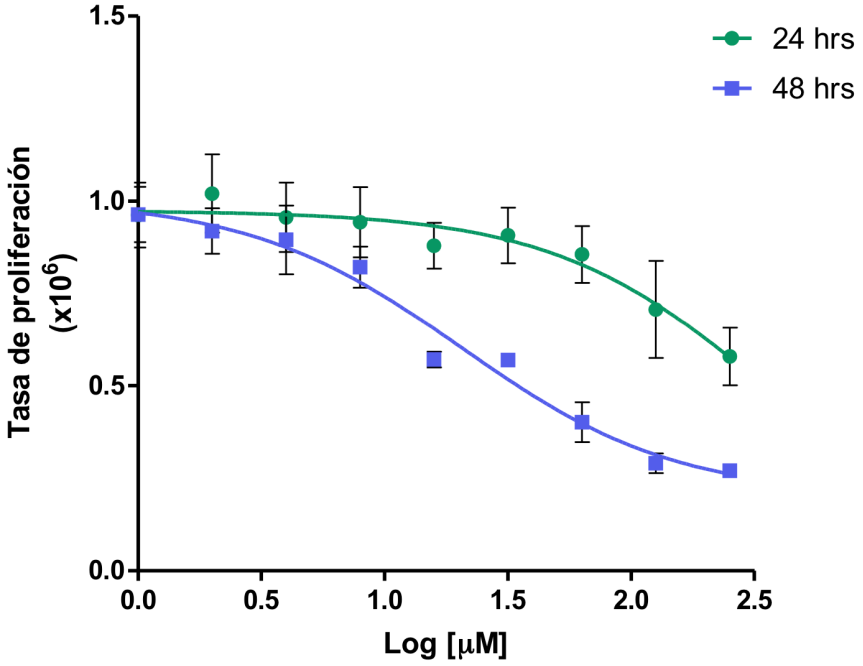


Figura 16. CCR de la tasa de proliferación de linfocitos T tratados con ácido ursólico a las 24 y 48 h

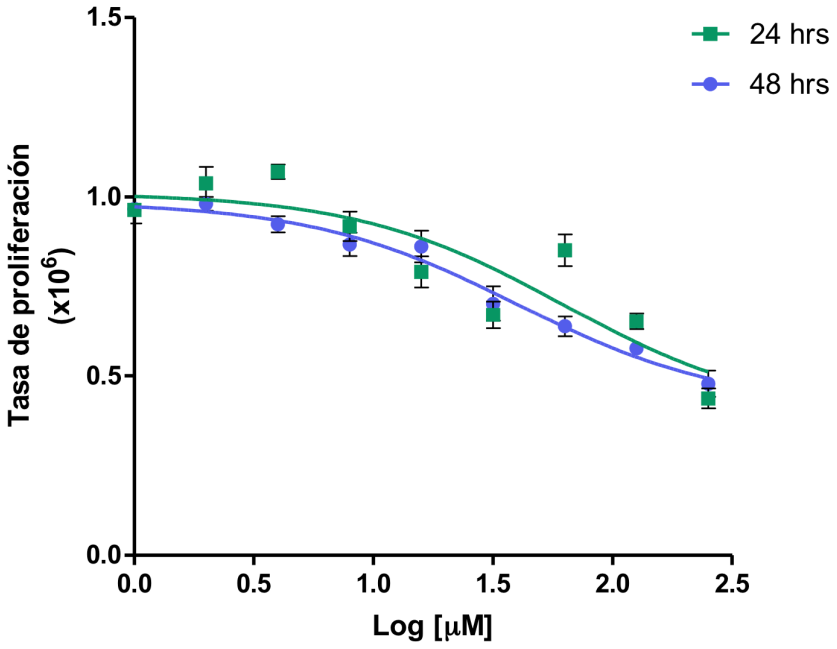


Figura 17. CCR de la tasa de proliferación de linfocitos T tratados con uvaol a las 24 y 48 h

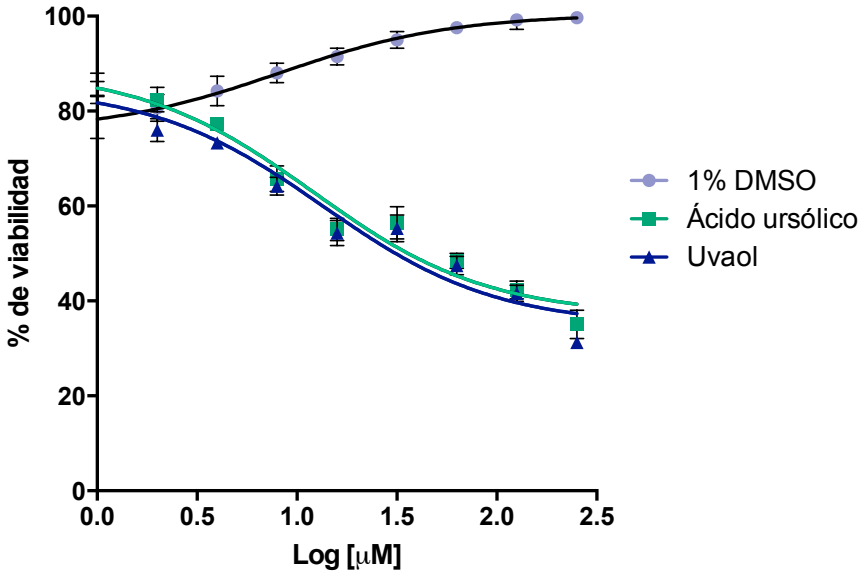


Figura 18. CCR del porcentaje de viabilidad celular con concentraciones crecientes del ácido ursólico, el uvaol y 1% de DMSO

Finalmente, se evaluó el efecto citotóxico del donador de NO, el SNP (1 mM) y el donador de H_2S, el NaHS (10 mM) 48 horas posteriores a su adición. Ambos donadores disminuyeron significativamente la viabilidad celular en los cultivos de linfocitos T en comparación con los triterpenos evaluados. Sin embargo, tanto el ácido ursólico como el uvaol disminuyeron de manera estadísticamente significativa la viabilidad celular en comparación con el control sin tratamiento y aquellas células tratadas con el vehículo, el DMSO (Tabla 6; Figura 19).

Tabla 6. Porcentaje de viabilidad celular de los linfocitos T 48 horas después a la adición de diferentes compuestos

Compuesto evaluado	% de viabilidad
Control	95.2 ± 3.2^{a}
DMSO	94.8 ± 2.5^{a}
Ácido ursólico	62.9 ± 3.7^{b}
Uvaol	59.6 ± 1.2^{b}
SNP	28.4 ± 3.2^{c}
NaHS	31.4 ± 4.1^{c}

^{a,b,c} Diferentes letras en los superíndices indican diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$)

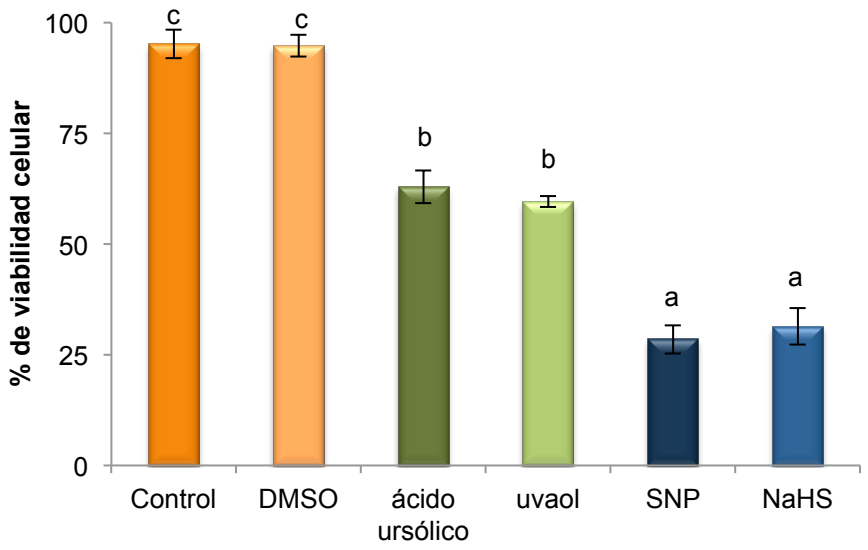


Figura 19. Representación en gráfica de barras del porcentaje de viabilidad celular de los linfocitos T, 48 horas después de la adición de diferentes compuestos. Todos los datos se presentan como la media ± SEM, calculada con la prueba de Tukey al 95%. Diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa

6.4 Efecto de los triterpenos sobre la actividad enzimática de la iNOS en cultivos de linfocitos T

El ácido ursólico y el uvaol incrementaron la concentración de nitritos y, por lo tanto de NO, en cultivos celulares de linfocitos T. Las concentraciones de NO fueron calculadas a partir de la ecuación de regresión lineal obtenida con la curva de calibración de $NaNO_2$ (Figura 20).

El SNP (70.63 ± 0.06 μM), un donador de NO, aumentó la concentración de NO 5.7 veces más que los triterpenos evaluados. El uvaol (26.58 ± 0.012 μM) incrementó de manera estadísticamente significativa la concentración de NO en comparación con el control sin tratamiento; mientras que entre el ácido ursólico (18.43 ± 0.034 μM) y el control (12.34 ± 0.048 μM) no se encontró diferencia estadísticamente significativa (Tabla 7; Figura 21).

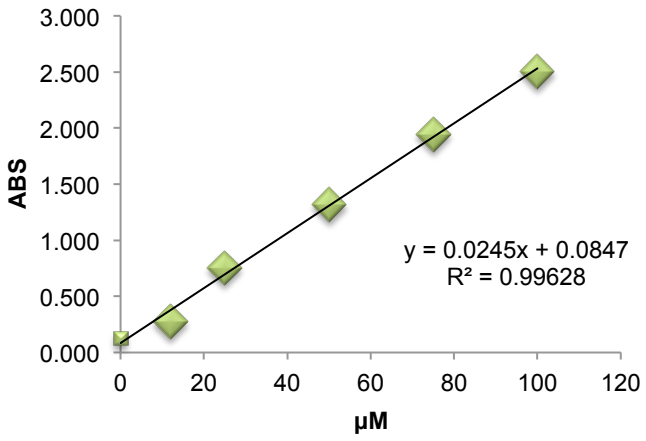


Figura 20. Curva de calibración de NO_2^- y su ecuación de regresión lineal correspondiente.

Tabla 7. Valores de concentración de nitritos por estimulación con la CE_{50} de triterpenos y controles evaluados en cultivos de linfocitos T

Compuesto evaluado	Concentración de NO_2^- (µM)
Nitroprusiato	70.63 ± 0.06[c]
Ácido ursólico	18.43 ± 0.034[a]
Uvaol	26.58 ± 0.012[b]
Control	12.34 ± 0.048[a]

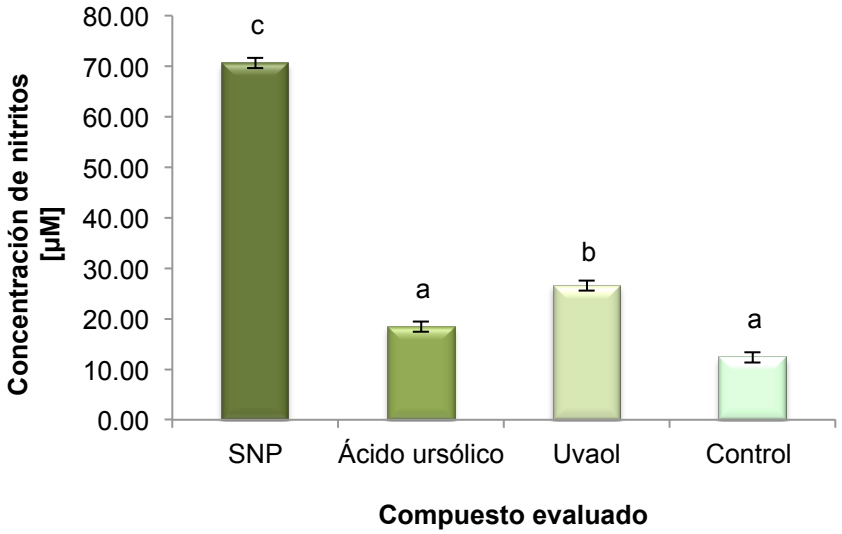


Figura 21. Representación en gráfica de barras de la concentración de nitritos ante la estimulación de cada uno de los compuestos evaluados. Todos los datos se presentan como la media ± SEM, calculada con la prueba de Tukey al 95%. Diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa

6.5 Efecto de los triterpenos sobre la actividad enzimática de la CSE en cultivos de linfocitos T

Se cuantificó el incremento en la concentración de H_2S biosintetizado en presencia de ácido ursólico y de uvaol en cultivos celulares de linfocitos T. Utilizando la curva de calibración de NaHS, se obtuvo una ecuación de regresión lineal que permitió conocer las concentraciones de H_2S en presencia de los triterpenos y controles evaluados (Figura 22).

El donador de H_2S, NaHS (53.71 ± 0.0303 µM) incrementó de manera significativa la concentración de H_2S en comparación con los tratamientos con triterpenos. El tratamiento con uvaol (23.29 ± 0.0142 µM) aumentó la concentración del H_2S de manera significativa, mientras que el ácido ursólico (11.14 ± 0.0134 µM) no presentó un incremento en la concentración de H_2S

estadísticamente significativo en comparación con el control (8.35 ± 0.0102 μM) (Tabla 8; Figura 23).

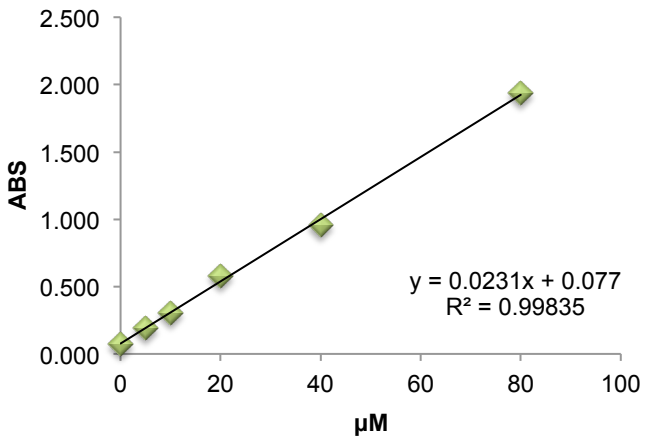


Figura 22. Curva de calibración de NaHS y su ecuación de regresión lineal correspondiente.

Tabla 8. Valores de concentración de H_2S por estimulación con la CE_{50} de triterpenos y controles evaluados en cultivos de linfocitos T

Compuesto evaluado	Concentración de H_2S (μM)
NaHS	53.71 ± 0.0303[c]
Ácido ursólico	11.14 ± 0.0134[a]
Uvaol	23.29 ± 0.0142[b]
Control	8.35 ± 0.0102[a]

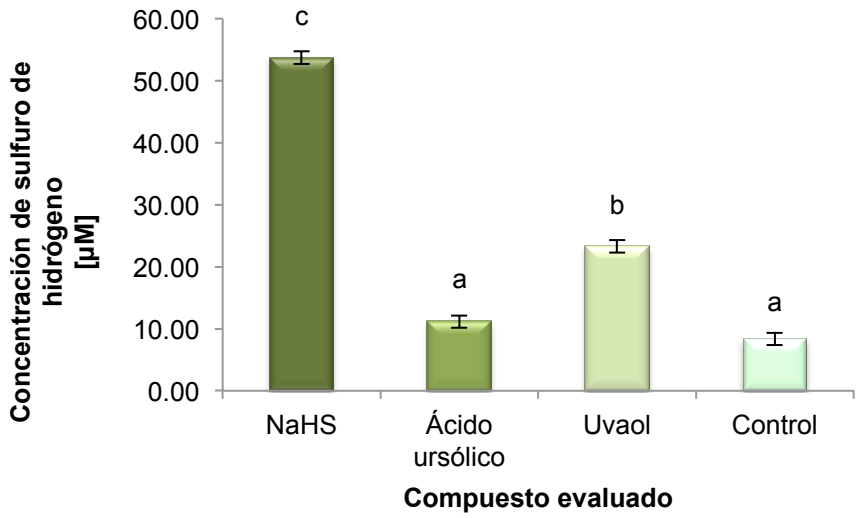


Figura 23. Representación en gráfica de barras de la concentración de H_2S ante la estimulación de cada uno de los compuestos evaluados. Todos los datos se presentan como la media ± SEM, calculada con la prueba de Tukey al 95%. Diferentes letras indican diferencia estadísticamente significativa

7. DISCUSIÓN

Estudios previos han demostrado la importancia fisiológica que tienen los transmisores gaseosos NO y H_2S en la regulación del tono vascular (Colleta *et al*., 2012). El primero lleva a cabo su función vasodilatadora mediante la elevación de los niveles de GMP cíclico (Curran *et al*., 2014), mientras que el segundo, lo hace principalmente mediante la activación de canales de K^+ y la inhibición de la PDE, enzima responsable de la degradación del cGMP (Kolluru *et al*., 2013). Estudios anteriores han sugerido la participación de triterpenos pentacíclicos, como el ácido ursólico y el uvaol, en la activación de las vías bioquímicas del NO/cGMP y del H_2S/CvK^+ (Xu *et al*., 2013; Solís-Gutiérrez, 2013).

Tomando en cuenta estos antecedentes, en la presente tesis se evaluó la actividad enzimática de la NOS y la CSE, en presencia de los triterpenos ácido ursólico y uvaol, los cuales presentaron un efecto vasodilatador mayor que la ACh en ensayos de aorta aislada de rata (Solís-Gutiérrez, 2013). La determinación de la actividad de estas enzimas se realizó mediante la cuantificación de los subproductos, los cuales son marcadores indirectos de su activación. En estudios previos, se determinó que la concentración del subproducto es directamente proporcional a la concentración de su producto original, NO o H_2S (Coneski y Schoenfisch, 2012).

Los triterpenos evaluados y la ACh incrementaron los niveles de NO en la aorta de rata. La presencia de ácido ursólico en la aorta incrementó significativamente la concentración de NO en comparación con la estimulación de dicha arteria con uvaol (Tabla 3; Figura 12). Este resultado es consistente con los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo, utilizando el ensayo de aorta aislada de rata, en donde se observó que el ácido ursólico indujo mayor efecto vasodilatador que el uvaol (Figura 4) (Solís-Gutiérrez, 2013). Adicionalmente,

ambos triterpenos indujeron una producción significativamente mayor de NO que la ACh (Tabla 1).

Los triterpenos evaluados también incrementaron significativamente la concentración de H_2S. El uvaol incrementó 9 veces la concentración de H_2S con relación al tejido tratado como control, mientras que el ácido ursólico incrementó la concentración 6 veces más. Ambos triterpenos resultaron ser más efectivos que la ACh (Tabla 4; Figura 14).

Los resultados que muestran un incremento en los niveles de NO y H_2S inducido por los triterpenos en aorta son consistentes con nuestros resultados, utilizando el ensayo de aorta aislada de rata e inhibidores de las enzimas que producen estos transmisores gaseosos: la NOS y la CSE. La inhibición de estas enzimas: la NOS con L-NAME y la CSE con PPG redujeron significativamente el efecto vasodilatador de estos compuestos (Solís-Gutiérrez, 2013).

Los resultados previamente descritos sugieren que los triterpenos estudiados activan las enzimas eNOS y CSE, incrementando la biosíntesis de sus respectivos transmisores gaseosos. Recientemente, nuestro grupo de investigación realizó un estudio farmacológico *in silico* que sugiere la interacción directa entre los triterpenos y sitios alostéricos en las enzimas eNOS y CSE (información no publicada), lo cual produciría un aumento en su actividad enzimática. Estos resultados son congruentes con los datos publicados por Rios *et al*. (2012), quienes describieron la interacción de un grupo de triterpenos ácidos, incluyendo al ácido ursólico, con un sitio alostérico en la eNOS. Sin embargo, es necesario continuar los estudios para descartar la participación de receptores membranales endoteliales en el efecto vasodilatador inducido por los triterpenos ácido ursólico y uvaol.

En estudios previos, se ha estudiado el efecto antiproliferativo que algunos triterpenos presentan en tipos celulares específicos del sistema inmunológico (Shishodia *et al*., 2003; Checker *et al*., 2012). En la presente investigación se determinó que ácido ursólico y el uvaol disminuyeron la tasa de proliferación y supervivencia de los linfocitos T.

Como vehículo para la dilución de los triterpenos se utilizó DMSO. No se observaron cambios en la tasa de proliferación estadísticamente significativos entre los cultivos celulares tratados únicamente con el vehículo y aquellos sin tratamiento (Figura 15), lo que sugiere que el DMSO no tiene efecto sobre la proliferación en la concentración utilizada.

La disminución en la tasa de proliferación de linfocitos T es dependiente del tiempo de tratamiento y la concentración de los triterpenos. La proliferación de los linfocitos T disminuye de manera estadísticamente significativa entre las 24 y las 48 horas posteriores a la adición del ácido ursólico (Figura 16). En una investigación realizada por Gao *et al*. (2011), se demostró que el ácido ursólico aumenta la activación tanto de las caspasas iniciadoras 8 y 9, como de las caspasas efectoras 3 y 7, en cultivos primarios y secundarios de linfocitos T; sin embargo, no hay estudios similares para el uvaol. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la adición de uvaol abate la proliferación celular desde las 24 horas y no presenta un cambio significativo 48 horas después de la adición del compuesto (Figura 17), lo anterior sugiere que el mayor efecto máximo del uvaol es alcanzado dentro de las primeras 24 h de tratamiento.

El porcentaje de viabilidad de los linfocitos T también disminuyó considerablemente en presencia de ambos triterpenos (Tabla 5; Figura 18). Los tratamientos iniciaron con aproximadamente 80% de viabilidad celular al momento de la siembra, 48 horas después de la adición de ácido ursólico y uvaol, la viabilidad disminuyó a 35% y 30%, respectivamente. Mientras que, al

mismo tiempo, el control de proliferación presentó un 95% de células vivas. Estos resultados demuestran el efecto citotóxico de los triterpenos, el cual es consistente con los reportes de Li *et al*. (2014) y Chudzik *et al*. (2015), sobre el efecto antiproliferativo y proapoptótico que inducen algunos triterpenos en una gran variedad de líneas celulares neoplásicas, incluyendo los linfocitos T.

Previamente, se reportó la participación del NO y el H_2S en la disminución de la proliferación y el efecto citotóxico en tipos celulares neoplásicos (Hammami *et al*., 2012; Napoli *et al*., 2013). Tomando en cuenta lo anterior, se exploró la participación de los trasmisores gaseosos en el efecto inducido por los triterpenos. Además de la evaluación del ácido ursólico y el uvaol, se utilizaron donadores específicos de cada unos de los transmisores gaseosos con la finalidad de determinar si el efecto citotóxico de los triterpenos involucraba la participación del NO y en H_2S. Se utilizo SNP como donador de NO (Chen *et al*., 2011) y NaHS para incrementar la concentración de H_2S en los cultivos celulares (Ryazantseva *et al*., 2011; Kanno *et al*., 2012). Los resultados obtenidos indicaron que la viabilidad celular disminuye tanto en presencia de los triterpenos evaluados, como en presencia de los donadores de NO y H_2S.

Nuestros resultados son consistentes con estudios anteriores que han demostrado que el efecto del NO sobre linfocitos T depende directamente de la concentración del mismo. Cuando el NO se encuentra en concentraciones pM y nM se favorecen procesos de proliferación y supervivencia celular. Mientras que concentraciones µM o mayores inducen citostaticidad, apoptosis y hasta necrosis de los linfocitos T (Hammami *et al*., 2012; Napoli *et al*., 2013).

La cuantificación de NO mediante la técnica de Griess demostró que los compuestos evaluados aumentaron la concentración de NO hasta concentraciones µM. El uvaol incrementó 2.5 veces más la concentración del NO que el control, mientras que el ácido ursólico no incrementó de manera

estadísticamente significativa la concentración del mismo transmisor gaseoso en comparación con el control sin tratamiento (Tabla 6; Figura 20). Sin embargo, en todos los casos se observó una disminución en la proliferación y en la viabilidad celular, lo cual sugiere la participación de vías de señalización alternativas activadas por los triterpenos en los linfocitos T.

En cuanto al estudio del efecto bioactivo del H_2S, Chattopadhyay *et al*. (2013) reportaron que entidades liberadoras de H_2S acopladas a un AINE (antiinflamatorio no esteroideo): naproxeno, ácido acetilsalicílico o ibuprofeno, disminuyen la proliferación y aumentan la apoptosis de una gran variedad de células neoplásicas, incluyendo las Jurkat E6.1. En estas células aumenta la activación de la caspasa activadora 3, lo cual disminuye considerablemente la expresión de β-catenina citoplasmática, afectando la comunicación intercelular vía E-cadherina, dando inicio a la apoptosis.

Los resultados de la cuantificación de H_2S fueron similares a aquellos de la cuantificación del NO. El uvaol incrementó significativamente la concentración del H_2S en comparación con el control que no recibió tratamiento; sin embargo, esto no ocurrió en el caso del tratamiento con ácido ursólico (Tabla 7; Figura 22). Estos resultados sugieren la posible activación de vías de señalización alternativas que participan en la disminución de la proliferación y la viabilidad celular observada en los cultivos celulares de linfocitos T.

Las técnicas de activación enzimática utilizadas en esta investigación, indican que los transmisores gaseosos participan en el efecto citotóxico producido por los triterpenos evaluados. Sin embargo, estos resultados no descartan la posible participación de otros mecanismos bioquímicos en el efecto citotóxico de estos compuestos. Anteriormente se había reportado la participación del NO y el H_2S en dicha actividad, sin embargo solo se han utilizado donadores específicos de cada uno de los transmisores gaseosos. En la presente investigación se

utilizaron el ácido ursólico y el uvaol para estimular la activación de las enzimas NOS y CSE.

La activación de otras vías bioquímicas, diferentes a las vías de los transmisores gaseosos, podrían contribuir al efecto citotóxico producido por los triterpenos. Por ejemplo, la similitud estructural que hay entre las hormonas esteroideas y los triterpenos, así como la región conservada CRAC en los RAPG; particularmente el receptor membranal de progesterona, el cual está acoplado a la subunidad α_i (Ndiaye *et al*., 2012; Wang *et al*., 2014) constituyen posibles mecanismos alternativos. La activación de estos receptortes se ha relacionado con la inhibición de procesos de supervivencia celular y podría contribuir en el efecto observado en los cultivos de linfocitos T tratados con ácido ursólico y uvaol.

Adicionalmente, tanto el ácido ursólico como el uvaol podrían llevar a cabo su efecto bioactivo en el interior de la célula. Su lipofilicidad les permite atravesar fácilmente las membranas plasmáticas y, una vez en el citoplasma, inhibir a IKK, evitando la separación del NF-κβ de su subunidad inhibitoria, Iκβ, disminuyendo la biosíntesis de proteínas necesarias para la proliferación y supervivencia de la célula (Checker *et al*., 2012).

Los triterpenos son metabolitos secundarios ampliamente estudiados por sus propiedades farmacológicas. La presente investigación demostró que el ácido ursólico y el uvaol producen la relajación de la aorta aumentando la biosíntesis de los transmisores gaseosos NO y H_2S, factores vasodilatadores derivados del endotelio, cuyas propiedades son de especial interés en el tratamiento de la hipertensión.

Asimismo, estos compuestos, tienen un efecto antineoplásico en linfocitos T, en donde disminuyen la proliferación, viabilidad y supervivencia de estas células. El efecto citotóxico de estos compuestos involucra, al menos en parte, la

participación de los transmisores gaseosos NO y H_2S; sin embargo, es posible que otros mecanismos bioquímicos estén involucrados en este efecto. Los triterpenos, ácido ursólico y uvaol, constituyen prototipos estructurales que pueden ser desarrollados como fármacos alternativos en el tratamiento de patologías de gran prevalencia mundial como la hipertensión y la leucemia.

8. CONCLUSIONES

- El efecto vasodilatador producido por el ácido ursólico y el uvaol involucra la participación del NO y el H_2S

- Tanto el ácido ursólico, como el uvaol disminuyen significativamente la tasa de proliferación de linfocitos T de manera dependiente de la concentración

- Los dos triterpenos estudiados, el ácido ursólico y el uvaol, disminuyen significativamente la viabilidad celular de los linfocitos T de manera dependiente de la concentración

- El uvaol, pero no el ácido ursólico, incrementa la concentración de ambos transmisores gaseosos (NO y H_2S)

- Es necesario explorar la participación de vías bioquímicas alternativas a las de los transmisores gaseosos en el efecto citotóxico inducido por los triterpenos en los cultivos de linfocitos T

9. BIBLIOGRAFÍA

Acamovic, T., Brooker, J.J. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. Proceeding of the Nutrition Society. **2005**. 64: 403-412.

Aguirre-Crespo, F., Vergara-Galicia, J., Villalobos-Molina, R., López-Guerrero, J., Navarrete-Vázquez, G., Estrada-Soto, S. Ursolic acid mediates the vasorelaxant activity of *Lepechinia caulescens* via NO release in isolated rat thoracic aorta. Life Science. **2006**. 79: 1062-1068.

Altaany, Z., Yang, G., Wang, R. Crosstalk between hydrogen sulfide and nitric oxide in endothelial cells. Journal of Cellular and Molecular Medicine. **2013**. 7: 879-888.

American Cancer Society. Leukemia in early life stages. **2014**. American Cancer Society Reports.

Asif, K.M., Gadalla, M.M., Snyder, S.H. Signaling by gasotransmitters. National Institute of Health. **2009**. 2 (68):re2.

Calvert, J.W., Coetzee, W.A., Lefer, D.J. Novel Insights Into Hydrogen Sulfide-Mediated Cytoprotection. Antioxidants and Redox Signaling. **2010**. 12: 1203-1217.

Chappel, J. Genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami. Current Opinion in Plant Biology. **2002**. 5: 151-157.

Chattopadhyay, M., Nath, N., Kodela, R., Sobocki, T., Metkar, S., Yuan-Gan, Z., Kashfi, K. Hydrogen sulfide-releasing aspirin inhibits the growth of lukemic Jurkat cells and modulates β-catenin expression. Leukemia Research. **2013**. 10: 1302-1308.

Checker, R., Sandur, S.K., Sharma, D., Patwardhan, R.S., Jayakumar, S., Kohli, V., Sethi, G., Aggarwal, B.B., Sainis, K.B. Potent Anti-Inflamatory Activity of Ursolic Acid, a triterpenoid Antioxidant, Is Mediated through Suppression of NF-κβ, AP-1 and NF-AT. PLos-one. **2012**. 7:e31318.

Chen, O.I., Lyniv, L.S., Igumentseva, N.I., Barska, M.L., Sybirna, N.O., Stasyk, O.V. Effect of Nitric Oxide Donor on Viability of Human Leukemic Cells Upon

Arginine Depravation. Studia Biologica. **2011**. 2: 17-28.

Chudzik, M., Korzonek-Szlacheta, I., Król W. Triterpenes as Potentially Cytotoxic Compounds. Molecules. **2015**. 20: 1610-1625.

Colleta, C., Papapetropoulos, A., Erdelyi, K., Olah, G., Módis, K., Panopoulos, P., Asimakopoulou, A., Gerö, D., Sharina, I., Martin, E., Szabo, C. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogénesis and endotheliun-dependent vasorelaxation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **2012**. 109: 9161-9166.

Coneski, P.N., Schoenfisch, M.H. Nitric oxide reléase: Part III. Measurement and reporting. Chemistry Society Reviews. **2012**. 41: 3753-3758.

Curado, M.P., Pontes, T., Guerra-Yi, M.E., Camargo-Cancela, M. Leukemia mortality trends among children, adolescents, and Young adults in Latin America. **2011**. Revista Panamericana de Salud Pública. 29: 96-102.

Curran, J., Tang, L., Roof, S.R., Velmurugan, S., Millard, A., Shonts, S., Wang, H., Santiago, D., Ahmad, U., Perryman, M., Bers, D.M., Mohler, P.J., Ziolo, M.T., Shannon, T.R. Nitric Oxide-Dependent Activation of CaMKII Increases Diastolic Sarcoplasmic Reticulum Calcium Release in Cardiac Myocytes in Response to Adrenergic Stimulation. PLOS one. **2014**. 9: e87495.

Dosiou, C., Hamilton, A.E., Pang, Y., Overgaard, M.T., Tulac, S., Dong, J., Thomas, P., Giudice, L.C. Expression of membrane progesterone receptor son human T lymphocytes and Jurkat cells and activation of G-proteins by progesterone. Journal of Endocrinology. **2008**. 196: 67-77.

Esquivel-Gutiérrez, E.R., Noriega-Cisneros, R., Bello-González, M.A., Saavedra-Molina, A., Ralgado-Garciglia, R. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. Biológicas. **2012**. 14: 45-52.

Förstermann, U., Sessa, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. European Heart Journal. **2012**. 33: 829-837.

Furchgott, R.F., Sawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **1980**. Nature.

288: 373-376.

Gadalla, M.M., Snyder, S.H. Hydrogen Sulfide as Gasotransmitter. Journal of Neurochemistry. **2010**. 113: 14-26

Gao, D., Tang, S., Tong, Q. Oleanolic acid liposomes with polyethylene glicol modification: Promising antitumor drug delivery. International Journal of Nanomedicine. **2012**. 7: 3517-3526.

Gao, N., Cheng, S., Budhraja, A., Gao, Z., Chen, J., Liu, E., Huang, C., Chen, D., Yang, Z., Lui, Q., Li, P., Shi, X., Zhang, Z. Ursolic acid induces apoptosis in human leukaemia cells and exhibits anti-leukaemic activity in nude mice throigh the PKB pathway. British Journal of Pharmacology. **2011**. 165: 1813-1826.

Giles, T.D., Sander, G.E., Nossaman, B.D., Kadowitz, P.J. Impaired Vasodilation in the Pathogenesis of Hypertension: Focus on Nitric Oxide, Endothelial Derived Hyperpolarizing Factors, and Prostaglandins. **2012**. The Journal of Clinical Hypertension. 14: 198-205.

Hammami, I., Bertrand, M., Chen, J., Bronte, V., De Crescenzo, G., Jolicoeur, M. Nitric oxide affects immune cells bioenergetics Long-term effects of nitric-oxide derivatives on leukaemic Jurkat cell metabolism. Immunobiology. 2012. **217**: 808-815.

Heinrich, T.A., Da Silva, R.S., Miranda, K.M., Switzer, C.H., Wink, D.A., Fukuto, J.M. Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. British Journal of Pharmacology. **2013**. 169: 1417-1429.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía, INEGI. Estadísticas de Mortalidad: Reporte de defunciones generales totales por principales causas de mortalidad. **2014**.

Kanno, S., Hirano, S., Sagi, M., Chiba, S., Takeshita, H., Ikawa, T., Ichiba, K., Nagai, T., Takada, M., Sakamoto, K., Mukai, T. Sulfide induces apoptosis and Rho kinase-dependent cell blebbing in Jurkat cells. Archives of Toxicology. **2013**. 87: 1245-1256.

Kolluru, G.K., Shen, X., Bir, S.C., Kevil, C.G. Hydrogen sulfide chemical biology: Pathophysiological roles and detection. Nitric Oxide. **2013**. 35: 5-20.

Lee, C., Yen, M. Nitric Oxide and Carbon Monoxide, Collaborative and Competitive Regulators of Hypertension. Review article from the Department of Pharmacology, National Defense Medical Center, Taipei, Taiwan. **2008**. 32: 12-21.

Levin, E.R. Extranuclear Steroid Receptors Are Essential for Steroid Hormone Actions. Annual Review of Medicine. **2015**. 66: 271-280.

Li, Z., Bao-ning, W. Yuan, L., Jun, W., Lei, F., Ze-yao, T. Research Progress if Ursolic Acid´s Anti-Tumor Actions. Chinese Journal of Integrative Medicine. **2014**. 20: 72-79.

Lloyd-Sherlock, P., Beard, J., Minicuci, N., Ebrahim, S., Chatterji, S. Hypertension among older adults in lowand middle-income countries: prevalence, awarness and control. International Journal of Epidemiology. **2014**. 43 116- 128.

Lokody, I. Tumour-promoting tissue mechanics. **2014**. Nature Reviews: Cancer. 14: 296-315.

Luna-Vázquez, F.J. Caracterización química y farmacológica de compuestos vasoactivos presentes en el fruto de *Prunus serotina*. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencia y Tecnología de alimentos. **2009**. 44-52.

Lundberg, J.O., Weitzberg, E., Galdwin, M.T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. Nature Reviews, Drug Discovery. **2008**. 7: 156-167.

Murad, F. Nitric Oxide and Cyclic GMP in Cell Signaling and Drug Development. New England Journal of Medicine. **2006**. 355: 2003-2011.

Napoli, C., Paolisso, G., Casamassimi, A., Al-Omran, M., Barbieri, M., Sommese, L., Infante, T., Ignarro, L. Effects of Nitric Oxide in Cell Proliferation. Journal of the American College of Cardiology. **2013**. 62: 89-94.

Nathan, C. Sectretory products of macrophages: twenty-five years on. The Journal of Clinical Investigation. **2014**. 4: 1189-1190.

Ndiaye, K., Poole, D.H., Walusimbi, S., Cannon, M.J., Toyokawa, K., Maalouf, S.W., Dong, J., Thomas, P., Pate, J.L. Journal of Reproductive Immunology.

2012. 95: 15-26.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Global Health Observatory Map Gallery: Blood Preasure Statistics. **2011**.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Información General sobre la Hipertensión en el Mundo. Una enfermedad que mata en silencio, una crisis de salud pública mundial. Document Production Services. Ginebra, Suiza. **2013**. 8-20.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Situación Reglamentaria de los Medicamentos. Programa de Medicina Tradicional de la OMS. **2008**. 1-11.

Ovesná, Z., Kozics, K., Slamenova, D. Protective effects of ursolic acida n oleanolic in leukemic cells. Mutation Research. **2006**. 600: 131-137.

Paul, B.D., Snyder, S.H. H_2S Signalling through protein sulfhydration and beyond. Molecular Cell Biology, Nature Reviews. **2012**. 13: 499-507.

Polhemus, D.J., Otsuka, H., Bhushan, S., Islam, K.N., Bradley, J.M., Elrod, J.W., Lefer, D.J. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is nitric oxide dependent. Nitric Oxide. **2014**. 39: 40-41.

Prasad, S., Yadav, V.R., Sung, B., Reuter, S., Kannappan, R., Deorukhkar, A., Diagaradjane, P., Wei, C., Baladandayuthapani, V., Krishnan, S., Guha, S., Aggarwal, B.B. Ursolic Acid Inhibits Growth and Metastasis of Human Colorectal Cancer in an Orthotopic Nude Mouse Model by Targetins Multiple Cell Signaling Pathways: Chemosensitization with Capecitabine. Clinical Cancer Research. **2012**. 18: 4942-4953.

Rios, J.L. Effects of triterpene son the immune system. Journal of Ethnopharmacology. **2010**. 128: 1-14.

Rios, M.Y., López-Martínez, S., López-Vallejo, F., Medina-Franco, J.L., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., Navarrete-Vázquez, G., Hidalgo-Figueroa, S., Hernández-Abreu, O., Estrada-Soto, S. Vasorelaxant activity of some structurally related triterpenic acids from Phoradendron reichenbachianu (Viscaceae) mainly by NO production: *Ex vivo* and *in silico* studies. Fitoterapia. **2012**. 83: 1023-1029.

Rodriguez-Rodriguez, R., Perona, J.S.,Herrera, M.D., Ruiz-Guitierrez, V. Triterpenic Compounds from “Orujo” Olive Oil Elicit Vasorelaxation in Aorta from Spontaneously Hypertensive Rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2006**. 54: 2096-2102.

Ryazantseva, N.V., Novitsky, V.V., Starikova, E.G., Kleptsova, L.A., Jakushina, V.D., Kaigorodova, E.V. Role of Hydrogen Sulfide in the Regulation of Cell Apoptosis. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. **2011**. 151: 702-704.

Savithramma, N., Rao, M.L., Suhrulatha, D. Screening of Medicinal Plants for Secondary Metabolites. Middle-East Journal of Scientific Research. **2011**. 8: 579-584.

Secretaría de Salud, Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, Dirección General de Epidemiología. Sistema Nacional de Vigilancia y Epidemiología. Perfil Epidemiológico del Cáncer en Niños y Adolecentes en México. **2011**.

Sen, N., Snyder, S.H. Protein Modifications Involved in Neurotransmitter and Gasotransmitter Signaling. Trends in Neuroscience. **2010**. 33: 493-502.

Shishodia, S., Mujumdar, S., Banerjee, S., Aggarwal, B.B. Ursolic Acid Inhibits Nuclear Factor-κβ Activation Induced by Carcinogenic Agents Through Suppression of IκBα Kinase and p65 Phosphorilation: Correlation with Down-Regulation of Cyclooxygenase 2, Matrix Metalloproteinase 9, and Cyclin D1. Cancer Research. **2003**. 63: 4375-4583.

Siddique, H.R., Saleem, M. Benecicial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies. Life Sciences. **2011**. 88: 285-293.

Smith, R.A., Manassaram-Baptiste, D., Brooks, D., Cokkinides, V., Doroshenk, M., Saslow, D., Wender, R.C., Brawley, O.W. Cancer screening in the Unided States, **2014**: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cáncer screening. Cancer Journal for Clinicians. 64: 30-51.

Solís-Gutiérrez, M. Determinación del efecto vasodilatador de triterpenos y elucidación de su mecanismo de acción. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Licenciado en Químico

Farmacéutico Biólogo. **2013**.

Somova, L.O., Nadar, A., Rammanan, P., Shode, F.O. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. Phytomedicine. **2003**. 10: 115-121

Thimmappa, R., Geisler, K., Louveau, T., O´Maille, P., Osbourn A. Triterpene Biosynthesis in Plants. Annual Review of Plan Biology. **2014**. 65: 225-257.

Thorthon, T.M., Rincon, M. Non-Classical p38 Map Kinase Functions: Cell Cycle Checkpoints and Survival. International Journal of Biological Sciences. **2009**. 5: 44-51.

Uto, T., Sakamoto, A., Huu Tung, N., Fujiki, T., Kishihara, K., Oiso, S., Kariyazono, H., Morinaga, O., Shoyama, Y. Anti-Proliferative Activities and Apoptosis Induction by Triterpenes Derived from *Eriobotrya japonica* in Human Leukemia Cell Lines. International Journal of Molecular Sciences. **2013**. 14. 4106-4120.

Wang, C., Liu, Y., Cap, J-M. G Protein-Cupled Receptors: Extranuclear Mediators for the Non-Genomic Action of Steroids. International Journal of Molecular Sciences. **2014**. 15: 15412-15425.

Wang, J., Liu, L., Qiu, H., Zhang, X., Guo, W., Chen, W., Tian, Y., Fu, L., Shi, D., Cheng, J., Huang, W., Deng, W. Ursolic Acid Simultaneously Targets Multiple Signaling Pathways to Suppress Proliferation and Induce Apoptosis in Colon Cancer Cells. Plos ONE. **2013**. 8: e63872.

Wang, R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. Physiological Reviews. **2012**. 92: 791-896.

Ward, E., DeSantis, C., Robbins, A., Kohler, B., Jemal, A. Childhood and adolescent cáncer statistics, 2014. Cancer Journal for Clinicians. **2014**. 64: 83-103.

Xu, K., Wang, P., Yuan, B., Cheng, Y., Li, Q., Lei, H. Structural and bioactive studies of terpenes and cyclopeptides from the Genus Rubia. Chemistry Central Journal. **2013**. 7: 81- 92.

Yang, G. Protein S-sulfhydration as a major source of H_2S bioactivity. Receptors

and Clinical Investigation. **2014**. 1: e337.

Zhang, J., Ding, L., Holmfeldt, L., Wu, G., Heatley, S.L., Payne-Turner, D., Easton, J., Chen, X., Wang, J., Rusch, M., Lu, C., Cheng, S.C., Wey, L., Collins-Underwood, J.R., Ma, J., Roberts K.G., Punds, S.B., Ulyanov, A., Becksort, J., Gupta, P., Huether, R., Kriwacki, R.W., Parker, M., McGoldrick, D.J., Zhao, D. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. **2012**. Nature. 481: 157- 163.

Zhu, Y., Bond, J., Thomas, P. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. PNAS. **2003 b**. 5: 2237-2242.

Zhu, Y., Rice, C.D., Pang, Y., Pace, M., Thomas, P. Cloning, expression, and characterization of a membrane progestin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. PNAS. **2003 a**. 5: 2231-2236.

10. SIGLAS Y ACRÓNIMOS

3-MST, 3-mercaptopiruvato sulfurotransferasa

ACh, acetilcolina

AcZn, acetato de zinc

AINE, antiinflamatorio no esteroideo

Ca^{2+}, ión calcio

CaM-Ca^{2+}, complejo calcio-calmodulina

CaM, calmodulina

cAMP, adenosina monofosfato cíclico

CBS, cistationina-β-sintasa

CCR, curva concentración-respuesta

CDC25a, proteína de división del ciclo celular tipo 25 homologo a

CDK, quinasa dependiente de ciclina

CE_{50}, concentración efectiva media

cGMP, guanosín monofosfato cíclico

CLM, cadena ligera de la miosina

CO, monóxido de carbono

CO_2, dióxido de carbono

CRAC, Cholesterol Recognition/Interaction Aminoacid Consensus Sequence

CSE, cistationina-γ-liasa

CvK^+, canales de potasio dependientes de voltaje

DAG, diacilglicerol

DPD, sulfato de N,N-dietil-p-fenilendiamina

EDHF, factor hiperpolarizante derivado de endotelio

EGF, factor de crecimiento epidermal

E_{max}, efecto máximo

eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial

ENT, enfermedades no transmisibles

$FeCl_3$, tricloruro de hierro

H_2S, sulfuro de hidrógeno

H_3PO_4, ácido fosfórico

HCl, ácido clorhídrico

HO-II, hemooxigenasa II

ICLAS, Counsil for Laboratory Animal Science

IKK, quinasa de la quinasa inhibitoria

iNOS, óxido nítrico sintasa inducible

IP_3, inositol trifosfato

IκB, factor inhibidor de κB

K^+, ión potasio

K_{Ca}, canales de potasio activados por calcio

L-NAME, éster metílico de L-nitroarginina

LLA, leucemia linfoblástica aguda

mAChR, receptor de acetilcolina muscarínico

MAPK, proteínquinasas activadas por mitógenos

MESO-IX, mesoporfirina IX

mPGR, receptor membranal a progesterona

nAChR, receptor de acetilcolina nicotínico

NaHS, hidrosulfuro de sodio

NF-κB, factor de transcripción nuclear κβ

nNOS, óxido nítrico sintasa neuronal

NO, óxido nítrico

NO_2^-, nitritos

NOS, óxido nítrico sintasa

O_2-CO_2, oxígeno-dióxido de carbono

OMS, Organización Mundial de la Salud

p38, proteína 38

PDE, fosfodiesterasa

PI3K, fosfatidilinositol-3-quinasa

PIP_2, fosfatidilinositol difosfato

PKA, proteínquinasa tipo A

PKG, proteínquinasa tipo G

PLC, fosfolipasa C

PPG, propargilglicina

PTT, proteínfosfatasa

RAPG, receptor acoplado a proteínas G

RE, retículo endoplásmico

RNS, especies reactivas de nitrógeno

ROS, especies reactivas de oxígeno

sGC, guanilato ciclasa soluble

SNP, nitroprusiato de sodio

TCA, ácido tricloroacético