

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biología Experimental

**“DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE LA
INCOMPTINA A EN UN MODELO MURINO DE CÁNCER DE MAMA”**

TESIS

Que para obtener el grado de Doctor en Biología Experimental

P R E S E N T A

Mtro. en Biol. Exp. Angel Giovanni Arietta García

Matrícula: 2192802423

Orcid: 0000-0002-0110-9265

Correo: angelo_arietta@hotmail.com

CÓMITE TUTORAL:

Dra. Rosa María Ordoñez Razo

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Dr. Fernando Calzada Bermejo

JURADO:

Presidente: Dr. Julio César Almanza Pérez

Secretario: Dr. Normand García Hernández

Vocal : Dr. Gerardo Blancas Flores

Vocal: Dr. Fernando Calzada Bermejo

Iztapalapa, Ciudad de México a 19 de diciembre del 2025.

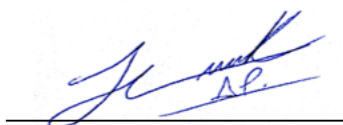
El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

Durante el desarrollo de este proyecto de Tesis, el M. en Biol. Exp. ANGEL GIOVANNI ARIETTA GARCÍA fue depositario de la Beca CONACyT con número de registro: 753803. La beca para realizar sus estudios de Doctorado fue otorgada durante el periodo de: agosto del 2021 a julio del 2025.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: “Determinación del efecto antitumoral de la incompina A en un modelo murino de cáncer de mama”, que presentó el **M. en Biol. Exp. Angel Giovanni Arietta García**

El día 19 de diciembre del año 2025

JURADO:




Dr. Julio César Almanza Pérez

Presidente



Dr. Normand García Hernández

Secretario



Dr. Gerardo Blancas Flores

Vocal 1



Dr. Fernando Calzada Bermejo

Vocal 2

MIEMBROS DEL COMITÉ DE TUTORES

Codirectora externa: Dra. Rosa María Ordoñez Razo

Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Unidad Médica de Alta Especialidad. Hospital Pediatría, 2° Piso, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. CDMX, México.

Codirector interno: Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. CDMX, México.

Asesor: Dr. Fernando Calzada Bermejo

Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Unidad Médica de Alta Especialidad. Hospital de Especialidades, 2° Piso, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. CDMX, México.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a **Dios** por permitirme llegar hasta este punto de mi vida académica.

- A la **Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), Unidad Iztapalapa**, mi alma mater, donde me formé como Licenciado y Maestro en Biología Experimental y que me abrió las puertas de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud para realizar el Doctorado en Biología Experimental.
- Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo otorgado a través de la beca N.º CVU 1012546, indispensable para la realización de mis estudios de posgrado.
- Al **Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)**, y en particular al **Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMNSXXI)**, por recibirme desde el servicio social y ser el lugar donde desarrollé la mayor parte de mis investigaciones.
- A la **Dra. Rosa María Ordoñez Razo**, por su confianza, por abrirme las puertas de su laboratorio y por su invaluable guía durante todos estos años de formación académica y científica.

- Al **Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar**, por el apoyo y asesoría brindados a lo largo de mi formación, por su disposición para acompañar mis avances y por facilitarme reactivos y apoyo experimental.
- Al **Dr. Fernando Calzada Bermejo**, por su asesoría y respaldo en este proyecto, así como por brindarme un espacio en su laboratorio y proporcionarme la incomptina A y los ratones necesarios para el desarrollo del trabajo.
- Al **Dr. Normand García Hernández**, por su guía y apoyo constante, así como por facilitarme un espacio en su laboratorio, equipos y reactivos fundamentales para esta investigación.
- A la **Unidad de Investigación Médica en Genética Humana** de la UMAE Hospital de Pediatría del CMNSXXI, a su personal y compañeros de laboratorio, por el tiempo compartido y por hacerme sentir en familia.
- A la **Unidad de Investigación Médica en Farmacología** de la UMAE Hospital de Especialidades del CMNSXXI, por brindarme un espacio en su laboratorio y por los colegas y amigos que allí encontré.
- A la **Unidad de Investigación Médica en Inmunología** de la UMAE Hospital de Pediatría del CMNSXXI, por el apoyo con el uso del citómetro de flujo.

- Al **Bioterio del Hospital de Especialidades**, CMNSXXI, por su apoyo con los ratones hembra utilizados en el presente trabajo.
- A mi padre, **Angel Arietta Velázquez**, por acompañarme siempre en mis sueños y metas, que hoy se hacen realidad. Por ser un padre excepcional, gracias por todo lo que me has dado; deseo algún día poder retribuirlo. Te amo, papá.
- A mi madre, **Xóchitl Gabriela García Padilla**, por su amor, cuidados y apoyo incondicional en cada paso de este camino. Te amo, mamá.
- A mi mami, mi abuela **Etelvina Velázquez Hernández**, y a mi abuela **Georgina Padilla García**; aunque no están físicamente presentes para ver culminar esta etapa, agradezco profundamente sus enseñanzas y el cariño que solo una abuela puede brindar. Las amo, y sé que algún día nos volveremos a ver.
- A mis **amigos y compañeros** que he conocido a lo largo de estos años y que hicieron más ameno este viaje, muchas gracias.

RESUMEN

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente entre las mujeres a nivel mundial. Las células tumorales asociadas a esta enfermedad presentan diversas adaptaciones que les permiten sobrevivir y proliferar rápidamente. Una de estas adaptaciones es la sobreexpresión de la enzima glucolítica hexocinasa II, involucrada en el metabolismo celular y en la inhibición de la apoptosis, lo que la convierte en un blanco terapéutico potencial en cáncer de mama.

La incomptina A es una lactona sesquiterpénica que ha demostrado un efecto citotóxico selectivo sobre diferentes subtipos de células de cáncer de mama, posiblemente mediante la reducción de la expresión de hexocinasa II. Sin embargo, hasta ahora, su efecto no ha sido evaluado en modelos *in vivo*. Por ello, el presente estudio tuvo como objetivo analizar la actividad antitumoral de la incomptina A en un modelo murino de cáncer de mama.

Posteriormente, se generó un modelo murino de cáncer de mama mediante la inoculación de células 4T1 en la glándula mamaria de ratones hembra. Siete días después se confirmó la formación tumoral, se conformaron distintos grupos experimentales y se administraron diferentes dosis de incomptina A. Al finalizar el tratamiento, se extrajeron los tumores para evaluar su peso y se realizaron distintos análisis: tinción histológica, western blot, citometría de flujo y estudios de actividad

mitocondrial. Además, se evaluó la toxicidad oral aguda de la incomptina A en ratones Balb/c.

Los resultados mostraron una reducción significativa en el tamaño y peso de los tumores tratados con incomptina A. El análisis histológico reveló una menor densidad de células tumorales, mientras que el western blot mostró una disminución en la expresión de hexocinasa II, sin cambios relevantes en otras proteínas del metabolismo celular. Además, se observó una reducción de la proteína anti apoptótica Bcl-2 y un aumento en la expresión de caspasa 3, lo que sugiere activación de la vía apoptótica; lo cual se confirmó mediante la citometría de flujo. Finalmente, los ensayos de actividad mitocondrial revelaron una disminución funcional en las mitocondrias de estas células.

En conjunto, estos hallazgos indican que la incomptina A ejerce un efecto antitumoral al inducir apoptosis en células de cáncer de mama, probablemente a través de la inhibición de la hexocinasa II. Por lo tanto, la incomptina A representa una molécula prometedora para futuros estudios preclínicos como agente anticancerígeno, particularmente en el tratamiento del cáncer de mama.

Palabras clave: incomptina A, actividad antitumoral, cáncer de mama, hexocinasa II, apoptosis.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common type of cancer among women worldwide. Tumor cells associated with this disease exhibit various adaptations that allow them to survive and proliferate rapidly. One of these adaptations is the overexpression of the glycolytic enzyme hexokinase II, involved in cellular metabolism and the inhibition of apoptosis, making it a potential therapeutic target in breast cancer.

Incomptine A is a sesquiterpene lactone that has demonstrated a selective cytotoxic effect on different subtypes of breast cancer cells, possibly by reducing hexokinase II expression. However, to date, its effect has not been evaluated in *in vivo* models. Therefore, the present study aimed to analyze the antitumor activity of incomptine A in a mouse model of breast cancer.

Subsequently, a murine model of breast cancer was generated by inoculating 4T1 cells into the mammary gland of female mice. Seven days later, tumor formation was confirmed, different experimental groups were formed, and different doses of incomptine A were administered. At the end of treatment, tumors were removed to evaluate their weight, and various analyses were performed: histological staining, western blot, flow cytometry, and mitochondrial activity studies. In addition, the acute oral toxicity of incomptine A was evaluated in Balb/c mice.

The results showed a significant reduction in the size and weight of tumors treated with incomptine A. Histological analysis revealed a lower density of tumor cells, while western blot showed a decrease in the expression of hexokinase II, without relevant changes in other cellular metabolic proteins. In addition, a reduction in the anti-apoptotic protein Bcl-2 and an increase in the expression of caspase 3 were observed, suggesting activation of the apoptotic pathway, which was confirmed by flow cytometry. Finally, mitochondrial activity assays revealed a functional decrease in the mitochondria of these cells.

Taken together, these findings indicate that incomptine A exerts an antitumor effect by inducing apoptosis in breast cancer cells, likely through the inhibition of hexokinase II. Therefore, incomptine A represents a promising molecule for future preclinical studies as an anticancer agent, particularly in the treatment of breast cancer.

Keywords: incomptine A, antitumor activity, breast cancer, hexokinase II, apoptosis.

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 El cáncer.	1
1.2 Clasificación del cáncer.	2
1.3 Epidemiología del cáncer a nivel mundial.	3
1.4 Cáncer de mama.	4
1.5 Estadificación del cáncer de mama.	5
1.6 Subtipos moleculares del cáncer de mama.	7
1.7 Tratamientos contra el cáncer de mama.	8
1.8 Reacciones adversas de los tratamientos contra el cáncer de mama.	10
1.9 Medicina tradicional mexicana.	16
1.10 Las plantas medicinales como fuente de agentes anticancerígenos.	17
2. ANTECEDENTES.	19
2.1 Generalidades de la especie <i>Decachaeta incompta</i> .	19
2.2 Usos tradicionales de <i>D. incompta</i> .	21
2.3 Estudios fitoquímicos de <i>D. incompta</i> .	21
2.4 Actividades farmacológicas de la incomptina A.	24
2.5 HKII y su relevancia como blanco terapéutico en el cáncer.	26

3. JUSTIFICACIÓN.	29
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	29
5. HIPÓTESIS.	29
6. OBJETIVO GENERAL.	30
7. OBJETIVOS PARTICULARES	30
8. MATERIALES Y MÉTODOS	31
8.1 Incomptina A.	31
8.2 Cultivo celular.	31
8.3 Animales de laboratorio.	31
8.4 Toxicidad oral aguda.	32
8.5 Modelo murino de cáncer de mama.	33
8.6 Actividad antitumoral.	33
8.7 Análisis de órganos y plasma sanguíneo.	34
8.8 Análisis histopatológico.	34
8.9 Western blot.	35
8.10 Tinción con Anexina V/Ghost Red.	36
8.11 Ensayo de actividad del complejo respiratorio I mitocondrial.	36
8.12 Análisis estadístico.	37
9. RESULTADOS.	38
9.1 Toxicidad oral aguda de la incomptina A.	38
9.2 Actividad antitumoral de la incomptina A.	38
9.3 Análisis histopatológico de tumores.	41
9.4 Toxicidad del tratamiento con IA en un modelo de ratón.	43

9.5 El tratamiento con IA disminuye la expresión de HKII en tumores mamarios	46
9.6 La IA induce la apoptosis en células tumorales de cáncer de mama.	47
9.7 IA disminuye la actividad mitocondrial de las células tumorales del cáncer de mama	50
10. DISCUSIÓN.	52
11. CONCLUSIÓN.	58
12. BIBLIOGRAFÍA	59
13. ANEXO	68
13.1 Artículo	68

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Clasificación TNM en cáncer de mama de acuerdo con AJCC.	6
Tabla 2. Descripción general de los subtipos moleculares de cáncer de mama.	7
Tabla 3. Plantas y compuestos bioactivos con actividad anticancerígena.	18
Tabla 4. Niveles plasmáticos de transaminasas en suero de ratones con y sin tratamiento.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Representación gráfica de la formación de un tumor y metástasis.	1
Figura 2. Tipos de cáncer más comunes a nivel mundial registrados en 2022 y su incidencia en porcentajes para ambos sexos.	4
Figura 3. Anatomía de la mama femenina.	5
Figura 4. Tratamientos utilizados contra el cáncer de mama.	9
Figura 5. <i>D. incompta</i> (DC) R. M. King and H. Robinson.	20
Figura 6. Distribución de <i>D. incompta</i> .	20
Figura 7. Lactonas sesquiterpénicas purificadas de <i>D.incompta</i> .	23
Figura 8. Funciones anti apoptóticas y metabólicas de HKII mitocondrial.	28
Figura 9. Actividad antitumoral del tratamiento con IA en las células 4T1 in vivo.	40
Figura 10. Microfotografías representativas con tinción H/E de tumores mamarios de ratón inducidos por células 4T1 observados a 20x.	42
Figura 11. El efecto del tratamiento con IA sobre el peso corporal y de órganos de ratones al final del tratamiento.	44
Figura 12. Expresión de enzimas glucolíticas en tumores del grupo sin tratamiento y tratados con IA (0.07, 0.7 y 2.5 mg/kg) y DOXO (80 mg/kg).	47
Figura 13. Expresión proteínas pro y anti apoptóticas en tumores del grupo sin tratamiento y tratados con IA (0.07, 0.7 y 2.5 mg/kg) y DOXO (80 mg/kg).	48
Figura 14. Apoptosis inducida en células tumorales tras el tratamiento con IA y DOXO.	49

Figura 15. Actividad mitocondrial de las células tumorales de mama después del tratamiento con IA (0.07, 0.7 y 2.5 mg/kg) y DOXO (80 mg/kg). **51**

Figura 16. Mecanismo de acción propuesto para IA en tumores de CM. **58**

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
2-DG	2-desoxi-D-glucosa
µg	Microgramos
µm	Micrómetros
ACS	American Cancer Society
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIF	Apoptosis-inducing factor
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALDOA	Aldolsa A
APAF-1	Apoptosis protease-activating factor-1
ATP	Adenosin trifosfato
Bcl-2	B-cell lymphoma gene 2
CC ₅₀	Concentración citotóxica 50
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50

CO ₂	Dióxido de carbono
Cyt C	Citocromo C
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
CM	Cáncer de mama
DE ₅₀	Dosis efectiva 50
DL ₅₀	Dosis letal 50
DOXO	Doxorrubicina
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EEM	Error estándar de la media
ENT	Enfermedades no transmisibles
g	gramos
Glu-6-F	Glucosa 6 fosfato
h	Horas
H/E	Hematoxilina-eosina
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

HKII	Hexocinasa II
IA	Incomptina A
IHQ	Inmunohistoquímica
IT	Índice terapéutico
LDH	Lactato deshidrogenasa
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
kg	Kilogramos
M	Molar
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MOM	Mitochondrial outer membrane
NCI	National Cancer Institute
NF- κ B	Factor de transcripción nuclear kappa B

NGHRI	National Genome Human Research Institute
NIH	National Institutes of Health
nm	Nanómetros
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
OMS	Organización Mundial de la Salud
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
RPM	Revoluciones por minuto
ROS	Reactive oxygen species
SERM'S	Moduladores selectivos de receptores estrogénicos
SGOT	Transaminasa glutámico ácido oxalacética
SGPT	Transaminasa glutámico-pirúvica
ST	Sin tratamiento
TOP	Topoisomerasa
VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel isoform.

1.INTRODUCCIÓN.

1.1 El Cáncer.

El cáncer es un término que engloba un conjunto de enfermedades caracterizadas por una proliferación continua y descontrolada de células anormales. Estas células pueden diseminarse desde el lugar original del tumor (el sitio primario) a tejidos y órganos adyacentes afectando la función normal del organismo. De hecho, la mayoría de las muertes por tumores sólidos son causadas por un proceso metastásico (Dillekas *et al.*, 2019). Muchos autores concuerdan que el inicio del cáncer se debe a la aparición de mutaciones en células somáticas que les confieren ventajas adaptativas como la división y proliferación acelerada que las distinguen de sus contrapartes normales (Figura 1) (Zhang *et al.*, 2024).

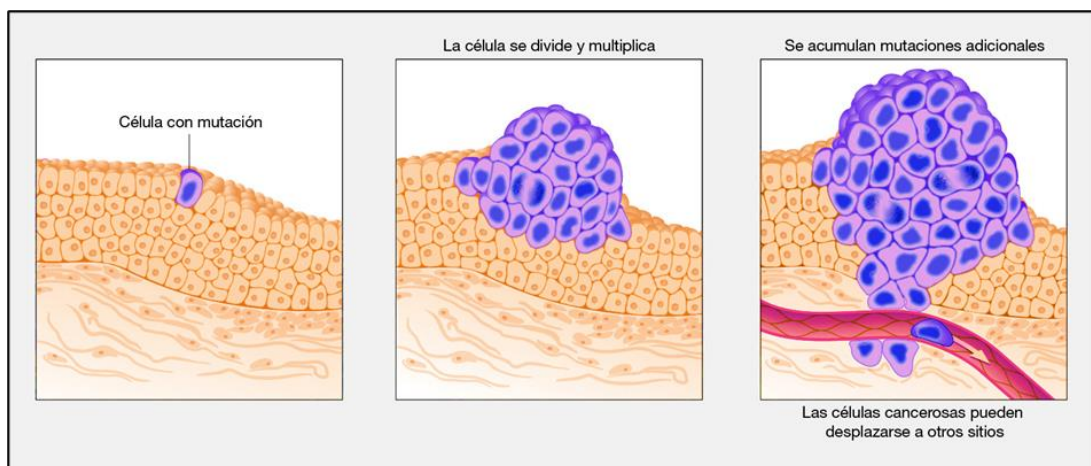


Figura 1. Representación gráfica de la formación de un tumor y metástasis. Editado de (NGHRI, 2025).

1.2 Clasificación del cáncer.

El cáncer puede afectar a cualquier célula del cuerpo, por lo que actualmente existen más de cien tipos distintos de cáncer, que varían sustancialmente en su comportamiento y respuesta al tratamiento.

De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH, 2025), los tumores se clasifican según el tipo de célula del que se originan. La mayoría de los cánceres entran en uno de los siguientes grupos principales:

- **Carcinoma:** El cáncer que afecta a las células epiteliales; el carcinoma se divide en dos subtipos: el adenocarcinoma (se desarrolla en órganos o glándulas) y el carcinoma de células escamosas (se desarrolla en el epitelio escamoso). Este es el tipo más común de cáncer.
- **Sarcoma:** El cáncer que se origina en los tejidos conectivos y de sostén, tales como huesos, tendones, cartílago, músculos y tejido adiposo.
- **Mieloma:** El mieloma es un cáncer que se origina en las células plasmáticas de la médula ósea.
- **Leucemia:** Las leucemias o cánceres sanguíneos son un tipo de cáncer de los elementos celulares que conforman la sangre.
- **Linfoma:** Los linfomas son cánceres que se desarrollan en las glándulas o ganglios del sistema linfático.

1.3 Epidemiología del cáncer a nivel mundial.

De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) las enfermedades cardiovasculares (ECV) y el cáncer son las principales causas de muerte prematura en el mundo. Se estima que por cada 10 personas que mueren prematuramente por enfermedades no transmisibles (ENT), 4 mueren por ECV y 3 mueren por algún tipo de cáncer y, según las clasificaciones actuales y las tendencias recientes, el cáncer podría superar a las ECV como principal causa de muerte prematura a lo largo de este siglo (Bray *et al.*, 2021).

Hoy en día se estima que aproximadamente una de cada cinco personas desarrollará cáncer a lo largo de su vida. Tan solo en el año 2022, se diagnosticaron 20 millones de casos nuevos y 9.7 millones de muertes por cáncer a nivel mundial. De estos, los más comunes fueron el cáncer de pulmón (12.4%), seguido por el cáncer de mama (11.5%), el cáncer colorrectal (9.6%), el cáncer de próstata (7.3%), el cáncer de estómago (4.8%) y el cáncer de hígado (4.3%) (Figura 2). (Bray *et al.*, 2024).

Además, se estima que estas cifras se mantendrán al alza durante los próximos años, por lo cual el cáncer se considera un problema relevante de salud pública del siglo XXI.

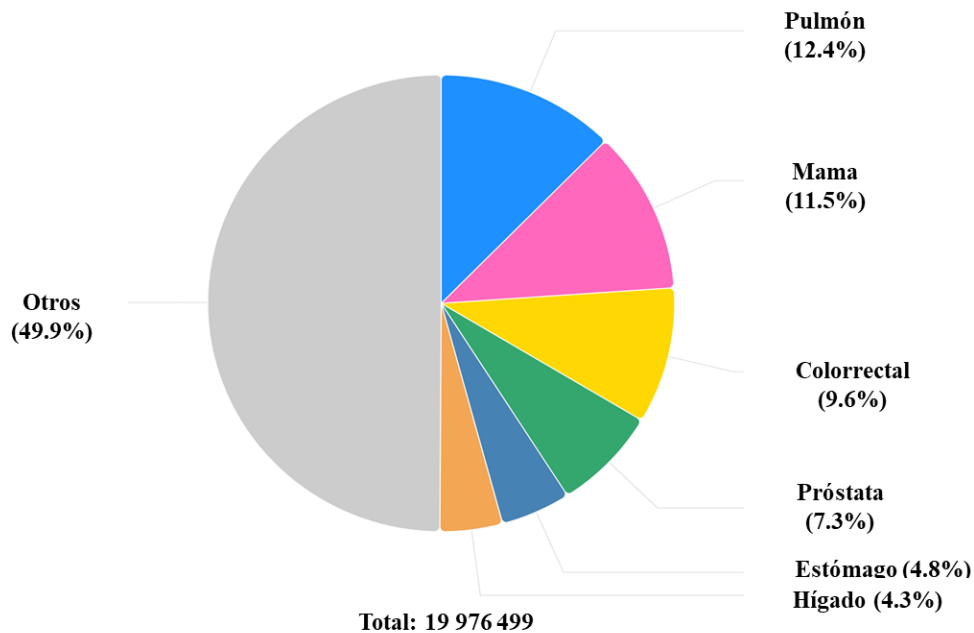


Figura 2. Tipos de cáncer más comunes a nivel mundial registrados en 2022 y su incidencia en porcentajes para ambos sexos. Datos tomados de (Bray *et al.*, 2024).

1.4 Cáncer de mama.

Las glándulas mamarias son órganos glandulares que se encuentran sobre las costillas superiores y los músculos del pecho. Cada mama se compone principalmente de glándulas, conductos, tejido graso y tejido conectivo (Figura 3). La función fisiológica de las glándulas mamarias en mujeres es la producción y liberación de leche para alimentar a los recién nacidos (NCI, 2025).

El cáncer de mama (CM) es un crecimiento aberrante y descontrolado de las células epiteliales, de los conductos y/o de los lobulillos de las glándulas mamarias. Este cáncer es el más común en mujeres a nivel mundial; y aunque se presenta casi exclusivamente en mujeres, también los hombres pueden padecerlo (ACS, 2025).

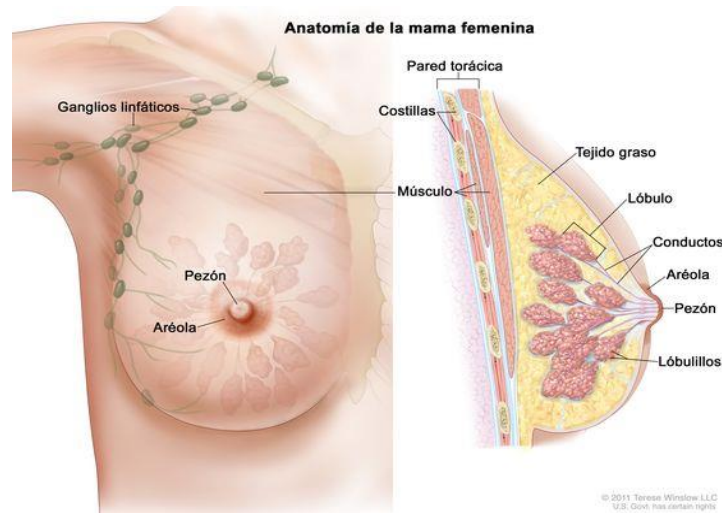


Figura 3. Anatomía de la mama femenina. Tomado de (NCI, 2025).

1.5 Estadificación del cáncer de mama.

La estadificación del CM es el proceso mediante el cual los médicos determinan la extensión y gravedad del cáncer en el cuerpo con el fin de diagnosticar y optar por el tratamiento más adecuado. El sistema de estadificación que se utiliza con más frecuencia para el CM es el sistema TNM del Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC), el cual es una estrategia para agrupar a las pacientes respecto a su pronóstico. Este sistema se basa en el tamaño de tumor (T), la propagación a los ganglios linfáticos cercanos (N) y la propagación (metástasis) a sitios distantes (M) (Amin *et al.* 2017) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación TNM en cáncer de mama de acuerdo con AJCC.

Estadios de cáncer de mama (TNM)			
Estadio 0	Tis (in situ)	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II A	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadio II B	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio III A	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Estadio III B	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Estadio III C	Cualquier T, N3 M0		
Estadio IV	Cualquier T, cualquier N, M1		

T: tamaño del tumor, N: compromiso linfático nodal, M: metástasis.

1.6 Subtipos moleculares del cáncer de mama.

El CM es heterogéneo, por lo cual, en lugar de basarse únicamente en características histológicas (como el tamaño o la invasión), la clasificación molecular analiza los perfiles genéticos y las características biológicas de las células tumorales como la expresión de biomarcadores, tipo receptores celulares (Tabla 2), lo que permite una comprensión más precisa de la biología del cáncer. Esta clasificación ayuda a identificar subtipos específicos de CM y permite la elección de un tratamiento más personalizado (Tsang y Tse, 2020).

Tabla 2. Descripción general de los subtipos moleculares de cáncer de mama			
Subtipo	Perfil genético	Fenotipo IHQ	Sobrevivencia
Luminal A	Alta expresión de genes epiteliales luminales y genes relacionados con RE.	RE, RP ≥20%, HER2-, Ki67 bajo	Alta
Luminal B	Baja expresión de genes epiteliales luminales y genes relacionados con RE, pero un mayor nivel de proliferación y genes relacionados con HER2 que luminal A.	RE, RP <20% HER2+ Ki67 alto	Alta/ intermedia
HER2+	Alta expresión de genes relacionados con HER2; baja expresión de genes relacionados con RE.	RE-, RP-, HER2+	Intermedia
Triple negativo	Alta expresión de genes basales epiteliales y de proliferación; baja expresión de genes relacionados con RE Y HER2.	RE-, RP-, HER2- Ki67 alto	Baja
Abreviaturas: RE, receptor de estrógeno; RP, receptor de progesterona; HER2, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano; Ki67, marcador utilizado para determinar la fracción de crecimiento de una población celular determinada; IHQ, inmunohistoquímica.			

1.7 Tratamientos contra el cáncer de mama.

Una vez que se ha detectado el CM, se debe optar por elegir el tratamiento adecuado para combatirlo, tomando en cuenta factores como el estadio, el grado de avance, la presencia de determinados biomarcadores y el estado general de salud, así como las preferencias personales. Todo esto con el fin de conocer los beneficios y los riesgos que el tratamiento implique. Los tratamientos contra el CM se dividen en dos grandes categorías: locales y sistémicos (ACS, 2025) (Figura 4).

Tratamientos locales: son aquellos que van dirigidos al tumor sin afectar el resto del cuerpo.

- Cirugía: se realiza con el fin de extirpar el tumor y puede variar dependiendo de qué tan avanzado se encuentre el cáncer.
- Mastectomía: cirugía realizada para extirpar el seno de manera parcial o total.
- Radioterapia: es un tratamiento en el que se usan rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para destruir células cancerosas y/o impedir que se multipliquen.

Tratamientos sistémicos: son medicamentos que se distribuyen por todo el cuerpo para atacar a las células cancerosas en donde quiera que se encuentren.

- Quimioterapia: se usan medicamentos que inhiben el crecimiento de las células cancerosas, ya sea destruyéndolas o evitando que se multipliquen.

- Terapia hormonal: se retrasa o detiene el crecimiento de tumores sensibles a las hormonas al bloquear la capacidad del cuerpo para producir o al interferir con la acción de las hormonas en las células tumorales.
- Terapia dirigida: actúa sobre las proteínas que controlan la forma en que las células cancerosas se multiplican, dividen y diseminan.
- Inmunoterapia: terapia donde se apoya al sistema inmunitario de una persona a combatir el cáncer.

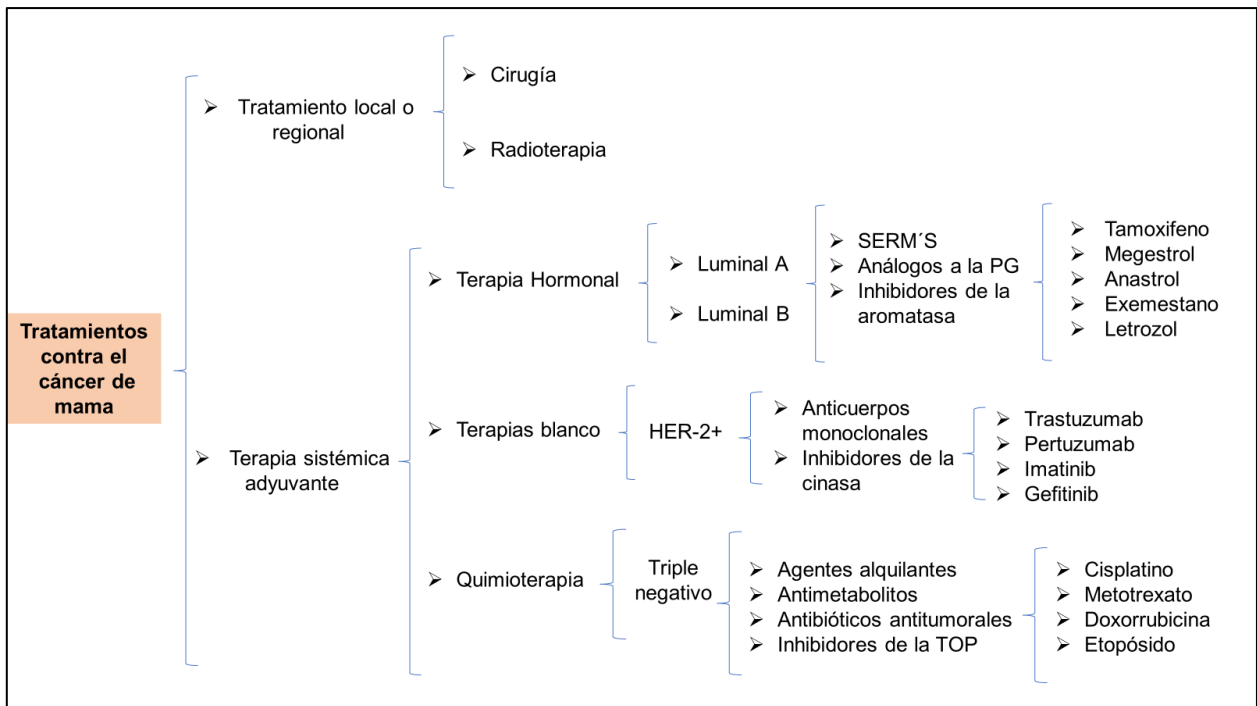


Figura 4. Tratamientos utilizados contra el cáncer de mama. Abreviaturas: HER2+ (Receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano); SERM'S (Moduladores selectivos de receptores estrogénicos); PG (progesterona); TOP (topoisomerasa).

1.8 Reacciones adversas de los tratamientos contra el cáncer de mama.

La principal actividad de los tratamientos utilizados contra el CM es afectar la proliferación y/o la viabilidad de las células tumorales; no obstante, también pueden afectar en menor medida a células sanas, lo que puede provocar diversas reacciones adversas. Estas reacciones pueden variar según el tratamiento y el estadio del tumor, así como las características individuales de cada persona, lo que puede llegar a afectar la calidad de vida de las pacientes de manera considerable (Tommasi *et al.*, 2022).

A continuación, se mencionan los efectos indeseables y adversos producidos por los tratamientos utilizados contra el CM.

Cirugía

- Dolor y sensibilidad: es común experimentar dolor en el área de la cirugía, que puede ser temporal o prolongarse.
- Hinchazón: la hinchazón alrededor de la zona operada es frecuente, especialmente después de una mastectomía.
- Cambios en la forma del pecho: puede haber cambios visibles en la forma o tamaño del pecho.
- Linfedema: enfermedad crónica y progresiva caracterizada por la acumulación de líquido en los tejidos intersticiales del brazo, hombro y cuello.

Radioterapia

La radioterapia utilizada para tratar CM puede causar diversos efectos secundarios a corto y a largo plazo (ACS, 2025).

Los efectos secundarios de la radioterapia a corto plazo incluyen:

- Reacciones en la piel: enrojecimiento, sequedad, picazón, irritación o dolor en la zona tratada.
- Fatiga: la radioterapia puede causar cansancio y debilidad que puede empeorar mediante avanza el tratamiento.
- Hinchazón y dolor: se puede presentar en los senos y/o en el área del pecho.
- Vómitos y náuseas: la radiación puede llegar a provocarlos.

El uso de radioterapia durante un tiempo prolongado puede desarrollar efectos secundarios a largo plazo y algunos de importancia como:

- Daño pulmonar: la radioterapia puede llevar a efectos tempranos en pulmones como la aparición de neumonitis o efectos tardíos, como fibrosis pulmonar.
- Neuropatía: la radiación al seno puede causar daño a algunos nervios del brazo y otras complicaciones como entumecimiento, hormigueo, dolor y debilidad en el hombro, el brazo y la mano.
- Cardiotoxicidad: la radiación puede afectar el corazón debido al endurecimiento de las arterias, daño a la válvula coronaria o palpitaciones cardíacas irregulares.

- Debilitamiento de las costillas: la radioterapia puede debilitar las costillas, lo que podría ocasionar una fractura.
- Mayor riesgo de cánceres secundarios: existe un riesgo ligeramente mayor de desarrollar otros tipos de cáncer, como el angiosarcoma, en la zona tratada con radiación.

Terapia hormonal

La terapia hormonal es una estrategia clave en el tratamiento de CM con receptores hormonales positivos (estrógenos y/o progesterona) y aunque generalmente es bien tolerada, puede presentar efectos secundarios que varían según el tipo de medicamento y las características individuales de cada paciente. Los efectos secundarios de la terapia hormonal dependen en gran medida del fármaco utilizado. Sin embargo, los sofocos, la disfunción sexual, el aumento de peso, los síntomas musculoesqueléticos y la fatiga son efectos secundarios comunes de todas las terapias hormonales (Franzoi *et al.*, 2021).

Los moduladores selectivos de receptores estrogénicos (SERM'S), como el tamoxifeno y toremifeno poseen una estructura química que les confiere afinidad para unirse a los receptores de estrógenos, induciendo efectos antagonistas estrogénicos en órganos como la mama y el endometrio, y efectos agonistas estrogénicos en hueso, corazón e hígado. Debido a esto, estos fármacos pueden tener efecto en células sanas y provocar reacciones adversas.

Entre los principales efectos adversos de los SERM'S se menciona el aumento de riesgo de cáncer endometrial, la fragilidad ósea, la formación de coágulos sanguíneos y la embolia pulmonar (Pérez *et al.*, 2004).

Otros fármacos utilizados para tratar este subtipo de CM son los inhibidores de la aromatasa como el anastrozol, letrozol y exemestano, los cuales bloquean la producción de estrógenos. Entre los efectos secundarios que pueden llegar a presentar estos fármacos se han reportado dolores, sofocos, fatiga, sequedad vaginal y algunos menos comunes, pero más graves como enfermedad cardiovascular, dislipidemia, depresión y osteoporosis (Bell *et al.*, 2020).

Terapia dirigida

La terapia dirigida para el CM es un tipo de tratamiento que actúa específicamente sobre moléculas o mecanismos implicados en el crecimiento y supervivencia de las células cancerosas. Aunque suele tener menos efectos secundarios que la quimioterapia convencional, no está exenta de efectos adversos. Estos varían según el tipo específico de terapia dirigida utilizada que se basa principalmente en el uso de anticuerpos monoclonales e inhibidores de cinasa (ACS, 2025).

Trastuzumab es uno de los anticuerpos monoclonales que se dirigen contra HER-2, una proteína sobre expresada en algunas células cancerosas y puede administrarse solo o en combinación con quimioterapia (EBCTCG, 2021).

Entre los efectos adversos clínicamente significativos asociados con trastuzumab se incluyen: dolor no especificado, astenia, nasofaringitis, trastornos cutáneos, dispepsia,

parestesia, infecciones respiratorias, aumento del lagrimeo, diarrea, mialgia, edema, fiebre, hemorragia nasal, eventos cardíacos, insomnio, tos, dolor de espalda, disnea, escalofríos, mareos o vértigo, hipertensión, insuficiencia cardíaca congestiva, problemas gastrointestinales y deshidratación (Jackson *et al.*, 2022).

Por otro lado, los inhibidores de cinasa como lapatinib, neratinib y el tucatinib, que se utilizan para bloquear las enzimas responsables de la proliferación celular se han asociado con efectos adversos como: anorexia, diarrea, náuseas, vómitos, toxicidades cutáneas, aumento de enzimas hepáticas y problemas cardíacos, que pueden incluir hipertensión y alteraciones en la función cardíaca (Schlam y Swain, 2021).

El manejo de estos efectos adversos suele implicar un monitoreo regular, tratamiento sintomático, cuidados de soporte y ajustes en la dosis según sea necesario. Es crucial que la terapia sea supervisada por un equipo médico especializado para adaptar el tratamiento a las necesidades individuales del paciente y minimizar los efectos secundarios.

Quimioterapia

La quimioterapia es un tratamiento médico que utiliza medicamentos que destruyen células cancerosas y/o impiden que se dividan; estos pueden administrarse solos o en combinación con otros tratamientos con el fin de tener una mejor respuesta. Sin embargo, estos medicamentos se administran de manera sistémica y no son dirigidos específicamente a las células cancerosas por lo que muchas células sanas resultan dañadas durante el tratamiento, lo que conlleva a la presencia de efectos indeseables

que pueden variar en intensidad dependiendo del paciente, la combinación de fármacos y otros factores individuales (ACS, 2025).

A continuación, se menciona una lista de efectos secundarios y adversos que pueden presentarse durante la quimioterapia:

- Fatiga: uno de los efectos más frecuentes, que puede variar desde cansancio leve hasta una fatiga extrema que afecta las actividades diarias.
- Náuseas y vómitos: aunque los medicamentos antieméticos pueden ayudar a controlar estos síntomas, muchas personas aún pueden experimentar náuseas.
- Pérdida de apetito: esto puede contribuir a la pérdida de peso y debilidad general.
- Caída del cabello: pérdida de cabello en todo el cuerpo, aunque este efecto es generalmente reversible después del tratamiento.
- Cambios en la piel y las uñas: la piel puede volverse más sensible o seca; las uñas pueden volverse quebradizas.
- Problemas digestivos: incluyen diarrea o estreñimiento.
- Problemas de fertilidad: la quimioterapia puede afectar la fertilidad; algunas mujeres pueden experimentar menopausia temprana.
- Efectos en la sangre: puede haber una disminución en el conteo de glóbulos blancos, rojos y plaquetas, lo que aumenta el riesgo de infecciones, anemia y sangrado.
- Dolores y molestias: puede haber dolores musculares o articulares.

- Infecciones: la reducción en el conteo de glóbulos blancos aumenta el riesgo de infecciones.
- Problemas emocionales: sentimientos de ansiedad, depresión o estrés emocional.

Algunos fármacos quimioterapéuticos son tóxicos para órganos específicos, como el corazón, el hígado o los riñones, lo que puede causar efectos secundarios más graves a largo plazo.

Debido a que la quimioterapia no es selectiva es necesario desarrollar tratamientos más específicos y que minimicen el daño a las células sanas, además de monitorear el seguimiento de los pacientes, especialmente durante y entre los ciclos de tratamiento, con el fin de observar a tiempo el desarrollo de toxicidad (van den Boogaard *et al.*, 2022).

1.9 Medicina tradicional mexicana.

La OMS define a la medicina tradicional como la suma de los conocimientos, habilidades y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias indígenas de diferentes culturas, explicables o no, que se utilizan en el mantenimiento de la salud y la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales. Hoy en día, 170 países han comunicado que utilizan la medicina tradicional y México no es la excepción. (OMS, 2023).

La medicina tradicional mexicana se remonta a tiempos prehispánicos, antes de la llegada de los españoles a América, principalmente en las civilizaciones mesoamericanas, como los aztecas y los mayas. Estas culturas tenían un profundo conocimiento de las plantas medicinales, muchas de las cuales aún se usan hoy en día debido a que sus beneficios fueron transmitidos de forma oral y documentados en códices (Bejar *et al.*, 2000).

México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales; con un registro de 3,000 plantas en el herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), de las cuales, solamente se ha hecho análisis farmacológico del 5% de ellas (CONABIO, 2020). Por lo tanto, el estudio de estas plantas es una gran oportunidad para el descubrimiento de sustancias con actividad farmacológica.

1.10 Las plantas medicinales como fuente de agentes anticancerígenos.

Como se mencionó, el cáncer cuenta con diferentes estrategias terapéuticas, como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, cuyo objetivo es matar a las células cancerosas y aumentar la esperanza de vida de los pacientes. Sin embargo, estas terapias presentan una variedad de efectos indeseables y, a la larga, pueden generar resistencia. Por lo tanto, es de vital importancia la búsqueda de nuevos agentes anticancerígenos. En los últimos años, las plantas han sido una fuente importante de compuestos bioactivos utilizados en la medicina, especialmente en el tratamiento contra el cáncer. Muchos fármacos anticancerígenos actuales tienen su origen en productos naturales derivados de plantas, gracias a su gran diversidad química y

biológica. A continuación, se enlista una variedad de plantas y compuestos que han mostrado eficacia contra distintos tipos de cáncer (Tabla 3).

Tabla 3. Plantas y compuestos bioactivos con actividad anticancerígena.

Nombre científico	Nombre común	Familia	Compuestos anticancerígenos	Actividad biológica	Referencia
<i>Taxus brevifolia</i>	Tejo del Pacífico	Taxaceae	Taxol	Inhíbe la división celular mediante estabilización de los microtúbulos.	(Schiff <i>et al.</i> , 1979).
<i>Catharanthus roseus</i>	Vinca rosada	Apocynaceae	Vincristina	Inhíbe la formación de microtúbulos en el huso mitótico.	(Miura <i>et al.</i> , 1988).
<i>Camptotheca acuminata</i>	Árbol de la Felicidad	Cornaceae	Camptotecina	Inhíbe la topoisomerasa I del ADN.	(Hsiang <i>et al.</i> , 1985).
<i>Curcuma longa</i>	Cúrcuma	Zingiberaceae	Curcumina	Inhibición de la proliferación celular e inducción de la apoptosis.	(Amaroli <i>et al.</i> , 2024).
<i>Tanacetum parthenium</i>	Matricaria	Asteraceae	Partenolida	Inhibición del factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB).	(Kashkoe <i>et al.</i> , 2024).

2. ANTECEDENTES.

2.1 Generalidades de la especie *Decachaeta incompta*.

Decachaeta incompta (DC.) R.M.King & H.Rob. pertenece al género *Decachaeta* de la familia Asteraceae, orden Asterales. El género comprende 9 especies aceptadas: *D. haenkeana*, *D. ovandensis*, *D. ovatifolia*, *D. perornata*, *D. pyramidalis*, *D. scabrella*, *D. serboana*, *D. thieleana* y *D. incompta*.

D. incompta o *Eupatorium incomptum* DC. crece principalmente en el bioma subtropical y en nuestro país es conocida con el nombre de “solecito” (POWO,2025).

D. incompta es una hierba erecta moderadamente ramificada que puede alcanzar los 3 metros de altura; posee hojas, filarios, corolas y estilos con pelos glandulares. Los tallos son estriados de color marrón y las hojas son ovadas y generalmente se encuentran alternadas. Sus inflorescencias contienen entre 8-16 flores de color amarillo o blancas aproximadamente (King y Robinson, 1969) (Figura 5).

El área de distribución de esta especie abarca desde México hasta Guatemala a una altitud de entre 900-2000 m sobre el nivel del mar; *D. incompta* se ha avistado en estados como Oaxaca, Michoacán, Jalisco, Puebla y Veracruz (Turner et al., 2011). (Figura 6).



Figura 5. *Decachaeta incompta* (DC) R. M. King and H. Robinson. Foto tomada de (Calzada et al., 2022).



Figura 6. Distribución de *D. incompta* (POWO, 2025).

2.2 Usos tradicionales de *D. incompta*.

La familia Asteraceae es uno de los grupos de plantas vasculares más grande que hay, con más de 1600 géneros y 25000 especies a nivel mundial. Muchos miembros de esta familia se han utilizado en la dieta y la medicina durante siglos. En México, algunas plantas de la familia Asteraceae forman parte del conocimiento tradicional, donde se han utilizado como alimento, fuente de aceites, insecticidas y plantas ornamentales; sin embargo, su principal uso es en la medicina tradicional (Rolnik y Olas, 2021; Cilia-López *et al.*, 2021).

D. incompta es una planta de la familia de las asteráceas que ha sido utilizada en la medicina tradicional mexicana; específicamente en el estado de Oaxaca donde según comunicaciones privadas de un hierbero local, las hojas de esta planta se utilizan en manera de infusión para tratar enfermedades gastrointestinales desde dolores estomacales hasta diarrea (Calzada *et al.*, 2009). Estas observaciones llevaron a distintos estudios fitoquímicos con el fin de identificar y purificar diversas moléculas.

2.3 Estudios fitoquímicos de *D. incompta*.

Las plantas sintetizan compuestos orgánicos conocidos como metabolitos, que se dividen en dos categorías principales: primarios y secundarios. Los metabolitos primarios son compuestos esenciales para el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas (proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos); mientras que los metabolitos secundarios son compuestos no esenciales para la supervivencia, pero que desempeñan roles importantes en la defensa, la comunicación y la adaptación al

medio ambiente (aceites esenciales, alcaloides, cumarinas, esteroides, fenoles, flavonoides, glucósidos, gomas, iridoides, lignanos, mucílagos, pectinas, quinonas, saponinas, taninos y terpenos) (Verdecia *et al.*, 2021).

Los terpenoides, y específicamente las lactonas sesquiterpénicas son un grupo de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos y diversificados en la familia de plantas Asteraceae, en la que se han reportado más de 5,000. Las lactonas sesquiterpénicas juegan un rol importante en la interacción entre plantas e insectos, actuando como atractores, disuasivos y anti alimentarios. Por otro lado, en los humanos juegan un rol importante como parte de una dieta balanceada como agentes terapéuticos y farmacológicos, ya que poseen actividades biológicas relevantes, como antibacteriales, antifúngicas, antivirales, antiinflamatorias y anticancerígenas (Chadwik *et al.*, 2013).

Debido a que la planta *D. incompta* se usa de manera tradicional en enfermedades gastrointestinales se realizaron estudios fitoquímicos con el fin de identificar y cuantificar los fitoquímicos presentes. Según la metodología de (Calzada et al., 2009) se recolectaron hojas de *D. incompta*, se molieron y se realizó el proceso de percolación a temperatura ambiente con diclorometano. Después de la filtración, el extracto se concentró al vacío, el cual se inyectó en una cromatografía en columna utilizando el sistema de gradiente de disolvente: hexano y diclorometano/metanol. Finalmente, se obtuvieron 10 fracciones de las cuales la fracción 1 (F1) y la fracción 8 (F8) se purificaron por cristalización y se obtuvieron dos lactonas sesquiterpénicas tipo heliangólidas que se denominaron incomptina A e incomptina B. Años más tarde,

(Bautista et al.,2012) purificó dos nuevas lactonas sesquiterpénicas a las que denominó incomptina C e incomptina D. (Figura 7).

De estas cuatro lactonas, la que más ha sido estudiada es la incomptina A debido a que posee actividades farmacológicas de interés.

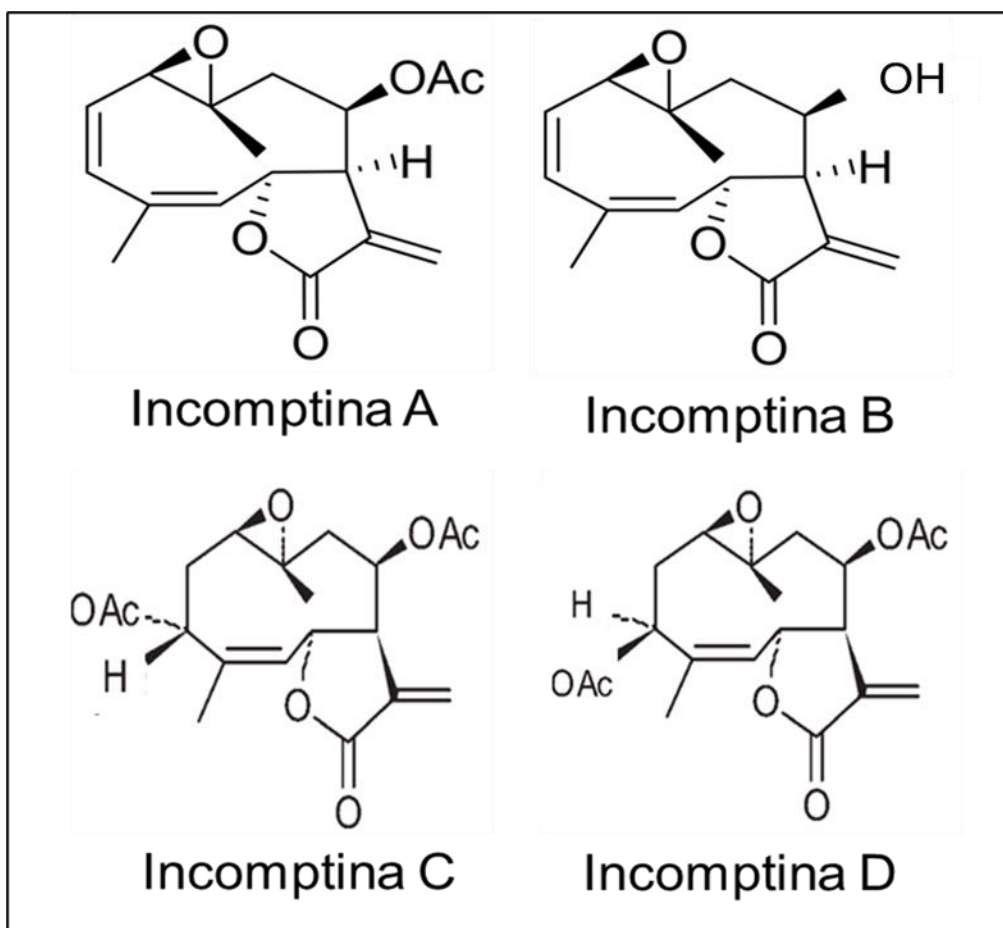


Figura 7. Lactonas sesquiterpénicas purificadas de *D.incompta*.

2.4 Actividades farmacológicas de la incomptina A.

La actividad farmacológica de *D. incompta* y específicamente de la incomptina A (IA) se han reportado mediante estudios *in vitro*, *in silico* e *in vivo*.

Las plantas de la familia Asteraceae, han sido utilizadas tradicionalmente para tratar dolores estomacales y enfermedades gastrointestinales como la diarrea. En este contexto, se evaluó el extracto de las hojas de *D. incompta*, así como las incomptinas A y B, en trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*; donde la IA mostró concentraciones inhibitorias 50 (CI₅₀) de 2.6 µg/ml para *E. histolytica* y 18.1 µg/ml para *G. lamblia*, valores comparables a los del fármaco antiamebiano emetina (Calzada *et al.*, 2009).

Años más tarde, se realizaron estudios proteómicos en trofozoítos de *E. histolytica* donde se evidenció que el tratamiento con IA provocó una regulación negativa de tres enzimas glucolíticas; la enolasa, el piruvato:ferredoxina oxidoreductasa y la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa. Estos resultados llevaron a hipótesis de que IA podría actuar alterando el metabolismo energético de *E. histolytica* (Velázquez-Domínguez *et al.*, 2013).

Actividad citotóxica y antitumoral de IA

El cáncer presenta rasgos distintivos, conocidos como "hallmarks", que permiten comprender su diversidad. Uno de estos rasgos es la reprogramación metabólica, donde las células cancerosas adoptan un metabolismo principalmente glucolítico, incluso en presencia de oxígeno (Hanahan y Weinberg, 2011; Warburg, 1925). Dado

que la IA altera el metabolismo energético en *E. histolytica*, se decidió investigar su potencial anticancerígeno debido a esta característica.

El primer estudio realizado sobre la actividad anticancerosa de la IA, se llevó a cabo sobre líneas celulares de linfoma no Hodgkin (U-937, Farage, SU-DHL-2 y REC-1), donde el tratamiento con IA mostrando una CI_{50} de 0.12 ± 0.02 , 2.3 ± 0.55 , 3.2 ± 0.04 y 3.5 ± 0.01 mM, respectivamente. Además, se observó la inducción de apoptosis, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y cambios en la expresión de proteínas, incluyendo las de la vía glucolítica (Pina-Jiménez *et al.*, 2021). Posteriormente se evaluó la actividad antitumoral de IA en un modelo *in vivo* de linfoma no Hodgkin en ratones de la cepa Balb/c, donde se obtuvo una dosis efectiva 50 (DE_{50}) de 2.4 ± 0.10 mg/kg (Calzada *et al.*, 2021). Estos resultados fueron prometedores y abrieron la puerta a evaluar la actividad antitumoral de IA en otros tipos de cáncer como el cáncer mamario.

La actividad anticancerosa de la IA se evaluó en distintas líneas celulares de cáncer mamario: 4T1 (cáncer de mama de ratón triple negativo), MDA-MB-231 (cáncer de mama humano triple negativo), SK-BR-3 (cáncer de mama con sobreexpresión de HER2), T-47D (cáncer de mama humano luminal A), MCF7 (cáncer de mama humano luminal A) y en la línea celular no tumorigénica MCF10A (células epiteliales de glándula mamaria). Los resultados mostraron que el tratamiento con IA tiene concentraciones citotóxicas 50 (CC_{50}) de 6.209 ± 0.38 , 7.58 ± 0.25 , 5.64 ± 0.09 , 7.83 ± 0.056 , 6.844 ± 0.25 y 13.12 ± 0.35 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Este estudio evidenció que IA presenta

una actividad citotóxica selectiva hacia las células cancerosas, causando menos daño en las células no tumorigénicas (MCF10A).

Una vez que se comprobó que IA posee actividad citotóxica en líneas celulares de CM, se analizó si IA podía afectar la expresión de enzimas glucolíticas en las células tratadas, específicamente de hexocinasa II (HKII), aldolasa (ALDO) y lactato deshidrogenasa (LDH) mediante estudios de western blot. De ellas, solo la expresión de HKII se vio afectada por el tratamiento con IA.

Posteriormente, se realizaron estudios de acoplamiento molecular *in silico* entre la IA y la proteína HKII. Se observó que la IA tiene un sitio de unión a HKII muy similar a 2-desoxi-D-glucosa (2-DG), un inhibidor de HKII. Estos resultados nos sugieren que la actividad anticancerosa de IA en las líneas celulares de cáncer de mama podría estar involucrado de manera directa a la unión con HKII (Arietta *et al.*, 2023).

2.5 HKII y su relevancia como blanco terapéutico en el cáncer.

Las hexocinasas, tal como la HKII; desempeñan un papel crucial en la captación y disposición celular de la glucosa. Por lo cual, en células cancerosas, existe una elevación en la expresión de estas enzimas lo que contribuye a la reprogramación metabólica y al desarrollo de esta enfermedad. En tumores mamarios humanos, la sobre expresión de HKII se ha asociado con una alta probabilidad de recurrencia y mal pronóstico, considerándola un blanco relevante contra el cáncer (Shin y Koo, 2021; Sato-Tadano, 2013).

Además de las funciones metabólicas, la HKII puede inhibir la apoptosis debido a una interacción física con las mitocondrias. Esto es posible, debido a que HKII se inserta en la membrana externa mitocondrial (MOM) e interactúa específicamente con el canal aniónico dependiente de voltaje 1 (VDAC1). Esta unión inhibe la liberación del citocromo C (Cyt c) y compite directamente con moléculas pro apoptóticas como BAX y BAK, lo que inhibe la apoptosis de las células cancerosas (Figura 8) (Schoeniger *et al.*, 2022; Haloi *et al.*, 2021; Magri *et al.*, 2018).

La inhibición de la apoptosis mediante HKII se ha observado en distintos tipos de cáncer y se sugiere contribuye a la supervivencia y resistencia a fármacos quimioterapéuticos (Mathupala *et al.*, 2006). Por lo tanto, HKII ha tomado relevancia en los últimos años como un blanco terapéutico para combatir el cáncer; ya que al inhibir su interacción con la mitocondria disminuye la proliferación, la viabilidad y la metástasis de las células cancerosas, así como la inducción de apoptosis (Fan *et al.*, 2019; Zheng *et al.* 2022).

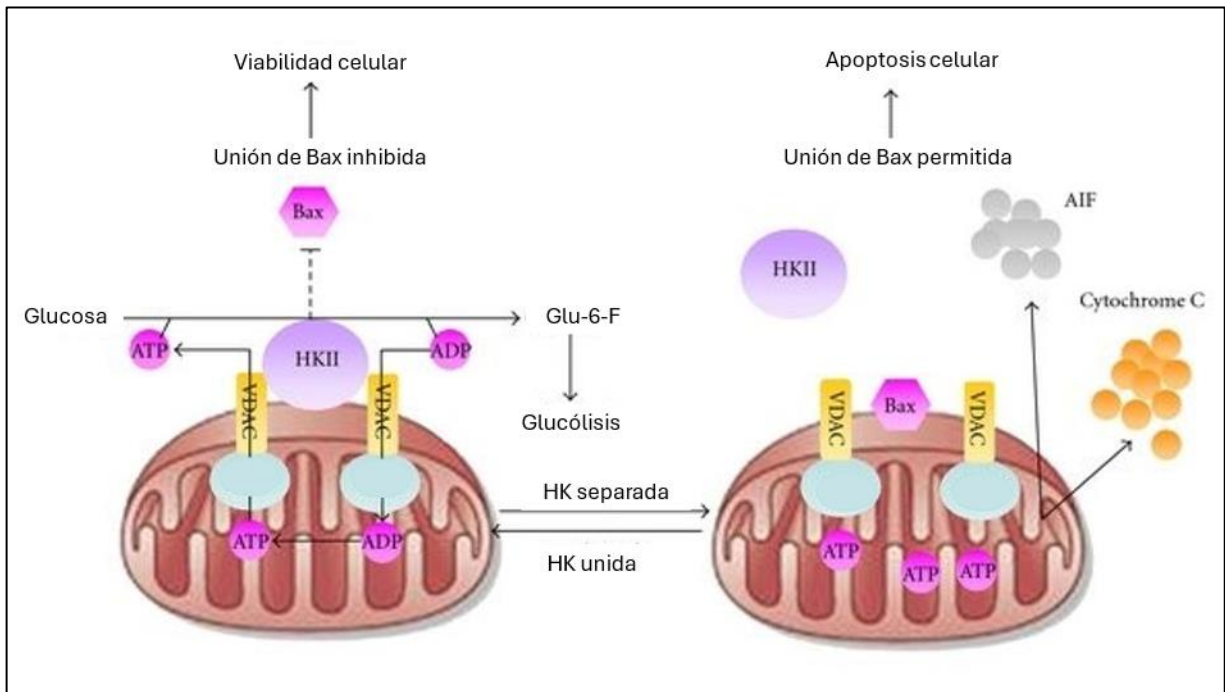


Figura 8. Funciones anti apoptóticas y metabólicas de la hexocinasa II mitocondrial (HKII). Izquierda: La unión específica de HKII a la membrana mitocondrial externa (OMM) promueve los intercambios de ATP a través de complejos que consisten en un canal aniónico dependiente de voltaje 1 (VDAC1). El ATP liberado podría participar directamente en la transición de glucosa a glucosa-6-fosfato, lo que acelera la actividad glucolítica. Mientras tanto, la unión de HKII a OMM también antagoniza la interacción de Bax con el sitio de contacto mitocondrial, lo que previene la aparición de apoptosis. Derecha: La separación de HKII de VDAC permite la unión de Bax e induce cambios potenciales entre la membrana mitocondrial externa e interna, conduciendo a la liberación de citocromo C y factores inductores de apoptosis (AIF) de la mitocondria provocando la apoptosis celular (Glu-6-F: glucosa 6 fosfato, HKII: Hexocinasa II) (Editada de Wang *et al.*, 2012).

3. JUSTIFICACIÓN.

El cáncer de mama continúa siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad por cáncer en mujeres tanto a nivel mundial como en México. Su elevada incidencia y la tendencia creciente en los casos nuevos representan un problema urgente de salud pública y aunque los tratamientos convencionales han mejorado la supervivencia, sus efectos adversos severos, la toxicidad sistémica y la aparición de resistencia terapéutica limitan su eficacia y reducen significativamente la calidad de vida de las pacientes. Ante este panorama, es indispensable explorar alternativas terapéuticas más selectivas y menos tóxicas. La incompitina A, un compuesto con potencial actividad antitumoral reportada en estudios preliminares, representa una opción prometedora para el desarrollo de nuevas estrategias contra el cáncer de mama. Evaluar su efecto en un modelo in vivo es un paso fundamental para determinar su eficacia biológica real, su posible mecanismo de acción y su perfil de seguridad.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿La incompitina A puede disminuir el tamaño tumoral en un modelo murino de cáncer de mama mediante la alteración de HKII y la inducción de apoptosis?

5. HIPÓTESIS.

La incompitina A es una lactona sesquiterpénica con actividad citotóxica en distintas líneas celulares de cáncer de mama mediante la disminución en la expresión de HKII, por lo tanto, el tratamiento con incompitina A mostrará actividad antitumoral en un

modelo murino de cáncer de mama mediante la alteración de HKII y la inducción de apoptosis en las células tumorales, lo que provocará la disminución del tumor.

6. OBJETIVO GENERAL.

Explorar el papel antitumoral de la incoptina A en un modelo murino de cáncer de mama.

7. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Evaluar la toxicidad oral aguda y establecer la dosis letal 50 (DL₅₀) de la incoptina A en ratones.
- Generar un modelo murino de cáncer de mama.
- Analizar la inhibición del crecimiento tumoral de la incoptina A en un modelo murino.
- Definir la participación de la incoptina A en el metabolismo glucolítico de tumores de cáncer de mama.
- Definir la implicación de la incoptina A en la muerte celular de las células tumorales.
- Proponer el posible mecanismo de acción de la incoptina A sobre la inhibición del crecimiento tumoral.

8. MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1 Incomptina A.

La incomptina A fue proporcionada por el Dr. Elihú Bautista, la cual se purificó a partir de las hojas de *D. incompta* según la metodología informada por (Bautista *et al.* 2012)

La identificación de IA se realizó mediante resonancia magnética nuclear con una muestra auténtica con 99% de pureza.

8.2 Cultivo celular.

La línea celular 4T1 (cat. CRL-2539) de cáncer de mama murino se adquirió del Bank of the American Type Culture Collection (ATCC). Las células 4T1 se mantuvieron en medio RPMI-1640 (GIBCO cat 11875093) con 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina (GIBCO 15140148), suplementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO 26140079) y 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina. Las células se incubaron y mantuvieron en una atmósfera humidificada a 37°C y 5% de CO₂ hasta que alcanzaron un 80% de confluencia.

8.3 Animales de laboratorio.

Se utilizaron ratones hembra vírgenes de la cepa BALB/c de entre 8-12 semanas de edad con un peso promedio de 22±3 g proporcionados por el bioterio del Centro Médico Nacional siglo XXI del IMSS. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de 18-26°C de temperatura y 40-70% de humedad, en jaulas de polivinilo limpias y estériles, con alimento y agua *ad libitum*.

El experimento se llevó a cabo bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM 0062-ZOO-1999 denominada Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Todas las investigaciones se realizaron con la aprobación del Comité de Ética Hospitalaria de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS (registro: R-2018-785-111).

8.4 Toxicidad oral aguda.

La evaluación de la toxicidad oral aguda de IA y el fármaco control, doxorubicina (DOXO), se realizó de acuerdo con los lineamientos descritos por la OECD (OECD Guideline For Testing of Chemical «Acute Oral Toxicity Acute Toxic Class Method» N° 423) (OECD, 2001). Para cada grupo se utilizaron tres ratones de la cepa BALB/c (hembras), con peso de 23 ± 3 g. Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 4 h antes de una administración única de IA y DOXO en dosis de 100, 150 y 200 mg/kg por vía intragástrica. Los grupos de estudio se mantuvieron en observación durante 4 h después de la administración de los tratamientos para observar cualquier anomalía, como diarrea, convulsiones, espasmos, vómitos, coma o mortalidad. La observación se mantuvo diariamente durante 15 días después de la administración. En el día 15, los ratones fueron sacrificados para realizar una autopsia y descartar cualquier daño macroscópico en los órganos. Finalmente, la dosis letal 50 (DL₅₀) se calculó mediante interpolación lineal de los valores del porcentaje de mortalidad, para cada dosis, utilizando el programa GraphPad Prisma versión 8.

8.5 Modelo murino de cáncer de mama.

El modelo murino de cáncer de mama se realizó según el protocolo de (Pulaski, 2001). Se inocularon células 4T1 (1×10^5 células en 100 μ l de medio de cultivo) por vía subcutánea alrededor de la glándula mamaria inferior izquierda de los ratones. Posteriormente se verificó la formación del tumor mediante palpación 7 días después de la inoculación. Una vez implantado el tumor, se formaron grupos de ratones de forma aleatoria y se inició el tratamiento.

8.6 Actividad antitumoral.

Los animales con tumor palpable fueron seleccionados y se dividieron en cinco grupos (n = 6): Sin tratamiento (ST); tratados con DOXO (80 mg/kg) y grupos tratados con distintas concentraciones de IA (0.07, 0.7 y 2.5 mg/kg).

Para determinar las dosis de IA se utilizó como referencia la concentración citotóxica 50 (CC₅₀) de la línea celular 4T1 (7 μ g/ml) obtenida con anterioridad (Arietta *et al.*, 2023) y se multiplicó 10X, 100X y 350X. Todos los tratamientos se administraron por vía oral-intragástrica durante 8 días. Los tamaños de los tumores se midieron cada 2 días usando un vernier y el volumen del tumor (VT) se calculó usando la siguiente fórmula: $VT = A \times B^2 \times 0.5$, donde A= diámetro más largo del tumor y B= diámetro más pequeño del tumor. Semanalmente se registró el peso y la supervivencia de los animales. La evaluación de la actividad antitumoral se determinó comparando el peso promedio del crecimiento del tumor mamario en los animales tratados con IA contra los animales sin tratamiento. La dosis efectiva 50 (DE₅₀) de IA y de DOXO se calculó

mediante interpolación lineal obtenida a partir de los datos sobre el porcentaje de disminución del crecimiento tumoral, mientras que el índice terapéutico (IT) se calculó dividiendo la DL_{50} de la población entre la dosis DE_{50} de la población.

8.7 Análisis de órganos y plasma sanguíneo.

Al final del tratamiento, se obtuvieron órganos y muestras de sangre de los ratones. Se comparó el peso promedio de los órganos (bazo, estómago, intestino, hígado y riñones) entre los grupos experimentales contra el grupo ST.

La sangre obtenida se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000 RPM por 15 min. a 4°C para obtener suero total, el cual se utilizó para medir los niveles de transaminasa glutámico-pirúvica (SGPT) y ácido oxalacético (SGOT) en suero como indicadores de daño hepático, utilizando el analizador de bioquímica automatizado SPOTCHEM EZ SP-4430 y comparando los valores contra los niveles de transaminasas de sueros de ratones sanos sin tumor.

8.8 Análisis histopatológico.

La tinción con hematoxilina/eosina (H/E) se realizó en los tumores obtenidos de ratones con y ST. Se cortaron pequeñas secciones de los tumores y se fijaron en formaldehído al 10% para su posterior procesamiento en bloques de parafina. Se realizaron cortes de 4 μ m utilizando un micrótopo y se adhirieron a portaobjetos, donde se tiñeron con H/E. Finalmente, los portaobjetos de cada grupo fueron

examinados por un patólogo con un microscopio equipado con una cámara, para comparar el efecto de los tratamientos sobre las células tumorales.

8.9 Western blot.

Una parte de las muestras de tumores de mama se utilizaron para la extracción de proteínas. Se separaron cantidades iguales de proteína para el grupo ST, los grupos tratados con IA y el grupo tratado con DOXO mediante SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Merck IPVH00010), se bloquearon con leche desnatada al 5% y se incubaron durante toda la noche con anticuerpo primario contra hexocinasa II (HKII) (1:2500, Santa Cruz Biotechnology, sc-130358), aldolasa A (ALDOA) (1:2500, Santa Cruz Biotechnology, sc-390733), lactato deshidrogenasa A (1:2500, Santa Cruz Biotechnology, sc-133123), caspasa 3 (1:2500, Santa Cruz Biotechnology, sc-56053) y Bcl-2 (1:2500, Santa Cruz Biotechnology, sc-7382). Se utilizó anticuerpo de burro anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (1:2500, Abcam, ab6820) para la detección secundaria. Las muestras se visualizaron con reactivo de quimioluminiscencia (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). El análisis de densitometría se cuantificó utilizando el software ImageJ (versión 1.46). La expresión relativa de las proteínas analizadas entre las muestras no tratadas y las tratadas con IA y DOXO se calculó después de normalizar la intensidad de la banda de β -actina (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, sc-47778) para cada muestra.

8.10 Tinción con Anexina V/Ghost Red.

Se incubaron 20 mg de tejido tumoral de los grupos DOXO 80 mg/kg e IA 2,5 mg/kg durante una hora con 400 U/ml de colagenasa I (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU., 100017) a 37 °C. Posteriormente, se detuvo la reacción enzimática con EGTA 0,1 M y se filtró a través de un filtro celular de 70 µm (Falcon, 352350) para obtener una suspensión celular que contenía las células cancerosas. Las células tumorales 4T1 se clasificaron utilizando el anticuerpo monoclonal CD44 (IM7), conjugado con PE-Cyanine5 (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU., 15-0441-82). La apoptosis celular se analizó con el kit de detección de apoptosis FITC Annexin V (BioLegend, CA, EE. UU., 640922) y la viabilidad celular se evaluó con el colorante de viabilidad Ghost Dye Red 780 (Tonbo Biosciences, CA, EE. UU., 13-0865). Las muestras se procesaron y se adquirieron 50,000 eventos en un citómetro de flujo MACSQuant Analyzer 10. Finalmente, los datos se analizaron con el software FlowJo 10.10.

8.11 Ensayo de actividad del complejo respiratorio I mitocondrial.

Se aislaron 100 mg de cada tumor mamario de los ratones y las mitocondrias utilizando el kit de aislamiento de tejido mitocondrial MitoCheck (Cayman Chemicals, MI, EE. UU.; n.º de artículo 701010) siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad del complejo respiratorio mitocondrial I se determinó utilizando 20 µg de proteína mitocondrial con el kit de ensayo de actividad del complejo I MitoCheck (Cayman Chemicals, MI, EE. UU., n.º de catálogo 700930). La absorbancia de todas las muestras se midió a 340 nm a intervalos de 30 segundos durante 15 minutos a 25 °C

utilizando un lector de placas. La actividad del complejo I se midió mediante la disminución de la absorbancia por minuto. Se utilizaron los valores de error estándar (EEM) de tres conjuntos de réplicas biológicas.

8.12 Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media (EEM) de seis mediciones. Los resultados se analizaron utilizando el programa GraphPad Prisma versión 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.), realizando ANOVA unidireccional, así como pruebas de comparación múltiple utilizando Dunnett, con un valor de $p < 0.05$ para establecer que hubo diferencias significativas entre los grupos de estudio.

9. RESULTADOS.

9.1 Toxicidad oral aguda de la incomptina A.

La toxicidad oral aguda de la IA y del fármaco control DOXO se evaluaron de acuerdo con la directriz 423 de la OCDE (OECD, 2001). La dosis letal 50 (DL₅₀) para IA y DOXO fue de 149.0 ± 0.50 mg/kg y de 100 ± 0.50 mg/kg, respectivamente. Por lo tanto, según la OCDE, los valores de DL₅₀ para ambos compuestos se encuentran dentro de la categoría 3 (LD₅₀=50-300 mg/kg) y se pueden considerar como compuestos moderadamente tóxicos y seguros para su consumo.

9.2 Actividad antitumoral de la incomptina A.

Se evaluó el efecto antitumoral del IA *in vivo* en un modelo tumoral murino ortotópico. Los tamaños tumorales representativos de cada grupo se muestran en la Figura 9A. El volumen tumoral promedio en el grupo ST fue de 1385 mm³ (Figura 9B). En el tratamiento con IA, el volumen tumoral fue menor en las tres dosis (0.07, 0.7 y 2.5 mg/kg); el volumen tumoral medio disminuyó a 1035, 900 y 535 mm³, respectivamente. En contraste, el volumen tumoral promedio para el tratamiento con el fármaco control DOXO (80 mg/kg) fue de 928 mm³. Por lo tanto, el tratamiento con IA redujo el volumen tumoral de forma dosis-dependiente hasta en un 61% en comparación con el grupo ST y en un 42% en comparación con el grupo DOXO (Figura 9B).

Se pesaron los tumores extirpados y se analizó la reducción del crecimiento tumoral (Figura 9C). Los grupos de tratamiento con IA mostraron una mayor disminución del crecimiento tumoral en las tres dosis analizadas, en comparación con el grupo ST. La

dosis de IA de 0.07 mg/kg redujo el crecimiento tumoral aproximadamente un 31%, mientras que la dosis de 0.7 mg/kg alcanzó una reducción del 42%. La dosis más alta de IA analizada (2.5 mg/kg) produjo el efecto más pronunciado, con una reducción del 66% en el crecimiento tumoral. Por el contrario, el tratamiento con DOXO (80 mg/kg) resultó en una reducción del 42% en el crecimiento tumoral en comparación con el grupo ST (Figura 9C).

Se determinó la DE_{50} tanto para IA como para DOXO a partir de los datos sobre la disminución porcentual del crecimiento tumoral. La DE_{50} para IA fue de 2.00 ± 0.12 mg/kg, y para DOXO, de 86.2 ± 5.5 mg/kg. Por lo tanto, IA puede reducir el tamaño tumoral con una dosis mucho menor que DOXO. Se calculó el índice terapéutico (IT) mediante la relación LD_{50}/ED_{50} . El IT se utiliza para evaluar la seguridad de un compuesto. El valor de IT para IA fue de 74.5, y para DOXO, de 1.16. Este resultado indica que IA es más seguro y menos tóxico que DOXO, ya que un compuesto se considera seguro cuando su IT es alto (Muller y Milton, 2012).

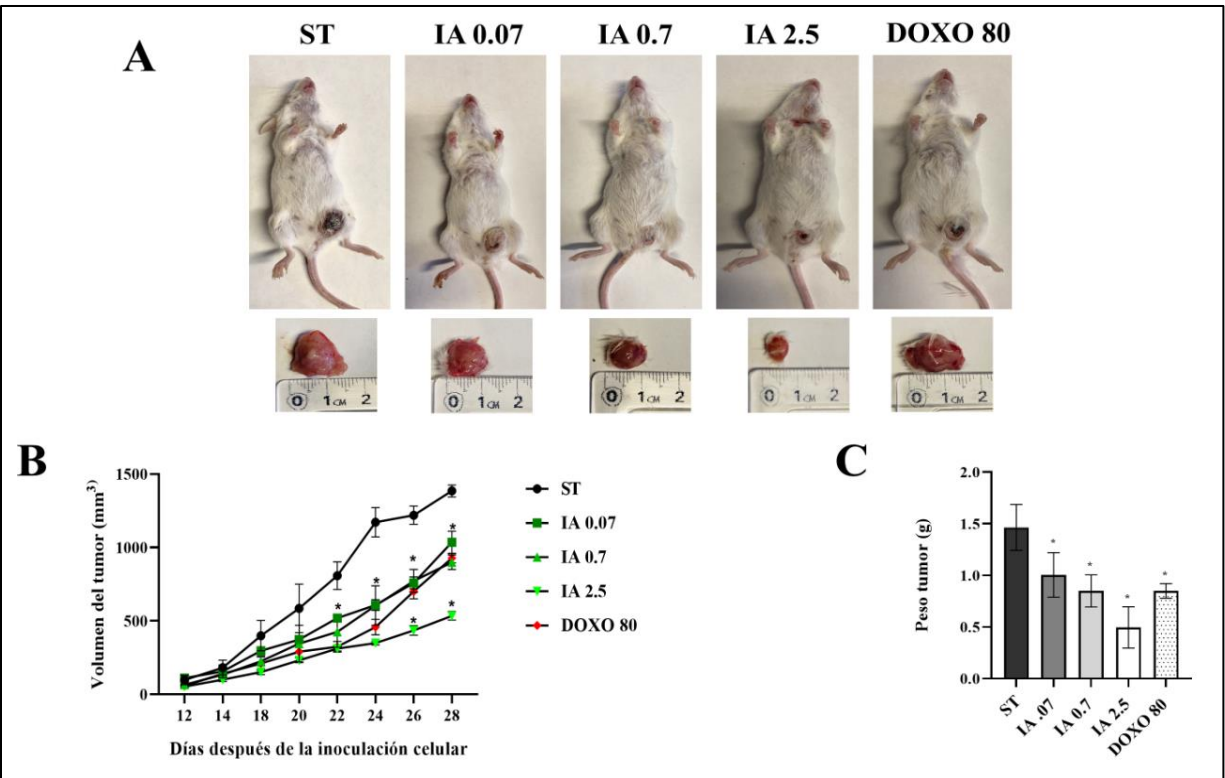


Figura 9. Actividad antitumoral del tratamiento con incomptina A en las células 4T1 *in vivo*. Los ratones fueron tratados con distintas dosis de IA (A). Volumen del tumor tratado con distintas dosis de IA (B). Peso del tumor tratado con distintas dosis de IA (C). Los datos se expresan como media \pm EEM, (n = 6). *p < 0.05 frente al grupo sin tratamiento. Abreviaturas: ST (sin tratamiento), IA (incomptina A), DOXO (doxorubicina).

9.3 Análisis histopatológico de tumores.

Para analizar los cambios histopatológicos en los tumores tratados con IA, se utilizó la tinción de hematoxilina-eosina. Los tumores ST que se muestran presentan pérdida estructural y son mayoritariamente viables, con células tumorales que presentan núcleos pleomórficos, vesiculares e hipercromáticos prominentes (Figura 10B, flechas negras). Un patrón de necrosis central se acompaña de infiltración linfocítica periférica y fibrosis del tejido conectivo circundante. En comparación, los ratones tratados con IA mostraron una mayor preservación del tejido conectivo circundante, así como una disminución significativa del número de células tumorales viables y un aumento de las células apoptóticas (Figuras 10D-F) y la presencia de cuerpos apoptóticos (círculos negros, Figuras 10E y 10F). Por otro lado, DOXO también mostró una disminución de la celularidad (Figura 10C), pero en menor medida que en el grupo tratado con IA. Estas observaciones indican que la IA está disminuyendo el número de células cancerosas al inducir la apoptosis celular.

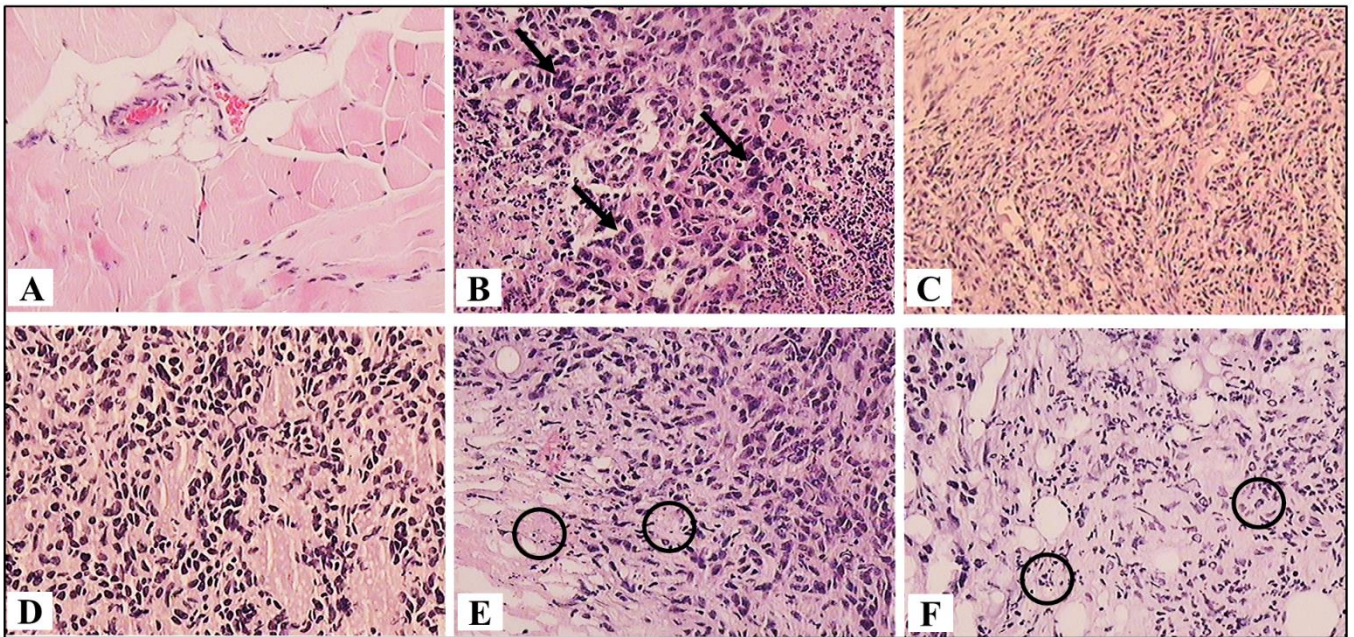


Figura 10. Microfotografías representativas con tinción H/E de tumores mamarios de ratón inducidos por células 4T1 observados a 20x. (A) Tejido mamario de ratón sano sin tumor, (B) Tumor mamario de ratón sin tratamiento, (C) Tumor mamario de ratón tratado con DOXO 80 mg/kg, (D) Tumor mamario de ratón tratado con IA 0.07 mg/kg (E) 0.7 mg/kg y (F) 2.5 mg/kg. Los datos se generaron a partir de seis campos por portaobjetos, con cuatro portaobjetos analizados de cada tumor y tres tumores examinados de cada grupo (n=6). Las flechas negras muestran células tumorales viables; los círculos negros muestran cuerpos apoptóticos.

9.4 Toxicidad del tratamiento con IA en un modelo de ratón.

Se evaluó la toxicidad sistémica del IA en el modelo *in vivo*. En todos los grupos, se midieron el peso corporal, el peso de los órganos y la hepatotoxicidad (Figura 11). Ninguno de los ratones tratados con IA mostró cambios en su peso corporal a lo largo del tiempo, a diferencia del grupo ST. Solo el grupo DOXO mostró una disminución significativa del peso corporal (Figura 11A). La necropsia macroscópica no mostró signos de toxicidad, y los pesos del bazo, estómago, intestino, hígado y riñón no mostraron diferencias entre los grupos IA y ST. Sin embargo, se observó un peso menor del bazo y el hígado en el grupo DOXO (Figura 11B), lo que podría indicar toxicidad en estos órganos.

Para analizar la hepatotoxicidad, se midieron los niveles plasmáticos de indicadores de daño hepático, como la transaminasa glutámico-oxalacética (SGOT) y la transaminasa glutámico-pirúvica sérica (SGPT) (Tabla 4). En el plasma de todos los ratones tratados con IA, no se observaron cambios en los perfiles de SGOT y SGPT, siendo estos valores muy similares a los obtenidos en ratones sanos sin tumores. Por el contrario, los ratones ST mostraron valores más altos en ambas enzimas. Por otro lado, en los ratones tratados con DOXO, solo los niveles de SGOT aumentaron significativamente. Por lo tanto, estos datos indican que IA tiene un perfil de seguridad aceptable.

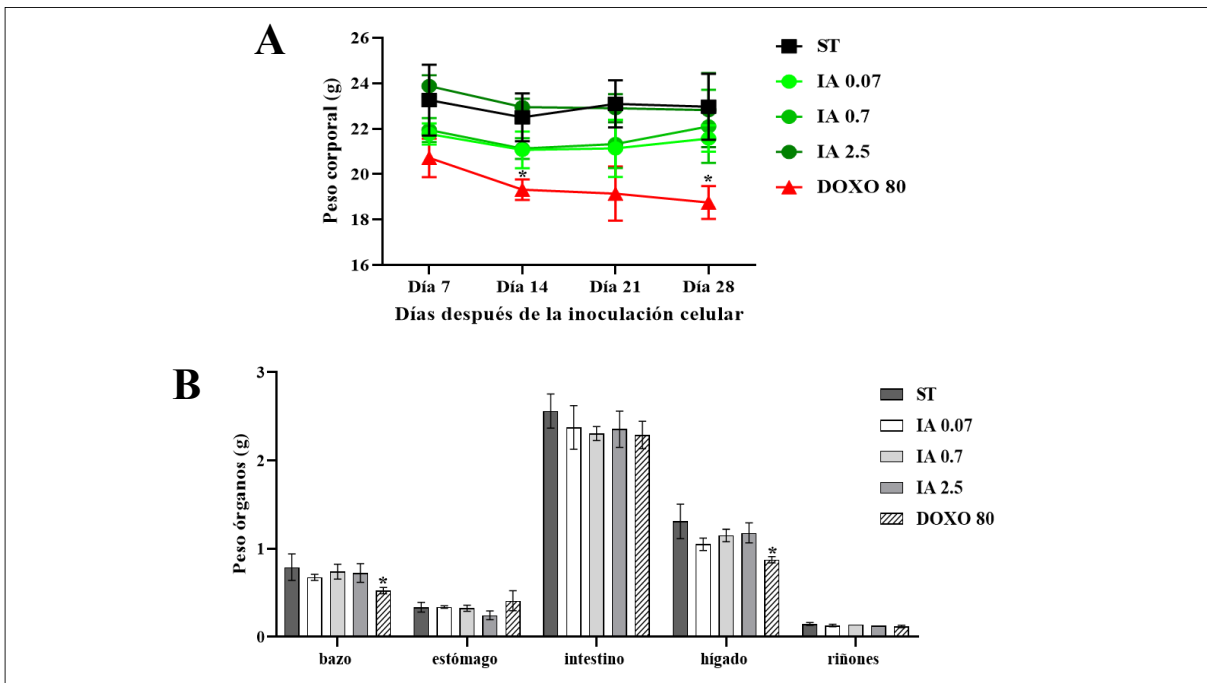


Figura 11. El efecto del tratamiento con IA sobre el peso corporal y de órganos de ratones al final del tratamiento. (A) El peso corporal de los ratones se midió semanalmente desde el día 7 al 28 después de la inoculación celular. (B) El peso de los órganos obtenidos al final del experimento. Todos los datos se obtuvieron de tres experimentos independientes y los datos se expresaron como el valor medio \pm EEM ($n = 6$). * $p < 0.05$ frente al grupo no tratado. IA (incomptina A), DOXO (doxorubicina), ST (sin tratamiento).

Tabla 4. Niveles plasmáticos de transaminasas en suero de ratones con y sin tratamiento.

Ratones	Tratamiento (mg/kg)	SGOT	SGPT
Sano sin tratamiento	Sin tratamiento	250.2±11	49±5.80
Tumor mamario	Sin tratamiento	970.5±29*	445±17*
	0.07	213.6±10	41.6±6
IA	0.70	244.3±4	43.3±9
	2.50	264.6±4	44.6±6
DOXO	80.00	478.6±4*	54.6±9

Datos expresados como media ± EEM (n = 6). *= valores diferentes de ratones sanos libres de tumores

*p < 0.05 frente a ratón sano y libre de tumores. IA=incomptina A, DOXO=doxorubicina, SGOT=transaminasa glutámico-oxalacética, SGPT= transaminasa glutámico-pirúvica sérica

9.5 El tratamiento con IA disminuye la expresión de HKII en tumores mamarios.

Para estudiar el efecto de la IA sobre algunas de las enzimas de la vía glucolítica en los tumores de ratones, se analizó la expresión de HKII, aldolasa A (ALDOA) y lactato deshidrogenasa (LDH) en Western blot (Figura 12). La expresión de HKII en los tumores tratados con las tres dosis de IA (0.07, 0.7 y 2.5 mg/kg) disminuyó significativamente (65%, 80% y 90%, respectivamente) en comparación con los tumores del grupo sin tratamiento (Figura 12A). En cuanto a la expresión de ALDOA y LDH, no se encontraron diferencias significativas en su expresión en los tumores tratados con IA respecto a los no tratados (Figura 12B-C). Los ratones tratados con DOXO no presentaron modificaciones significativas en la expresión de ninguna de las enzimas analizadas (Figura 12A-C). Estos datos sugieren que el efecto antitumoral de la IA quizás esté directamente relacionado con la HKII.

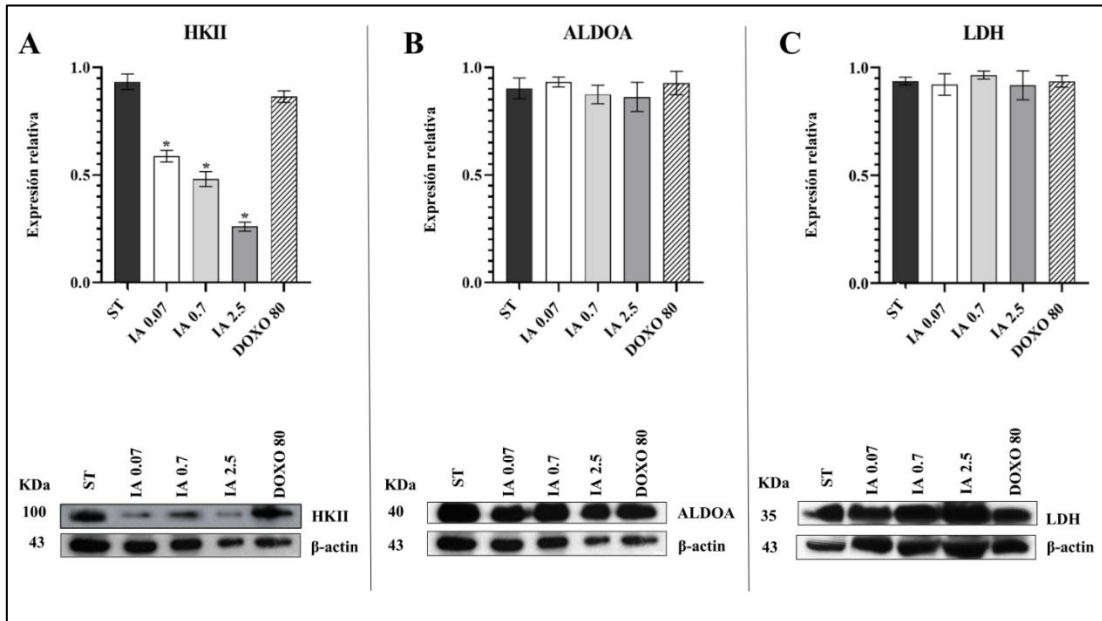


Figura 12. Expresión de enzimas glucolíticas en tumores del grupo sin tratamiento y tratados con IA (0.07, 0.7 y 2.5 mg/kg) y DOXO (80 mg/kg). Expresión relativa de HKII (A), ALDOA (B) y LDH (C). Los datos se representaron como la media \pm EEM de 3 experimentos independientes. * $P < 0.05$ frente al grupo sin tratamiento. ST (sin tratamiento), IA (incomptina A), DOXO (doxorubicina).

9.6 La IA induce la apoptosis en células tumorales de cáncer de mama.

Debido a que no hubo modificaciones en las otras enzimas glucolíticas y a que HKII también participa en la inhibición de la apoptosis, analizamos el efecto de IA sobre la apoptosis en las células tumorales. La proteína anti apoptótica Bcl-2 y la caspasa-3 se cuantificaron mediante densitometría Western blot en los tumores de ratones tratados con IA (0.07, 0.7 y 2.5 mg/kg) y DOXO (80 mg/kg), en comparación con los tumores de ratones ST (Figura 13). Estos ensayos mostraron que la expresión de caspasa-3

aumentó significativamente en los ratones que recibieron las tres dosis de IA (0.07, 0.7 y 2.5 mg/kg). En el grupo tratado con DOXO (80 mg/kg), también se observó un aumento significativo de caspasa-3 en comparación con los tumores ST (Figura 13A); sin embargo, este aumento fue mucho menor que el observado con IA. Por otra parte, la expresión de la proteína anti apoptótica Bcl-2 disminuyó significativamente en los ratones tratados con las tres dosis de IA y DOXO en comparación con los tumores ST (Figura 13B).

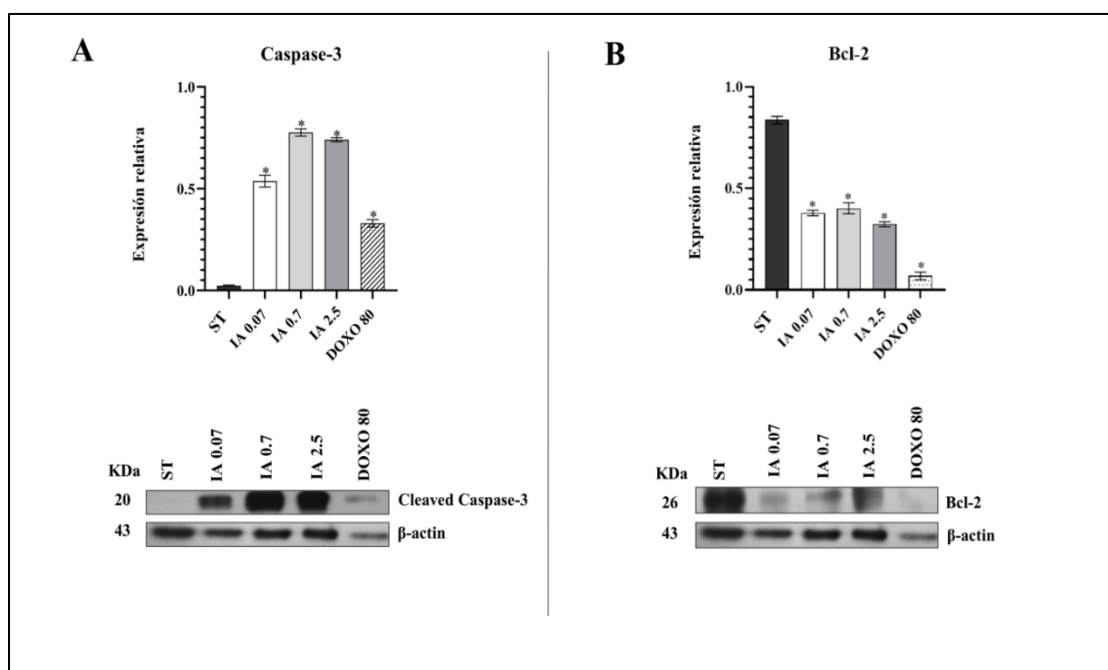


Figura 13. Expresión proteínas pro y anti apoptóticas en tumores del grupo sin tratamiento y tratados con IA (0.07, 0.7 y 2.5 mg/kg) y DOXO (80 mg/kg). Expresión relativa de caspasa 3 (A) y Bcl-2 (B). Los datos se representaron como la media \pm EEM de 3 experimentos independientes. *P < 0.05 frente al grupo sin tratamiento. ST (sin tratamiento), IA (incomptina A), DOXO (doxorubicina).

Los resultados de la citometría de flujo mostraron que los tratamientos con IA (2.5 mg/kg) y DOXO (80 mg/kg) aumentaron la proporción de células apoptóticas en los tumores en un 33.6% y un 22.2 %, respectivamente, en comparación con el grupo ST (Figura 14). Estos resultados sugieren que la IA podría estar asociada con el aumento de la apoptosis en tumores mamarios de ratón.

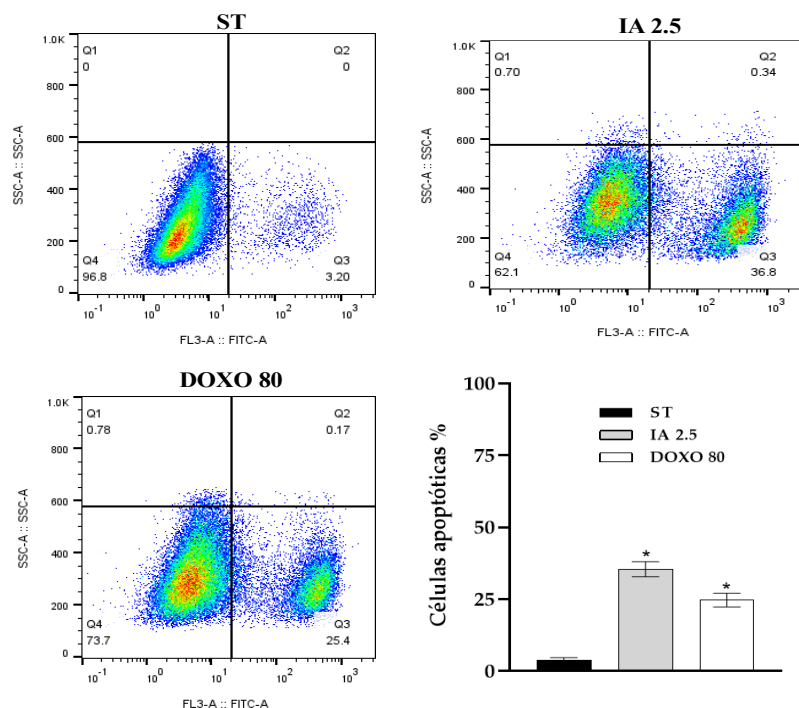


Figura 14. Apoptosis inducida en células tumorales tras el tratamiento con IA y DOXO. Gráficos de puntos representativos de la apoptosis para los tratamientos con IA (2.5 mg/kg) y DOXO (80 mg/kg) y células tumorales sin tratar. El gráfico de barras compara el porcentaje de apoptosis entre los tratamientos con IA y DOXO y el grupo ST. Datos expresados como media \pm EEM, n = 3; *p < 0,05 frente al grupo sin tratamiento. Abreviaturas: IA (incomptina A), DOXO (doxorrubicina) y ST (sin tratamiento).

9.7 IA disminuye la actividad mitocondrial de las células tumorales del cáncer de mama.

Debido al papel fundamental de la actividad mitocondrial en la muerte celular, se analizaron las modificaciones en la función mitocondrial en tumores mamarios de ratón tratados con 0.07, 0.7 y 2.5 mg/kg de IA. Se observó una disminución de la actividad mitocondrial en todos los tumores tratados con IA a 0, 7.5 y 15 minutos en comparación con los ratones sin tratamiento (Figura 15). La actividad mitocondrial disminuyó un 16.35% a 0.07 mg/kg; el 46,84% con 0.7 mg/kg y el 46.16% con IA 2.5 mg/kg. A los 7.5 minutos, la disminución fue del 15.84%, 44.9% y 46.16% con IA 0.07, 0.7 y 2.5 mg/kg, respectivamente. Finalmente, a los 15 minutos se observó una disminución del 15.3% con IA 0.07 mg/kg, del 43.63% con IA 0.7 mg/kg y del 45.98% con IA 2.5 mg/kg. Por otro lado, en los tumores tratados con DOXO 80 mg/kg la actividad mitocondrial disminuyó un 6.57%, en el minuto 0; 6.04% en el minuto 7.5 y 6.04% en el minuto 15. La disminución de la actividad mitocondrial observada en las células tumorales tratadas con IA es consistente con la hipótesis de que la IA podría estar participando en la inducción de la apoptosis.

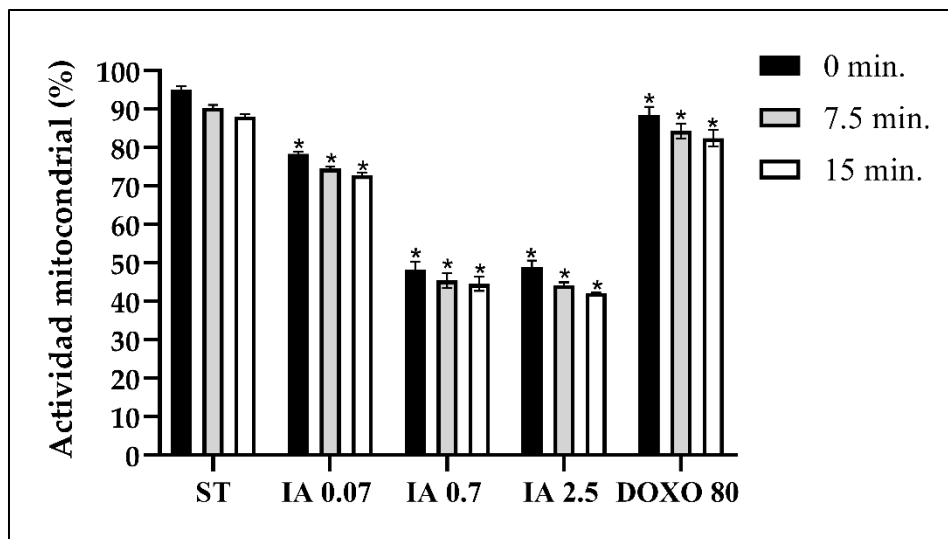


Figura 15. Actividad mitocondrial de las células tumorales de mama después del tratamiento con IA (0.07, 0.7 y 2.5 mg/kg) y DOXO (80 mg/kg) durante 15 min, usando el kit MitoCheck (Cayman Chemical; utilizando mitocondrias aisladas de corazón bovino). Las actividades representadas se normalizaron para las células tumorales sin tratamiento. Los datos se representaron como la media \pm EEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ frente al grupo sin tratamiento. ST (sin tratamiento), IA (incomptina A), DOXO (doxorubicina).

10. DISCUSIÓN.

El CM es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Durante varios años, se han realizado esfuerzos para desarrollar mejores tratamientos con características más universales que puedan utilizarse en todos los subtipos de este cáncer (luminal A, luminal B, HER2+ y triple negativo) y con menos efectos secundarios. En este contexto, estudiamos los efectos del compuesto natural incomptina A en un modelo murino de CM.

Debido a la primera aplicación de IA como tratamiento en un modelo *in vivo* para el CM, se utilizaron varias dosis para obtener la DE₅₀. La actividad inhibidora de IA sobre el tumor se observó desde la dosis inicial, pero aumentó a más del 50 % con una dosis de 2.5 mg/kg (DE₅₀ = 2.006 ± 0.12 mg/kg). La comparación con DOXO (DE₅₀ = 86.2 ± 5.5) mostró que, para reducir el crecimiento tumoral, se requiere una dosis mucho menor de IA. Por lo tanto, el IA tiene un mayor efecto antitumoral y podría ser más eficaz en la reducción de la masa tumoral que la DOXO. Estos resultados concuerdan con los reportados previamente en un modelo de linfoma murino, donde IA también redujo el tamaño tumoral con una DE₅₀ de 2.4 ± 0.10 mg/kg (Calzada *et al.*, 2021). De igual manera, otras lactonas sesquiterpénicas, como la partenólida y la costunólida, han mostrado efectos antitumorales en un modelo *in vivo* a dosis inferiores a 10 mg/kg (Kim *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2021).

Además, la IA puede ser un compuesto apropiado para el tratamiento del CM, ya que es más seguro y menos tóxico gracias a su IT (74.5), mayor que el IT (1.16) de la

DOXO. Un valor bajo de IT, como el de la DOXO, implica que el fármaco dosificado debe usarse con precaución y que la persona que lo recibe debe ser monitorizada estrechamente para detectar cualquier signo de toxicidad (Muller y Milton, 2012). DOXO es una antraciclina que se intercala en el ADN celular, inhibiendo su síntesis y causando la muerte celular. Este mecanismo no es específico y afecta tanto a células cancerosas como normales, lo que provoca diversos efectos secundarios y adversos en los pacientes (Thorn *et al.*, 2011), como pérdida de peso debido a la atrofia del músculo esquelético (Hiensch *et al.*, 2020), contracción esplénica (Jadapalli *et al.*, 2018) y hepatotoxicidad (Prasanna *et al.*, 2020). En este trabajo, observamos que los ratones tratados con DOXO mostraron cambios en el peso corporal y un aumento en los marcadores de daño hepático en comparación con los ratones ST y los ratones sanos. En cambio, los ratones tratados con IA mantuvieron su peso corporal durante todo el estudio, no presentaron daño orgánico y presentaron marcadores de daño hepático normales. Estos resultados refuerzan la evidencia de que el IA tiene un margen de seguridad significativamente mayor y una menor toxicidad en comparación con la DOXO. Por lo tanto, el IA, además de mostrar actividad antitumoral a dosis bajas, también se considera seguro.

El CM es una enfermedad heterogénea, en la que cada subtipo presenta una capacidad diferente de proliferación y metástasis; sin embargo, todos los subtipos se caracterizan por una reprogramación metabólica, específicamente un alto metabolismo glucolítico y una baja respiración mitocondrial, que promueve la resistencia y supervivencia de las células cancerosas (Wang *et al.*, 2020; Navarro *et*

al., 2022). Las alteraciones en la actividad y el nivel de expresión de varias enzimas metabólicas, como HKII, están estrechamente relacionadas con la progresión del cáncer (Zheng *et al.*, 2022). HKII se sobre expresa en todos los subtipos de carcinomas mamarios invasivos (Li *et al.*, 2022), por lo que ha sido objeto de varias investigaciones sobre su papel en el CM. Estos estudios han demostrado que HKII participa en la aceleración de la glucólisis (Zhang *et al.*, 2016) y en la inhibición de la apoptosis (Schoeniger *et al.*, 2022). Con respecto a la apoptosis en células cancerosas, HKII actúa como una molécula anti apoptótica, compitiendo directamente con moléculas pro apoptóticas como BAX y BAK, y en consecuencia previene la liberación de citocromo C (Cyt C) e inhibe la apoptosis (Bachmann *et al.*, 2018).

Un informe previo mostró que el tratamiento con IA en líneas celulares de CM disminuyó la expresión de HKII, pero no afectó la expresión de otras enzimas glucolíticas como ALDOA y LDH, lo que sugiere que la reducción de la expresión de HKII afectaría principalmente su participación en la inhibición de la apoptosis debido a la probable unión directa de IA con HKII observada en el análisis de acoplamiento molecular (Arietta *et al.*, 2023). La fuerza de unión de IA con HKII fue mayor que la de 2-DG, un inhibidor previamente descrito de HKII (Arietta *et al.*, 2023). En este trabajo, evaluamos si el tratamiento con IA en un modelo de ratón de CM exhibió el mismo efecto. Observamos que, al igual que en el modelo *in vitro*, en el modelo de ratones *in vivo*, el tratamiento con IA no modificó significativamente la expresión de las enzimas glucolíticas ALDOA y LDH, pero la expresión de HKII disminuyó considerablemente, lo que respalda la hipótesis de que HKII podría ser el objetivo de IA, que actuaría como

un inhibidor de HKII (Arietta et al., 2023). Aunque el papel del 2-DG como inhibidor de HKII está bien establecido, tras su uso como agente antitumoral en ensayos clínicos (Stein et al., 2010), parece unirse al sitio de unión de HKII de forma similar al IA (Arietta et al., 2023). En este trabajo, no se consideró como molécula de control en lugar de DOXO debido a su baja eficacia como monoterapia, ya que requiere la administración concomitante con otros regímenes de quimioterapia o a dosis altas para lograr un efecto terapéutico significativo (Muley et al., 2015; Raez et al., 2013; Schmidt et al., 2021), lo que podría dificultar el análisis de los resultados.

También evaluamos la inducción de apoptosis en el modelo *in vivo* causada por el tratamiento con IA. En primer lugar, en los cortes histológicos de los tumores tratados con IA, se observó que las células experimentaban un proceso apoptótico directo, así como la presencia de cuerpos apoptóticos, lo que podría explicar la disminución del número de células cancerosas y, en consecuencia, la reducción del tamaño tumoral. Posteriormente, en el análisis de la expresión proteica relacionada con la apoptosis, se observó una clara disminución de la proteína anti apoptótica Bcl-2 y un aumento de la expresión de la caspasa 3 en los tumores tratados con IA, en comparación con el grupo ST. Además, se realizaron análisis de citometría de flujo para determinar la presencia de apoptosis en las células tumorales obtenidas de los tumores tratados con IA (2.5 mg/kg) y se observó que el porcentaje de células tumorales en apoptosis aumentó (33.6%) en comparación con las células de los tumores ST (3.2%). En general, estos tres análisis evidenciaron la mayor presencia de apoptosis en los tumores de ratones tratados con IA; por lo tanto, podríamos sugerir que la inducción

de apoptosis en estas células es una consecuencia de la unión de IA con HKII, que libera VDAC1 y por lo tanto induce apoptosis. Sin embargo, más estudios son necesarios para verificar esta hipótesis.

Debido al aumento observado en la apoptosis en células tumorales tratadas con IA y al papel crucial de las mitocondrias en este proceso, analizamos la actividad mitocondrial en tumores de mama del modelo *in vivo*. Se cuantificó la actividad del complejo mitocondrial I durante 15 minutos, y se observó una clara disminución de la actividad en los tumores tratados con IA, especialmente con la dosis más baja (0.07 mg/kg), en comparación con el grupo ST. Estos resultados evidencian la posible interacción entre IA y HKII, ya que esta unión impediría la formación de un complejo de unión entre HKII y VDAC1, alterando así el potencial de membrana mitocondrial y potencialmente provocando disfunción mitocondrial, así como un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Se ha demostrado que otras lactonas sesquiterpénicas, como la partenólida, la cinaropicrina y la desoxielefantopina, inducen estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en diversos tipos de cáncer. Se ha observado que estos compuestos aumentan la producción de ROS en las células cancerosas. Además, afectan el potencial de membrana mitocondrial. Estos efectos comprometen la viabilidad de las células cancerosas al interferir con funciones celulares críticas y potencialmente inducir la apoptosis (Zeng *et al.*, 2024; Rotondo *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2023). En cuanto a IA, se ha reportado que genera ROS en células de linfoma no Hodgkin (Pina-Jiménez *et al.*, 2021), pero esto no se ha verificado en el cáncer de mama; por lo tanto, sería ideal analizarlo con más profundidad.

En un informe previo, un posible mecanismo de acción del IA en líneas celulares de cáncer de mama implica la unión del IA a HKII, lo que, a su vez, induce apoptosis. El acoplamiento molecular del IA con HKII sugirió una fuerte unión a HKII (Arietta et al., 2023). Cuando el IA se une a HKII, lo atrapa e impide que se asocie con VDAC1 en la MOM, lo que resulta en la inducción de apoptosis. En este modelo *in vivo*, observamos resultados similares a los del modelo *in vitro* (Arietta et al., 2023; por lo tanto, el mecanismo propuesto previamente es consistente en ambos modelos. Sugerimos que la unión del IA a HKII causa una reducción en su expresión, lo que lleva a la inducción de apoptosis (Figura 16), que a su vez puede resultar en una disminución en el tamaño y peso de los tumores de cáncer de mama en ratones. Con estos datos, se demostró que IA es eficaz en CM y proponemos que pudiera considerarse como candidata para estudios más profundos dirigidos a analizar si puede ser utilizado como fitomedicamento.

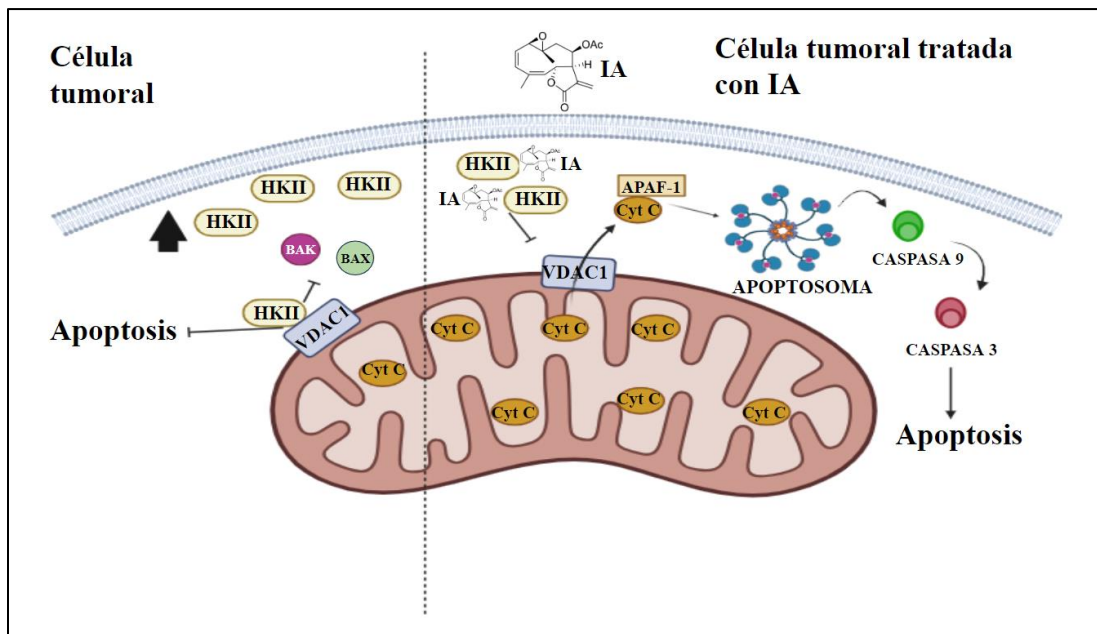


Figura 16. Mecanismo de acción propuesto para IA en tumores de CM. En las células tumorales, HKII se sobre expresa y se une a VDAC1, previniendo la apoptosis. Cuando a los ratones se les administra IA, esta se une a HKII, impidiendo la unión de HKII a VDAC1, liberando moléculas pro apoptóticas como Cyt C, y permitiendo la actividad de moléculas pro apoptóticas, como caspasa 3 y la disminución de moléculas anti apoptóticas, como Bcl-2, induciendo la apoptosis. Por lo tanto, disminuye el volumen y peso del tumor. HKII (hexocinasa II), VDAC1 (canal aniónico dependiente de voltaje 1), APAF-1 (factor activador de proteasa de apoptosis 1), Cyt C (citocromo c).

11. CONCLUSIÓN.

IA demostró una actividad antitumoral significativa en un modelo murino de CM al alterar la expresión de HKII, lo que indujo apoptosis y disfunción mitocondrial en las células tumorales, reduciendo así el tamaño y el peso del tumor. Por lo tanto, IA podría ser un compuesto prometedor para futuros estudios que investiguen su posible uso en el CM.

12. BIBLIOGRAFÍA.

ACS (American Cancer Society). (2025). Radiation Therapy Side Effects. Consultado en junio del 2025. <https://www.cancer.org/cancer/managing-cancer/treatment-types/radiation/effects-on-different-parts-of-body.html>.

ACS (American Cancer Society). (2025). Treating breast cancer. Consultado en febrero del 2025. <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/treatment.html>.

ACS (American Cancer Society). (2025). What is breast cancer? Consultado en febrero del 2025. <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>.

Amaroli, A., Panfoli, I., Bozzo, M., Ferrando, S., Candiani, S. y Ravera, S. (2024). The bright side of curcumin: A narrative review of its therapeutic potential in cancer management. *Cancers*, 16(14), 2580. <https://doi.org/10.3390/cancers16142580>.

Amin, M., Greene, F., Edge, S., Compton, C., Gershenwald, J., Brookland, R., Meyer, L., Gress, D., Byrd, D. y Winchester, D. (2017). The eighth edition AJCC cancer staging manual: continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 67(2), 93–99. <https://doi.org/10.3322/caac.21388>.

Arietta-Garcia, A., Calzada, F., Ramirez-Sanchez, I., Bautista, E., Garcia-Hernandez, N. y Ordonez-Razo, R. (2023). Advances in the properties of incomptine A: cytotoxic activity and downregulation of hexokinase II in breast cancer cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15). <https://doi.org/10.3390/ijms241512406>.

Bachmann, M., Costa, R., Peruzzo, R., Prosdocimi, E., Checchetto, V. y Leanza, L. (2018). Targeting Mitochondrial Ion Channels to Fight Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7). <https://doi.org/10.3390/ijms19072060>.

Bautista, E., Calzada, F., Yopez-Mulia, L., Chavez-Soto, M. y Ortega, A. (2012). Incomptines C and D, two heliangolides from *Decachaeta incompta* and their antiprotozoal activity. *Planta Medica*, 78(15), 1698-1701. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1315255>.

Bejar, E., Reyes-Chilpa, R. y Jiménez-Estrada, M. (2000). Bioactive compounds from selected plants used in the xvi century mexican traditional medicine. *Studies in Natural Products Chemistry*, 24. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(00\)80055-1](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(00)80055-1).

Bell, S., Dalton, L., McNeish, B., Fang, F., Henry, N., Kidwell, K. y McLean, K. (2020). Aromatase inhibitor use, side effects and discontinuation rates in gynecologic oncology patients. *Gynecologic Oncology*, 159(2), 509-514. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2020.08.015>

Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R., Soerjomataram, I. y Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.

Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E. y Soerjomataram, I. (2021). The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*, 127(16), 3029–3030. <https://doi.org/10.1002/cncr.33587>.

Calzada, F., Bautista, E., Hidalgo-Figueroa, S., Garcia-Hernandez, N., Barbosa, E., Velazquez, C., Ordonez-Razo, R., y Arietta-Garcia, A. (2021). Antilymphoma effect of incomptine A: in vivo, in silico, and toxicological studies. *Molecules*, 26(21). <https://doi.org/10.3390/molecules26216646>.

Calzada, F., Garcia-Hernandez, N., Hidalgo-Figueroa, S., Bautista, E., Barbosa, E., Velázquez, C y Hernández-Caballero, M. (2022). Expanding the study of the cytotoxicity of incomptines A and B against leukemia cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(5), 1687. <https://doi.org/10.3390/molecules27051687>.

Calzada, F., Yépez-Mulia, L., Tapia-Contreras, A. y Ortega, A. (2009). Antiprotozoal and antibacterial properties of *Decachaeta incompta*. *Revista Latinoamericana de Química*, 37.

Chadwick, M., Trewin, H., Gawthrop, F. y Wagstaff, C. (2013). Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 12780–12805. <https://doi.org/10.3390/ijms140612780>.

Chen, J., Yan, Q., Bai, M., Liu, Q., Song, S. y Yao, G. (2023). Deoxyelephantopin, a germacrane-type sesquiterpene lactone from *Elephantopus scaber*, induces mitochondrial apoptosis of hepatocarcinoma cells by targeting Hsp90alpha in vitro

and *in vivo*. *Phytotherapy Research*, 37(2), 702-716. <https://doi.org/10.1002/ptr.7654>.

Cilia-López, Virginia Gabriela, Cariño-Cortés, Raquel, & Zurita-Salinas, Luis Ricardo. (2021). Ethnopharmacology of the Asteraceae family in Mexico. *Botanical Sciences*, 99(3), 455-486. Epub 25 de junio de 2021. <https://doi.org/10.17129/botsci.2715>.

CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad) (2020). Plantas medicinales. Consultado en febrero de 2025. <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/medicinal/plantas>.

Dillekås, H., Rogers, M. y Straume, O. (2019). Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Medicine*, 8(12), 5574–5576. <https://doi.org/10.1002/cam4.2474>.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative group (EBCTCG) (2021). Trastuzumab for early-stage, HER2-positive breast cancer: a meta-analysis of 13 864 women in seven randomised trials. *The Lancet. Oncology*, 22(8), 1139–1150. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00288-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00288-6)

Fan, K., Fan, Z., Cheng, H., Huang, Q., Yang, C., Jin, K., Luo, G., Yu, X., & Liu, C. (2019). Hexokinase 2 dimerization and interaction with voltage-dependent anion channel promoted resistance to cell apoptosis induced by gemcitabine in pancreatic cancer. *Cancer Med*, 8(13), 5903-5915. <https://doi.org/10.1002/cam4.2463>.

Franzoi, M., Agostinetti, E., Perachino, M., Del Mastro, L., de Azambuja, E., Vaz-Luis, I., Partridge, A. y Lambertini, M. (2021). Evidence-based approaches for the management of side-effects of adjuvant endocrine therapy in patients with breast cancer. *The Lancet. Oncology*, 22(7), e303–e313. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30666-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30666-5).

Haloi, N., Wen, P., Cheng, Q., Yang, M., Natarajan, G., Camara, A., Kwok, W., y Tajkhorshid, E. (2021). Structural basis of complex formation between mitochondrial anion channel VDAC1 and Hexokinase-II. *Communications Biology*, 4(1), 667. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02205-y>.

Hanahan, D. y Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

Hiensch, A., Bolam, K., Mijwel, S., Jeneson, J., Huitema, A., Kranenburg, O., van der Wall, E., Rundqvist, H., Wengstrom, Y. y May, A. (2020). Doxorubicin-induced skeletal muscle atrophy: Elucidating the underlying molecular pathways. *Acta Physiologica (Oxf)*, 229(2), e13400. <https://doi.org/10.1111/apha.13400>.

Hsiang, Y., Hertzberg, R., Hecht, S. y Liu, L. (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *Journal of Biological Chemistry*, 260(27), 14873-14878.

Huang, H., Park, S., Zhang, H., Park, S., Kwon, W., Kim, E., Zhang, X., Jang, S., Yoon, D., Choi, S., Yi, J., Kim, S., Dong, Z., Lee, M., Ryoo, Z. y Kim, M. O. (2021). Targeting AKT with costunolide suppresses the growth of colorectal cancer cells and induces apoptosis in vitro and in vivo. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 40(1), 114. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01895-w>.

Jackson, C., Finikarides, L. y Freeman, A. (2022). The adverse effects of trastuzumab-containing regimes as a therapy in breast cancer: A piggy-back systematic review and meta-analysis. *PLoS one*, 17(12), e0275321. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275321>.

Jadapalli, J., Wright, G., Kain, V., Sherwani, M., Sonkar, R., Yusuf, N. y Halade, G. (2018). Doxorubicin triggers splenic contraction and irreversible dysregulation of COX and LOX that alters the inflammation-resolution program in the myocardium. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 315(5), H1091-H1100. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00290.2018>.

Kashkooe, A., Jalali, A., Zarshenas, M. y Hamed, A. (2024). Exploring the phytochemistry, signaling pathways, and mechanisms of action of *Tanacetum parthenium* (L.) Sch.Bip.: A comprehensive literature review. *Biomedicines*, 12(10), 2297. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12102297>.

Kim, S., Trang, K., Kim, S., Kim, I., Lee, S., Lee, S., Kim, D. y Kim, S. (2012). Parthenolide suppresses tumor growth in a xenograft model of colorectal cancer cells by inducing mitochondrial dysfunction and apoptosis. *International journal of oncology*, 41(4), 1547–1553. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1587>

King, R. y Robinson, H. (1969). Studies in the Eupatorieae (Compositae). XVI. A monograph on the genus *Decachaeta* DC. *Brittonia*, 21, 275-284. <https://doi.org/10.2307/2805579>.

Li, R., Mei, S., Ding, Q., Wang, Q., Yu, L. y Zi, F. (2022). A pan-cancer analysis of the role of hexokinase II (HK2) in human tumors. *Scientific Reports*, 12(1), 18807. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23598-8>.

Magri, A., Reina, S. y De Pinto, V. (2018). VDAC1 as pharmacological target in cancer and neurodegeneration: Focus on its role in apoptosis. *Frontiers in Chemistry*, 6, 108. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00108>.

Mathupala, S., Ko, Y. y Pedersen, P. (2006). Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene*, 25(34), 4777-4786. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209603>.

Miura, Y., Hirata, K., Kurano, N., Miyamoto, K. y Uchida, K. (1988). Formation of vinblastine in multiple shoot culture of *Catharanthus roseus*. *Planta Medica*, 54(1), 18–20. <https://doi.org/10.1055/s-2006-96232>.

Muller, P. y Milton, M. (2012). The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(10), 751-761. <https://doi.org/10.1038/nrd3801>.

Muley, P., Olinger, A. y Tummala, H. (2015). 2-Deoxyglucose induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cells independent of its glycolysis inhibition. *Nutrition and cancer*, 67(3), 514–522. <https://doi.org/10.1080/01635581.2015.1002626>.

Navarro, C., Ortega, A., Santeliz, R., Garrido, B., Chacin, M., Galban, N., Vera, I., De Sanctis, J., y Bermudez, V. (2022). Metabolic Reprogramming in Cancer Cells: Emerging Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches. *Pharmaceutics*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061303>.

NCI (National Institute of Cancer), (2025). Glándula mamaria. Consultado en febrero del 2025. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/glandula-mamaria>.

NGHR (National Genome Human Research), (2025). Cáncer. Consultado en febrero del 2025. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Cancer>.

NIH (National Institute of Health), (2025). What Is Cancer? Consultado en febrero del 2025. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.

Norma Oficial Mexicana. NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones Técnicas Para la Producción, Cuidado y Uso de Los Animales de Laboratorio. 1999. Consultado en febrero del 2025. <https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>.

OECD. Guideline for Testing of Chemicals 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organización para la cooperación y el desarrollo económicos, OECD/OCDE. 2001. Consultado en febrero del 2025. https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en#page1.

OMS (Organización Mundial de la Salud) (2023) Medicina tradicional. Consultado en febrero de 2025. <https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/traditional-medicine>.

Pérez L. (2004). Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERM). Revista Española de Reumatología, 31(1):13-7.

Pina-Jiménez, E., Calzada, F., Bautista, E., Ordoñez-Razo, R., Velázquez, C., Barbosa, E. y García-Hernández, N. (2021). Incomptine A induces apoptosis, ROS production and a differential protein expression on non-Hodgkin's lymphoma cells. International Journal of Molecular Sciences, 22(19), 10516. <https://doi.org/10.3390/ijms221910516>.

POWO (Plants of the World Online) (2025). Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Consultado en febrero del 2025. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:8542-1>.

Prasanna, P., Renu, K. y Valsala Gopalakrishnan, A. (2020). New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. Life Sciences, 250, 117599. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117599>.

Pulaski, B. y Ostrand-Rosenberg, S. (2001). Mouse 4T1 breast tumor model. Current Protocols in Immunology, Chapter 20. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39>.

Raez, L., Papadopoulos, K., Ricart, A., Chiorean, E., DiPaola, R., Stein, M., Rocha Lima, C., Schlesselman, J., Tolba, K., Langmuir, V., Kroll, S., Jung, D., Kurtoglu, M., Rosenblatt, J. y Lampidis, T. A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-d-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors.

Cancer Chemother. Pharmacol. 2013, 71(2), 523-530.
<https://doi.org/10.1007/s00280-012-2045-1>.

Rolnik, A. y Olas, B. (2021). The Plants of the Asteraceae Family as Agents in the Protection of Human Health. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3009. <https://doi.org/10.3390/ijms22063009>

Rotondo, R., Oliva, M. y Arcella, A. (2022). The Sesquiterpene Lactone Cynaropicrin Manifests Strong Cytotoxicity in Glioblastoma Cells U-87 MG by Induction of Oxidative Stress. *Biomedicines*, 10(7).
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10071583>.

Sato-Tadano, A., Suzuki, T., Amari, M., Takagi, K., Miki, Y., Tamaki, K., Watanabe, M., Ishida, T., Sasano, H. y Ohuchi, N. (2013). Hexokinase II in breast carcinoma: a potent prognostic factor associated with hypoxia-inducible factor-1alpha and Ki-67. *Cancer Science*, 104(10), 1380-1388. <https://doi.org/10.1111/cas.12238>.

Schiff, P., Fant, J. y Horwitz, S. (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, 277(5698), 665-667.

Schlam, I. y Swain, S. (2021). HER2-positive breast cancer and tyrosine kinase inhibitors: the time is now. *NPJ Breast Cancer*, 7(1), 56.
<https://doi.org/10.1038/s41523-021-00265-1>.

Schmidt, M. y O'Donnell, A. 'Sugarcoating' 2-deoxyglucose: mechanisms that suppress its toxic effects. *Curr. Genet.* 2021, 67(1), 107-114.
<https://doi.org/10.1007/s00294-020-01122-7>.

Schoeniger, A., Wolf, P. y Edlich, F. (2022). How Do Hexokinases Inhibit Receptor-Mediated Apoptosis? *Biology (Basel)*, 11(3).
<https://doi.org/10.3390/biology11030412>.

Shin, E. y Koo, J. (2021). Glucose metabolism and glucose transporters in breast cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 728759.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.728759>.

Stein, M., Lin, H., Jeyamohan, C., Dvorzhinski, D., Gounder, M., Bray, K., Eddy, S., Goodin, S., White, E. y DiPaola, R. (2010). Targeting tumor metabolism with 2-deoxyglucose in patients with castrate-resistant prostate cancer and advanced malignancies. *The Prostate*, 70(13), 1388-1394.
<https://doi.org/10.1002/pros.21172>.

Thorn, C, Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T., y Altman, R. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetic Genomics*, 21(7), 440-446. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>.

Tommasi, C., Balsano, R., Corianò, M., Pellegrino, B., Saba, G., Bardanzellu, F., Denaro, N., Ramundo, M., Toma, I., Fusaro, A., Martella, S., Aiello, M., Scartozzi, M., Musolino, A. y Solinas, C. (2022). Long-term effects of breast cancer therapy and care: calm after the storm? *Journal of Clinical Medicine*, 11(23), 7239. <https://doi.org/10.3390/jcm11237239>.

Tsang, J. y Tse, G. (2020). Molecular classification of breast cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, 27(1), 27–35. <https://doi.org/10.1097/PAP.000000000000232>

Turner, B. (2011). A new species of *Decachaeta* (Asteraceae: Eupatorieae), from Oaxaca, México. *Phytologia*, 93 , 346–350.

van den Boogaard, W., Komninos, D. y Vermeij, W. (2022). Chemotherapy side-effects: not all DNA damage is equal. *Cancers*, 14(3), 627. <https://doi.org/10.3390/cancers14030627>.

Velázquez-Domínguez, J., Marchat, L., López-Camarillo, C., Mendoza-Hernández, G., Sánchez-Espíndola, E., Calzada, F., Ortega-Hernández, A., Sánchez-Monroy, V. y Ramírez-Moreno, E. (2013). Effect of the sesquiterpene lactone incomptine A in the energy metabolism of *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology*, 135(3), 503-510.

Verdecia, D., Herrera, R., Torres, E., Sánchez-Laiño, A., Hernandez-Montiel, L., Rafael, H., Ribera, J., Bodas, R., Giráldez, F., Guillaume, J., Uvidia, H. y López, S. (2021). Primary and secondary metabolites of six species of trees, shrubs and herbaceous legumes. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 5, 1.

Wang, L., Zhang, S. y Wang, X. (2020). The Metabolic Mechanisms of Breast Cancer Metastasis. *Frontiers in Oncology*, 10, 602416. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.602416>.

Wang, Z., Wang, N., Chen, J. y Shen, J. (2012). Emerging Glycolysis Targeting and Drug Discovery from Chinese Medicine in Cancer Therapy. *Evidence-based*

complementary and alternative medicine: eCAM, 873175.
<https://doi.org/10.1155/2012/873175>.

Warburg, O. (1925). The metabolism of carcinoma cells. *The Journal of Cancer Research*, 9(1), 148-163. <https://doi.org/10.1158/jcr.1925.148>.

Zeng, S., Yin, Y., Zhang, Y., Zhao, Q., Yang, Y., Zhang, Z. y Zou, X. (2024). Parthenolide as a potential therapeutic agent for gastric cancer: Exploring oxidative stress and DNA damage. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 10, 100365. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2024.100365>.

Zhang, D., Yip, Y. y Li, L. (2016). *In silico* construction of HK2-VDAC1 complex and investigating the HK2 binding-induced molecular gating mechanism of VDAC1. *Mitochondrion*, 30, 222-228. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.08.009>.

Zhang, S., Xiao, X., Yi, Y., Wang, X., Zhu, L., Shen, Y., Lin, D. y Wu, C. (2024). Tumor initiation and early tumorigenesis: molecular mechanisms and interventional targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 149. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01848-7>

Zheng, X., Ma, H., Wang, J., Huang, M., Fu, D., Qin, L. y Yin, Q. (2022). Energy metabolism pathways in breast cancer progression: The reprogramming, crosstalk, and potential therapeutic targets. *Translational Oncology*, 26, 101534. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101534>.

Zheng, X., Pan, Y., Yang, G., Liu, Y., Zou, J., Zhao, H., Yin, G., Wu, Y., Li, X., & Wei, Z. (2022). Kaempferol impairs aerobic glycolysis against melanoma metastasis via inhibiting the mitochondrial binding of HK2 and VDAC1. *European Journal of Pharmacology*, 931, 175226. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175226>.

13. Anexo

13.1 Artículo



Article

The Antitumor Role of Incomptine A in a Breast Cancer Murine Model: Impairment of Hexokinase II Expression and Apoptosis Induction

Angel Giovanni Arietta-García ^{1,2}, Fernando Calzada ³, Antonio Franco-Vadillo ⁴, Irais Monserrat Barrientos-Buendía ², Francisco Javier Alarcón-Aguilar ⁵, Elihú Bautista ⁶, Paola Santana-Sánchez ⁷, Israel Ramírez-Sánchez ⁸ and Rosa María Ordoñez-Razo ^{2,*}

¹ Posgrado en Biología Experimental, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Col. Leyes de Reforma 1a Secc. Iztapalapa, Ciudad de México C.P. 09310, Mexico; angelo_arietta@hotmail.com

² Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund”, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, Ciudad de México C.P. 06720, Mexico; irais.m3093@gmail.com

³ Unidad de Investigación Médica en Farmacología, UMAE Hospital de Especialidades, 2° Piso CORSE, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, Ciudad de México C.P. 06720, Mexico; fercalber10@gmail.com

⁴ Medicina Hiperbárica Experimental y Farmacología Molecular, SEPI, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Salvador Díaz Mirón esq. Plan de San Luis S/N, Casco de Santo Tomas, Ciudad de México C.P. 11340, Mexico; afv2504@gmail.com

⁵ Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Col. Leyes de Reforma 1a Secc. Iztapalapa, Ciudad de México C.P. 09310, Mexico; alaguilar888@gmail.com

⁶ CONAHCYT—Consortio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., San Luis Potosí C.P. 78216, Mexico; francisco.bautista@ipicyt.edu.mx

⁷ Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund”, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, Ciudad de México C.P. 06720, Mexico; pao-ss@live.com.mx

⁸ Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Salvador Díaz Mirón esq. Plan de San Luis S/N, Casco de Santo Tomas, Ciudad de México C.P. 11340, Mexico; iramirezsanchez@ucsd.edu

* Correspondence: romaorr@yahoo.com.mx



Academic Editor: Zhixiang Wang

Received: 30 June 2025

Revised: 21 July 2025

Accepted: 31 July 2025

Published: 2 August 2025

Citation: Arietta-García, A.G.; Calzada, F.; Franco-Vadillo, A.; Barrientos-Buendía, I.M.; Alarcón-Aguilar, F.J.; Bautista, E.; Santana-Sánchez, P.; Ramírez-Sánchez, I.; Ordoñez-Razo, R.M. The Antitumor Role of Incomptine A in a Breast Cancer Murine Model: Impairment of Hexokinase II Expression and Apoptosis Induction. *Cells* **2025**, *14*, 1192. <https://doi.org/10.3390/cells14151192>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract

Breast cancer (BC) is the most common type of cancer in women worldwide. Hexokinase II (HKII) overexpression is associated with the proliferation and survival of tumor cells, as it inhibits apoptosis. Incomptine A (IA) is cytotoxic to breast cancer cells, likely due to a decrease in the expression of HKII. This study evaluated the antitumor activity of IA in an in vivo mouse model of BC. A model was generated from 4T1 cells and grouped tumor-bearing animals according to treatment: in IA or doxorubicin (DOXO), or untreated (UT). Comparing the body weight and tumor size between groups, tumors were analyzed using histopathological, Western blot, flow cytometry, and mitochondrial activity assays. Tumors IA-treated showed a reduction in size, weight, and number of tumor cells; the expression of HKII and Bcl-2 decreased, while that of Caspase-3 increased. IA treatment increased apoptosis and reduced mitochondrial activity in tumor cells. This data showed that IA has an impact on tumor cells by reducing tumor volume and size, increasing cell apoptosis, and decreasing mitochondrial activity, all of which could be attributed to reduced HKII expression. Therefore, IA may be a promising compound that requires further studies to elucidate its mechanism of action and analyze its possible future use in BC.

Keywords: incompitine A; antitumor activity; breast cancer; hexokinase II; apoptosis

1. Introduction

Breast cancer (BC) has the highest incidence and mortality in women worldwide and represents approximately 23.8% of reported cases and 15.4% of deaths caused by cancer [1]. In México, only in 2022, 23,790 new cases and 7888 deaths from BC were reported, making BC a significant public health problem [2].

BC can be classified molecularly into four categories, HER-2+ (human epidermal growth factor receptor 2), luminal A, luminal B, and triple-negative, which differ in factors such as incidence, survival, and treatment [3]. Because of this, specific medications are required for each subtype; however, it has been reported that tumor cells can generate resistance to drugs and can also present adverse effects that impact the patients [4,5]. Because of this, it is vitally essential to search for new treatments that are more effective and selective against cancer cells. A necessary source for the obtention of new anticancer agents is the natural products obtained from medicinal plants, which have contributed significantly to pharmacotherapy [6].

Sesquiterpene lactones are a subclass of terpenoids, with structural diversity and confirmed antitumor activity in different types of cancer [7]. Incompitine A (IA) is a sesquiterpene lactone that exhibits cytotoxic and antitumor activities in non-Hodgkin's lymphoma cells [8,9] and in BC cell lines [10]. In BC, IA has shown a similar cytotoxic activity among luminal A, HER-2(+), and triple-negative subtypes as well as greater selectivity towards cancer cells, since much less damage was observed in non-tumorigenic cells [10], which suggests that IA could be a compound that meets the characteristics of universality and selectivity necessary to be considered in studies aimed at analyzing its possible use as a phytopharmaceutical for BC.

Hexokinase II (HKII) is a glycolytic enzyme that is often found to be overexpressed in various types of cancer. In BC, this increased expression is correlated with more advanced histological grades, increased proliferative activity, increased risk of recurrence, and adverse clinical outcomes [11,12]. HKII also participates in regulating apoptotic signaling by inhibiting cell death by binding to the voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) located in the mitochondrial outer membrane (MOM). HKII competes with pro-apoptotic molecules, such as BAX and BAK, to bind to VDAC1, thereby inhibiting apoptosis [13–15]. Based on this, HKII is considered an important therapeutic target in cancer.

A previous report demonstrated that IA treatment in different BC cell lines reduces HKII expression but not the expression of other glycolytic enzymes [10]. The same report suggested that the HKII reduction could be due to the strong interaction between IA and HKII observed in molecular docking analyses [10]. The comparison of the IA-HKII union site to the union site for 2-Deoxy-D-glucose (2-DG), an HKII inhibitor, revealed that IA and 2-DG share a similar binding site for HKII [10]. Based on this, it is proposed that the cytotoxic mechanism of IA involves its binding to HKII, thereby blocking HKII activity and releasing VDAC1, which consequently induces apoptosis in these cancer cells [10]. However, it is necessary to demonstrate that the reported IA activity in BC cell lines is the same in an *in vivo* tumor model. Therefore, this study aimed to examine the antitumor activity of IA in a murine model of BC and its effect on the expression of HKII and apoptosis-related proteins.

2. Materials and Methods

2.1. *Incomptine A*

Dr. Elihú Bautista provided the IA. The IA was purified from the leaves of *Decachaeta incompta* according to the reported methodology by Bautista et al. (2012) [16]. IA identification was performed using nuclear magnetic resonance spectroscopy with an authentic sample of 99% purity.

2.2. Cell Culture

The 4T1 cell line (cat CRL-2539) was acquired from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The 4T1 cell line was cultivated in RPMI-1640 medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with 100 µg/mL of penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The cells were incubated and maintained in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO₂ until they were 80% confluent.

2.3. Laboratory Animals

To generate the murine model, virgin female Balb/c mice weighing 22 ± 2 g were used. The mice were obtained from the bioterium of the Centro Médico Nacional SXXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Clean and sterile polyvinyl cages were maintained during the investigation. The mice were manipulated according to the specifications of the Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 [17] for the production, care, and use of laboratory animals. All investigations were performed with the endorsement of the Comité de Ética and the Comité Científico de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social, Siglo XXI.

2.4. Acute Oral Toxicity

An evaluation of the acute oral toxicity of IA and the control drug doxorubicin was performed at lethal dose 50 (LD₅₀), which is the dose at which 50% of the treated animals can die, and according to guideline 423 described by the OECD for the evaluation of acute oral toxicity of chemical substances [18]. Eighteen mice of the BALB/c strain (females) weighing 20 ± 2 g were used for each group. The mice were fasted for 4 h before a single administration of IA and DOXO at doses of 100, 150, and 200 mg/kg, administered oral-intragastrically. The animals were observed for 4 h after the administration of the treatments to verify any abnormalities such as diarrhea, convulsions, spasms, vomiting, coma, or mortality. The observation occurred once a day for 15 days, and the mice were then sacrificed to perform an autopsy and rule out any macroscopic damage to the organs. Subsequently, the LD₅₀ values for IA and DOXO were determined using linear regression in the GraphPad Prism version 8 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Finally, their toxicity category, IA and DOXO, was determined according to the OECD categories: Toxicity Category I (highly toxic), Toxicity Category II (moderately toxic), Toxicity Category III (slightly toxic), and Toxicity Category IV (practically non-toxic) [18].

2.5. Murine Model of Breast Cancer

A murine model of BC was created according to Pulaski's protocol [19]. 4T1 cells (1×10^5 cells) in 100 µL of culture medium were inoculated subcutaneously around the left lower mammary gland of the mice. Subsequently, tumor formation was verified by palpation 7 days after inoculation. Once the tumor was implanted, the mice were randomly assigned to groups.

2.6. Antitumor Activity

The mice were assigned to five groups (n = 6): a UT group; a DOXO treatment group (80 mg/kg); and three IA treatment groups (0.07, 0.7, and 2.5 mg/kg). The doses of IA used in this work were selected based on the cytotoxic concentration 50 (CC₅₀) reported by Arietta et al. (2023) [10]. The CC₅₀ of 7 µg/mL of the cell lines was multiplied at 10X, 100X, and 350X according to the methods of Schlie-Guzman [20]. The final doses administered to the mice were 0.07, 0.7, and 2.5 mg/kg. All treatments were administered orally, one dose daily for 8 days. Day 1 of the treatment was day 7 post-inoculation, and day 8 was day 14 after cell inoculation. The tumors were measured with a vernier beginning on day 12 after cell inoculation and then every 2 days, until day 28, which was the day the animals were euthanized. Tumor volume (VT) was calculated with the formula $VT = A \times B^2 \times 0.5$, where A is the longest diameter of the tumor and B is the shortest diameter of the tumor. The weight and survival of the animals were recorded weekly for 4 weeks. The antitumor activity was determined by comparing the average weight of the mammary tumor growth in the animals treated with IA against those without treatment. The effective dose 50 (ED₅₀) of IA was then calculated by linear interpolation obtained from the data on the percentage of decrease in tumor growth. The weight and survival of the animals were recorded weekly for 4 weeks. The antitumor activity was determined by comparing the average weight of the mammary tumor growth in the animals treated with IA against those without treatment. Finally, the effective dose 50 (ED₅₀) of IA was calculated by linear interpolation obtained from the data on the percentage of decrease in tumor growth.

2.7. Toxicity and Safety Profile of IA in the Murine BC Model

The blood obtained was incubated for 30 min at room temperature and then centrifuged at 3000 RPM for 15 min at 4 °C to obtain total serum, which was used to measure the levels of glutamic-pyruvic transaminase (SGPT) and glutamic-pyruvic transaminase oxalacetic acid (SGOT) using the SPOTCHEM EZ SP-4430 automated biochemistry analyzer (Arkray Global Business Inc, Miami, FL, USA).

2.8. Histopathological Analysis

The tumors were divided into four sections, and then, one section was fixed in paraffin. The latter was then sectioned into 7 µm sections using a microtome and placed on a slide, where it was subjected to hematoxylin–eosin (H&E) staining. An analysis was performed using a high-resolution microscope connected to a digital camera (Exview HAD; Sony México, Ciudad de México, México) and a standard computer (IBM computer system, Ciudad de México, México).

2.9. Western Blot

A portion of the breast tumor samples was used for protein extraction. Equal amounts of protein for the UT, IA-treated, and DOXO-treated groups were separated by SDS-PAGE; transferred to a PVDF polyvinylidene difluoride membrane (Merck, Rahway, NJ, USA. IPVH00010); blocked with 5% skim milk; and incubated overnight with primary antibodies against hexokinase II (HKII) (1:2500, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA. sc-130358), aldolase A (ALDOA) (1:2500, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA. sc-390733), lactate dehydrogenase A (1:2500, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA. sc-133123), caspase 3 (1:2500, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA. sc-56053), and Bcl-2 (1:2500, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA. sc-7382). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated donkey anti-mouse antibody (1:2500, Abcam, Cambridge, UK, ab6820) was used for secondary detection, and the reaction was visualized using a chemiluminescent reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A densitometry analysis was

quantified using ImageJ software version 1.53 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The relative expression of the analyzed proteins between the untreated and IA-treated samples was calculated after normalizing to the intensity of the β -actin (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA. sc-47778) band for each sample.

2.10. Annexin V/Ghost Red Staining

A total of 20 mg of tumoral tissue from the DOXO 80 mg/kg and IA 2.5 mg/kg groups was incubated for one hour with 400 U/mL collagenase I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 100017) at 37 °C. Subsequently, the enzymatic reaction was stopped with 0.1 M EGTA and filtered through a 70 μ m cell strainer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 352350) to obtain a cell suspension containing the cancer cells. The 4T1 tumor cancer cells were then sorted using the CD44 Monoclonal Antibody (IM7), conjugated to PE-Cyanine5 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 15-0441-82). Cell apoptosis was analyzed using the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BioLegend, San Diego, CA, USA, 640922), and cell viability was assessed with Ghost Dye Red 780 Viability Dye (Tonbo Biosciences, San Diego, CA, USA, 13-0865). The samples were processed, and 50,000 events were acquired on a MACSQuant Analyzer 10 flow cytometer (Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, GER). Finally, the data were analyzed with FlowJo 10 software (BD Biosciences, Ashland, OR, USA).

2.11. Mitochondrial Respiratory Complex I Activity Assay

For the analysis of mitochondrial activity, 100 mg of tissue from each tumor was used. The mitochondria were purified using the MitoCheck Mitochondrial (Tissue) Isolation Kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) following the manufacturer's instructions. Then, 20 μ g of mitochondrial protein was used to determine the mitochondrial respiratory complex I activity with the MitoCheck Complex I activity Assay Kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA), and the absorbance of each sample was measured for 30 s intervals for 15 min at 25 °C and at 340 nm in a plate reader. Complex I activity resulted in a decrease in absorbance per minute. Standard error (SE) values were obtained from three sets of biological replicates.

2.12. Statistical Analysis

The results are expressed as the mean \pm SE of six measurements and were statistically analyzed using GraphPad Prism version 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), which performed a one-way ANOVA. Multiple comparison tests were performed with Dunnett's test with a *p*-value less than 0.05 to establish significant differences between study groups.

3. Results

3.1. Acute Oral Toxicity of Incomptine A

The acute oral toxicity of IA and DOXO was evaluated in agreement with OECD guidelines 423 for the use of natural products in human consumption [18]. The LD₅₀ for IA was 149.0 \pm 0.50 mg/kg, and for DOXO, it was 100 \pm 0.50 mg/kg. Therefore, based on the OECD, the LD₅₀ values for IA and DOXO fall within category 3 (LD₅₀ = 50–300 mg/kg), indicating that both can be considered slightly toxic. Hence, IA can be used in animal models without problems, as its risk is minimal.

3.2. Antitumor Activity of Incomptine A

The antitumor effect of IA was evaluated *in vivo* in an orthotopic murine tumor model. Representative tumor sizes for each group are shown in Figure 1A. The average

tumor volume in the UT group was 1385 mm³ (Figure 1B). In the IA treatment group, the tumor volume was less in the three doses (0.07, 0.7, and 2.5 mg/kg); the mean tumor volume decreased to 1035, 900, and 535 mm³, respectively. In contrast, the average tumor volume for treatment with the control drug DOXO (80 mg/kg) was 928 mm³. Therefore, IA treatment reduced tumor volume in a dose-dependent manner by up to 61% compared with the UT group and by 42% compared with the DOXO group (Figure 1B).

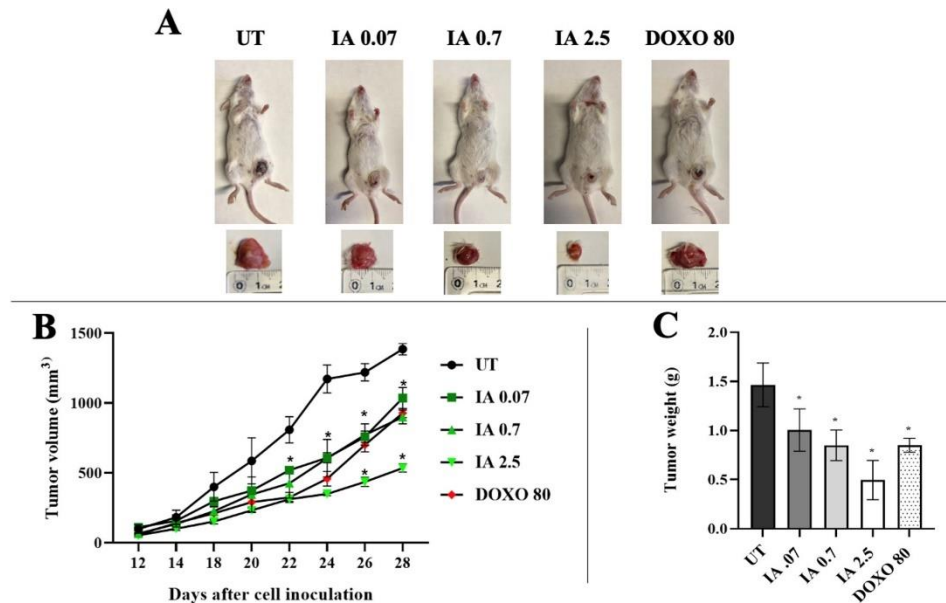


Figure 1. The antitumor effect of IA treatment on the in vivo model of BC. (A) Treated mice with IA (0.07, 0.7, and 2.5 mg/kg); the animals had extirpated tumors after treatment. (B) Tumor volumes were measured and calculated daily. (C) The tumor mass was weighed. The data are expressed as mean \pm SEM (n = 6). * $p < 0.05$ vs. untreated group. Abbreviations: IA (incomptine A), DOXO (doxorubicin), UT (untreated).

The excised tumors were weighed, and the reduction in tumor growth was analyzed (Figure 1C). The IA treatment groups showed a greater decrease in tumor growth in the three doses analyzed compared to the UT group. The IA at 0.07 mg/kg reduced tumor growth by approximately 31%, while the 0.7 mg/kg dose reached a 42% reduction. The highest dose of IA tested (2.5 mg/kg) produced the most pronounced effect, with a 66% reduction in tumor growth. In contrast, the treatment with DOXO (80 mg/kg) resulted in a 42% reduction in tumor growth relative to the UT group (Figure 1C).

The ED₅₀ for both IA and DOXO was determined from the data on the percentage decrease in tumor growth. The ED₅₀ for IA was 2.00 \pm 0.12 mg/kg, and for DOXO, it was 86.2 \pm 5.5 mg/kg. Therefore, IA can reduce tumor size with a much lower dose than DOXO. The therapeutic index (TI) was calculated with the LD₅₀/ED₅₀ ratio. TI is used to assess whether a safe compound is safe. The TI value for IA was 74.5, and for DOXO, it was 1.16. This result indicates that IA is safer and less toxic than DOXO, since a compound is considered safe when its TI is high [21].

3.3. Histopathology Analysis of Tumors

To analyze the histopathological changes in the IA-treated tumors, hematoxylin–eosin staining was used. The UT tumors shown exhibited structural loss and were mostly viable, with tumor cells displaying prominent pleomorphic, vesicular, and hyperchromatic nuclei (Figure 2B, black arrows). A pattern of central necrosis was accompanied by peripheral lymphocytic infiltration and fibrosis of the surrounding connective tissue. In comparison, the IA-treated mice showed greater preservation of the surrounding connective tissue as well as a significant decrease in the number of viable tumor cells and an increase in apoptotic cells (Figure 2D–F), and the presence of apoptotic bodies (black circles, Figure 2E,F). On the other hand, DOXO also showed a decrease in cellularity (Figure 2C), albeit to a lesser extent than the IA-treated group. These observations indicate that IA is decreasing the number of cancer cells by inducing cellular apoptosis.

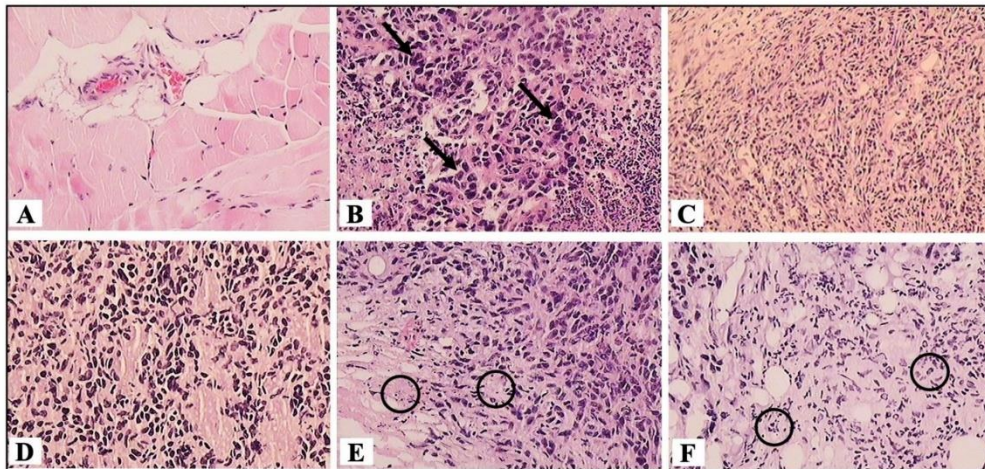


Figure 2. Representative photomicrographs with hematoxylin–eosin (H&E) staining of mouse mammary tumors induced by 4T1 cells observed at 20 \times . (A) The healthy breast tissue of mice; (B) untreated mouse mammary tumor; (C) mouse mammary tumor treated with DOXO; (D) mouse mammary tumor treated with IA 0.07 mg/kg, (E) 0.7 mg/kg, and (F) 2.5 mg/kg. The data were generated from six fields per slide, with four slides analyzed from each tumor, and three tumors were examined from each group. ($n = 6$). The black arrows indicate viable tumor cells, and the black circles indicate apoptotic bodies.

3.4. Toxicity of Incomptine A Treatment in an In Vivo Mouse Model

The systemic toxicity of IA was evaluated in the in vivo model. In all groups, body weight, organ weight, and hepatotoxicity were measured (Figure 3). None of the mice treated with IA showed changes in their body weight over time, like the UT group. Only the DOXO group showed a significant decrease in body weight (Figure 3A). Gross necropsy did not show any sign of toxicity, and the weights of the spleen, stomach, intestine, liver, and kidney were not different between the IA and the UT groups. However, there was a minor weight difference between the spleen and liver in the DOXO group (Figure 3B), which could indicate toxicity in these organs.

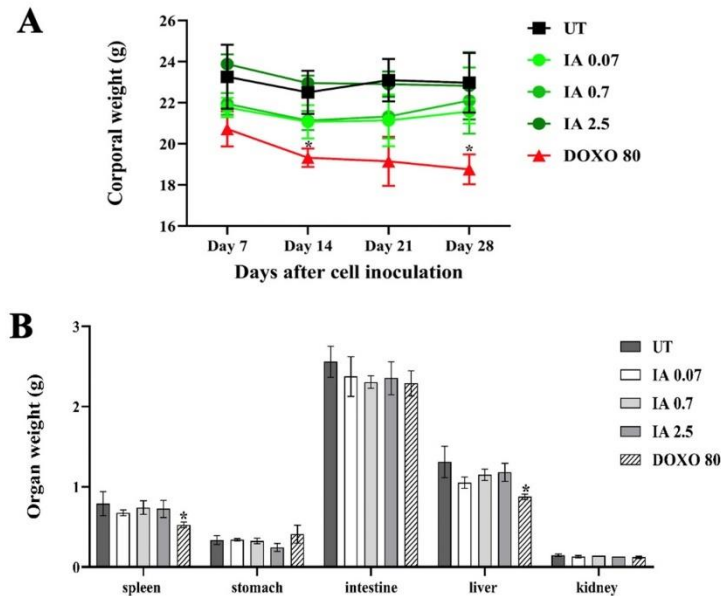


Figure 3. The effect of IA treatment on the corporal and organ weight of mice at the end of the treatment. **(A)** The corporal weight of the mice was measured weekly from days 7 to 28 after cell inoculation. **(B)** The weight of the organs obtained at the end of the experiment. All data were obtained from three independent experiments and expressed as the mean value \pm SEM ($n = 6$). * $p < 0.05$ vs. untreated group. Abbreviations: IA (incomptine A), DOXO (doxorubicin), UT (untreated).

To analyze the hepatotoxicity, the plasma levels of indicators of liver cell injury, such as glutamic-oxaloacetic transaminase (SGOT) and serum glutamic-pyruvic transaminase (SGPT), were measured (Table 1). In the plasma of all the IA-treated mice, there were no changes in the SGOT and SGPT profiles, with these values being very similar to those obtained in healthy mice without tumors. In contrast, the UT mice showed higher values in both enzymes. On the other hand, in the DOXO-treated mice, only SGOT levels increased significantly. Therefore, these data indicate that IA has an acceptable safety profile.

3.5. Treatment with Incomptine A Decreases HKII Expression in Mammary Tumors of Mice

To study the effect of IA on some of the enzymes of the glycolytic pathway in mouse tumors, the expression of HKII, aldolase A (ALDOA), and lactate dehydrogenase (LDH) was analyzed in a Western blot (Figure 4). The HKII expression in the tumors treated with the three doses of IA (0.07, 0.7, and 2.5 mg/kg) decreased significantly (65%, 80%, and 90%, respectively) in comparison with tumors from the UT group (Figure 4A). Regarding the expression of ALDOA and LDH, no differences were found to be significant in its expression in tumors IA-treated compared to those not treated (Figure 4B). The mice treated with DOXO did not present modification significance in the expression of any of the other enzymes analyzed (Figure 4B,C). These data suggest that the antitumor effect of IA is perhaps directly related to HKII.

Table 1. Plasma levels of glutamic-oxaloacetic transaminase (SGOT) and serum glutamic-pyruvic transaminase (SGPT) in healthy tumor-free mice, untreated mammary tumor mice, and mice treated with incompitine A and doxorubicin.

Mice	Treatment (mg/kg)	SGOT	SGPT
Healthy tumor-free	untreated	250.2 ± 11	49 ± 5.80
Mammary tumor	untreated	970.5 ± 29 *	445 ± 17 *
	0.07	213.6 ± 10	41.6 ± 6
IA	0.70	244.3 ± 4	43.3 ± 9
	2.50	264.6 ± 4	44.6 ± 6
DOXO	80.00	478.6 ± 4 *	54.6 ± 9

Data expressed as the mean ± SEM (n = 6). * $p < 0.05$ vs. healthy tumor-free mouse. IA = incompitine A; DOXO = doxorubicin.

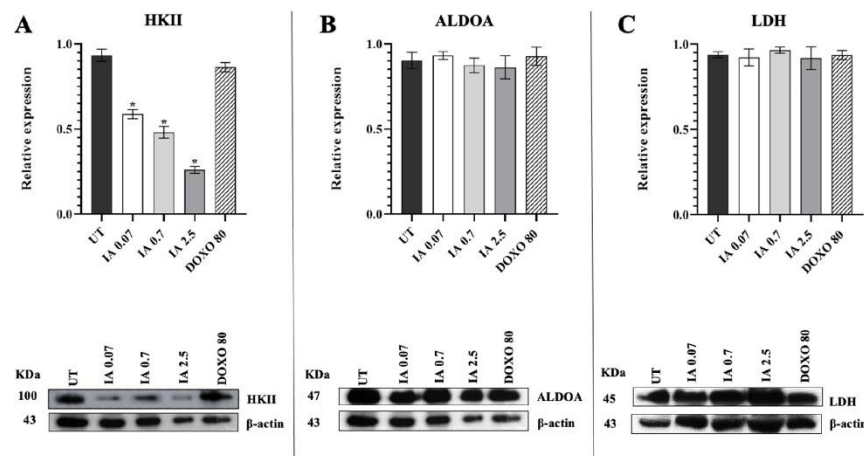


Figure 4. Expression of glycolytic enzymes in tumors of the untreated group and the groups treated with IA (0.07, 0.7, and 2.5 mg/kg) and DOXO (80 mg/kg). (A) Relative expressions of HKII, (B) ALDOA, and (C) LDH. Data are represented as the mean ± SEM of 3 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. untreated group. Abbreviations: IA (incompitine A), DOXO (doxorubicin), UT (untreated), HKII (hexokinase II), ALDOA (aldolase A), LDH (lactate dehydrogenase).

3.6. Incompitine A Induces Apoptosis in Breast Cancer Tumor Cells

Because there were no modifications in the other glycolytic enzymes and because HKII also participates in the inhibition of apoptosis, we analyzed the effect of IA on apoptosis in the tumor cells. The anti-apoptotic protein Bcl-2 and caspase-3 were quantified by Western blot densitometry in the tumors of mice treated with IA (0.07, 0.7, and 2.5 mg/kg) and DOXO (80 mg/kg), compared to the tumors of UT mice (Figure 5). These assays showed that the expression of caspase-3 increased significantly in mice receiving the three doses of IA (0.07, 0.7, and 2.5 mg/kg). In the group treated with DOXO (80 mg/kg), a significant increase in caspase-3 was also observed compared to the UT tumors (Figure 5A); however, this increase was much smaller than that observed with IA. On the other hand, the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 decreased significantly in mice treated with the three doses of IA and DOXO compared to the UT tumors (Figure 5B).

The results of flow cytometry showed that IA (2.5 mg/kg) and DOXO (80 mg/kg) treatments increased the proportion of apoptotic cells in the tumors by 33.6% and 22.2%, respectively, compared with the UT group (Figure 6). These results suggest that IA may be associated with the increase in apoptosis in mouse mammary tumors.

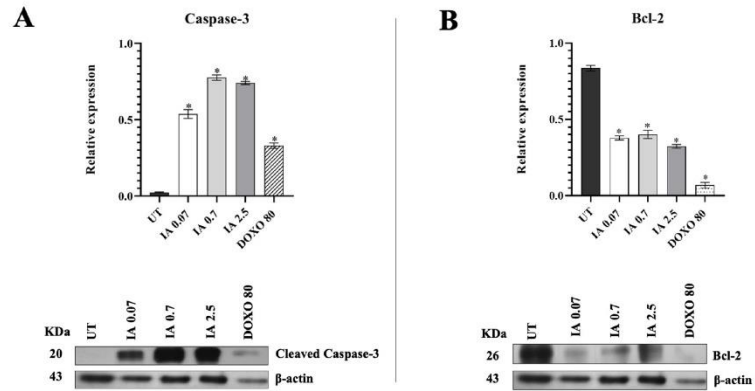


Figure 5. Expression of (A) caspase 3 and (B) Bcl-2 in tumors of an untreated group and groups treated with IA (0.07, 0.7, and 2.5 mg/kg) and DOXO (80 mg/kg). The data are represented as the mean ± SEM of 3 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. untreated group. Abbreviations: IA (incomptine A), DOXO (doxorubicin), UT (untreated).

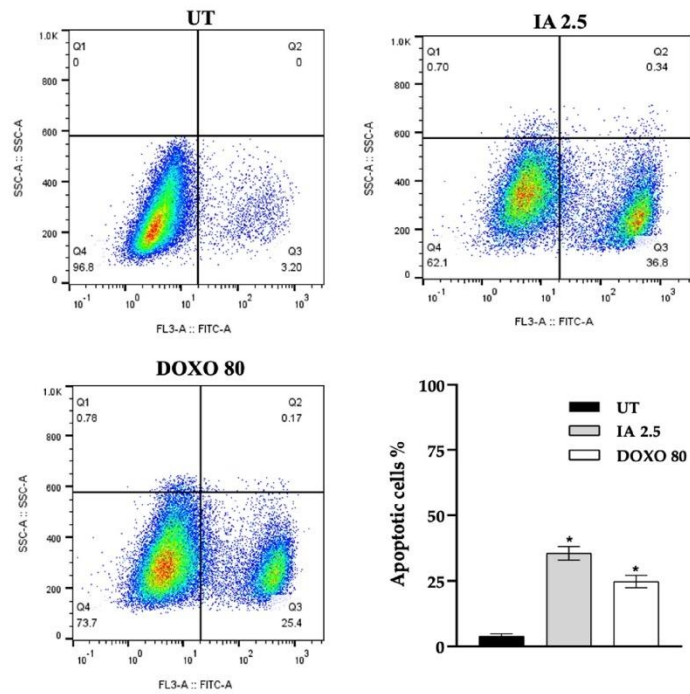


Figure 6. Induced apoptosis in tumor cells after treatment with IA and DOXO. Representative dot plots of apoptosis for IA (2.5 mg/kg) and DOXO (80 mg/kg) treatments and untreated tumor cells. The bar graph compares the percentage of apoptosis between the IA and DOXO treatments with the UT group. The data are expressed as mean ± SEM, $n = 3$; * $p < 0.05$ versus the untreated group. Abbreviations: IA (incomptine A), DOXO (doxorubicin), and UT (untreated).

3.7. Incomptine A Decreases the Mitochondrial Activity of Breast Cancer Tumor Cells

Due to the fundamental role of mitochondrial activity in cell death, we analyzed the modifications in mitochondrial function in mouse mammary tumors treated with 0.07, 0.7, and 2.5 mg/kg of IA. Mitochondrial activity in all IA treatment tumors decreased to 0, 7.5, and 15 min compared to mice without treatment (Figure 7). Mitochondrial activity decreased by 16.35% to 0.07 mg/kg, 46.84% with 0.7 mg/kg, and 46.16% to IA 2.5 mg/kg at 0 min. At 7.5 min, the decrease was 15.84%, 44.9%, and 46.16% with IA 0.07, 0.7, and 2.5 mg/kg, respectively. Finally, at 15 min, a decrease of 15.3% was observed with IA 0.07 mg/kg, 43.63% with IA 0.7 mg/kg, and 45.98% with IA 2.5 mg/kg (Figure 7). On the other hand, in tumors treated with DOXO at 80 mg/kg, mitochondrial activity decreased by 6.57% at 0 min, 6.04% at 7.5 min, and 5.67% at 15 min. The decrease in mitochondrial activity observed in tumor cells IA-treated is consistent with the hypothesis that IA could be participating in the induction of apoptosis.

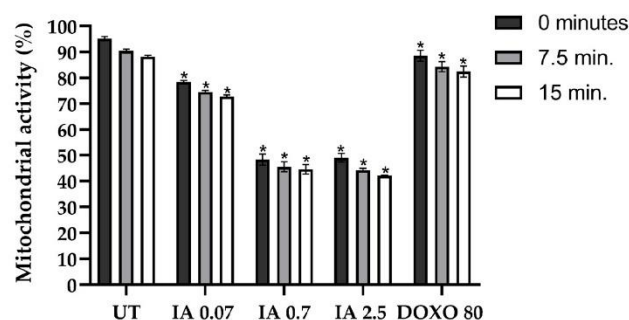


Figure 7. The mitochondrial activity of breast tumor cells after treatment with IA (0.07, 0.7, and 2.5 mg/kg) or DOXO (80 mg/kg) for 15 min. Normalized activities are depicted in untreated tumor cells and represented data as the mean \pm SEM of 3 independent experiments. * $p < 0.05$ vs. untreated group. Abbreviations: IA (incomptine A), UT (untreated).

4. Discussion

BC is one of the leading causes of death worldwide. For several years, efforts have been made to develop more effective treatments with universal characteristics that can be used in all subtypes of this cancer (luminal A, luminal B, HER2+, and triple-negative) and with fewer side effects; however, this goal has not yet been achieved. In this context, we studied the effects of the naturally occurring compound incomptine A in a mouse model of BC.

Due to the first-time use of IA as a treatment in an *in vivo* model for BC, several doses were used to obtain the ED_{50} . The IA inhibitory activity on the tumor was observed from the initial dose but increased to more than 50% with a dose of 2.5 mg/kg ($ED_{50} = 2.006 \pm 0.12$ mg/kg). The comparison with DOXO ($ED_{50} = 86.2 \pm 5.5$) showed that to reduce tumor growth, a much lower dose of IA is required; therefore, IA has a greater antitumor effect and could be more effective in reducing tumor mass than DOXO. These results are consistent with those previously reported in a murine lymphoma model, where IA also reduced tumor size with an ED_{50} of 2.4 ± 0.10 mg/kg [9]. Similarly, other sesquiterpene lactones such as parthenolide and costunolide have shown antitumor effects in an *in vivo* model at doses lower than 10 mg/kg [22,23].

Additionally, IA can be an appropriate compound for use in BC, as it is safer and less toxic due to its TI (74.5) value, which is higher compared to the TI (1.16) for DOXO. A low TI value, as in DOXO, implies that the dosed drug should be used with caution and the person receiving it should be closely monitored for any signs of toxicity [21]. The drug DOXO is

an anthracycline, which is interspersed in the DNA of the cell, inhibiting its synthesis and causing cell death. This mechanism is not specific and affects both cancerous and normal cells, leading to various side effects and adverse effects in patients [24], such as weight loss due to skeletal muscle atrophy [25], splenic contraction [26], and hepatotoxicity [27]. In this work, we observed that DOXO-treated mice exhibited changes in body weight and an increase in liver damage markers compared to UT and healthy mice.

In contrast, IA-treated mice maintained their body weight throughout the study, showed no organ damage, and exhibited normal liver damage markers. These results reinforce the evidence that IA has a significantly larger safety margin and less toxicity compared to DOXO. Therefore, IA, in addition to exhibiting antitumor activity at low doses, is also considered safe for use.

BC is a heterogeneous disease, in which each subtype has a different capacity for proliferation and metastasis; however, all subtypes are characterized by metabolic reprogramming, specifically a high glycolytic metabolism and low mitochondrial respiration, which promotes the resistance and survival of cancer cells [28,29]. Alterations in the activity and expression level of several metabolic enzymes, such as HKII, are closely related to cancer progression [30]. HKII is overexpressed in all subtypes of invasive breast carcinomas [31], so it has been the subject of several investigations on its role in BC. These studies have shown that HKII is involved in the acceleration of glycolysis [32] and in the inhibition of apoptosis [13]. Regarding apoptosis in cancer cells, HKII acts as an anti-apoptotic molecule, competing directly with pro-apoptotic molecules such as BAX and BAK, and consequently prevents the release of cytochrome C (Cyt C) and inhibits apoptosis [33].

A previous report showed that IA treatment in BC cell lines decreased HKII expression but did not affect the expression of other glycolytic enzymes such as ALDOA and LDH, suggesting that the reduction in HKII expression would mainly affect their participation in the inhibition of apoptosis due to the likely direct binding of IA with HKII observed in the molecular docking analysis [10]. The binding strength of IA with HKII was greater than that of 2-DG, a previously described inhibitor of HKII [10]. In this work, we evaluated whether IA treatment in a mouse model of BC exhibited the same effect. We also observed that, like in the *in vitro* model, in the *in vivo* mice model, IA treatment did not significantly modify the expression of glycolytic enzymes ALDOA and LDH, but the expression of HKII decreased considerably, which supports the hypothesis that HKII could be the target of IA, which acts like an HKII inhibitor [10]. Although the role of 2-DG as an HKII inhibitor is well established, having been used as an antitumor agent in clinical trials [34], it appears to bind to the HKII binding site similarly to IA [10]. In this work, it was not considered as a control molecule instead of DOXO because one of its main limitations is its low efficacy as monotherapy, since it requires concomitant administration with other chemotherapy regimens or at high doses to achieve significant therapeutic effects [35–37], which could complicate the analysis of the results.

We also evaluated the induction of apoptosis in the *in vivo* model caused by IA treatment. Firstly, in the histological sections of the tumors treated with IA, cells were observed to undergo a straightforward apoptotic process, as well as the presence of apoptotic bodies, which could explain the decrease in the number of cancer cells and, consequently, the reduction in tumor size. Subsequently, in the analysis of protein expression related to apoptosis, a clear decrease in the anti-apoptotic protein Bcl-2 and an elevation in the expression of caspase 3 were observed in the tumors treated with IA compared to the UT group. In addition, flow cytometry analyses were performed to determine the presence of apoptosis in the tumor cells obtained from the tumors treated with IA 2.5 mg/kg, and it was observed that the percentage of tumor cells in apoptosis increased when the tumor was treated (33.6%) compared to the cells of the UT tumors (3.2%). Overall, these three

analyses evidenced the greater presence of apoptosis in the tumors of mice treated with IA; hence, we could suggest that the induction of apoptosis in these cells is a consequence of the union of IA with HKII, which releases VDAC1 and thus induces apoptosis. However, more studies are necessary to verify this hypothesis.

Due to the observed increase in apoptosis in IA-treated tumor cells and the crucial role mitochondria play in this process, we analyzed mitochondrial activity in the breast tumors of the *in vivo* model and quantified the mitochondrial complex I activity over 15 min, with a clear decrease in activity observed in tumors treated with IA, particularly at the lowest dose (0.07 mg/kg), compared to the UT group. These results provide evidence of the potential interaction between IA and HKII, as this union would prevent the formation of a binding complex between HKII and VDAC1, thereby altering the mitochondrial membrane potential and potentially leading to mitochondrial dysfunction, as well as an increase in reactive oxygen species (ROS). Other sesquiterpene lactones, such as Parthenolide, Cynaropicrin, and Deoxyelephantopin, have been shown to induce oxidative stress and mitochondrial dysfunction in various types of cancer. It has been observed that these compounds increase the production of ROS within cancer cells. Moreover, they affect mitochondrial membrane potential. These effects compromise the viability of cancer cells by interfering with critical cellular functions and potentially inducing apoptosis [38–40]. Regarding IA, it has been reported that it generates ROS in non-Hodgkin's lymphoma cells [8], but this has not been verified in BC; therefore, it would be ideal to analyze it further.

In a previous report, a possible mechanism of action of IA in BC cell lines involves IA binding to HKII, which, in turn, induces apoptosis. Molecular docking of IA against HKII suggested strong binding to HKII [10]. When IA binds to HKII, it traps it and prevents it from associating with VDAC1 in the MOM, resulting in the induction of apoptosis. In this *in vivo* model, we observed results like those from the *in vitro* model [10]; therefore, the previously proposed mechanism is consistent in both models. We suggest that IA binding to HKII causes a reduction in its expression, leading to the induction of apoptosis, which in turn can result in a decrease in the size and weight of the BC tumors in mice (Figure 8). With this data, we propose that IA could be considered a candidate for more in-depth studies aimed at analyzing whether it can be used as a phytomedicine.

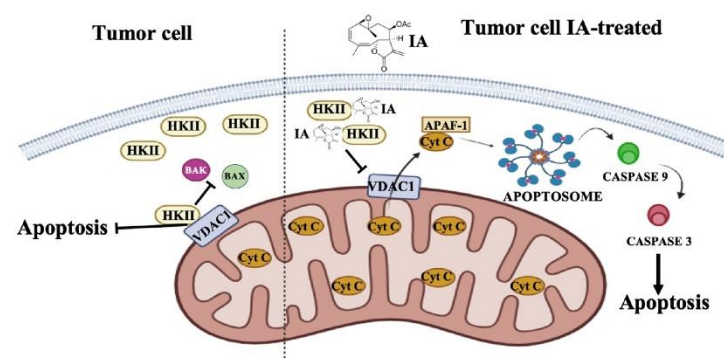


Figure 8. Proposed mechanism of action for IA in BC tumors. In cancer cells, HKII is overexpressed and binds to VDAC1, preventing apoptosis. When mice are administered IA, it binds to HKII, preventing the binding of HKII to VDAC1 and leaving the pore free, releasing pro-apoptotic molecules such as Cyt C, as well as increasing the presence of pro-apoptotic molecules such as caspase 3, with which apoptosis can be induced, and therefore decreasing tumor volume and weight. Abbreviations: IA (incomptine A), HKII (hexokinase II), VDAC1 (voltage-dependent anion channel 1), APAF-1 (apoptosis protease-activating factor-1), Cyt C (cytochrome C).

5. Conclusions

IA demonstrated significant antitumor activity in a murine model of BC by altering HKII expression, which induced apoptosis and mitochondrial dysfunction in tumor cells, thereby reducing the tumor size and weight. Therefore, IA may be a promising compound for further investigation into its potential use in breast cancer.

Author Contributions: A.G.A.-G. performed all experiments, analyzed the data, and prepared the original draft of the manuscript. F.C. participated as an advisor and reviewer of the murine model. A.F.-V. participated in all analyses of histopathological and mitochondrial activity. F.J.A.-A. participated in the investigation, supervision, and draft preparation. E.B. purified compound IA for all experiments. I.M.B.-B. and P.S.-S. participated in the performance of flow cytometry. I.R.-S. participated in the creation of the Western blots. R.M.O.-R. conceptualized the work, participated in all experimental assays, wrote the manuscript, and obtained funding. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Financiamiento para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social. Grant number: R-2023-3603-015.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Scientific and Ethics Local Committee of Health 3603, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (protocol code R-2023-3603-015 and approval date 2 March 2023).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data are available on request to romaorr@yahoo.com.mx.

Acknowledgments: This work is from the PhD Thesis of Angel Giovanni Arietta García (scholarship CVU-1012546 of the Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)).

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflicts of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

BC	Breast cancer
HER-2+	Human epidermal growth factor receptor 2
IA	Incomptine A
HKII	Hexokinase II
VDAC1	Voltage-dependent anion channel 1
MOM	Mitochondrial outer membrane
ATP	Adenosine triphosphate
Cyt c	Cytochrome c
DOXO	Doxorubicin
UT	Untreated
CC ₅₀	Cytotoxic concentration 50
ED ₅₀	Effective dose of 50
LD ₅₀	Lethal dose 50
TI	Therapeutic index
ALDOA	Aldolase A
LDH	Lactate dehydrogenase
Bcl-2	B-cell lymphoma 2

References

- Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.; Soerjomataram, I.; Jemal, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2024**, *74*, 229–263. [CrossRef]
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). Estadísticas a Propósito del día Internacional de la Lucha Contra el Cáncer de mama (19 de Octubre) Comunicado de Prensa número 595/23. 17 October 2023. Available online: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2023/EAP_CMAMA23.pdf (accessed on 18 March 2025).
- Johnson, K.; Conant, E.; Soo, M. Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Review for Breast Radiologists. *J. Breast Imaging* **2021**, *3*, 12–24. [CrossRef]
- Chun, K.; Park, J.; Fan, S. Predicting and Overcoming Chemotherapeutic Resistance in Breast Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *1026*, 59–104.
- Schmitz, K.; DiSipio, T.; Gordon, L.; Hayes, S. Adverse breast cancer treatment effects: The economic case for making rehabilitative programs standard of care. *Support. Care Cancer* **2015**, *23*, 1807–1817. [CrossRef]
- Chaachouay, N.; Zidane, L. Plant-Derived Natural Products: A Source for Drug Discovery and Development. *Drugs Drug Candidates* **2024**, *3*, 184–207. [CrossRef]
- Dhyani, P.; Sati, P.; Sharma, E.; Attri, D.; Bahukhandi, A.; Tynybekov, B.; Szopa, A.; Sharifi-Rad, J.; Calina, D.; Suleria, H.A.; et al. Sesquiterpenoid lactones as potential anticancer agents: An update on molecular mechanisms and recent studies. *Cancer Cell Int.* **2022**, *22*, 305. [CrossRef]
- Pina-Jimenez, E.; Calzada, F.; Bautista, E.; Ordonez-Razo, R.; Velazquez, C.; Barbosa, E.; Garcia-Hernandez, N. Incomptine A Induces Apoptosis, ROS Production and a Differential Protein Expression on Non-Hodgkin's Lymphoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10516. [CrossRef] [PubMed]
- Calzada, F.; Bautista, E.; Hidalgo-Figueroa, S.; Garcia-Hernandez, N.; Barbosa, E.; Velazquez, C.; Ordonez-Razo, R.; Arietta-Garcia, A. Antilymphoma Effect of Incomptine A: In Vivo, In Silico, and Toxicological Studies. *Molecules* **2021**, *26*, 6646. [CrossRef] [PubMed]
- Arietta-Garcia, A.; Calzada, F.; Ramirez-Sanchez, I.; Bautista, E.; Garcia-Hernandez, N.; Ordonez-Razo, R. Advances in the Properties of Incomptine A: Cytotoxic Activity and Downregulation of Hexokinase II in Breast Cancer Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 12406. [CrossRef] [PubMed]
- Shin, E.; Koo, J.S. Glucose Metabolism and Glucose Transporters in Breast Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 728759. [CrossRef]
- Sato-Tadano, A.; Suzuki, T.; Amari, M.; Takagi, K.; Miki, Y.; Tamaki, K.; Watanabe, M.; Ishida, T.; Sasano, H.; Ohuchi, N. Hexokinase II in breast carcinoma: A potent prognostic factor associated with hypoxia-inducible factor-1alpha and Ki-67. *Cancer Sci.* **2013**, *104*, 1380–1388. [CrossRef]
- Schoeniger, A.; Wolf, P.; Edlich, F. How Do Hexokinases Inhibit Receptor-Mediated Apoptosis? *Biology* **2022**, *11*, 412. [CrossRef]
- Haloi, N.; Wen, P.; Cheng, Q.; Yang, M.; Natarajan, G.; Camara, A.; Kwok, W.; Tajkhorshid, E. Structural basis of complex formation between mitochondrial anion channel VDAC1 and Hexokinase-II. *Commun. Biol.* **2021**, *4*, 667. [CrossRef] [PubMed]
- Magri, A.; Reina, S.; De Pinto, V. VDAC1 as Pharmacological Target in Cancer and Neurodegeneration: Focus on Its Role in Apoptosis. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 108. [CrossRef]
- Bautista, E.; Calzada, F.; Yepez-Mulia, L.; Chavez-Soto, M.; Ortega, A. Incomptines C and D, two heliangolides from *Decachaeta incompta*. and their antiprotozoal activity. *Planta Med.* **2012**, *78*, 1698–1701. [CrossRef]
- Norma Oficial Mexicana. NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones Técnicas Para la Producción, Cuidado y Uso de Los Animales de Laboratorio. 1999. Available online: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf (accessed on 18 March 2025).
- OECD. Guideline for Testing of Chemicals 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organización para la cooperación y el desarrollo económico, OECD/OCDE. 2001. Available online: https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en#page1 (accessed on 18 March 2025).
- Pulaski, B.; Ostrand-Rosenberg, S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr. Protoc. Immunol.* **2001**, *20*, 20–22. [CrossRef]
- Schlie-Guzman, M.; Garcia-Carranca, A.; Gonzalez-Esquinca, A. In vitro and in vivo antiproliferative activity of laherradurin and cherimolin-2 of *Annona diversifolia* Saff. *Phytother. Res.* **2009**, *23*, 1128–1133. [CrossRef]
- Muller, P.; Milton, M. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 751–761. [CrossRef] [PubMed]
- Kim, S.; Trang, K.; Kim, S.; Kim, I.; Lee, S.; Lee, S.; Kim, D.; Kim, S. Parthenolide suppresses tumor growth in a xenograft model of colorectal cancer cells by inducing mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Int. J. Oncol.* **2012**, *41*, 1547–1553. [CrossRef] [PubMed]
- Huang, H.; Park, S.; Zhang, H.; Park, S.; Kwon, W.; Kim, E.; Zhang, X.; Jang, S.; Yoon, D.; Choi, S.; et al. Targeting AKT with costunolide suppresses the growth of colorectal cancer cells and induces apoptosis in vitro and in vivo. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2021**, *40*, 114. [CrossRef]

24. Thorn, C.; Oshiro, C.; Marsh, S.; Hernandez-Boussard, T.; McLeod, H.; Klein, T.; Altman, R. Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet. Genom.* **2011**, *21*, 440–446. [[CrossRef](#)]
25. Hiensch, A.E.; Bolam, K.; Mijwel, S.; Jeneson, J.; Huitema, A.; Kranenburg, O.; van der Wall, E.; Rundqvist, H.; Wengstrom, Y.; May, A. Doxorubicin-induced skeletal muscle atrophy: Elucidating the underlying molecular pathways. *Acta Physiol.* **2020**, *229*, e13400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Jadapalli, J.; Wright, G.; Kain, V.; Sherwani, M.; Sonkar, R.; Yusuf, N.; Halade, G. Doxorubicin triggers splenic contraction and irreversible dysregulation of COX and LOX that alters the inflammation-resolution program in the myocardium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2018**, *315*, H1091–H1100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Prasanna, P.; Renu, K.; Valsala Gopalakrishnan, A. New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Life Sci.* **2020**, *250*, 117599. [[CrossRef](#)]
28. Wang, L.; Zhang, S.; Wang, X. The Metabolic Mechanisms of Breast Cancer Metastasis. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 602416. [[CrossRef](#)]
29. Navarro, C.; Ortega, A.; Santeliz, R.; Garrido, B.; Chacin, M.; Galban, N.; Vera, I.; De Sanctis, J.; Bermudez, V. Metabolic Reprogramming in Cancer Cells: Emerging Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Zheng, X.; Ma, H.; Wang, J.; Huang, M.; Fu, D.; Qin, L.; Yin, Q. Energy metabolism pathways in breast cancer progression: The reprogramming, crosstalk, and potential therapeutic targets. *Transl. Oncol.* **2022**, *26*, 101534. [[CrossRef](#)]
31. Li, R.; Mei, S.; Ding, Q.; Wang, Q.; Yu, L.; Zi, F. A pan-cancer analysis of the role of hexokinase II (HK2) in human tumors. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 18807. [[CrossRef](#)]
32. Zhang, D.; Yip, Y.; Li, L. In silico construction of HK2-VDAC1 complex and investigating the HK2 binding-induced molecular gating mechanism of VDAC1. *Mitochondrion* **2016**, *30*, 222–228. [[CrossRef](#)]
33. Bachmann, M.; Costa, R.; Peruzzo, R.; Prosdoci, E.; Checchetto, V.; Leanza, L. Targeting Mitochondrial Ion Channels to Fight Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2060. [[CrossRef](#)]
34. Stein, M.; Lin, H.; Jeyamohan, C.; Dvorzhinski, D.; Gounder, M.; Bray, K.; Eddy, S.; Goodin, S.; White, E.; DiPaola, R. Targeting tumor metabolism with 2-deoxyglucose in patients with castrate-resistant prostate cancer and advanced malignancies. *Prostate* **2010**, *70*, 1388–1394. [[CrossRef](#)]
35. Muley, P.; Olinger, A.; Tummala, H. 2-Deoxyglucose induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cells independent of its glycolysis inhibition. *Nutr. Cancer* **2015**, *67*, 514–522. [[CrossRef](#)]
36. Raez, L.; Papadopoulos, K.; Ricart, A.; Chiorean, E.; DiPaola, R.; Stein, M.; Rocha Lima, C.; Schlesselman, J.; Tolba, K.; Langmuir, V.; et al. A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-d-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2013**, *71*, 523–530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Schmidt, M.; O'Donnell, A. 'Sugarcoating' 2-deoxyglucose: Mechanisms that suppress its toxic effects. *Curr. Genet.* **2021**, *67*, 107–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Zeng, S.; Yin, Y.; Zhang, Y.; Zhao, Q.; Yang, Y.; Zhang, Z.; Zou, X. Parthenolide as a potential therapeutic agent for gastric cancer: Exploring oxidative stress and DNA damage. *Pharmacol. Res. Mod. Chin. Med.* **2024**, *10*, 100365. [[CrossRef](#)]
39. Rotondo, R.; Oliva, M.; Arcella, A. The Sesquiterpene Lactone Cynaropicrin Manifests Strong Cytotoxicity in Glioblastoma Cells U-87 MG by Induction of Oxidative Stress. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1583. [[CrossRef](#)]
40. Chen, J.; Yan, Q.; Bai, M.; Liu, Q.; Song, S.; Yao, G. Deoxyelephantopin, a germacrane-type sesquiterpene lactone from *Elephantopus scaber*, induces mitochondrial apoptosis of hepatocarcinoma cells by targeting Hsp90alpha in vitro and in vivo. *Phytother. Res.* **2023**, *37*, 702–716. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00173

Matrícula: 2192802423

DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE LA INCOMPTINA A EN UN MODELO MURINO DE CÁNCER DE MAMA.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 19 del mes de diciembre del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
- DR. GERARDO BLANCAS FLORES
- DR. FERNANDO CALZADA BERMEJO
- DR. NORMAND GARCIA HERNANDEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DE: ANGEL GIOVANNI ARIETTA GARCIA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ANGEL GIOVANNI ARIETTA GARCIA
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH ARENAS RIOS

PRESIDENTE

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

DR. GERARDO BLANCAS FLORES

VOCAL

DR. FERNANDO CALZADA BERMEJO

SECRETARIO

DR. NORMAND GARCIA HERNANDEZ