



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la actividad antiproliferativa *in vitro* de
flavonoides y triterpenos aislados de plantas medicinales
mexicanas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

SILVIA DANIELA LÓPEZ ZEPEDA



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Mariano Martínez Vázquez

MÉXICO, D.F.
2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del Alumno	1. Datos del Alumno
Apellido Paterno	López
Apellido Materno	Zepeda
Nombre(s)	Silvia Daniela
Teléfono	56 73 48 02
Universidad Nacional	Universidad Nacional
Autónoma de México	Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de Cuenta	307506210
2. Datos del Tutor	2. Datos del Tutor
Grado	Dr.
Nombre(s)	Mariano
Apellido Paterno	Martínez
Apellido Materno	Vázquez
3. Datos del Sinodal 1	
Grado	Dra.
Nombre(s)	Alicia Enriqueta
Apellido Paterno	Brechú
Apellido Materno	Franco
4. Datos del Sinodal 2	
Grado	Dr.
Nombre(s)	Sol
Apellido Paterno	Cristians
Apellido Materno	Niizawa
5. Datos del Sinodal 3	
Grado	M. en C.
Nombre(s)	Armando
Apellido Paterno	Gómez
Apellido Materno	Campos
6. Datos del Tutor Sinodal 4	
Grado	Q.A.
Nombre(s)	Verónica
Apellido Paterno	Muñoz
Apellido Materno	Ocotero
7. Datos del trabajo escrito	
Título	Evaluación de la actividad antiproliferativa in vitro de flavonoides y triterpenos aislados de plantas medicinales mexicanas
Número de páginas	80 p.
Año	2014

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Ciencias

Al Instituto de Química

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez

A los miembros del Jurado

A los técnicos-académicos del Instituto de Química, en particular a la M. en C.
Teresa Ramírez Apan y al M. en C. Antonio Nieto Camacho

A la M. en C. Martha Celina González Güereca

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo
otorgado para la elaboración de esta tesis (Proyecto CB-2010/152650)

A mis padres

A mis maestros

Índice

1.	Introducción	1
2.	Antecedentes	3
2.1.	La medicina tradicional	3
2.1.1.	La medicina tradicional mexicana	3
2.2.	El cáncer	5
2.2.1.	El cáncer en México y el mundo	6
2.2.2.	Tratamientos contra el cáncer	7
2.2.2.1.	Cisplatino	8
2.3.	Inflamación	9
2.4.	Inflamación y cáncer	9
2.5.	Metabolitos secundarios	10
2.5.1.	Flavonoides	11
2.5.1.1.	Flavonoides como agentes anticarcinogénicos	13
2.5.2.	Terpenos	15
2.5.2.1.	Triterpenos	16
2.5.2.1.1.	Triterpenos como agentes anticarcinogénicos	17
2.6.	El orégano mexicano: <i>Lippia graveolens</i> Kunth	18
2.6.1.	Jerarquía taxonómica	18
2.6.2.	Género <i>Lippia</i>	18
2.6.3.	Generalidades de <i>Lippia graveolens</i> Kunth	19
2.6.4.	Etnobotánica y usos de <i>Lippia graveolens</i> Kunth	21
2.6.5.	Composición fitoquímica de <i>Lippia graveolens</i> Kunth	22
2.6.6.	Farmacología de <i>Lippia graveolens</i> Kunth	24
2.7.	El cuachalalate: <i>Amphipterygium adstringens</i> (Schltdl.) Standl.	25
2.7.1.	Jerarquía taxonómica	26
2.7.2.	Etnobotánica y usos de <i>Amphipterygium adstringens</i> (Schltdl.) Standl.	26
2.7.3.	Composición fitoquímica de <i>Amphipterygium adstringens</i> (Schltdl.) Standl.	27

2.7.4.	Farmacología de <i>Amphipterygium adstringens</i> (Schltdl.) Standl.	28
2.7.5.	Ácido 3 α -hidroximasticadienónico	28
3.	Justificación	30
4.	Hipótesis	31
5.	Objetivos	32
5.1.	Objetivo General	32
5.2.	Objetivos Particulares	32
6.	Diseño Experimental	33
6.1.	Análisis Fitoquímico	33
6.2.	Evaluación de la actividad biológica	35
6.2.1.	Evaluación de la actividad anti-inflamatoria mediante el ensayo de edema auricular en ratón inducido por TPA	35
6.2.2.	Evaluación de la inhibición de la proliferación celular en líneas de cáncer humano mediante el método de sulforrodamina B (SRB)	37
6.2.2.1.	Evaluación antiproliferativa en líneas de cáncer humano de combinaciones a diferentes concentraciones de un fármaco anticarcinogénico y un extracto	39
6.2.2.2.	Evaluación antiproliferativa en líneas de cáncer humano de combinaciones a diferentes concentraciones de un fármaco anticarcinogénico y un triterpeno	40
6.2.2.3.	Análisis de las combinaciones	42
7.	Resultados	45
7.1.	Rendimiento del extracto	45
7.2.	Aislamiento de metabolitos secundarios	45
7.3.	Resultados de las pruebas biológicas del extracto hidroalcohólico	46
7.3.1.	Actividad anti-inflamatoria	46
7.3.2.	Actividad antiproliferativa	47
7.4.	Resultados de las pruebas biológicas de la sakuranetina (2)	48

7.4.1. Actividad anti-inflamatoria	48
7.4.2. Actividad antiproliferativa	48
7.5. Evaluación antiproliferativa en la línea PC-3 de combinaciones a diferentes concentraciones de cisplatino y extracto de <i>L. graveolens</i>	50
Evaluación antiproliferativa en la línea PC-3 de combinaciones a diferentes concentraciones de cisplatino y ácido 3 α -hidroximasticadienónico	52
8. Discusión	54
9. Conclusiones	64
10. Referencias	65
11. Anexos	73
11.1 Propiedades físicas y espectroscópicas de los compuestos puros	73
11.2 Espectros	74
11.3 Modelo de edema auricular en ratón inducido por TPA	79
11.4 Curvas dosis-respuesta	79

Lista de abreviaturas

γ	Índice de Interacción
3 α AMD	Ácido 3 α -hidroximasticadienónico
5-LOX	5-lipooxigenasa
AcOEt	Acetato de Etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Akt	Proteína cinasa B
AMD	Ácido masticadienónico
AP	Proteína activadora 1
Bad	Promotor de muerte asociado a Bcl-2
Bcl-2	Linfoma 2 de células B
Bcl-xL	Linfoma de células B grandes
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblasto básico
C1	Separación cromatográfica 1
C2	Separación cromatográfica 2
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CDDP	Cisplatino
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media (para referirse a compuestos y sus combinaciones)
COSY	Correlation Spectroscopy
COX-2	Ciclooxigenasa-2
DE ₅₀	Dosis efectiva media (para referirse a extractos y sus combinaciones)
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidermal
EHA	Extracto hidroalcohólico
EHAA	Extracto hidroalcohólico tratado con acetato de etilo
EM	Espectrometría de Masas
EOL	Encyclopedia of Life
EtOH	Etanol
H ₂ O	Agua
HCT-15	Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano
HIF-1 α	Subunidad alfa del factor inducible por hipoxia
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy

HSP	Proteínas de choque térmico
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
IL-6	Interleucina 6
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
iNOS	Óxido nítrico sintasa
IR	Espectrometría de infrarrojo
ITIS	Integrated Taxonomic Information System
JAK	Cinasa Janus
K562	Línea celular de leucemia mieloide crónica humana
L-1210	Línea celular de leucemia de ratón
LC-DAD-ESI/MS	Cromatografía líquida acoplada a un detector de arreglo de diodos y espectrómetro de masas
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MCF-7	Línea celular de adenocarcinoma de mama humano
MeOH	Metanol
MMP	Metaloproteasa de matriz
NCI	Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés)
p21	Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina
PARP	Poli(ADP-ribosa) polimerasa
PC-3	Línea celular de adenocarcinoma de próstata humano
PI3-K	Fosfoinositol 3-cinasa
p.f.	Punto de fusión
PK	Proteína cinasa
PKC	Proteína cinasa C
PTK	Tirosina cinasa
Rb	Proteína del retinoblastoma
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SIRE	Sistema de Información para la Reforestación
SKLU-1	Línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano
SRB	Sulforrodamina B
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TCA	Ácido tricloroacético
TPA	13-acetato de 12-0-tetradecanoilforbol
U251	Línea celular de glioblastoma humano

VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
------	---

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química del cis-diaminodicloroplatino(II) o Cisplatino	8
Figura 2. Estructura química de los principales flavonoides	12
Figura 3. Isopreno, la subunidad de los terpenos	15
Figura 4. Distribución geográfica aproximada de <i>L. graveolens</i>	21
Figura 5. Estructuras de los componentes principales de los aceites esenciales de <i>L. graveolens</i>	23
Figura 6. Estructuras de algunos flavonoides de <i>L. graveolens</i>	24
Figura 7. Estructuras de algunos triterpenos de <i>A. adstringens</i>	27
Figura 8. Estructura química del ácido 3- α -hidroxi-masticadienónico (3 α AMD)	29
Figura 9. Preparación y fraccionamiento del extracto hidroalcohólico	34
Figura 10. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria	37
Figura 11. Evaluación de la actividad antiproliferativa	39
Figura 12. Isoblograma de interacción cero de una combinación de los fármacos A y B	42
Figura 13. Isoblograma de interacción sinérgica de una combinación de los fármacos A y B	43
Figura 14. Isoblograma de interacción antagónica de una combinación de los fármacos A y B	43
Figura 15. Estructura química de la ladaneina (1)	45
Figura 16. Estructura química de la sakuranetina (2)	46
Figura 17. Vía de señalización de AKT	63

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de la proliferación de células de la línea PC-3 de tres diferentes combinaciones de cisplatino (CDDP) y extracto hidroalcohólico de <i>L. graveolens</i> (EHA) a varias concentraciones.	50
Gráfica 2. Isoblograma que ilustra las concentraciones de A (CDDP) y B (EHA) que, actuando independientemente, producen el 50% de la inhibición de la proliferación celular en la línea PC-3.	51
Gráfica 3. Porcentaje de inhibición de la proliferación de células de la línea PC-3 de tres diferentes combinaciones de cisplatino (CDDP) y ácido 3 α -hidroximasticadienónico (3 α AMD) a varias concentraciones.	52
Gráfica 4. Isoblograma que ilustra las concentraciones de A (CDDP) y B	53

(3 α AMD) que, actuando independientemente, producen el 50% de la inhibición de la proliferación celular en la línea PC-3.

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Jerarquía taxonómica de <i>Lippia graveolens</i> Kunth	18
Cuadro 2. Jerarquía taxonómica de <i>Amphipterygium adstringens</i> (Schltdl.) Standl.	26
Cuadro 3. CI ₅₀ de 3 α AMD	29
Cuadro 4. Combinaciones y concentraciones de CDDP y EHA	40
Cuadro 5. Combinaciones y concentraciones de CDDP y 3 α AMD	41
Cuadro 6. Rendimiento del extracto hidroalcohólico obtenido a partir de las partes aéreas vegetativas de <i>L. graveolens</i> .	45
Cuadro 7. Actividad anti-inflamatoria de EHA en el ensayo de edema auricular en ratón inducido por TPA.	46
Cuadro 8. Actividad antiproliferativa de EHA en líneas de cáncer humano mediante el método de SRB	47
Cuadro 9. Actividad anti-inflamatoria de la sakuranetina (2) en el ensayo de edema auricular en ratón inducido por TPA.	48
Cuadro 10. Actividad antiproliferativa de la sakuranetina (2) en líneas de cáncer humano mediante el método de SRB	49
Cuadro 11. Valores de CI ₅₀ de 2 en las líneas K562 y PC-3.	49
Cuadro 12. Índice de interacción (γ) de las tres diferentes combinaciones de CDDP y EHA	51
Cuadro 13. Índice de interacción (γ) de las tres diferentes combinaciones de CDDP y 3 α AMD	53
Cuadro 14. Inhibición de la proliferación de la línea PC-3 al utilizar diferentes combinaciones y dosis de cisplatino (CDDP) y extracto hidroalcohólico de <i>L. graveolens</i> (EHA)	58
Cuadro 15. Inhibición de la proliferación de la línea PC-3 al utilizar diferentes combinaciones y concentraciones de CDDP y 3 α AMD	61

1. Introducción

El cáncer es actualmente una de las enfermedades que más vidas cobra alrededor del mundo. Si bien existe una variedad de tratamientos que tienen como fin eliminar los tumores, la mayoría de estos tratamientos son sumamente tóxicos para el organismo, atacando no sólo a las células neoplásicas, sino también a las células sanas. Es por esto que surge la necesidad de buscar alternativas a dichos tratamientos, y aquí es donde los productos naturales surgen como opción prometedora. Alrededor del mundo se han identificado más de 3000 plantas con propiedades anticarcinogénicas, y la incidencia global del uso de productos derivados de plantas medicinales para el tratamiento del cáncer es del 10-40% en la población, llegando hasta 50% en países asiáticos (Alonso-Castro et al., 2011).

La medicina tradicional se vale del uso de plantas medicinales para el tratamiento de múltiples enfermedades y padecimientos, y el fundamento yace en una tradición empírica milenaria que ha sido transmitida de generación en generación y ha llegado hasta el presente. Hoy en día la ciencia ha descubierto que los efectos se deben a que las plantas producen, vía su metabolismo secundario, una serie de compuestos orgánicos que pueden actuar en la planta como sistema de defensa contra patógenos o herbívoros, y que en el hombre proporcionan beneficios para la salud. En el mundo, se calcula que el 80% de la población utiliza plantas para tratar diversos padecimientos, y el 25% de los fármacos prescritos globalmente contienen agentes derivados de plantas medicinales (Alonso-Castro et al., 2012).

Dentro de los metabolitos secundarios producidos por las plantas cabe destacar los flavonoides y los triterpenos. Numerosos estudios previos han mostrado que algunos flavonoides y triterpenos poseen potencial anticarcinogénico, y es por esto que surge el interés en el aislamiento, elucidación y evaluación de la actividad antiproliferativa de estos fitoquímicos que en un futuro puedan servir para el desarrollo de fármacos en la lucha contra el cáncer.

México es un país botánicamente megadiverso, con un uso generalizado de la medicina tradicional basada en la herbolaria; sin embargo, sólo una proporción de las 5000 especies mexicanas registradas con uso medicinal han sido objeto de evaluación científica para corroborar sus propiedades. Se tienen identificadas 300 especies vegetales pertenecientes a 90 familias botánicas con potencial efecto anticarcinogénico, de las cuales sólo 181 se han sometido a estudios *in vitro* e *in vivo* (Alonso-Castro et al., 2011).

Dos especies vegetales mexicanas que cabe resaltar son *Lippia graveolens* Kunth y *Amphyterygium adstringens* (Schltdl.) Standl. Existen estudios que demuestran que ambas especies sintetizan diversos metabolitos secundarios, algunos de ellos con propiedades anticarcinogénicas. Por lo tanto, buscamos profundizar el conocimiento sobre los metabolitos secundarios de dichas especies, y evaluarlos como potenciales agentes anticarcinogénicos.

En este trabajo se realizó el aislamiento de dos flavonoides a partir de *L. graveolens*, y uno de ellos -la sakuranetina- se probó para determinar su actividad anti-inflamatoria y antiproliferativa. Además se probó la actividad antiproliferativa del extracto hidoralcohólico a partir del cual se aislaron dichos flavonoides en combinación con cisplatino, un fármaco ampliamente usado en la quimioterapia. Por otro lado, se probó la actividad antiproliferativa de un triterpeno obtenido de *A. adstringens* -el ácido 3 α -hidroximasticadienónico- combinado con cisplatino.

“Que el alimento sea tu medicina, y la medicina tu alimento”

Hipócrates, 400-377 a.C.

2. Antecedentes

2.1. La medicina tradicional

El uso de las plantas como fuente de remedios medicinales se remonta a los inicios del ser humano como especie, e incluso antes. Existe evidencia que los primeros Neanderthales, los cuales desaparecieron en algún punto hace 24 y 30 mil años, contaban con tal grado de conocimiento de su medio natural, que tenían la habilidad de usar ciertas plantas con fines medicinales (Hardy, et al. 2012). El *Homo sapiens sapiens* poseía la capacidad de discernir entre las plantas que servían para comer, curar o matar. Este conocimiento fue reforzado con el surgimiento de la agricultura; se formaron las primeras aldeas y se dio un espacio propicio para el intercambio de conocimientos y experiencias que habían adquirido acerca del consumo de plantas (Lozoya, 1994). A partir de entonces, los sistemas médicos tradicionales se fueron desarrollando en varias culturas de todo el mundo, y actualmente a pesar de la dominancia del modelo científico occidental que rige a la medicina, en algunos países la medicina tradicional es a la fecha el principal sistema médico (Firenzuoli y Gori, 2007). En algunos países de África, la medicina tradicional es utilizada por un 80% de la población para atender sus necesidades sanitarias, mientras que en China representa un 40% de la atención médica. En Latinoamérica, la medicina tradicional se sigue utilizando por gran parte de la población e incluso en países desarrollados la medicina complementaria y alternativa está cobrando auge, con un creciente porcentaje de la población que la utiliza (OMS, 2002).

2.1.1. La medicina tradicional mexicana

“No se me cansan los ojos de ver tan hermosas verduras y tan diversas a las nuestras. Creo que hay en estas islas muchas hierbas y muchos árboles que valen mucho en España para tinturas y para

medicinas de especiería, mas yo no las conozco, lo que me da gran pena... porque estoy bien cierto que todas son cosas de valía y de ellas traigo la muestra y así mismo de las hierbas... porque me dicen que valen mucho.” Cristóbal Colón, 1492, Diario de a bordo (tomado de Lozoya, 1994).

Los españoles quedaron sorprendidos con la riqueza de plantas medicinales que encontraron al llegar al actual territorio mexicano -resultado de su privilegiada posición biogeográfica que da lugar a una gran variedad de nichos ecológicos-, así como con el vasto conocimiento que poseían las culturas mesoamericanas sobre las características, efectos y usos de dichas plantas, y no tardaron en plasmar dicho conocimiento en una variedad de códices y textos. El primero de estos textos se trata de el *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, también conocido como *Códice De la Cruz-Badiano*, el cual fue escrito en 1552 como regalo para el rey de España, y donde figuraban pinturas de las plantas medicinales mas representativas y sus propiedades curativas. Otros trabajos importantes corresponden a la *Historia general de las cosas de la Nueva España*, donde aparecen capítulos sobre enfermedades y su tratamiento, así como plantas medicinales y su uso, y a la *Historia natural de Nueva España*, escrito por el médico Francisco Hernández por encargo de Felipe II, donde se recopila la información de cerca de 2000 plantas con efectos medicinales usadas por médicos y curanderos indígenas (Viesca, 1999).

Todo este conocimiento milenario, fruto del ensayo y error de las culturas tradicionales de México y el mundo, ha servido como base de la medicina alopática moderna, y hoy en día existe un interés cada vez mayor en la búsqueda y el aislamiento de compuestos con principios biológicamente activos a partir de recursos naturales, siguiendo las pistas que el conocimiento tradicional nos ha brindado (Dhami, 2013).

2.2. El cáncer

El Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos de América (NCI, 2014) define al cáncer como el grupo de enfermedades en el cual células anormales se dividen sin control y son capaces de invadir otros tejidos. Las células cancerosas se pueden diseminar a otras partes del organismo mediante el sistema circulatorio y el sistema linfático.

De acuerdo al NCI, existen más de 100 tipos diferentes de cáncer, los cuales se pueden agrupar en las siguientes categorías:

- Carcinoma: cáncer que comienza en la piel o en los tejidos que recubren los órganos internos. Dentro de esta categoría, existen las siguientes subcategorías: adenocarcinoma, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células transitorias.
- Sarcoma: cáncer que comienza en el hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otros tejidos conectivos o de soporte.
- Leucemia: cáncer que comienza en el tejido formador de sangre como la médula ósea y que provoca la producción de un gran número de células sanguíneas anormales que entran a la sangre.
- Linfoma y Mieloma: cáncer que comienza en las células del sistema inmune.
- Cáncer del Sistema Nervioso Central: cáncer que comienza en los tejidos del cerebro y la médula espinal.

La carcinogénesis en un organismo multicelular puede resultar por factores químicos, físicos, biológicos o genéticos (Pitot, 1993). Las etapas de la carcinogénesis son iniciación, promoción y progresión. La iniciación es el proceso por el cual una célula normal sufre una mutación genética que refuerza su tendencia a proliferar y le proporciona una ventaja sobre las células vecinas; dicha mutación debe ser transmitida a sus células hijas. La célula transformada o iniciada puede permanecer inofensiva a menos que un agente promotor estimule su proliferación, y es aquí cuando comienza la promoción; a diferencia de la iniciación, esta etapa es reversible. Durante esta etapa se lleva a cabo el crecimiento del tumor. Dicho desarrollo tumoral es promovido por la

supervivencia y “expansión clonal” de las células iniciadas. Los agentes promotores no interactúan directamente con el material genético, pero sí afectan la expresión de los genes. En la progresión ya se pueden apreciar alteraciones morfológicas discernibles en el genoma de las células, donde mutaciones y aberraciones cromosómicas se ven involucradas, así como una pérdida de forma y estructura de las células, mientras el tumor sigue en crecimiento. Durante la progresión, las células que ya poseen ventajas de crecimiento significativas sobre las células normales, se ven aún más dañadas. Estas alteraciones cariotípicas están asociadas con una tasa de crecimiento acelerada, alta capacidad de invasión y metástasis. En la invasión se lleva a cabo una degradación por proteólisis de la matriz extracelular. Finalmente, en la metástasis, las células adquieren características fibroblastoides, lo cual aumenta su motilidad y les permite invadir revestimiento epitelial y membrana basal hasta llegar a los vasos sanguíneos o linfáticos. Las células llevan a cabo una intravasación y viajan a través de la circulación, hasta que hay un arresto donde las células sufren una extravasación y posteriormente comienzan a proliferar en un órgano nuevo. Desde una perspectiva clínica, la metástasis es el aspecto crítico de la carcinogénesis, pues más del 90% de la mortalidad del cáncer la provoca la metástasis (Pitot et al., 1981; Uma-Devi, 2005; Grivennikov et al., 2010).

2.2.1. El cáncer en México y el mundo

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. Según datos de GLOBOCAN, durante el año 2012 hubo 14.1 millones de casos nuevos de cáncer en el mundo, 8.2 millones de muertes por cáncer y 32.6 millones de personas viviendo con cáncer (dentro de los primeros 5 años de su diagnóstico). El 57% de los casos nuevos de cáncer, 65% de las muertes por cáncer y 48% de los casos de cáncer prevalentes por 5 años se dieron en las regiones menos desarrolladas del globo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) los tipos de cáncer que causan más muertes por año son de pulmón, de hígado, estómago, colorrectal y mama, y los tipos más frecuentes varían entre hombres y mujeres. Aproximadamente el 30% de las muertes por cáncer se deben a factores de riesgo y estilos de vida como son un alto índice

de masa corporal, bajo consumo de frutas y verduras, falta de actividad física y el uso y abuso de alcohol y tabaco. Se espera que el número de casos aumente de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas décadas (GLOBOCAN, 2014; WHO, 2014)

En México, la tercera causa de muerte para ambos sexos son los tumores malignos, después de las enfermedades del corazón y la diabetes mellitus. En el año 2012, de un total de 602,354 muertes, 73,240 defunciones se debieron a tumores malignos (12.16%) En las mujeres, los principales tumores malignos son los de mama (5,613 defunciones), cuello del útero (3,840 defunciones) y de hígado y vías biliares intrahepáticas (2,890 defunciones), mientras que en los hombres fueron tumores de próstata (5,911 defunciones) y de tráquea, bronquios y pulmón (4,152 defunciones) (INEGI, 2012).

2.2.2 Tratamientos contra el cáncer

Una vez que el cáncer es detectado, puede ser posible eliminarlo. Si el tumor se encuentra confinado en regiones específicas puede ser removido quirúrgicamente. La detección temprana de estos tumores es importante, pues el cáncer se puede remover antes de que haya metastatizado. Sin embargo, en algunos casos la cirugía no es una opción; este es el caso de la leucemia, en donde el crecimiento incontrolado de leucocitos en la médula ósea no puede ser tratado por medio de una cirugía, o cuando el tumor se encuentra comprometiendo tejido sano que no puede ser removido. La quimioterapia puede ser una opción en estos casos; es el tratamiento con uno o más fármacos antineoplásicos. Algunos agentes quimioterapéuticos dañan el ADN o previenen su replicación, evitando que se divida, y llevándola a su muerte. Pueden afectar partes de la célula que actúan como elementos críticos para la división celular. Otra alternativa es la radioterapia, la cual utiliza rayos X o gamma para dañar el ADN de la célula tumoral. La quimioterapia y la radioterapia pueden ser usadas en combinación con el fin de aumentar su efecto. Sin embargo, estas dos terapias pueden tener efectos nocivos en las células normales. La quimioterapia puede exponer a todas las células a sustancias tóxicas, debilitando además las defensas naturales del organismo.

La radiación también daña células sanas, y tiene muchos efectos secundarios (Enger et al., 2011).

2.2.2.1. Cisplatino

Existen varios complejos de platino que son utilizados como terapia coadyuvante contra el cáncer con el fin de inducir la muerte celular. Entre ellos se encuentra el cisplatino (CDDP) (Figura 1), el cual es ampliamente utilizado para el tratamiento de varios tipos de cáncer. Dependiendo el tipo de célula cancerosa y la concentración utilizada de CDDP, éste puede actuar como agente citotóxico e inducir apoptosis, mediante la activación de diversas vías de transducción de señales. Se ha discutido que dicho efecto se relaciona con la inhibición de síntesis y reparación del ADN, lo cual arresta el ciclo celular en las fases G1, S o G2-M, induciendo así la apoptosis. Además del daño al ADN, se ha sugerido que el CDDP induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales desencadenan muerte celular. A pesar de que lo anterior ha sido probado *in vitro*, aún no existe evidencia de la formación de ROS inducida por CDDP en tumores primarios (Florea y Büsselberg, 2011).

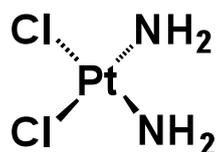


Figura 1. Estructura química del cis-diaminodichloroplatino(II) o Cisplatino

Desafortunadamente, la citotoxicidad y apoptosis no son inducidas exclusivamente en células cancerosas, por lo cual, el cisplatino puede provocar varios efectos secundarios como toxicidad renal y neural, inmunosupresión y mielosupresión. Otro inconveniente del uso del cisplatino es que las células cancerosas pueden volverse resistentes a este fármaco, lo cual puede llevar a la aparición de tumores secundarios. Para vencer estas dificultades es muy común que se recurra a una terapia combinatoria, en la cual se utilicen 2 ó 3 fármacos anticancerígenos con diferentes mecanismos de acción (Florea y Büsselberg, 2011).

2.3. Inflamación

La inflamación se trata de una serie de interacciones entre factores solubles y células en cualquier tejido, que se da en respuesta a una lesión traumática, infecciosa, post-isquémica, tóxica o autoinmune. Este proceso generalmente lleva a una recuperación de la infección, así como a una curación. Sin embargo, si la destrucción y reparación asistida se encuentran desfasadas, la inflamación puede llevar a un daño persistente del tejido mediado por leucocitos, linfocitos o colágeno (Nathan, 2002).

2.4. Inflamación y cáncer

La inflamación crónica que se presenta en respuesta a una infección o irritación puede desencadenar un microambiente que fomente lesiones genómicas y la iniciación de un tumor. Uno de los mecanismos por los cuales el hospedero lucha contra una infección microbiana es por medio de la producción de radicales libres, los cuales generan daño oxidativo y nitración de las bases del ADN, aumentando el riesgo de mutaciones en el ADN. Cuando existe una infección, hay una gran pérdida de células, por lo que debe existir una repoblación por medio de la expansión de otras células. Muchas vías inflamatorias se encargan de reparar el tejido, promoviendo la proliferación y supervivencia de las células iniciadas, llevando así a la promoción del tumor (Rakoff-Nahoum, 2006).

Aunque aproximadamente un 25% de todos los tipos de cáncer se deben a un proceso de inflamación crónica o infección, el rol de la inflamación en cambios genéticos y epigenéticos asociados con el desarrollo del cáncer es aún mayor. Algunos mecanismos por los cuales la inflamación contribuye a la carcinogénesis son: inducción de inestabilidad cromosómica, alteración de eventos epigenéticos que llevan a una alteración en la expresión génica, aumento de la proliferación, evasión de la apoptosis, estimulación de la neovascularización intratumoral, invasión vía la membrana vasal asociada al tumor, estimulación del movimiento metastático. Existe una sobreproducción o

una activación elevada de diversos mediadores de la inflamación como citocinas, quimiocinas, ciclooxigenasa-2 (COX-2), prostaglandinas, óxido nítrico (NO) y óxido nítrico sintasa (iNOS), los cuales estimulan la proliferación, aceleran la invasión y metástasis. Durante la inflamación crónica, diversas vías de señalización intracelular pierden su regulación, llevando así a una expresión anormal de genes proinflamatorios involucrados en una transformación maligna. Varias proteínas cinasas como la proteína cinasa B (Akt), la cinasa janus (JAK), la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) son activadas, transmitiendo señales de crecimiento alteradas. La inflamación también induce la activación de varios factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF- κ B), el transductor de señal y activador de la transcripción (STAT), la proteína activadora 1 (AP-1) y la subunidad alfa del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α), implicadas en el crecimiento tumoral, angiogénesis y metástasis (Kundu y Surh, 2012)

2.5. Metabolitos secundarios

Las plantas sintetizan dos tipos de metabolitos: los primarios y los secundarios. Los metabolitos primarios son sustancias que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza: fitoesteroles, ácidos lipídicos, nucleótidos, aminoácidos y ácidos orgánicos son algunos ejemplos; la acumulación de dichos metabolitos satisface las necesidades nutricionales y estructurales de la planta, y son indispensables para vivir (Croteau et al., 2000). Los metabolitos secundarios son mediadores de la respuesta de las plantas a factores ambientales bióticos y abióticos, como adaptación o defensa; contribuyen al sabor de los frutos y color de las flores, atraen polinizadores y dispersores de semillas, actúan como compuestos de defensa o toxinas contra patógenos y herbívoros, protegen a las plantas contra el estrés abiótico como la luz UV (Yang et al., 2012). Es por esto que diversas señales de estrés abiótico como la temperatura, salinidad, cantidad de agua, radiación y estrés químico y mecánico poseen una influencia en la producción de metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios se encuentran distribuidos diferencialmente dentro de algunos de los grupos taxonómicos del reino vegetal. Tradicionalmente se ha denominado a los metabolitos secundarios como sustancias ecológicamente

eficaces, frente a los metabolitos primarios, los cuales son fisiológicamente eficaces (Ramos et al., 1998).

Los metabolitos secundarios de las plantas son una fuente importante de fármacos, aditivos alimentarios y productos químicos con importancia industrial. La producción de estos compuestos por lo general es baja (cerca del 1% del peso seco de la planta) y depende en gran medida del estadio fisiológico y de desarrollo de la planta (Ramakrishna y Ravishankar, 2011).

Dentro de los metabolitos secundarios podemos encontrar principalmente tres grupos: terpenoides, compuestos fenólicos y compuestos que contienen nitrógeno. Los terpenoides contienen una o más unidades C₅, las cuales son sintetizadas por la vía del mevalonato citosólico o por la vía del metileritioil fosfato. Los compuestos fenólicos son muy diversos e incluyen a los fenilpropanoides, cumarinas, estilbenos y flavonoides. Los compuestos que contienen nitrógeno son también muy diversos y comprenden a los alcaloides, aminoácidos no proteicos y aminas. Para el año 2012, se conocían más de 36,000 terpenoides, 12,000 alcaloides y 10,000 flavonoides, aunque estos representan sólo una fracción de los que existen en la naturaleza (Yang et al., 2012).

2.5.1. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que poseen 15 átomos de carbono; están formados por dos anillos de benceno (A y B) unidos por una cadena alifática de tres carbonos (C). A este arreglo se le conoce como C₆-C₃-C₆. Así como otros polifenoles, los flavonoides derivan en su mayoría de la ruta biosintética del ácido shikímico. Se agrupan en flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonolas, catequinas, flavan-3-oles, antocianinas, isoflavonoides, neoflavonoides, chalconas y auronas (Figura 2) (Gil y Cout, 2013).

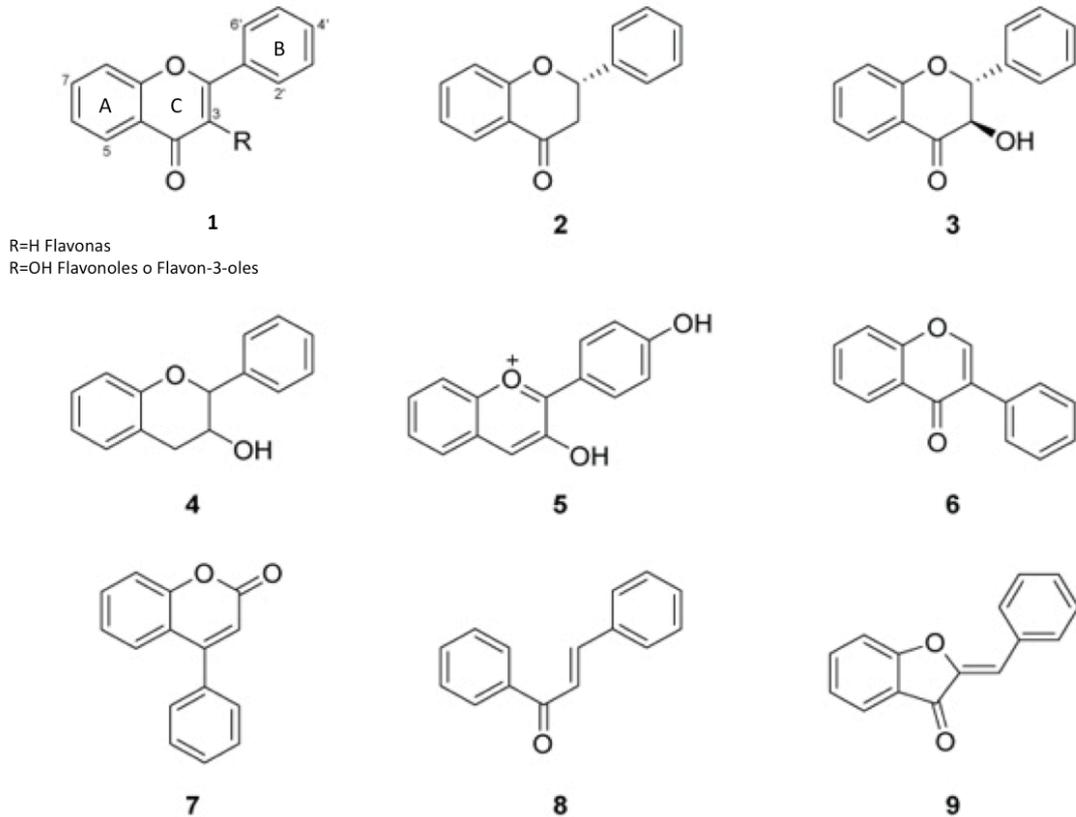


Figura 2. Estructura química de los principales flavonoides. (2.1) Flavonas y Flavonoles, (2.2) Flavanonas, (2.3) Flavanonolas, (2.4) Catequinas, Flavonoles y Flavon-3-oles (2.5) Antocianinas, (2.6) Isoflavonoides, (2.7) Neoflavonoides, (2.8) Chalconas y (2.9) Auronas. (Modificada de Gil y Cout, 2013)

Los flavonoides se encuentran presentes en la mayoría de los tejidos vegetales; se han aislado de frutas, semillas, flores y otros tejidos, donde comúnmente se encuentran en vacuolas. Estos pueden existir como monómeros, dímeros u oligómeros. Gran cantidad de interacciones planta-animal son influenciadas por flavonoides. El color de flores y frutos, que sirve para atraer polinizadores y dispersores de semillas, es resultado de la presencia de antocianinas vacuolares, así como de otros tipos de flavonoides. Algunos flavonoides protegen a las plantas contra radiación UV-B. Mientras que algunos flavonoides atraen insectos para que se coman la planta, otros agregan un sabor amargo a la planta lo cual evita que los insectos se alimenten de ella. Otros más facilitan la fijación del nitrógeno en interacciones con bacterias. También se han estudiado, aunque no muy ampliamente, los

flavonoides asociados con la formación de duramen y corteza. (Croteau et al., 2000).

Desde hace mucho tiempo, se ha reconocido que los flavonoides poseen actividad anti-inflamatoria, antioxidante, hepatoprotectora, antitrombótica, antiviral y anticarcinogénica. Debido a que son compuestos fenólicos, los flavonoides actúan como potentes quelantes y neutralizadores de radicales libres (Ebadi, 2006).

2.5.1.1. Flavonoides como agentes anticarcinogénicos

A veces el metabolismo secundario en las plantas genera flavonoides glucosilados, lo cual propicia su absorción en el cuerpo humano. Existe evidencia experimental que indica que los flavonoides interfieren con procesos carcinogénicos como la proliferación, inflamación, angiogénesis, invasión, activación de la apoptosis y metástasis. A continuación se presentan los posibles mecanismos de acción de la actividad anticarcinogénica de algunos flavonoides.

Las proteínas cinasas (PKs) son enzimas que catalizan la fosforilación de diversos sustratos celulares, los cuales a su vez regulan diversas funciones celulares. Bajo condiciones patológicas, las PKs pueden no estar reguladas, lo cual desencadena alteraciones en la fosforilación que dan como resultado divisiones celulares sin control, inhibición de la apoptosis y otras anomalías. Varios estudios muestran que algunos flavonoides inhiben la actividad de las PKs. Por ejemplo, las tirosina cinasas (PTK) son enzimas que están involucradas en el crecimiento celular y diferenciación; una señalización descontrolada de las tirosina cinasas tiene como consecuencia respuestas inflamatorias y cáncer. Se ha encontrado que flavonoides como quercetina, apigenina y fisetina, entre otros, inhiben la actividad de estas enzimas. Las proteínas cinasas C (PKC), pueden llegar a fosforilar activadores de la transcripción, lo cual aumenta la expresión de oncogenes, promoviendo así la progresión del cáncer; sin embargo, algunas flavonas como luteolina y flavonoles como fisetina, quercetina y miricetina, son potentes inhibidores de

estas enzimas. Las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) se encuentran involucradas en procesos reguladores del ciclo celular como transcripción y procesamiento de mRNA. Flavonoides como quercetina, daidzeina y luteolina están involucrados en un arresto del ciclo celular en las fase G1 y G2/M (lo cual inhibe la proliferación celular), al inhibir la actividad de las CDKs. La fosfoinositol 3-cinasa (PI3-K) es una enzima que tiene un importante papel en la transducción de señales y en la transformación celular, y los flavonoles son potentes inhibidores de dicha enzima (Ravishankar et al., 2013).

Las topoisomerasas son enzimas que mantienen la topología del ADN durante los procesos de replicación, transcripción y recombinación. Los fármacos que interfieren con la actividad de estas son de interés como agentes quimioterapéuticos. Los inhibidores de topoisomerasas son agentes citotóxicos que se unen a las topoisomerasas libres previniendo la formación de un complejo enzima-ADN. Un ejemplo de inhibidor de topoisomerasa tipo II es la doxorrubicina. Otro tipo de inhibidores de topoisomerasas permiten la unión de la enzima con el ADN, pero evitan que se lleve a cabo el paso de re-ligación. Existen estudios que informan que flavonoides y otros compuestos polifenólicos actúan como inhibidores de topoisomerasas (Ravishankar et al., 2013).

Los flavonoides también producen efectos antiangiogénicos, inhibiendo procesos como invasión, migración y señalización, por medio de la regulación de la expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) inducida por IL-6 vía Stat3, metaloproteasas de matriz (MMPs), receptor de factor de crecimiento epidermal (EGFR) e inhibiendo vías de señalización como NFκB, PI3-K/Akt y ERK 1/2 (Ravishankar et al., 2013).

Otros mecanismos de acción de los flavonoides incluyen inducción de la apoptosis a través de la activación del promotor de muerte asociado a Bcl-2 (Bad) y de las caspasas-3 y -7; reducción de la expresión de claudinas pro-invasión a través de la supresión de PI3K/AKT; supresión de la inflamación mediada por NFκB, COX-2, proteínas de choque térmico (HSP-70 y HSP-90); represión de la expresión de la aromatasa CYP19 (enzima que cataliza la

reacción de síntesis de estrógeno) en células MCF-7 de cáncer de mama; reversión de la hipermetilación del ADN y restitución de la expresión del gen supresor de tumores *BRCA-1* en células de cáncer de mama (modificando genes epigenéticamente silenciados) (Romagnolo y Selmin, 2012).

Estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de flavonoides en la dieta puede reducir el riesgo de tumores de mama, colon, pulmón, próstata y páncreas. Si bien estos estudios sugieren que consumir flavonoides en la dieta puede reducir el riesgo de tumores, se debe tener cuidado al generalizar los efectos, pues algunos de los beneficios son específicos a ciertas subclases de flavonoides y subgrupos poblacionales, debido a la heterogeneidad del consumo de flavonoides entre poblaciones dadas las diferencias agrícolas, sociodemográficas y en los factores de vida (Romagnolo y Selmin, 2012).

2.5.2. Terpenos

Los terpenos son compuestos orgánicos derivados de la fusión repetitiva de subunidades de cinco átomos carbono; estas subunidades son conocidas como isoprenos (Figura 3) Los terpenos se clasifican según el número de subunidades de isoprenos en: hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos. Los terpenos son la clase más abundante de productos naturales, y se encuentran no solo en plantas, sino también en hongos, insectos, animales marinos, entre otros organismos (Gershenzon y Dudareva, 2007).

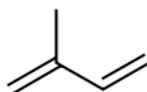


Figura 3. Isopreno, la subunidad de los terpenos

La función de los terpenos en las plantas es considerada tanto ecológica como fisiológica. Algunos terpenos inhiben el crecimiento de plantas competidoras (por medio del fenómeno conocido como alelopatía). Existen triterpenos insecticidas, mientras que otros se encuentran en flores y frutos y atraen

insectos polinizadores (Cseke et al., 1998). La herbivoría también induce la emisión de compuestos volátiles, dentro de los cuales los terpenos son compuestos mayoritarios; se trata de un llamado de auxilio por parte de las plantas, pues al liberar estas mezclas de compuestos volátiles, predadores o parasitoides son atraídos para atacar a los herbívoros. Cuando las moscas de sierra, miembros del suborden Symphyta, colocan sus huevos en las hojas de los pinos, los compuestos volátiles que se liberan atraen avispas que parasitan los huevos. Además, existen terpenos que pueden dispersarse por el sustrato, estimulando así el crecimiento de hongos formadores de micorrizas arbusculares, lo cual resulta en una asociación simbiótica. Los terpenos volátiles también pueden alertar sobre la presencia de herbívoros a plantas vecinas, las cuales responden aumentando sus propias defensas. Los terpenos de las plantas son importantes en la resistencia a enfermedades causadas por hongos y bacterias. El drimano, un sesquiterpeno, posee actividad antibacteriana, antifúngica y es tóxico para diversos animales. Además, otros terpenos han sido reportados como toxinas, inhibidores de crecimiento o disuasivos contra microorganismos o animales. En las plantas, es común encontrar mezclas de terpenos, de manera tal que se acentúe la función de los terpenos, ya sea de comunicación o de defensa. Acerca de las mezclas, se ha discutido mucho la posibilidad de que estas puedan tener un efecto sinérgico. (Gershenzon y Dudareva, 2007).

2.5.2.1. Triterpenos

Estos metabolitos secundarios se encuentran distribuidos abundantemente en la naturaleza. Se componen de 30 átomos de carbono, y pueden dividirse de acuerdo al número de anillos que presenten.

Los triterpenos poseen un amplio espectro de propiedades farmacológicas, como actividad anti-inflamatoria, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, antidiabética, antiulcerogénica, anticariogénica, hepatoprotectora, neuroprotectora, antiparasitaria, analgésica, antioxidante, entre otras (González-Coloma et al., 2011).

2.5.2.1.1. Triterpenos como agentes anticarcinogénicos

Varios estudios han demostrado que los triterpenos suprimen la inflamación crónica, a través de la modulación de mediadores proinflamatorios, por ejemplo inhibiendo la 5-lipooxigenasa (5-LOX), iNOS, COX-2 y NF- κ B (Patlolla y Rao, 2012).

Algunos triterpenos inducen el arresto del ciclo celular en la fase G1, por medio de la inducción de un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina (p21) y disminuyendo la expresión de ciclinas D1 y E, así como fosforilando la proteína del retinoblastoma (Rb), CDK2 y CDK4. Otros triterpenos inducen el arresto en G0/G1, inhibiendo así la proliferación celular, y existen triterpenos que arrestan en la fase G2, lo cual está asociado con la regulación negativa de la ciclina B1 y los niveles de expresión de cdc25C (Patlolla y Rao, 2012).

Estudios han probado que algunos triterpenos inducen la apoptosis por medio de la inducción de la escisión de las caspasas-3 y -8, evento que es precedido por la alteración del potencial de la membrana mitocondrial y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). También se ha reportado que regulan negativamente la expresión de productos génicos regulados por STAT-3, como Bcl-2, Bcl-xL, ciclina D1 y survivina, aumentando la apoptosis al incrementar la población celular sub-G1 y aumentando la escisión de poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) inducido por la caspasa-3 (Patlolla y Rao, 2012).

Respecto a la angiogénesis, se ha demostrado que algunos triterpenos inhiben la formación de vasos sanguíneos inducidos por el Factor de Crecimiento de Fibroblasto básico (bFGF) o por el Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF) (Patlolla y Rao, 2012).

Se ha probado que hay triterpenos que inhiben la expresión de isoenzimas involucradas en la activación metabólica de procarcinogénicos en metabolitos genotóxicos. También se han realizado estudios *in vivo* que exhiben los efectos

anticarcinogénicos de algunos triterpenos. Los estudios clínicos de triterpenos como anticarcinogénicos son limitados (Patlolla y Rao, 2012).

2.6. El orégano mexicano: *Lippia graveolens* Kunth

El término “orégano” es utilizado para referirse a una serie de plantas de aroma y sabor similares. Se tratan de más de 60 especies que son utilizadas alrededor del mundo como especia, cuya mayoría pertenece a las familias Lamiaceae y Verbenaceae. Dentro de estas especies podemos encontrar a *Lippia graveolens* Kunth (sinonimias *Goniostachyum graveolens*, *Lantana origanoïdes*, *Lippia berlandieri*) conocida como el “orégano mexicano” (Kintzios, 2003; Tropicos, 2014).

2.6.1. Jerarquía taxonómica

Cuadro 1. Jerarquía taxonómica de *Lippia graveolens* (ITIS, 2014)

Reino	Plantae
Subreino	Viridaeplantae
Infrarreino	Streptophyta
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophytina
Infradivisión	Angiospermae
Clase	Magnoliopsida
Superorden	Asteranae
Orden	Lamiales
Familia	Verbenaceae
Género	<i>Lippia</i>
Especie	<i>Lippia graveolens</i>

2.6.2. Género *Lippia*

El género *Lippia* pertenece a la familia Verbenaceae y consiste en aproximadamente 200 especies distribuidas en su mayoría en América tropical

o subtropical, mientras que algunas viven en el Viejo Mundo. Se tratan de arbustos o subarbustos, herbáceas o incluso árboles pequeños que con frecuencia son aromáticas si se exprimen. Las hojas se presentan por lo general opuestas, aunque en ocasiones son ternadas o alternas; con frecuencias son pecioladas y pinnatinervadas. Las inflorescencias son racimosas, aunque por lo regular están contraídas en forma de espiga o cabezuela; son axilares y solitarias o fasciculadas, a veces paniculadas o en conjuntos corimbiformes. Las brácteas son más o menos conspicuas. Las flores son zigomorfas y generalmente hermafroditas; su cáliz es pequeño, campanulado y comprimido, 2 ó 4-dentado o bipartido. La corola es pequeña, hipocraterimorfa o infundibuliforme, blanca, amarilla, rosa o morada, tubo cilíndrico, limbo ligeramente bilabiado con el labio abaxial 3-lobado y el adaxial más reducido, entero o emarginado. Los estambres son 4, didínamos, insertados en la parte superior del tubo corolino. El ovario es bilocular con un óvulo en cada lóculo. El estilo es corto y terminal, y el estigma oblicuo o curvado. El fruto se encuentra encerrado en el cáliz persistente, seco, en la madurez se separa con frecuencia en dos mericarpios. Las semillas no tienen endosperma (Rzedowski y Calderón, 2002).

2.6.3. Generalidades de *Lippia graveolens* Kunth

El epíteto específico, *graveolens*, significa “de fuerte olor” en latín. *L. graveolens* es un arbusto que llega a alcanzar los 2 o 3 metros de alto. Sus ramas son estrigoso-pubérulas y a veces pilosas; las principales a menudo presentan corteza exfoliante. Las hojas son opuestas, el peciolo es delgado (2 mm-2 cm de largo), las láminas son ovadas, oblongas o elípticas (1 a 6 cm de largo, 0.4 a 3.5 de ancho), el ápice es obtuso o redondeado, incluso puede ser agudo, la base es obtusa a subcordada, pero también puede ser diminuta y abruptamente cuneada, margen crenado, la textura es cartácea, el haz puede ser reticulado-rugoso, estrigoso-piloso a casi glabro, mientras que en envés va de pubérulo a tomentoso. Las inflorescencias tienen forma de espigas, van de cónicas a cilíndricas (4 a 15 mm de largo), agrupadas de 2 a 4 en las axilas de las hojas, se encuentran sobre pedúnculos (2-15 mm de largo). Las brácteas (2-3 mm de largo) se agrupan en cuatro hileras, son persistentes y van de

ovadas a suborbiculares, el ápice es agudo a acuminado y son densamente pilosas-villosas por fuera. El cáliz (1-2 mm de largo) se encuentra comprimido, es 4-dentado y es piloso-viloso. La corola (3-6 mm de largo) es blanca o amarilla, hipocraterimorfa, pubérulo por fuera. Los estambres son inclusos. Los frutos son desconocidos (Rzedowski y Calderón, 2002).

Su distribución general abarca Estados Unidos, México, Belice, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua y Costa Rica. En México, la distribución es disyunta en 6 parches que comprenden el litoral del Golfo, la vertiente del Pacífico, la península de Yucatán, las depresiones y valles interiores (Balsas, Tehuacán, depresión de Chiapas, istmo de Tehuantepec), las zonas áridas de Tamaulipas e Hidalgo y el desierto de Chihuahua. Los estados en los cuales se distribuye son Veracruz, Yucatán, Campeche, Quintana Roo, Chiapas, Guerrero, Puebla, Morelos, Edo. de México, Michoacán, Oaxaca, Sinaloa, Sonora; el tipo *berlandieri* en Hidalgo, Tamaulipas, Nuevo León, Querétaro, Guanajuato, San Luis Potosí; las poblaciones muy aromáticas se encuentran en el desierto chihuahuense y el suroeste del altiplano en Jalisco-Zacatecas, Jalisco, Durango, Coahuila y San Luis Potosí (Soto et al., 2007)

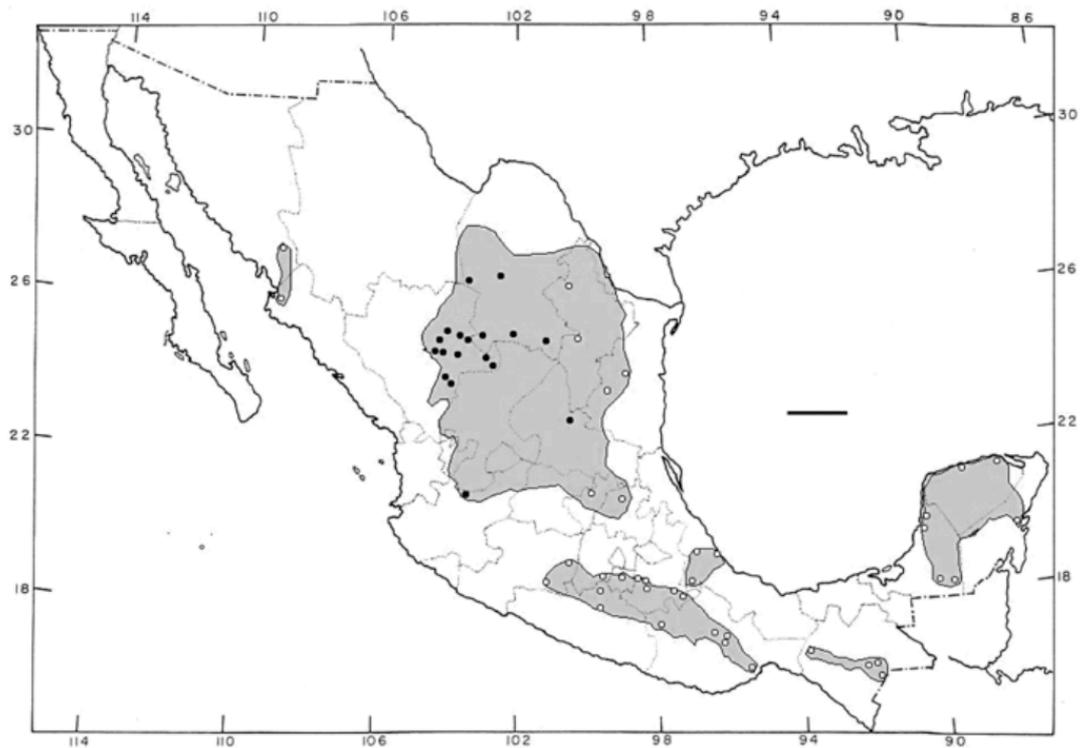


Figura 4. Distribución geográfica aproximada de *L. graveolens*. Los símbolos rellenos representan poblaciones fuertemente aromáticas (Soto et al., 2007).

En el desierto de Chihuahua es abundante en los matorrales xerófilos, pero en otras zonas crece en matorrales subtropicales, bosque tropical caducifolio (selva baja), chaparrales y acahuales derivados de bosque tropical subcaducifolio (selva mediana), y crece a una altitud entre el nivel del mar y los 2300 msnm (González-Güereca et al., 2011). Florece de julio a enero. Debido a su relativa frecuencia, esta planta no se considera en peligro de extinción (Rzedowski y Calderón, 2002).

2.6.4. Etnobotánica y usos de *Lippia graveolens* Kunth

En el Códice de la Cruz-Badiano, se informa que *ahuiyac xihuitl* era utilizado para el cansancio de pies y para el menstuo sanguinoliento. Pablo Reko sugiere que *ahuiyac xihuitl* se trata de *L. graveolens* (De la Cruz, 1964). Los usos culinarios y medicinales de *L. graveolens* han sido reportados desde principios del siglo XVIII (Rivero-Cruz et al., 2011).

La sinonimia popular del orégano es: cacachica, canelilla, flor de orégano, hierba dulce, orégano del monte, orégano del país, oreganón, salvia, salvia de castilla. En Quintana Roo: ak'ilche, xak' ilche, xaak' che (maya). En Puebla: kaoreegano, kamaxha, nga ga'a ntaa (popoloca) (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

El orégano se utiliza para preparar diversos platillos típicos, entre los cuales se encuentran el pozole, el adobo, el pipián, la barbacoa, el menudo, platillos italianos como las pizzas, salsas, aderezos, es adicionado en alimentos enlatados, entre otros (Huerta, 1997).

Como planta medicinal, el orégano es muy utilizado en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales –se bebe para el tratamiento de diarrea, indigestión, dolor de estómago- y enfermedades respiratorias –se usa como expectorante para aliviar asma, bronquitis y tos-, además de que es usado contra obstrucción del hígado, afecciones menstruales y músculo-esqueléticas, contra infecciones en general y contra la diabetes (Hernández et al., 2003; Rivero-Cruz et al., 2011).

Del orégano se emplean sus ramas con hojas y flores, las cuales se cuecen en agua tibia para la preparación de un “té”, dicho “té” se bebe para aliviar las molestias causadas por la fiebre y la tos; como abortivo se usa como agua de tiempo; para que baje la regla se prepara cociendo sus hojas; y si se usan más hojas, agua y alcohol puede ser utilizado para dar baños de asiento en caso de comezón en la vagina (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

2.6.5. Composición fitoquímica de *Lippia graveolens* Kunth

La mayoría de las investigaciones enfocadas al estudio de la composición química y de la actividad farmacológica del orégano corresponden a sus aceites esenciales. Se sabe que las condiciones agronómicas, como la duración del día, la temperatura, el estrés hídrico y la fase de crecimiento en la cual se encuentre la planta afectan el desarrollo del orégano y la composición

de su aceite esencial. Los principales componentes del aceite esencial, según un estudio realizado por Silva-Vázquez y Dunford (2005) son: timol, carvacrol y *p*-cimeno, además de 1,8-cineol y γ -terpineno.

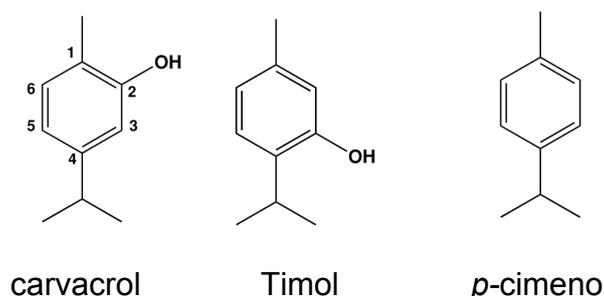


Figura 5. Estructuras de los componentes principales de los aceites esenciales de *L. graveolens* (Rivero-Cruz et al., 2011).

Se ha determinado la presencia de diversos iridoides, como ácido carioptosídico, sus derivados 6'-O-*p*-cumaroil y 6'-O-cafeoil, loganina, secologanina, secoxiloganina, dimetilsecologanósido, ácido logánico, ácido 8-epi-logánico y carioptósido (Rastrelli et al., 1998).

Sin embargo, la información correspondiente a los flavonoides en el orégano no es aún muy extensa. González-Güereca et al. (2007) por medio de un análisis de LC-MS (cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas) reportan la presencia de los siguientes flavonoides: naringenina, kaempferol, isokaempferido, pilosina, circimaritina, derivado de catequina y hexósido de quercetina. Lin et al. (2007) con un ensayo de LC-DAD-ESI/MS (cromatografía líquida acoplada a un detector de arreglo de diodos y espectrómetro de masas), identificaron la presencia de: pentahidroflavanona-A hexósido, 6-hidroxluteolina 7-O-hexósido, pentahidroflavanona-B hexósido-1, pentahidroflavanona-B hexósido-2, luteolina 7-O-glucósido, taxifolina, 6-hidroxluteolina 7-O-rhamnosido, 6-hidroxluteolina, 3-hidroxfloretina 6'-O-hexósido, apigenina 7-O-glucósido, phloridzina, scutellareina, eriodictiol, luteolina, quercetina, scutellareina 7-O-hexósido, naringenina, 6-metilscutellareina, 6,7-dimetilscutellareina, pinoembrina, galangina, metilgalangina y sakuranetina. Cabe mencionar que los flavonoides

mencionados anteriormente fueron simplemente identificados en el orégano por medio de las técnicas utilizadas, sin embargo estos no fueron aislados de dicha planta.

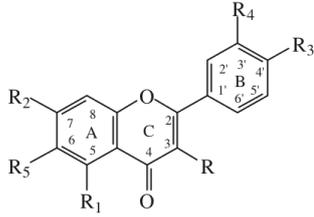
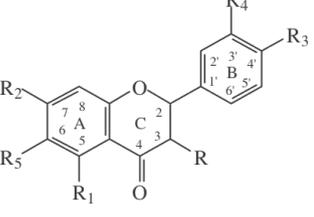
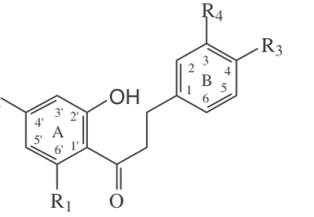
	<p>Grupo 1: Flavonas (R=H) y Flavonoles (R=OH o O-gly)</p> <p>Galangina: R=R1=R3=OH, R2=R4=R5=H Apigenina: R1=R3=R2=OH, R=R4=R5=H Scutellareina: R1=R2=R3=R5=OH, R=R4=H 6-Metilscutellareina: R1=R2=R3=OH, R5=OMe, R=R4=H 6,7-Dimetilscutellareina: R1=R3=OH, R2=R5=OMe, R=R4=H Luteolina: R1=R2=R3=R4=OH, R=R5=H Quercetina: R=R1=R3=R2=R4=OH, R5=H 6-Hidroxiluteolina: R1=R2=R3=R4=R5=OH, R=H</p>
	<p>Grupo 2: Flavanonas</p> <p>Pinocembrina: R1=R2=OH, R=R3=R4=R5=H Naringenina: R1=R2=R3=OH, R=R4=R5=H Eriodictiol: R1=R2=R3=R4=OH, R=R5=H Taxifolina: R=R1=R2=R3=R4=OH, R5=H Pentahidroxiflavanona-A (Probablemente 5,6,7,3',4'-pentahidroxi flavanona) Pentahidroxiflavanona-B (Probablemente 3,5,6,7,4'-pentahidroxi flavanona)</p>
	<p>Grupo 3: Dihidrochalconas</p> <p>Floretina: R1=R2=R3=OH, R4=H 3-Hidroxifloretina: R1=R2=R3=R4=OH</p>

Figura 6. Estructuras de algunos flavonoides de *L. graveolens* (Lin et al., 2007).

2.6.6. Farmacología de *Lippia graveolens* Kunth

El aceite esencial de *L. graveolens* posee propiedades antifúngicas (Hernández et al., 2008). Ha sido reportado que el timol y el carvacol presentan actividad biológica como antioxidantes y antimicrobianos en sistemas *in vitro* (Silva-Vázquez y Dunford, 2005). El extracto acuoso del orégano presenta actividad antioxidante, sin ningún efecto tóxico *in vitro* e *in vivo* (Soto et al., 2012). El potencial antiardiásico del orégano también ha sido reportado (Rufino-González et al., 2012). La actividad abortiva y reductora de la fertilidad de *L. graveolens* es explicada por diversos autores por la presencia relativamente alta de monoterpenos tóxicos: alcanfor, *p*-cimeno y acetato bornil (Pascual et al., 2001). La actividad antiespasmódica de sus aceites esenciales también es explicada por la presencia timol, carvacrol y *p*-cimeno (Rivero-Cruz et al., 2011).

2.7. El cuachalalate: *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl.

Amphipterygium adstringens (sinonimia *Juliania adstringens*, *Hypopterygium adstringens*) familia Anacardiaceae, es un árbol dioico que llega a medir hasta 10 metros de altura, de 10 a 40 cm de diámetro a la altura del pecho, la copa es aplanada, tiene el tronco torcido y su corteza es color moreno grisáceo, gris plomizo, o café rojiza; ornamentada con grandes escamas y aspecto áspero. Las hojas son sésiles, obovadas y con el borde aserrado, se encuentran agrupadas de 3-5 en el extremo de las ramas y son verde opaco en el anverso y verde grisáceo en el reverso; éstas se pierden en ambos sexos durante 6 meses al año. Las flores son sésiles o con pedicelos de hasta 3 mm de largo, actinomorfas. Estos árboles florecen de mayo a junio. Las flores masculinas forman panículas tomentosas y las femeninas se encuentran solitarias en las hojas de las axilas en pedúnculos aplanados. Frutos de 2.5 a 5 cm, nueces abultadas y alargadas que persisten por varios meses. (Solares y Gálvez, 2002; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Tropicos, 2014).

2.7.1. Jerarquía taxonómica

Cuadro 2. Jerarquía taxonómica de *Amphipterygium adstringens* (EOL, 2014).

Reino	Plantae
Subreino	Viridaeplantae
Infrarreino	Streptophyta
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophytina
Infradivisión	Angiospermae
Clase	Magnoliopsida
Orden	Sapindales
Familia	Anacardiaceae
Género	<i>Amphipterygium</i>
Especie	<i>Amphipterygium adstringens</i>

A. adstringens es un componente de la Selva Baja Caducifolia de México, y se puede encontrar desde los 100 hasta los 1700 msnm en los estados de Jalisco, Colima, Guerrero, México, Puebla, Nayarit, Morelos, Michoacán, Oaxaca y la cuenca del Balsas (SIRE Paquetes Tecnológicos *Amphipterygium adstringens*, 2014).

2.7.2. Etnobotánica y usos de *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl.

La corteza de esta planta es administrada de diversas formas: como macerado acuoso, pulverizada, se utiliza la resina de la corteza o se prepara un jarabe con la corteza y con otras plantas medicinales. Se reporta que es utilizada para el tratamiento de úlceras, cáncer de estómago, gastritis, lesiones cutáneas, granos, heridas, llagas, golpes, rozaduras, mordeduras de animales, como cicatrizante, para lavados vaginales, para malestares digestivos, afecciones respiratorias, enfermedades del riñón, problemas circulatorios, como analgésico y para el tratamiento de la fiebre. (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). Reduce la inflamación de ovarios, endurece las encías, se administra en el tratamiento de la malaria y tifoidea, se usa como

antiséptico y antidiabético, reduce el colesterol en la sangre, destruye cálculos renales y biliares, es antibiótico y purifica la sangre (Solares y Gálvez, 2002).

2.7.3. Composición fitoquímica de *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl.

Los componentes mayoritarios de los extractos orgánicos de corteza de *A. adstringens* (Figura 7) son el ácido masticadienónico (7.8) y el ácido 3 α -hidroximasticadienónico (7.6) (Rosas-Acevedo et al., 2011).

Otros triterpenos que han sido aislados de esta planta son: ácido 3 α -hidroxi-6-oxo-7,24Z-tirucaladien-26-oico (7.1); ácido 3,7-dioxo-8,24Z-tirucaladien-26-oico (7.2); ácido 3 α -hidroxi-7-oxo-8,24Z-tirucaladien-26-oico (7.3); ácido 7,11-dioxo-3 α -hidroxi-8,24Z-tirucaladien-26-oico (7.4); ácido 3,8-dioxo-7 β -hidroxi-7,9-ciclo-7,8-seco-24Z-tirucaladien-26-oico (7.5); ácido 3 β -hidroximasticadienónico (7.7); ácido oleanólico (7.9); ácido oleanónico (7.10); 3 α -hidroxi-11 α ,12 α -epoxi-oleonano-28,13 β -olido (7.11); 3 β -hidroxi-11 α ,12 α -epoxi-oleonano-28,13 β -olido (7.12); β -sitosterol (7.13); ocotillona (7.14) (Makino et al., 2004).

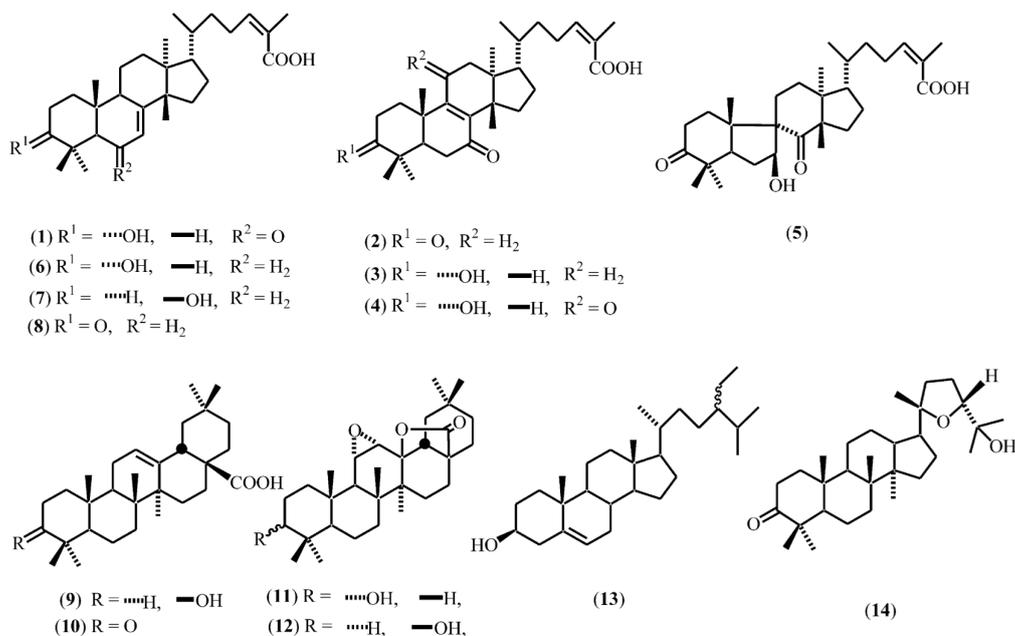


Figura 7. Estructuras de algunos triterpenos de *A. adstringens* (Makino et al., 2004)

2.7.4. Farmacología de *Amphipterygium adstringens* (Schltdl.) Standl.

El efecto gastroprotector ha sido bien demostrado en modelos animales. El extracto metanólico de la corteza produce un efecto gastroprotector dependiente de la dosis contra lesiones gástricas inducidas por etanol, lo cual proporciona validación adicional para el uso popular de esta planta como remedio contra las úlceras en la medicina tradicional mexicana (Navarrete et al., 1998). Se ha demostrado que el extracto metanólico del cuachalalate protege contra lesiones gástricas inducidas por altas dosis de diclofenaco sódico, sin alterar el efecto anti-inflamatorio del medicamento (Navarrete et al., 2005). También se ha determinado el efecto antibacteriano de la corteza de esta planta, al ser probada la fracción de éter de petróleo, así como una mezcla de ácidos anacárdicos obtenidos de dicha fracción contra *Helicobacter pylori* (Castillo-Juárez et al., 2007). El extracto hexánico y una mezcla de ácidos anacárdicos de esta planta poseen actividad anti-censado de quórum en las bacterias *C. violaceum* y *P. aeruginosa* (Castillo-Juárez et al., 2013). El extracto hexánico de la corteza ejerce un significativo efecto hipocolesterolémico (Mata et al., 1991). Se ha encontrado que algunos triterpenos aislados de *A. adstringens* presentan actividad citotóxica moderada contra células de leucemia de ratón (L-1210) (Makino et al., 2004). *A. adstringens* también presenta actividad anti-inflamatoria (Oviedo-Chávez et al., 2004).

2.7.5. Ácido 3 α -hidroximasticadienónico

El ácido 3 α -hidroximasticadienónico (3 α AMD) (Figura 8), también conocido como ácido 3-epimasticadienónico, es un triterpeno tetracíclico y es uno de los componentes principales de diversas especies, entre ellas *A. adstringens*.

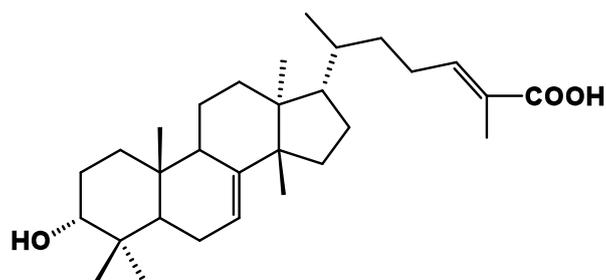


Figura 8.

Estructura química del ácido 3- α -hidroxi-masticadienónico (3 α AMD)

Se ha demostrado que 3 α AMD posee efectos anti-inflamatorios en modelos *in vivo*: el modelo de edema auricular en ratón inducido por TPA y el modelo de edema plantar inducido por carragenina. La actividad anti-inflamatoria que presenta el extracto hexánico de *A. adstringens* se atribuye a la presencia tanto de 3 α AMD, como de ácido masticadienónico (AMD). Así mismo, estos dos triterpenos inhiben la producción de óxido nítrico (NO), la cual está involucrada con procesos inflamatorios (Oviedo-Chávez et al., 2004). También se ha demostrado que 3 α AMD posee una moderada actividad antiproliferativa contra varias líneas de cáncer humano (Oviedo-Chávez et al., 2005).

Cuadro 3. CI_{50} de 3 α AMD (Oviedo-Chávez et al., 2005)

Muestra	Valores de CI_{50} en líneas celulares de cáncer humano (μ M)				
	HCT-15	MCF-7	U251	PC-3	K562
3 α AMD	27.6 \pm 6.0	31.5 \pm 6.8	31.6 \pm 5.4	29.2 \pm 0.3	24.2 \pm 0.7

El 3 α AMD causa una deficiencia en las funciones mitocondriales, lo cual podría explicar su potencial antiproliferativo (Dalla et al., 2012).

3. Justificación

El cáncer es un importante problema de salud pública, pues se trata de una de las principales causas de muerte en nuestro país, así como a nivel mundial.

En la búsqueda de nuevas alternativas a los tratamientos contra el cáncer, los productos naturales surgen como importantes agentes quimiopreventivos, debido a su baja toxicidad y su potencial efectividad (Greenlee, 2012). Los flavonoides, una de las clases principales de productos naturales y que cuenta con una amplia distribución en las plantas, son de particular interés debido al amplio espectro de su actividad farmacológica (Pouget, et al., 2001). Los triterpenos, ubicuos en el reino vegetal, también poseen potencial actividad anticarcinogénica (Patlolla y Rao, 2012).

A pesar del uso extendido de los medicamentos utilizados contra el cáncer, en muchas ocasiones una cantidad suficiente del fármaco antineoplásico no puede ser administrado debido a los nocivos efectos secundarios que produce en el organismo. Así mismo, el tratamiento con muchos de estos medicamentos frecuentemente resulta en el desarrollo de quimioresistencia, lo cual lleva a un fracaso en el tratamiento. Recientemente, se han hecho estudios sobre terapias combinatorias que involucran un fármaco antineoplásico y diversos compuestos fitoquímicos. Algunos de estos suplementos de origen vegetal han demostrado tener actividad antiproliferativa, reforzando la actividad del fármaco antineoplásico.

4. Hipótesis

- Si se han identificado un gran número de flavonoides en *Lippia graveolens*, y se sabe que algunos de estos compuestos fenólicos tienen actividad anticarcinogénica, entonces se espera encontrar en *L. graveolens* flavonoides con actividad antiproliferativa en líneas de cáncer humano.
- Si el extracto hidroalcohólico de *L. graveolens* presenta actividad antiproliferativa en líneas de cáncer humano, entonces se puede pensar que al combinarse con cisplatino, un fármaco anticarcinogénico, se apreciará una mayor actividad antiproliferativa.
- Si el ácido 3- α -hidroxi-masticadienónico, triterpeno aislado de *Amphypterygium adstringens*, posee actividad antiproliferativa en líneas de cáncer humano, entonces es factible suponer que al administrarse en combinación con un fármaco anticarcinogénico, se observará una actividad antiproliferativa.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Evaluar la inhibición de la proliferación celular en líneas de cáncer humano de la sakuranetina –flavonoide aislado de *Lippia graveolens*-, así como de las combinaciones de cisplatino con extracto hidroalcohólico de *L. graveolens*, y de cisplatino con ácido 3- α -hidroxi-masticadienónico -triterpeno aislado de *Amphipterygium adstringens*-.

5.2. Objetivos Particulares

- Obtener el extracto hidroalcohólico de las partes aéreas vegetativas de *L. graveolens*.
- Evaluar la actividad anti-inflamatoria en edema de ratón y antiproliferativa en líneas de cáncer humano del extracto hidroalcohólico de *L. graveolens*.
- Aislar e identificar los compuestos mayoritarios del extracto hidroalcohólico de *L. graveolens*.
- Evaluar la actividad anti-inflamatoria en edema de ratón y antiproliferativa en líneas de cáncer humano de los compuestos aislados del extracto hidroalcohólico de *L. graveolens*.
- Evaluar la actividad antiproliferativa en la línea de adenocarcinoma de próstata humano (PC-3) del extracto hidroalcohólico de *L. graveolens* en combinación con cisplatino.
- Evaluar la actividad antiproliferativa en la línea de adenocarcinoma de próstata humano (PC-3) de 3- α -hidroxi-masticadienónico obtenido de la corteza de *A. adstringens* en combinación con cisplatino.

6. Diseño experimental

6.1. Análisis Fitoquímico

El material vegetal de *L. graveolens* fue donado por la M. en C. Martha Celina González Güereca, investigadora del CIIDIR IPN, Unidad Durango. Dicho material vegetal fue recolectado en los municipios de Nombre de Dios, Poanas, Mapiní, Tlahualillo, Santa Clara, Lerdo, Cuencamé y San Luis Cordero, Durango en Septiembre y Octubre de 2010. Un voucher de cada espécimen completo fue depositado en el Herbario del CIIDI IPN bajo los número de registro 16550, 16556, 16477, 16457, 16540, 16471, 16539, 16545, 16546, 16547, 35452 y 13548.

Se utilizó 1 kg de las partes aéreas vegetativas (tallos y hojas) de *L. graveolens* deshidratadas a temperatura ambiente para realizar una extracción hidroalcohólica con una mezcla metanol/agua (MeOH/H₂O) en una proporción 7:3, por 48 horas a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó a presión reducida en un rotaevaporador, obteniéndose de esta manera 236.16 g del extracto hidroalcohólico (EHA). EHA se disolvió en MeOH y se trató con acetato de etilo (AcOEt). A la fracción soluble en AcOEt se le denominó EHAA. Se realizaron dos separaciones cromatográficas por CCA de EHAA. En la primera, (C1), se absorbieron 400 mg de extracto en 400 mg de gel de sílice, y la columna se empacó con 2400 mg de gel sílice. La elución de la columna se realizó con hexano, mezclas de hexano/AcOEt de polaridad creciente, AcOEt, mezclas de AcOEt/MeOH de polaridad creciente y finalmente MeOH. Para la segunda separación cromatográfica, (C2), se tomaron 18.56 g de EHAA, se absorbieron en 20 g de gel de sílice, y la columna se empacó con 120 g de gel de sílice. La elución de la columna se realizó con hexano, mezclas de hexano/AcOEt de polaridad creciente y MeOH. Con ayuda de la CCF, se reunieron aquellas fracciones que presentaban similitud en su patrón cromatográfico. Los compuestos se purificaron por medio de recristalización con hexano y cloruro de metileno.

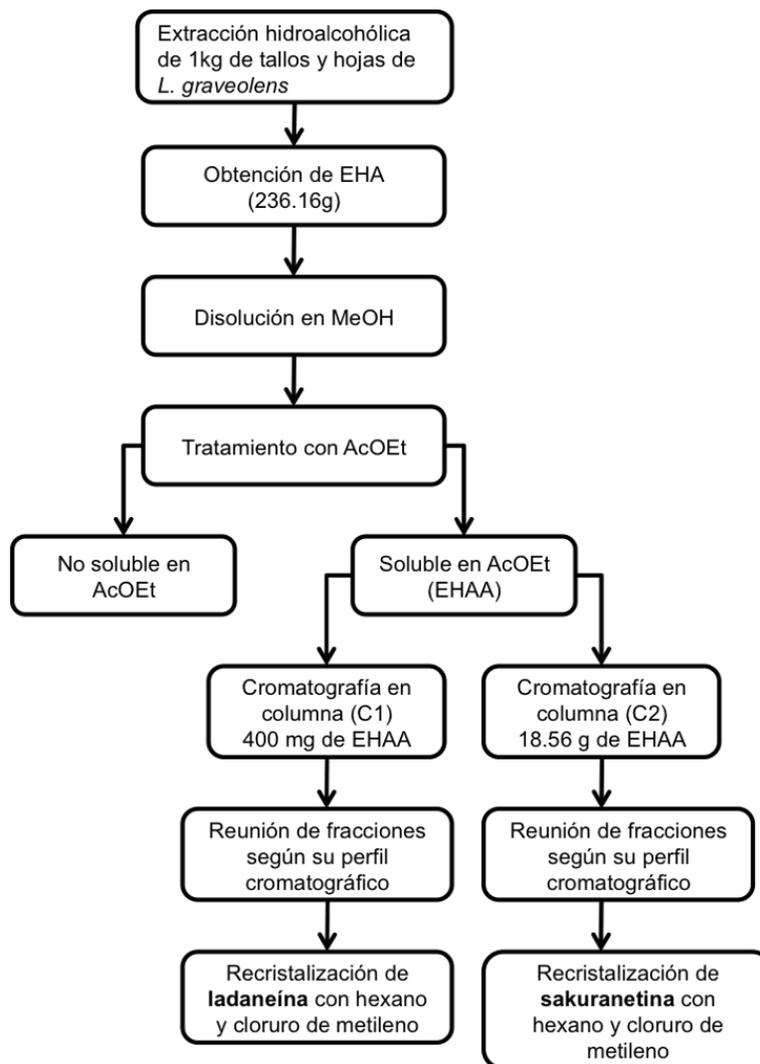


Figura 9. Preparación y fraccionamiento del extracto hidroalcohólico

La separación y purificación de los extractos se realizó por medio de la técnica de cromatografía en columna abierta (CCA). Como fase estacionaria se utilizó gel de sílice MN-Kieselgel G60, MERCK®, en una proporción 3:1 con respecto al extracto, el cual se colocó arriba de la fase estacionaria en una proporción 1:1 extracto/gel sílice de las mismas especificaciones antes mencionadas.

Para la cromatografía en capa fina (CCF) se utilizaron placas ALUGRAM® SILG/UV254. Para revelar las sustancias, las placas se observaron bajo luz UV a 365 y 254 nm y se rociaron con una disolución de sulfato cérico tetrahidratado al 1% en una disolución de ácido sulfúrico.

La determinación de los puntos de fusión (p.f.) se realizó con un aparato Fisher-Johns, y los valores se reportan sin corrección.

Los espectros infrarrojo (IR) se obtuvieron mediante un espectrofotómetro Nicolet Magna-IR 750, por medio del método de pastilla de KBr.

La espectrometría de masas (EM) fue generada por un espectrómetro de masas JEOL AX505HA, por medio de la técnica de impacto electrónico.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) ^1H y ^{13}C se obtuvieron por medio de los aparatos Varian Gemini XL-200 y Varian VXR-300, con tetrametilsilano como referencia interna y cloroformo como disolvente deuterado (CDCl_3). Para experimentos adicionales como DEPT, COSY, HSQC y HMBC se utilizó un espectrómetro Varian-Inova 500 MHz.

6.2. Evaluación de la actividad biológica

6.2.1. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria mediante el ensayo de edema auricular en ratón inducido por TPA

Para medir la actividad anti-inflamatoria se llevó a cabo el ensayo de edema auricular en ratón inducido por TPA (13-acetato de 12-0-tetradecanoilforbol) (para mecanismo de acción, ver Anexos). Para este ensayo se utilizaron 6 ratones hembra de la cepa CDI, con un peso entre 20 y 30 g. Los ratones se anestesiaron con Pentobarbital administrado vía intraperitoneal a una dosis de 31.5 mg/kg, y se dividieron al azar en dos grupos: 3 ratones en el grupo inflamado y 3 ratones en el grupo experimental.

A todos los ratones se les administró tópicamente 10 μL de TPA disuelto en EtOH (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en la oreja derecha, y 10 μL de EtOH y 20 μL de vehículo en la oreja izquierda.

A los ratones del grupo inflamado se les administró tópicamente 20 μL de vehículo en la oreja derecha. El vehículo corresponde al disolvente en el cual es soluble el extracto o compuesto a probar.

A los ratones del grupo experimental se les administró tópicamente 20 μL de muestra, ya sea extracto o compuesto, disuelto en el vehículo en la oreja derecha (1 mg/20 μL en caso de extracto o 1 μmol /20 μL en caso de compuesto).

Después de 4 horas, los ratones se sacrificaron en una cámara de CO_2 y por medio de un sacabocados de 7 mm de diámetro se obtuvieron las biopsias de ambas orejas de los ratones. Las biopsias se colocaron en tubos Eppendorf previamente pesados, y se calcularon las diferencias de peso entre la oreja tratada (derecha) y la oreja no tratada (izquierda) de cada animal. Para determinar el porcentaje de inhibición del edema se realiza la siguiente ecuación, donde \bar{x} experimental corresponde a la proporción de la inflamación media del grupo experimental y \bar{x} inflamado corresponde a la proporción de la inflamación media del grupo inflamado:3

$$\% \text{ de inhibición del edema} = 100 - [(\bar{x} \text{ experimental} / \bar{x} \text{ inflamado}) * 100]$$

Los datos representan el promedio de tres animales \pm el error estándar de la media. Los resultados fueron analizados por una prueba de t de Student y los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa respecto al control.

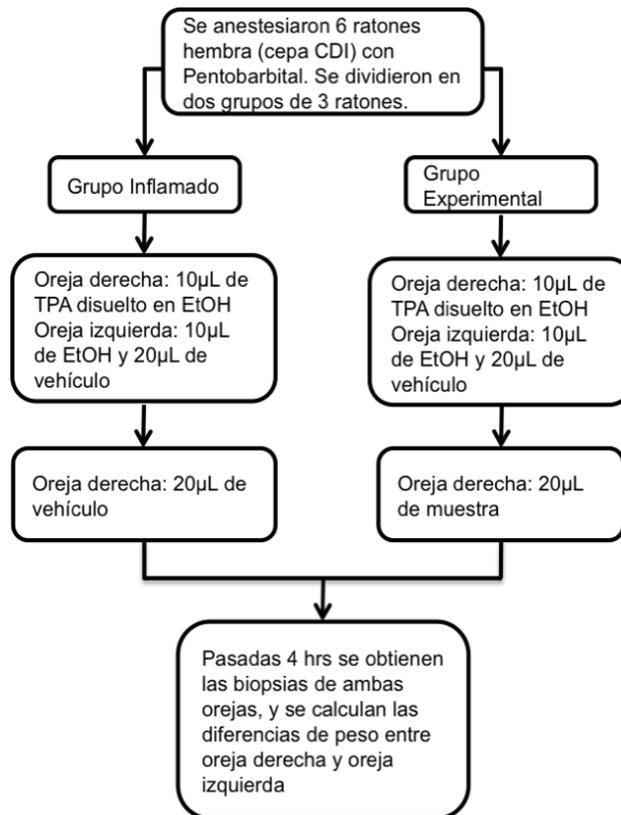


Figura 10. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria

6.2.2. Evaluación de la inhibición de la proliferación celular en líneas de cáncer humano mediante el método de sulforrodamina B (SRB)

Se utilizaron seis líneas celulares para este ensayo: leucemia mieloide crónica (K562), adenocarcinoma colorrectal (HCT-15), adenocarcinoma de mama (MCF-7), adenocarcinoma de próstata (PC-3), adenocarcinoma de pulmón (SKLU-1) y glioblastoma (U251). Las líneas celulares pertenecen al panel del NCI (Instituto Nacional de Cáncer, EEUU) y fueron adaptadas al medio de cultivo RPMI-1640 adicionado con suero fetal bovino (10%), una mezcla de antibióticos y antifúngicos (100 UI/mL de penicilina G, 100 UI/mL de sulfato de estreptomina, 0.25 mg/mL de anfotericina B GIBCO®) y 2 mM de L-glutamina GIBCO®.

Las líneas se mantuvieron en las botellas de cultivo a una temperatura de 37°C, atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa. Todas las líneas, a excepción de la K562, se adhieren al fondo de las botellas, por lo que para cosecharlas se debe adicionar 1 mL de tripsina-EDTA al 0.05%. Se adicionaron 5-10 mL de cultivo para inactivar la tripsina. Las células ya desprendidas se

colocaron en tubos cónicos y se centrifugaron por 3 minutos. Se resuspendió el paquete celular con medio de cultivo y se tomó 0.05 mL del inóculo, al cual se le agregó 0.45 mL de azul de tripano. Con ayuda de un hematocitómetro se determinó el número de células por mL y se realizaron los cálculos necesarios para depositar 100 μ L/pozo con la densidad celular adecuada para cada línea. Las microplacas se incubaron por 24 horas a una temperatura de 37°C, atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa. Una vez transcurrido este tiempo se disuelven las muestras a probar en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 50 μ g/mL, y se agregan 100 μ L a cada pozo, para tener un volumen total de 200 μ L por pozo. Como control positivo se usó la Doxorubicina SIGMA® y como control negativo se usó DMSO. La microplaca se incubó por 48 horas bajo las condiciones antes mencionadas. Al finalizar el periodo de incubación las proteínas celulares se fijaron *in situ* con una disolución de ácido tricloroacético (TCA) frío al 50% y al 80% para células adheridas y en suspensión respectivamente. La placa se incubó a 4°C por 1 hora, y posteriormente los sobrenadantes se desecharon y la placa se lavó con agua desionizada, dejando secar por 24 horas. La tinción de las células se realizó con 100 μ L de sulforrodamina B SIGMA® al 4%, incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos. Para remover la SRB no unida a las células se realizaron tres lavados con ácido acético al 1% y se dejó secar al ambiente por 24 horas. Para favorecer la disolución del complejo se agregaron 100 μ L de buffer Tris y se sometió a agitación por 10 minutos. La densidad óptica se midió en un lector de microplacas a una longitud de onda de 515 nm. La densidad óptica (DO) es directamente proporcional a la cantidad de proteínas, la cual a su vez es directamente proporcional al número de células, por lo que a menor densidad óptica mayor el efecto antiproliferativo de la muestra probada. El porcentaje de inhibición de la proliferación se calcula conforme a la siguiente ecuación, donde DO_t es el promedio de la DO de los 3 pozos/línea tratados con el compuesto, DO_c es el promedio de la DO de los 3 pozos/línea con DMSO:

$$\% \text{ Inhibición del Crecimiento} = 100 - [(DO_t/DO_c) * 100]$$

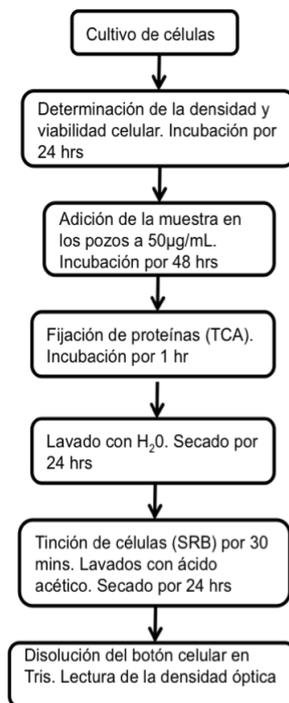


Figura 11. Evaluación de la actividad antiproliferativa

6.2.2.1. Evaluación antiproliferativa en líneas de cáncer humano de combinaciones a diferentes concentraciones de un fármaco anticarcinogénico y un extracto

El extracto hidroalcohólico de *L. graveolens* (EHA) se utilizó en combinación con un fármaco antineoplásico, Cisplatino (Sigma®) (CDDP). Las combinaciones que se utilizaron fueron 1:1, 1:3 y 2:1 (CDDP/EHA). Se determinó que el valor máximo de CDDP a utilizar en las tres combinaciones fuera 10 µg/mL (tomando en consideración que la CI_{50} de CDDP es aproximadamente 14 µM o 4.214 µg/mL), con el fin de que la concentración de CDDP como máximo inhibiera el 100% las células.

Se realizó un experimento por triplicado de la evaluación de la inhibición de la proliferación celular en la línea celular de adenocarcinoma de próstata humano mediante el método de sulforrodamina B, descrito previamente.

Las concentraciones administradas de CDDP y EHA fueron las siguientes:

Cuadro 4. Combinaciones y concentraciones de CDDP y EHA

Combinación	1:1		CDDP (µg/mL)	EHA (µg/mL)
		Concentraciones		
1	1:1	1	1.25	1.25
		2	2.5	2.5
		3	5	5
		4	10	10

Combinación	1:3		CDDP (µg/mL)	EHA (µg/mL)
		Concentraciones		
2	1:3	5	1.25	3.75
		6	2.5	7.5
		7	5	15
		8	10	30

Combinación	2:1		CDDP (µg/mL)	EHA (µg/mL)
		Concentraciones		
3	2:1	9	1.25	0.65
		10	2.5	1.25
		11	5	2.5
		12	10	5

Se administraron además ambos compuestos por separado, para realizar una curva de dosis-respuesta.

6.2.2.2. Evaluación antiproliferativa en líneas de cáncer humano de combinaciones a diferentes concentraciones de un fármaco anticarcinogénico y un triterpeno

El ácido 3α-hidroximasticadienónico fue aislado a partir del extracto hexánico de corteza de *A. adstringens* y me fue proporcionado ya purificado.

Se determinaron tres combinaciones de Cisplatino (Sigma®) (**CDDP**) y ácido 3α-hidroximasticadienónico (**3αAMD**): 1:1, 1:3 y 3:1 (CDDP/3αAMD), a diferentes concentraciones obtenidas a partir del siguiente algoritmo:

$$Z_{\text{add}} = \frac{A}{p + R(1-p)}$$

Ecuación 1. Donde Z_{add} : la concentración total de ambos compuestos; A: CI_{50} del compuesto a (en este caso CDDP); p: la proporción de a en la combinación; 1-p: la proporción de b (en este caso 3αAMD) en la combinación; R: potencia relativa (CI_{50a} / CI_{50b}). Z_{add} proporcionó un punto de referencia para la administración; el valor obtenido de Z_{add} se duplicó y a este valor obtenido

se le consideró como la máxima concentración a evaluar, seguido del valor de Z_{add} , posteriormente de la mitad del valor de Z_{add} y finalmente de la mitad de este último valor (Tallarida, et al., 1999)

Se realizaron dos experimentos (cada uno por triplicado) de la evaluación de la inhibición de la proliferación celular en la línea celular de adenocarcinoma de próstata humano mediante el método de sulforrodamina B, descrito previamente.

Las concentraciones administradas de CDDP y 3 α AMD fueron las siguientes:

Cuadro 5. Combinaciones y concentraciones de CDDP y 3 α AMD

Combinación 1	1:1		CDDP (μ M)	3 α AMD (μ M)
		Concentraciones		
		1	2.36574074	2.36574074
		2	4.73148148	4.73148148
		3	9.46296296	9.46296296
	4	18.9259259	18.9259259	

Combinación 2	1:3		CDDP (μ M)	3 α AMD (μ M)
		Concentraciones		
		5	1.43539326	4.30617978
		6	2.87078652	8.61235955
		7	5.74157303	17.2247191
	8	11.4831461	34.4494382	

Combinación 3	3:1		CDDP (μ M)	3 α AMD (μ M)
		Concentraciones		
		9	3.01771654	1.00590551
		10	6.03543307	2.01181102
		11	12.0708661	4.02362205
	12	24.1417323	8.04724409	

Igual que en el experimento anterior, se administraron también ambos compuestos por separado, para realizar la curva de dosis-respuesta.

6.2.2.3. Análisis de las combinaciones

Los isobogramas son representaciones gráficas en un sistema de coordenadas de dosis equiefectivas de dos fármacos o sustancias. En cada uno de los ejes se representa la dosis equiefectiva de uno de los fármacos que se estudian, en este caso se denominan (D_a) y (D_b) respectivamente. Estos dos puntos se unen mediante una línea (isobolo) que también se conoce como línea de aditividad o de no interacción. En la Figura 12 se representa el valor de dosis de la combinación de ambos fármacos (d_a, d_b), que es equiefectiva con las dosis individuales de los fármacos. Cuando los fármacos no interaccionan (interacción cero) los puntos que representan las dosis isoeffectivas de la combinación están situados sobre el isobolo formando una línea recta (Zhao et al., 2004).

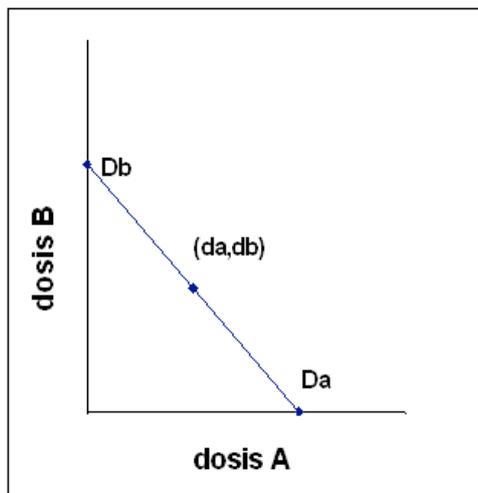


Figura 12. Isoblograma de interacción cero de una combinación de los fármacos A y B

Cada uno de los puntos de esta línea representa una combinación de A y B en la que las sustancias se comportan de modo aditivo, es decir, no se produce interacción.

Cuando la combinación es más efectiva de lo que se espera, se requiere menos cantidad de d_a y/o d_b para producir el mismo efecto, mientras que D_a y D_b permanecen inalteradas, con lo que se define un isoblograma cóncavo (sinergia) (Figura. 13).

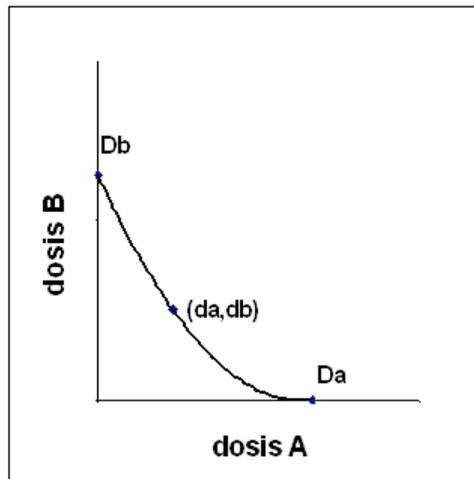


Figura 13. Isoblograma de interacción sinérgica de una combinación de los fármacos A y B.

Por otra parte, cuando los agentes en combinación son menos efectivos que lo esperado, d_a y/o d_b deberán ser incrementados con el fin de obtener el mismo efecto (antagonismo). La gráfica en este caso describe un isobolo convexo (Figura 14).

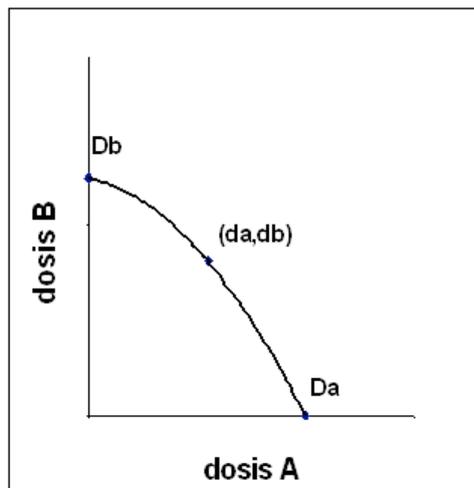


Figura 14. Isoblograma de interacción antagónica de una combinación de los fármacos A y B

El método más utilizado para evaluar interacciones entre fármacos es el modelo de aditividad de Loewe (Lee et al. 2007). Se define de la siguiente manera:

$$\frac{a}{A} + \frac{b}{B} = \gamma$$

Ecuación 2. Índice de Interacción (γ). Donde a y b son las dosis de los fármacos 1 y 2 en mezcla, los cuales producen un efecto y, mientras que A y B son las dosis de los fármacos 1 y 2 que producen el mismo efecto y cuando son administrados por separado. γ es denotado como el índice de interacción; si $\gamma=1$ la combinación es aditiva, si $\gamma<1$ es sinérgica y si $\gamma>1$ es antagónica (Tallarida, 2002).

Para evaluar la interacción entre cisplatino y el extracto hidroalcohólico de *L. graveolens*, así como la interacción entre cisplatino y ácido 3 α -hidroximasticadienónico se calculó el índice de interacción (γ) para las tres distintas combinaciones que fueron probadas en cada experimento. A corresponde a la CI_{50} del cisplatino, B a la CI_{50} del extracto en el primer experimento, y del ácido 3 α -hidroximasticadienónico en el segundo experimento y (a,b) es la concentración de la combinación de CDDP y EHA o bien de CDDP y 3 α AMD que produce el mismo efecto, es decir, un 50% de la inhibición de la proliferación celular.

7. Resultados

7.1. Rendimiento del extracto

El rendimiento de la extracción hidroalcohólica de *L. graveolens* fue el siguiente:

Cuadro 6. Rendimiento del extracto hidroalcohólico obtenido a partir de las partes aéreas vegetativas de *L. graveolens*.

Extracto	Peso del material vegetal (g)	Peso del extracto (g)	Rendimiento del extracto (%)
Extracto hidroalcohólico (EHA)	1000	236.16	23.62%

7.2. Aislamiento de metabolitos secundarios

A partir de la C1 se obtuvieron 113 fracciones de 10 mL cada una. Las fracciones 30-35, que fueron eluidas con Hexano/AcOEt (8:2) presentaron un perfil cromatográfico semejante en CCF, por lo cual fueron reunidas y de esta reunión se aislaron 3 mg de un sólido café. Por medio de la comparación con sus datos espectroscópicos con aquellos presentes en la literatura (Ver Anexos), se pudo elucidar su estructura y se identificó como **ladaneina (1)**.

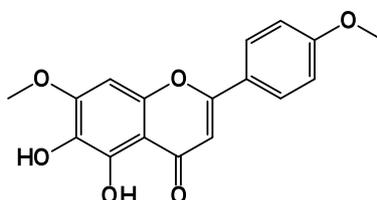


Figura 15. Estructura química de la **ladaneina (1)**

A partir de la C2 se obtuvieron 194 fracciones de 250 mL cada una. Las fracciones 101-110, que se eluyeron con Hexano/AcOEt (9:1), fueron reunidas

debido a la similitud en su perfil cromatográfico y se aislaron 48.2 mg de un sólido café claro. Dada la comparación de sus datos espectroscópicos con aquellos reportados en la literatura (ver Anexos) se identificó como **sakuranetina (2)**

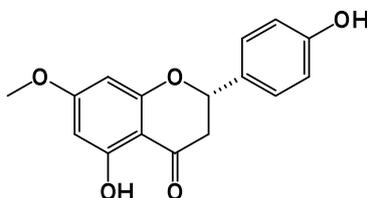


Figura 16. Estructura química de la **sakuranetina (2)**

7.3. Resultados de las pruebas biológicas del extracto hidroalcohólico

7.3.1. Actividad anti-inflamatoria

En la primera fila del cuadro 7 se presenta el peso promedio del edema en aquellos animales que no estuvieron sometidos a ningún tratamiento. En la segunda fila se presenta el peso promedio del edema de los animales a los cuales se les administró tópicamente 1 mg por oreja de EHA. Como se puede observar, sí se presentó una disminución en el tamaño del edema como consecuencia de la administración de EHA. Por medio de un análisis estadístico de *t* de Student, se puede afirmar que a una dosis de 1 mg por oreja, el EHA presenta actividad anti-inflamatoria significativa.

Cuadro 7. Actividad anti-inflamatoria de EHA en el ensayo de edema auricular en ratón inducido por TPA.

Muestra	Dosis por oreja	Edema (mg)	Inhibición inflamatoria (%)
TPA		16.10±0.40	
TPA+EHA	1 mg	10.47±0.41*	34.99*

Los datos representan el promedio de tres animales ± el error estándar. Los valores de $p \leq 0.05$ (*) se consideran como diferencia estadísticamente significativa con respecto al control. Vehículo: EtOH/Acetona 1:1

7.3.2. Actividad anti-proliferativa

En las líneas celulares U251, HCT-15, MCF-7 y SKLU-1 la proliferación celular fue inhibida completamente al tratarse con EHA a una dosis de 50 µg/mL. En el caso de la línea celular K562, la inhibición fue también bastante alta. La línea de PC-3 no fue utilizada en este experimento, debido a que al momento de realizar el ensayo no se contaba con una cantidad suficiente de células.

Cuadro 8. Actividad antiproliferativa de EHA en líneas de cáncer humano mediante el método de SRB

Inhibición del crecimiento en líneas celulares de cáncer humano (%)						
Muestra (50 µg/mL)	U251 (glioblastoma)	PC-3 (adenocarcinoma de próstata)	K562 (leucemia mielóide crónica)	HCT-15 (adenocarcinoma colorrectal)	MCF-7 (adenocarcinoma de mama)	SKLU-1 (adenocarcinoma de pulmón)
EHA	100	No probado	99.76	100	100	100

7.4. Resultados de las pruebas biológicas de la sakuranetina (2)

Debido a la poca cantidad de ladaneina (1) que se aisló (3 mg), no fue posible evaluar su actividad anti-inflamatoria y antiproliferativa. Los resultados de la evaluación de la actividad anti-inflamatoria y antiproliferativa de la sakuranetina (2) se muestran a continuación.

7.4.1. Actividad anti-inflamatoria

Aunque sí se presentó una disminución del peso del edema en el grupo al cual se le administró sakuranetina (2) con respecto al grupo sin ningún tratamiento, esta diferencia no es estadísticamente significativa, por lo que 2 no proporciona una actividad anti-inflamatoria con significancia estadística.

Cuadro 9. Actividad anti-inflamatoria de la sakuranetina (2) en el ensayo de edema auricular en ratón inducido por TPA.

Muestra	Dosis por oreja	Edema (mg)	Inhibición inflamatoria (%)
TPA		16.27±0.63	
TPA+2	1 µmol	12.30±0.78	24.39

Los datos representan el promedio de tres animales ± el error estándar. Vehículo: Cloruro de Metileno/ Acetona 1:1

7.4.2. Actividad antiproliferativa

En el cuadro 10 se aprecia que sakuranetina (2) inhibió por completo la proliferación celular de las líneas U251, PC-3, K562 y SKLU-1 a una dosis de 50 µg/mL. La actividad antiproliferativa no fue tan considerable en MCF-7, con un 88.4% de inhibición, mientras que HCT-15 no fue probada en este experimento debido a que al momento de realizar el ensayo no se contaba con una cantidad suficiente de células.

Cuadro 10. Actividad antiproliferativa de la sakuranetina (**2**) en líneas de cáncer humano mediante el método de SRB

Inhibición del crecimiento en líneas celulares de cáncer humano (%)						
Muestra	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
(50 µg/mL o 174 µM)	(glioblasto- ma)	(adenocarcino- ma de próstata)	(leucemia mieloide crónica)	(adenocarcino- ma colorrectal)	(adenocarcino- ma de mama)	(adenocarcino- ma de pulmón)
2	100	100	100	No probado	88.4	100

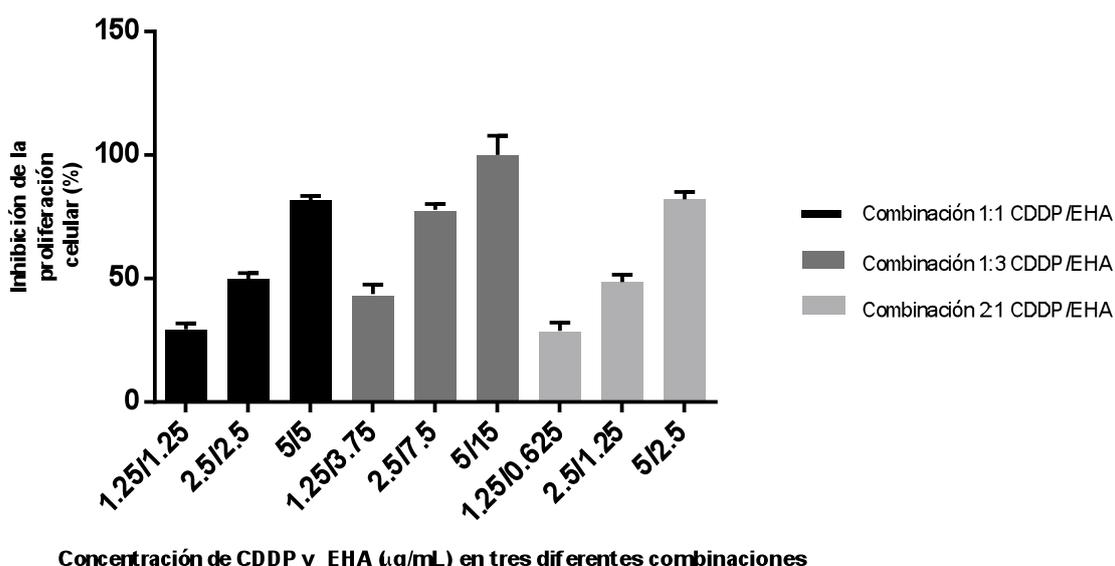
Debido a la considerable actividad antiproliferativa que presentó sakuranetina (**2**) a 50 µg/mL, se prosiguió a determinar su CI_{50} en las líneas K562 y PC-3 (ver Anexos).

Cuadro 11. Valores de CI_{50} de **2** en las líneas K562 y PC-3.

Valores de CI_{50} (µM) n=3		
Compuesto	K562	PC-3
	(leucemia mieloide crónica)	(adenocarcinoma de próstata)
2	14.3±1.9	18.6±1.7

7.5. Evaluación antiproliferativa en la línea PC-3 de combinaciones a diferentes concentraciones de cisplatino y extracto hidroalcohólico de *L. graveolens*

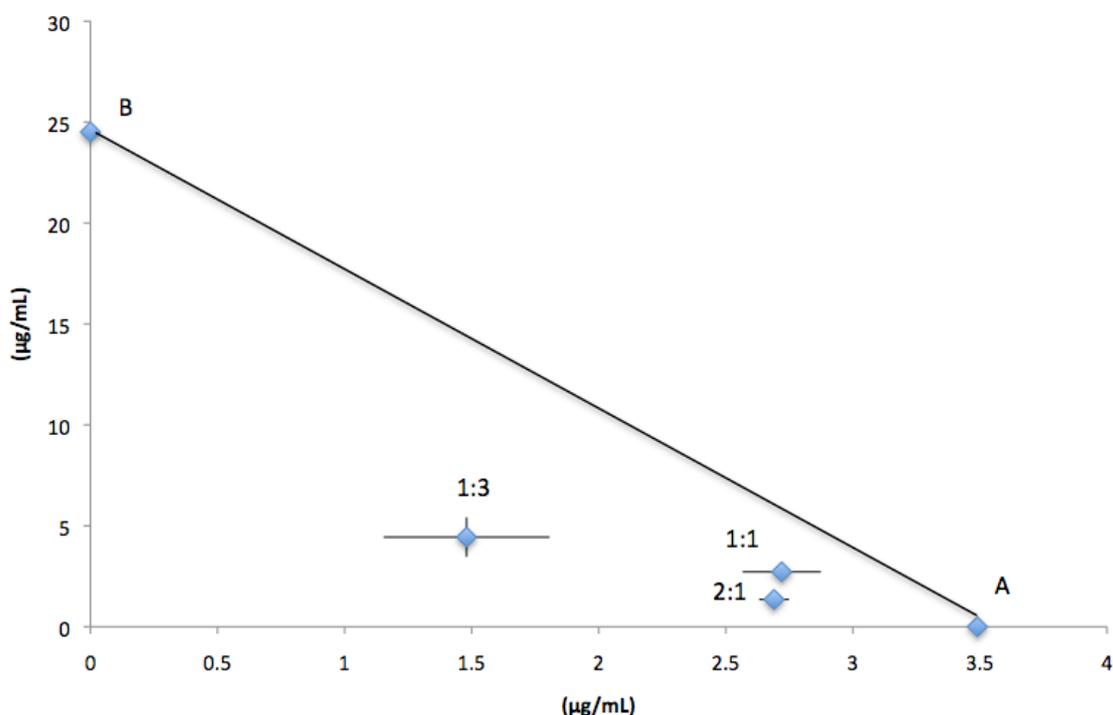
Si bien se probaron cuatro concentraciones por combinación, es decir, se probaron en total 12 diferentes concentraciones (Cuadro 4), sólo se graficaron 9 de ellas, pues a una concentración de 10 µg/mL de CDDP se inhibe el 100% de la proliferación celular, por lo que la combinación CDDP/EHA que contenga esta concentración de CDDP también va a inhibir el 100% de la proliferación y no se va a apreciar la contribución de EHA a la actividad antiproliferativa, así que se decidió no graficar la actividad antiproliferativa a esta concentración de CDDP.



Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de la proliferación de células de la línea PC-3 de tres diferentes combinaciones de cisplatino (CDDP) y extracto hidroalcohólico de *L. graveolens* (EHA) a varias concentraciones.

En la Gráfica 1 se presenta la inhibición de la proliferación que ejerció cada combinación de CDDP y EHA, donde las tres primeras columnas corresponden a la combinación 1:1 (CDDP/EHA), las siguientes tres columnas representan la combinación 1:3 (CDDP/EHA) y las últimas columnas son de la combinación 2:1 (CDDP/EHA). Cada par de cifras en el eje de las abscisas corresponde a la

concentración de CDDP y a la concentración de EHA (expresadas en $\mu\text{g/mL}$) que se utilizaron para cada combinación.



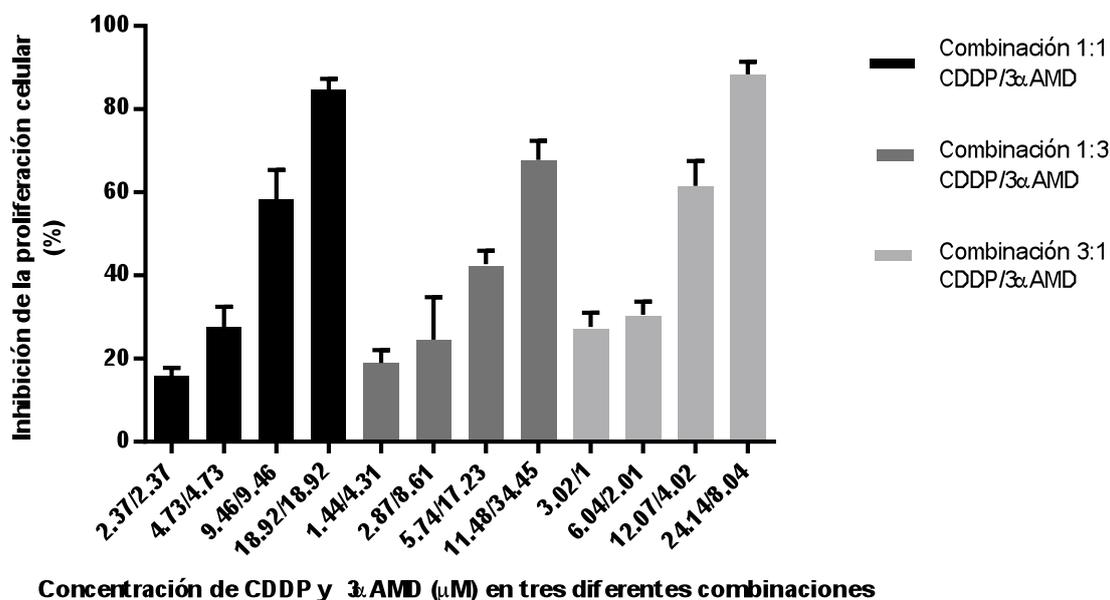
Gráfica 2. Isoblograma que ilustra las concentraciones de A (CDDP) y B (EHA) que, actuando independientemente, producen el 50% de la inhibición de la proliferación celular en la línea PC-3. La línea que conecta los puntos de A y B es la línea de aditividad. Los otros tres puntos graficados corresponden a las concentraciones de ambos compuestos, en combinaciones 1:1, 1:3 y 2:1 (CDDP/EHA), que producen el 50% de la inhibición de la proliferación celular.

Utilizando el método de Loewe, se calculó el índice de interacción (γ) para cada combinación.

Cuadro 12. Índice de interacción (γ) de las tres diferentes combinaciones de CDDP y EHA

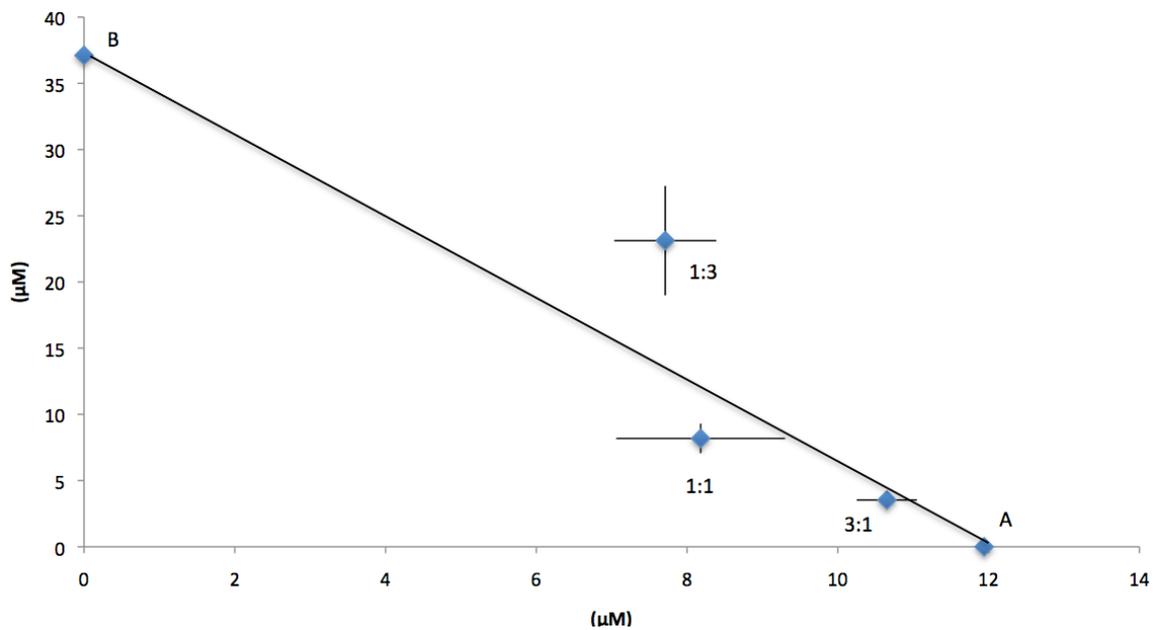
Combinación (CDDP/ EHA)	Índice de Interacción (γ)
1:1	0.891
1:3	0.606
2:1	0.827

7.6. Evaluación antiproliferativa en la línea PC-3 de combinaciones a diferentes concentraciones de cisplatino y ácido 3 α -hidroximasticadienónico



Gráfica 3. Porcentaje de inhibición de la proliferación de células de la línea PC-3 de tres diferentes combinaciones de cisplatino (CDDP) y ácido 3 α -hidroximasticadienónico (3 α AMD) a varias concentraciones.

En la gráfica 3 se muestran los porcentajes de inhibición de la proliferación celular de en la línea PC-3 que producen determinadas combinaciones de cisplatino y ácido 3 α -hidroximasticadienónico a diferentes concentraciones. Las primeras cuatro columnas corresponden a diferentes concentraciones de la combinación 1:1 (CDDP/3 α AMD), las siguientes cuatro son las distintas concentraciones de la combinación 1:3 (CDDP/3 α AMD) y las últimas cuatro son las correspondientes a las concentraciones de la combinación 3:1 (CDDP/3 α AMD). Cada par de cifras del eje de las abscisas corresponden a la concentración en μ M de cisplatino y a la concentración en μ M del ácido 3 α -hidroximasticadienónico que se utilizaron para realizar la combinación.



Gráfica 4. Isoblograma que ilustra las concentraciones de A (CDDP) y B (3 α AMD) que, actuando independientemente, producen el 50% de la inhibición de la proliferación celular en la línea PC-3. La línea que conecta los puntos de A y B es la línea de aditividad. Los otros tres puntos graficados corresponden a las concentraciones de ambos compuestos, a las combinaciones 1:1, 1:3 y 3:1 (CDDP/3 α AMD), que producen el 50% de la inhibición de la proliferación celular.

A continuación se presentan los valores del Índice de Interacción obtenidos a partir de la Ecuación 2. para cada una de las combinaciones que fueron probadas.

Cuadro 13. Índice de interacción (γ) de las tres diferentes combinaciones de CDDP y 3 α AMD

Combinación (CDDP/ 3 α AMD)	Índice de Interacción (γ)
1:1	0.905
1:3	1.268
3:1	0.986

8. Discusión

México es el principal exportador de *L. graveolens* a nivel mundial (González-Güereca et al., 2007). El 80% del orégano colectado en México es exportado a los Estados Unidos de América, donde es procesado con el fin de obtener sus aceites esenciales (Granados-Sánchez et al., 2013). Es por esto que los estudios de *L. graveolens* se han enfocado principalmente en la composición química de sus aceites esenciales.

Sin embargo es conocido que *L. graveolens* se utiliza como remedio herbolario para varios síntomas. Adicionalmente se sabe que *L. graveolens* sintetiza flavonoides con propiedades antiinflamatorias e inhibitorias de la proliferación de células cancerosas (González-Güereca et al., 2010). Tomando en cuenta lo anterior decidimos evaluar las propiedades anti-inflamatorias y antiproliferativas del extracto hidroalcohólico (EHA) de esta planta.

Nuestros resultados indicaron que en el ensayo de edema auricular en ratón inducido por TPA, EHA presentó actividad anti-inflamatoria estadísticamente significativa a una dosis de 1 mg por oreja. Así mismo, los resultados de la evaluación de la actividad antiproliferativa, mediante el método de sulforrodamina B en líneas de cáncer humano, mostraron que EHA a una dosis de 50 µg/mL inhibe completamente la proliferación de las líneas celulares de cáncer humano: glioblastoma, adenocarcinoma colorrectal, adenocarcinoma de mama y adenocarcinoma de pulmón, e inhibe al 99.76% la proliferación de la línea celular de leucemia mieloide crónica.

Con el fin de obtener los posibles responsables de las actividades antiinflamatorias e inhibidoras de la proliferación celular se propuso el aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en EHA. El tratamiento de EHA con acetato de etilo produjo nuevo extracto (EHAA), el cual se sometió a cromatografía en columna abierta obteniéndose ladaneína (una flavona) y sakuranetina (una flavanona).

Es sabido que la síntesis de los diferentes metabolitos secundarios en una especie vegetal, se debe a la expresión de un sinnúmero de enzimas. También es conocido que la expresión del aparato enzimático de la especie es una consecuencia directa de la expresión génica, la cual está regulada por diversos estímulos tanto endógenos como exógenos. Por consiguiente, la presencia de los diversos metabolitos secundarios en una especie depende en gran medida de las condiciones de crecimiento de dicha especie (Ramakrishna y Ravishankar, 2011). Un ejemplo de lo anterior, lo constituye el hecho de que en un estudio previo, nuestro equipo de trabajo aisló el glucósido de flavanona, el (-)(2S)-5,6,7,3',5'-pentahidroxi-flavanona-7-O-β-D-glucopiranosido. Este compuesto fue aislado a partir del extracto de acetato de etilo de las partes aéreas de *L. graveolens*. Sin embargo, en el presente estudio no se encontró este compuesto, ni varios otros que fueron identificados en el ensayo de LC-DAD-ESI/MS de Lin et al. (2007).

Esta es la primera ocasión que se aísla ladaneína (**1**) de *L. graveolens*. Sin embargo, debido a que solamente se obtuvieron 3 mg de **1**, no se pudieron realizar pruebas biológicas para evaluar su actividad anti-inflamatoria y antiproliferativa. Se ha reportado previamente que **1**, aislada a partir de *Marrubium peregrinum*, presenta inhibición celular en las líneas K562, K562R y 679 (Alkhatib et.al., 2010).

Por otro lado, la sakuranetina (**2**) ya había sido detectada en un extracto de metanol de *L. graveolens* mediante un análisis de cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos y espectrometría de masas (LC-DAD-ESI/MS) (Lin et al., 2007). La presencia de dicha flavanona se corrobora en el presente estudio, en el cual se informa por primera vez el aislamiento de **2** a partir de un extracto hidroalcohólico de *L. graveolens*. Adicionalmente, nuestros resultados indicaron que **2** presentó una inhibición completa en las líneas de glioblastoma, adenocarcinoma de próstata, leucemia mieloide crónica y adenocarcinoma de pulmón, y una inhibición al 88.4% de la proliferación de la línea de adenocarcinoma de mama, a una concentración de 50 μM.

En estudios previos, **2** ya había sido evaluada como compuesto antiproliferativo contra diversas líneas celulares de cáncer, como son HeLa, de seno, melanoma y adenocarcinoma de colon. Los resultados de estos ensayos señalaron que **2** posee una actividad antiproliferativa de actividad baja a media (Ohtsuki et al. 2004; Lambert et al. 2005; Pichette et al. 2010; Wesołowska et al. 2012). Lo anterior contrasta con el presente trabajo, en el cual **2** presentó actividad significativa contra las líneas de leucemia mieloide crónica y adenocarcinoma de próstata, con valores de CI_{50} de $14.3 \pm 1.9 \mu M$ y $18.6 \pm 1.7 \mu M$ respectivamente. Estos resultados indican que las líneas de leucemia mieloide crónica y adenocarcinoma de próstata son más susceptibles a la actividad de **2**.

Así mismo, EHA presentó una inhibición inflamatoria del 34.99% en modelo de edema auricular en ratón inducido por TPA a una dosis de 1 mg por oreja. Sin embargo, **2** solo presentó una inhibición de la inflamación de 24.39% a una dosis de 1 mg por oreja. Si bien puede ser que **2** esté contribuyendo a la actividad anti-inflamatoria de EHA, deben existir en dicho extracto otros componentes anti-inflamatorios que produzcan el efecto total de EHA, o bien que estén actuando sinérgicamente en combinación con **2** y potenciando su efecto.

Debido a que una inhibición de la inflamación del 24.39% producida por **2** no es de significancia estadística ó biológica (la indometacina, un fármaco anti-inflamatorio, presenta una inhibición de la inflamación de 64.1% a dosis de 1 mg por oreja (Oviedo-Chávez et al., 2004)), es poco probable que la actividad antiproliferativa de **2** este relacionada con su actividad anti-inflamatoria.

Es conocido que las células cancerosas evaden, mediante varios mecanismos, su eliminación. Uno de ellos es la resistencia que desarrollan a los diferentes fármacos citotóxicos, como al cisplatino (CDDP). Tomando en cuenta lo anterior, una aproximación es tratar a las células cancerosas con combinaciones de dos o más fármacos. La lógica detrás de estas combinaciones es combatir a las células cancerosas bajo dos mecanismos diferentes.

El cisplatino es un efectivo agente antineoplásico usado comúnmente en el tratamiento de varios tipos de tumores. Sin embargo, se trata de un fármaco muy tóxico y los efectos secundarios que produce disminuyen considerablemente la calidad de vida de los pacientes. En muchos casos, una cantidad suficiente del fármaco para el tratamiento del cáncer no puede ser administrada debido a los severos efectos secundarios que se presentan. Por lo tanto, surge como alternativa el administrar suplementos que refuercen la actividad del fármaco antineoplásico. Si bien en un principio no se probó la actividad antiproliferativa del extracto EHA en PC-3 por falta de células, se puede suponer que la sakuranetina -la cual inhibe la proliferación del 100% de las células PC-3 a 50 µg/mL, y que se encuentra presente en EHA- puede conferirle actividad antiproliferativa a EHA, por lo cual se decidió evaluar la línea de cáncer de próstata humano PC-3 con la combinación de CDDP y extracto hidroalcohólico de *L. graveolens*.

En el Cuadro 14 se resumen las combinaciones y las concentraciones en µg/mL utilizadas de CDDP y EHA así como los efectos de inhibición de la proliferación en la línea de cáncer de próstata PC-3.

Cuadro 14. Inhibición de la proliferación de la línea PC-3 al utilizar diferentes combinaciones y concentraciones de cisplatino (CDDP) y extracto hidroalcohólico de *L. graveolens* (EHA)

Combinación (CDDP/EHA)	Concentración (µg/mL)	Inhibición de la proliferación (%)	DE ₅₀ (CDDP/EHA)
1:1	1.25/1.25	29.49	
	2.5/2.5	49.71	2.72 µg/mL* / 2.72 µg/mL
	5/5	81.68	
	10/10	100	*2.72 µg/mL CDDP =9.05 µM
1:3	1.25/3.75	43.68	
	2.5/7.5	77.84	1.48 µg/mL* / 4.44 µg/mL
	5/15	100	
	10/30	100	*1.48 µg/mL CDDP =4.92 µM
2:1	1.25/0.625	28.83	
	2.5/1.25	48.54	2.69 µg/mL* / 1.35 µg/mL
	5/2.5	82.12	
	10/5	100	*2.69 µg/mL CDDP =8.95 µM
CI ₅₀ de CDDP individual:		DE ₅₀ de EHA individual:	
3.49 µg/mL		24.51 µg/mL	

En la formulación de las tres combinaciones evaluadas, se utilizaron las mismas concentraciones de CDDP (1.25, 2.5 y 5.0 µg/mL) variando solamente las concentraciones de EHA (Cuadro 14). Como se puede observar en todas las combinaciones al aumentar las concentraciones de CDDP y EHA, aumenta la inhibición de la proliferación celular, por lo tanto, la actividad es dependiente de la dosis de ambas sustancias. Llama la atención que en las combinaciones 1:1 y 2:1 (CDDP/EHA) los porcentajes de inhibición fueran muy similares. Estos resultados indican que en estas combinaciones, un aumento al doble de la concentración de EHA no influye marcadamente en la actividad. Por el contrario en la combinación 1:3, la inhibición de la proliferación aumentó en comparación a las otras combinaciones. Este resultado indica que el aumento de tres veces la dosis de EHA en la combinación es importante para la actividad.

Para simplificar el análisis de las combinaciones de CDDP y EHA solo se tomaron en cuenta las dosis efectivas que produjeran el 50% de la inhibición de proliferación de las células PC-3. Así para EHA fue de 24.51 $\mu\text{g/mL}$ y para CDDP fue de 3.49 $\mu\text{g/mL}$. Estos valores se ubicaron en los ejes del isoblograma (Gráfica 2).

Tomando en cuenta los valores de DE_{50} de las combinaciones evaluadas, nuestros resultados indican que el índice de interacción (γ) de las tres combinaciones es menor a 1, por lo que de acuerdo al modelo de Loewe, CDDP y EHA actúan de manera sinérgica. En el isoblograma (Gráfica 2), los tres puntos que se encuentran dentro del plano cartesiano y que corresponden a las dosis efectivas que inhiben el 50% de la proliferación de las tres combinaciones, se localizan por debajo de la línea de aditividad que une a las concentraciones de CDDP y de EHA por separado, lo cual confirma su carácter sinérgico.

Nuestros resultados indican que la mejor combinación de CDDP y EHA es la 1:3, ya que en esta se usa una menor concentración de CDDP y se obtiene mayor actividad.

Si bien éste se trata de un experimento *in vitro*, los resultados nos llevan a pensar que a un paciente que se encuentra en tratamiento de CDDP, se le podría prescribir, como suplemento a la quimioterapia, infusiones de *L. graveolens*. Al combinar la quimioterapia con las infusiones de esta planta, la dosis de CDDP podría reducirse considerablemente debido a la sinergia entre ambos, trayendo ventajas para el paciente, como una disminución de los efectos secundarios producidos por CDDP.

Nuestros estudios previos así como de otros grupos de investigación han demostrado que el extracto de *L. graveolens* es una mezcla compleja de varios compuestos, donde sobresalen los flavonoides. Además, se conoce que algunos flavonoides como la sakuranetina, presente en EHA, poseen actividad citotóxica. Por lo tanto es factible suponer que, la sakuranetina, así como otros flavonoides pueden contribuir a la actividad antiproliferativa mediante una

sinergia con el CDDP. Para comprobar esta propuesta, sería necesario realizar otros estudios, combinando CDDP con la sakuranetina y otros flavonoides presentes en EHA, de manera individual. También sería interesante conocer el mecanismo de acción de la sakuranetina, con el fin de poder hacer predicciones sobre la naturaleza de su interacción con CDDP.

Originalmente, la intención era probar sakuranetina combinada con CDDP en este mismo modelo experimental, con el fin de comprobar si un compuesto puro podía presentar actividad sinérgica tal como la tuvo el extracto. Sin embargo, no se contó con la cantidad suficiente de sakuranetina para realizar este experimento.

Por otro lado, existe evidencia que los triterpenos poseen actividad antineoplásica y refuerzan la actividad de los fármacos anticarcinogénicos en diversas líneas celulares (Yamai et al., 2009). Tomado en cuenta lo anterior, se decidió probar diversas combinaciones de CDDP y ácido 3 α -hidroximasticadienónico (3 α AMD), uno de los triterpenos mayoritarios de *A. adstringens* que posee actividad antiproliferativa contra líneas celulares de cáncer humano.

En el cuadro 15 se resumen las combinaciones y las concentraciones en μM utilizadas de CDDP y 3 α AMD así como los efectos de inhibición de la proliferación en la línea de cáncer de próstata PC-3. La CI_{50} de CDDP individual en este experimento fue 11.94 μM , mientras que la CI_{50} de 3 α AMD fue 37.11 μM .

Cuadro 15. Inhibición de la proliferación de la línea PC-3 al utilizar diferentes combinaciones y concentraciones de CDDP y 3 α AMD

Combinación (CDDP/3 α AMD)	Concentración (μ M)	Inhibición de la proliferación (%)	CI ₅₀ (CDDP/3 α AMD)
1:1	2.37/2.37	15.88	8.18 μ M /8.18 μ M
	4.73/4.73	27.59	
	9.46/9.46	58.28	
	18.92/18.92	84.65	
1:3	1.44/4.31	18.94	7.71 μ M /23.12 μ M
	2.87/8.61	24.53	
	5.74/17.23	42.72	
	11.48/34.45	67.83	
3:1	3.02/1	28.01	10.65 μ M /3.53 μ M
	6.04/2.01	30.55	
	12.07/4.02	61.57	
	24.14/8.04	88.33	
CI ₅₀ de CDDP individual:		CI ₅₀ de 3 α AMD individual:	
11.94 μ M		37.11 μ M	

Como se aprecia en la Gráfica 3, en las tres combinaciones (1:1, 1:3 y 3:1) a mayor concentración de compuestos, el porcentaje de la inhibición de la proliferación celular aumenta, por lo cual la actividad es dependiente de la dosis.

Para comprobar la interacción entre CDDP y 3 α AMD se calculó el índice de interacción. Los resultados indicaron que para las combinaciones 1:1 y 3:1, el índice de interacción fue $\gamma < 1$, mientras que para la combinación 1:3 resultó $\gamma > 1$. Tomando en cuenta estos resultados y de acuerdo con el modelo de Loewe, las combinaciones 1:1 y 3:1 son sinérgicas, mientras que la combinación 1:3 es antagonista, lo cual es congruente con el modelo del isoblograma, pues los puntos que se encuentran por debajo de la línea de aditividad corresponden a combinaciones sinérgicas, mientras que aquellos puntos arriba de la línea son de combinaciones antagonistas.

Es importante hacer hincapié que lo que se pretende es utilizar la menor cantidad posible de CDDP, debido a su alta toxicidad, y combinarlo con la cantidad necesaria de 3 α AMD de tal forma que se obtenga la mayor actividad antiproliferativa posible. La eficacia aumentada de la combinación de compuestos usados puede reducir la dosis necesaria de CDDP, minimizando así los efectos secundarios de éste.

Por lo tanto, en el Cuadro 15 así como en el isoblograma (Gráfica 4) se puede apreciar que el valor máximo de concentración tanto de CDDP como de 3 α AMD usados en combinación no sobrepasa la CI_{50} de CDDP ni de 3 α AMD individuales. Por consiguiente, administrar CDDP y 3 α AMD en combinación disminuye la cantidad que debe ser empleada individualmente de ambos compuestos.

Un estudio paralelo de nuestro equipo de trabajo demostró que en la línea celular PC-3, 3 α AMD arresta el ciclo celular en la fase G1, inhibe la fosforilación de AKT cinasa (es decir, inhibe su activación, evitando así que esta enzima a su vez fosforile a otros sustratos pro-supervivencia) (Figura 17) y finalmente induce la apoptosis. Además, 3 α AMD no es tóxica en células no cancerosas. Por otro lado, aunque el ADN ha sido considerado como el blanco del CDDP, su mecanismo a nivel celular aún es desconocido (Rebillard et al., 2007). Sin embargo, es probable que al estar actuando CDDP y 3 α AMD por mecanismos celulares distintos, la presencia de uno de los compuestos potencie la acción del otro.

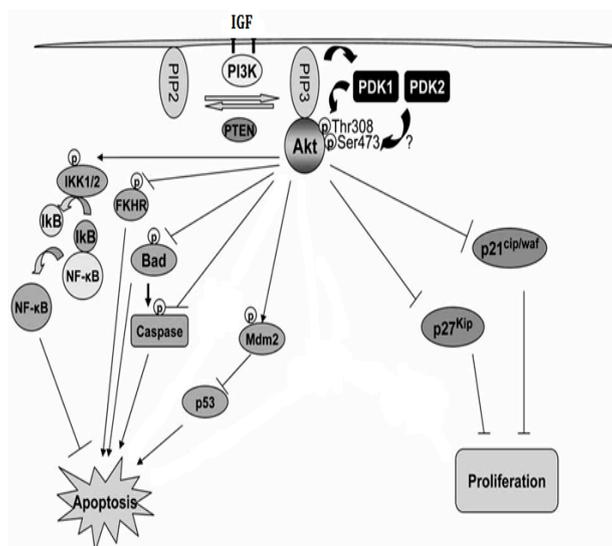


Figura 17. Vía de señalización de AKT (Wang et al., 2007)

Adicionalmente a los efectos secundarios que produce el cisplatino, otra de las limitaciones de su uso es que en algunos casos, en específico en cáncer colorectal, de pulmón y de próstata, los tumores se vuelven resistentes a este fármaco. Por lo tanto, una combinación entre cisplatino y algún agente de origen vegetal, puede ayudar a vencer esta resistencia, atacando diferentes blancos bioquímicos y mejorando la eficacia clínica sin superar la toxicidad permitida.

Es probable que no solo las diferentes combinaciones y concentraciones de dos compuestos ejerzan distintos grados de sinergia y antagonismo. También puede estar involucrado el orden en que se administran los compuestos, así como el tiempo que las células se encuentran sometidas a los compuestos.

Los experimentos *in vitro* que fueron realizados con diferentes combinaciones y concentraciones de cisplatino y sustancias de origen vegetal, arrojaron resultados prometedores, los cuales impulsan a continuar estos estudios *in vivo*.

9. Conclusiones

En el presente informe se da a conocer el aislamiento, por vez primera, de los flavonoides sakuranetina y ladaneína a partir de un extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de de *Lippia graveolens* Kunth. La identificación de estos compuestos se logró mediante la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con aquellos publicados para estos flavonoides en la literatura.

La sakuranetina presentó una moderada actividad anti-inflamatoria; sin embargo, presentó una considerable actividad antiproliferativa, con valores de CI_{50} de $14.3 \pm 1.9 \mu\text{M}$ contra la línea de leucemia mieloide crónica y $18.6 \pm 1.7 \mu\text{M}$ contra la línea de adenocarcinoma de próstata.

De las combinaciones de cisplatino y extracto hidroalcohólico de *L. graveolens* que fueron probadas en células de cáncer de próstata, la mejor fue la 1:3 (CDDP/EHA), debido a su alto grado de sinergismo según el modelo de aditividad de Loewe. Además, esta fue la combinación que presentó la DE_{50} más baja, con valores de $1.48 \mu\text{g/mL}$ de cisplatino y $4.44 \mu\text{g/mL}$ de extracto hidroalcohólico.

En el experimento donde se combinó cisplatino y ácido 3α -hidroximasticadienónico, la combinación con mayor actividad de las tres probadas según el modelo de aditividad de Loewe, fue de 1:1 (CDDP/ 3α AMD). Sin embargo, la combinación que presentó la menor CI_{50} fue la combinación 1:3, cuyos valores corresponden a $7.71 \mu\text{M}$ de cisplatino y $23.12 \mu\text{M}$ de ácido 3α -hidroximasticadienónico.

10. Referencias

- Alkhatib R, S Joha, M Cheok, V Roumy, T Idziorek, C Preudhomme, B Quesnel, S Sahpaz, F Bailleul, T Hennebelle. (2010). Activity of Ladanein on Leukemia Cell Lines and Its Occurrence in *Marrubium vulgare*, *Planta Medica*, 76: 86–87.
- Alonso-Castro AJ, ML Villarreal, LA Salazar-Olivo, M Gómez-Sanchez, F Dominguez, A García-Carranca. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J Ethnopharmacol.* 133(3):945-72.
- Alonso-Castro AJ, JJ Maldonado-Miranda, A Zarate-Martinez, MR Jacobo-Salcedo, C Fernández-Galicia, LA Figueroa-Zuñiga, NA Rios-Reyes , MA de León-Rubio, NA Medellín-Castillo, A Reyes-Munguia, R Méndez-Martínez, C Carranza-Álvarez. (2012). Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, México. *J Ethnopharmacol.* 143(1):292-8.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009) [en línea]. [Consultada el 12 de enero de 2014]. Disponible: <<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>>
- Castillo-Juárez I, F Rivero-Cruz, H Celis, I Romero. (2007). Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *J Ethnopharmacol.* 114(1):72-7.
- Castillo-Juárez I, R García-Contreras, N Velázquez-Guadarrama M, Soto-Hernández, M Martínez-Vázquez. (2013). *Amphipterygium adstringens* anacardic acid mixture inhibits quorum sensing-controlled virulence factors of *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Med Res.* 44(7):488-94.
- Croteau R, TM Kutchan, NG Lewis. (2000). Cap. 24. Natural products (secondary metabolites) En: B. Buchanan, W. Grisse, and R. Jones, eds., *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. (pp. 1250–1268). Rockville, MD. American Society of Plant Biologists.
- Cseke LJ, A Kirakosyan, PB Kaufman, S Warber, JA Duke, HL Brielmann. (1998). *Natural Products from Plants (First Edition)*. USA: CRC Press.

- Dalla Via L, A Braga, AN García-Argáez, M Martínez-Vázquez, A Toninello. (2012). 3 α -Hydroxymasticadienonic acid as an antiproliferative agent that impairs mitochondrial functions. *J Nat Prod.* 27;75(4):557-62.
- De la Cruz M. (1964). *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, IMSS, México.
- Dhimi N. (2013). Trends in Pharmacognosy: A modern science of natural medicines, *Journal of Herbal Medicine*, 3(4):123-131.
- Ebadi M. (2006). *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine* (Second Edition). USA: CRC Press.
- Enger E, F Ross, D Bailey. (2011). *Concepts in Biology* (Fourteenth Edition). McGraw-Hill Education.
- EOL (Encyclopedia of Life). (2014) [en línea]. [Consultada el 27 de febrero de 2014]. Disponible: <<http://eol.org/pages/5614174/overview>>
- Firenzuoli F y L Gori. (2007). Herbal Medicine Today: Clinical and Research Issues. *Evid Based Complement Alternat Med.* 4(1):37-40.
- Florea AM, D Büsselberg. (2011). Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers* 3(1):1351-1371.
- Gershenzon J, N Dudareva. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol.* 3(7):408-14.
- Gil ES y Cout RO. (2013). Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. *Rev. bras. farmacogn* 23(3): 542-558.
- GLOBOCAN. (2014) [en línea]. [Consultada el 21 de febrero de 2014]. Disponible: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>
- González-Coloma A, C López-Balboa, O Santana, M Reina, BM Fraga. (2011). Triterpene-based plant defensas. *Phytochem Rev.* 10(2):245-260.
- González-Güereca MC, G Kite, M Martínez-Vázquez, M Soto-Hernández. (2007). Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Revista Fitotecnia Mexicana.* 30(1):43-49.
- González-Güereca MC, M Soto-Hernández, M Martínez-Vázquez. (2010). Isolation of (-)(2S)-5,6,7,3',5'-pentahydroxyflavanone-7-O- β -D-glucopyranoside, from *Lippia graveolens* H.B.K. var. *berlandieri* Schauer,

- a new anti-inflammatory and cytotoxic flavanone. *Natural Product Research*. 24(16):1528-1536.
- González MS, M González, I López, J Tena, F Retana, L Ruacho, MC González. (2011). *Lippia graveolens* H.B.K. ¿Especie o complejo de especies? en *El Orégano Mexicano: estado actual del conocimiento*. Artes gráficas La Impresora. Pérez G, G Alejandre, MP González Castillo, MC González, compiladores. Durango, México.
 - Granados-Sánchez D, M Martínez-Salvador, G López-Ríos, A Borja-De la Rosa, G & Rodríguez-Yam. (2013). Ecología, aprovechamiento y comercialización del orégano (*Lippia graveolens* H. B. K.) en Mapimí, Durango. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 19(2), 305-322.
 - Greenlee H. (2012). Natural products for cancer prevention. *Semin Oncol Nurs*. 28(1):29-44.
 - Grivennikov SI, FR Greten, M Karin. (2010). Immunity, Inflammation and Cancer. *Cell* 140:883-899.
 - Hardy K, S Buckley, MJ Collins, A Estalrich, D Brothwell, L Copeland, A García-Tabernerero, S García-Vargas, M de la Rasilla, C Lalueza-Fox, R Huguet, M Bastir, D Santamaría, M Madella, J Wilson AF Cortés, A Rosas. (2012). Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. *Naturwissenschaften*. 99(8):617-26.
 - Hernández T, M Canales, JG Avila, A Duran, J Caballero, A Romo de Vivar, R Lira. (2003). Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México), *Journal of Ethnopharmacology*, 88(2–3):181-188.
 - Hernández T, Canales M, García AM, Duran Á, Meráz S, Dávila P, Ávila JG. (2008). Antifungal Activity of the Essential Oils of Two Verbenaceae: *Lantana achyranthifolia* and *Lippia graveolens* of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *BLACPMA* 7(4): 202-206.
 - Huerta C. (1997). Orégano mexicano: oro vegetal. *CONABIO. Biodiversitas* 15:8-13.
 - INEGI. (2012) [en línea]. [Consultada el 12 de marzo de 2014]. Disponible: <

<http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>>

- ITIS (Integrated Taxonomic Information System). (2014) [en línea]. [Consultada el 3 de enero de 2014]. Disponible: <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=32068>
- Kintzios, S. (2003). Oregano: The genera *Origanum* and *Lippia*. USA and Canada: CRC Press.
- Kundu JK, YJ Surh. (2012). Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free Radic Biol Med.* 52(9):2013-37.
- Lambert JD, S Sang, A Dougherty, CG Caldwell, RO Meyers, RT Dorr, BN Timmermann. (2005). Cytotoxic lignans from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry* 66(7): 811-815.
- Lee JJ, M Kong, GD Ayers, R Lotan. (2007). Interaction Index and Different Methods for Determining Drug Interaction in Combination Therapy. *Journal of Biopharmaceutical Statistics* 17(3): 461-480.
- Lin LZ, S Mukhopadhyay, RJ Robbins, JM Harnly. (2007). Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *J Food Compos Anal* 20(5):361-369.
- Lozoya X. (1994). Plantas, medicina y poder: breve historia de la herbolaria mexicana. México: Editorial Pax.
- Makino M, T Motegi, Y Fujimoto. (2004). Tirucallane-type triterpenes from *Juliania adstringens*. *Phytochemistry* 65(7): 891-896.
- Mata R, F Calzada, A Navarrete, F del Río, G Delgado. (1991). Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens* J. *Ethnopharmacol.* 34(2-3):147-54.
- Nathan C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature.* 420(6917):846-52.
- Navarrete A, LS Martínez-Uribe, B Reyes. (1998). Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytotherapy Research* 2(1):1-4.
- Navarrete A, I Oliva, ME Sánchez-Mendoza, J Arrieta, L Cruz-Antonio, G Castañeda-Hernández. (2005). Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium*

- adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *J Pharm Pharmacol* 57(12):1629-36.
- NCI (National Cancer Institute). (2014) [en línea]. [Consultada el 21 de febrero de 2014]. Disponible: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>>
 - Ohtsuki T, T Koyano, T Kowithayakorn, N Yamaguchi, M Ishibashi. (2004). Isolation of austroinulin possessing cell cycle inhibition activity from *Blumea glomerata* and revision of its absolute configuration. *Planta Med.* 70(12): 1170-1173.
 - OMS. (2002). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Ginebra:OMS.
 - Oviedo-Chávez I, T Ramírez-Apan, M Soto-Hernández, M Martínez-Vázquez. (2004). Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine* 11(5):436-45.
 - Oviedo-Chávez I, T Ramírez-Apan, M Martínez-Vázquez. (2005). Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57:1087-1091.
 - Pascual ME, K Slowing, E Carretero, D Sánchez Mata, A Villar. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Ethnopharmacology*, 76:201-214.
 - Passos GF, R Medeiros, R Marcon, AF Nascimento, JB Calixto, LF Pianowski. (2013). The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice. *Eur J Pharmacol.* 698(1-3):413-20
 - Patlolla JM y Rao CV. (2012). Triterpenoids for cancer prevention and treatment: current status and future prospects. *Curr Pharm Biotechnol.* 13(1):147-55.
 - Pichette A, A Eftekhari, P Georges, S Lavoie, V Mshvildadze, J Legault. (2010). Cytotoxic phenolic compounds in leaf buds of *Populus tremuloides*. *Can. J. Chem.* 88(2): 104-110.
 - Pitot HC, T Goldsworthy, S Moran. (1981). The natural history of carcinogenesis: Implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer 17(2):133-146.

- Pitot HC. (1993). The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*. 72(3 Suppl): 962-70.
- Pouget C, Lauthier F, Simon A, Fagnere C, Basly JP, Delage C, Chulia AJ. (2001). Flavonoids: structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11(24):3095-3097.
- Rakoff-Nahoum S. (2006). Why cancer and inflammation? *Yale J Biol Med*. 79(3-4):123-30.
- Ramakrishna A, GA Ravishankar. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav*. 6(11):1720-31.
- Ramos, G, P Frutos, FJ Giráldez y AR Mantecón. (1998). Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. *Arch. Zootec*. 47: 597-620.
- Rastrelli L, A Caceres, C Morales, F De Simone, R Aquino. 1998. Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry* 49(6):1829-1832.
- Ravishankar D, AK Rajora, F Greco, HM Osborn. (2013). Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 45(12):2821-31.
- Rebillard A, X Tekpli, O Meurette, O Sergent, G LeMoigne-Muller, L Vernhet, M Gorria, M Chevanne, M Christmann, B Kaina, L Counillon, E Gulbins, D Lagadic-Gossmann, MT Dimanche-Boitrel. *Cancer Res*. 2007. Cisplatin-induced apoptosis involves membrane fluidification via inhibition of NHE1 in human colon cancer cells. 67(16):7865-74.
- Rivero-Cruz I, G Duarte, A Navarrete, R Bye, E Linares, R Mata. (2011). Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils. *J. Food Sci*. 76(2):C309-C317.
- Romagnolo DF, OI Selmin. (2012). Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. *J Nutr Gerontol Geriatr* 31(3):206-38.
- Rosas-Acevedo H, T Terrazas, ME González-Trujano, Y Guzmán, M Soto-Hernández. (2011). Anti-ulcer activity of *Cyrtocarpa procera* analogous to that of *Amphipterygium adstringens*, both assayed on the experimental gastric injury in rats. *J Ethnopharmacol*. 134(1):67-73.

- Rufino-González Y, M Ponce-Macotela, A González-Maciel, R Reynoso-Robles, M Jiménez-Estrada, Á Sánchez-Contreras, MN Martínez-Gordillo. (2012). In vitro activity of the F-6 fraction of oregano against *Giardia intestinalis*. Parasitology. 139(4):434-40.
- Rzedowski J, G Calderón. (2002). Verbenaceae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 100. Pátzcuaro, Mich: Instituto de Ecología, A. C. Centro Regional del Bajío.
- Silva-Vázquez R, NT Dunford. (2005). Bioactive components of Mexican oregano oil as affected by moisture and plant maturity. J. Essential Oil Res. 17:668-671.
- SIRE (Sistema de Información para la Reforestación). Paquetes tecnológicos. *Amphipterygium adstringens*. Sistema de Información para la Reforestación (SIRE). Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). Consejo Nacional para la Conservación de la Biodiversidad (CONABIO) (2014) [en línea]. [Consultada el 27 de febrero de 2014]. Disponible: <<http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/884Amphipterygium%20adstringens.pdf>>
- Solares F y MC Gálvez. (2002). Manual para una producción sustentable de corteza de Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Shiede ex Schlech.). Zacatepec, Morelos: Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Instituto Nacional De Investigaciones Forestales Agrícolas Y Pecuarias, Centro De Investigación Regional Del Centro Campo Experimental "Zacatepec".
- Soto M, F González, Ó Sánchez. (2007). Evaluación del riesgo de extinción de *Lippia graveolens* de acuerdo al numeral 5.7 de la NOM-059-SEMARNAT-2001, En: Sánchez O, R Medellín, A Aldama, B Goettsch, J Soberón Mainero, M Tambutti. Método de evaluación de riesgo de extinción de las especies silvestres en México (MER) (pp. 91-110). México. Eds. Semarnat, INE, Instituto de Ecología UNAM y Conabio.
- Soto A, R García, Y Ramírez, J Morán, LB Serrano. (2012). The Aqueous Extract from Oregano (*Lippia graveolens* HBK) from the North of Mexico Has Antioxidant Activity without Showing a Toxic Effect in vitro and in vivo. Int. J. Morphol. 30(3):937-944.

- Tallarida RJ, DJ Stone Jr, JD McCary, RB Raffa. (1999). Response surface analysis of synergism between morphine and clonidine. *J Pharmacol Exp Ther* 289(1):8-13.
- Tallarida RJ. (2002). The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain*. 98(1-2):163-168.
- Tropicos. (2014) [en línea] Missouri Botanical Garden. [Consultada el 04 de junio 2014] Disponible: <<http://www.tropicos.org>>
- Uma-Devi P. (2005). Basics of Carcinogenesis. *Health Administrator*. 17(1):16-24.
- Viesca C. (1999). Uso de las plantas medicinales mexicanas. *Arqueología Mexicana* 7:30-35.
- Wang Y, JI Kreisberg, PM Ghosh. 2007. Cross-talk between the androgen receptor and the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in prostate cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 7(6):591-604.
- Wesołowska O, J Wiśniewski, K Sroda-Pomianek, A Bielawska-Pohl, M Paprocka, D Duś, N Duarte, MJ Ferreira, K Michalak. (2012). Multidrug Resistance Reversal and Apoptosis Induction in Human Colon Cancer Cells by Some Flavonoids Present in Citrus Plants. *J. Nat. Prod.* 75(11):1896-1902.
- WHO (World Health Organization). (2014) [en línea]. [Consultada el 27 de febrero de 2014]. Disponible: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>
- Yamai H, N Sawada, T Yoshida, J Seike, H Takizawa, K Kenzaki, T Miyoshi, K Kondo, Y Bando, Y Ohnishi, A Tangoku. (2009). Triterpenes augment the inhibitory effects of anticancer drugs on growth of human esophageal carcinoma cells in vitro and suppress experimental metastasis in vivo. *Int J Cancer*. 125(4):952-60.
- Yang CQ, X Fang, XM Wu, YB Mao, LJ Wang, XY Chen. (2012). Transcriptional regulation of plant secondary metabolism. *J Integr Plant Biol.* 54(10):703-12.
- Zhao L, MG Wientjes, JL Au. (2004). Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses. *Clin Cancer Res.* 10(23):7994-8004.

11. Anexos

11.1 Propiedades físicas y espectroscópicas de los compuestos puros

Ladaneína. C₁₇H₁₄O₆; p.f. 215-217°C

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 12.81(1H, s, 5-OH), 10.94 (1H, s, 6-OH), 8.03 (2H,d, J = 8.9 Hz,H-2' y H-6'), 7.10 (2H, d, J = 9 Hz, H-3' y H-5'), 6.95(1H, s, H-3), 6.54 (1H, s, H-8), 3.95 (3H, s, OMe), 3.84(3H, s, OMe).

EM [m/z]: 314 [M⁺](100), 296 [M-H₂O] (84), 268 [M-H₂O-CO] (24), 182 [A1⁺](15), 152 [A1-OMe+H]⁺(23), 139 [153-Me+H] (15), 133[B1⁺](33).

Sakuranetina C₁₆H₁₄O₅; p.f. 152-154°C.

IR: ν_{\max} (KBr) cm⁻¹, 3525.44, 3109.42, 1614.82, 1571.05, 1500.37, 1159.10.

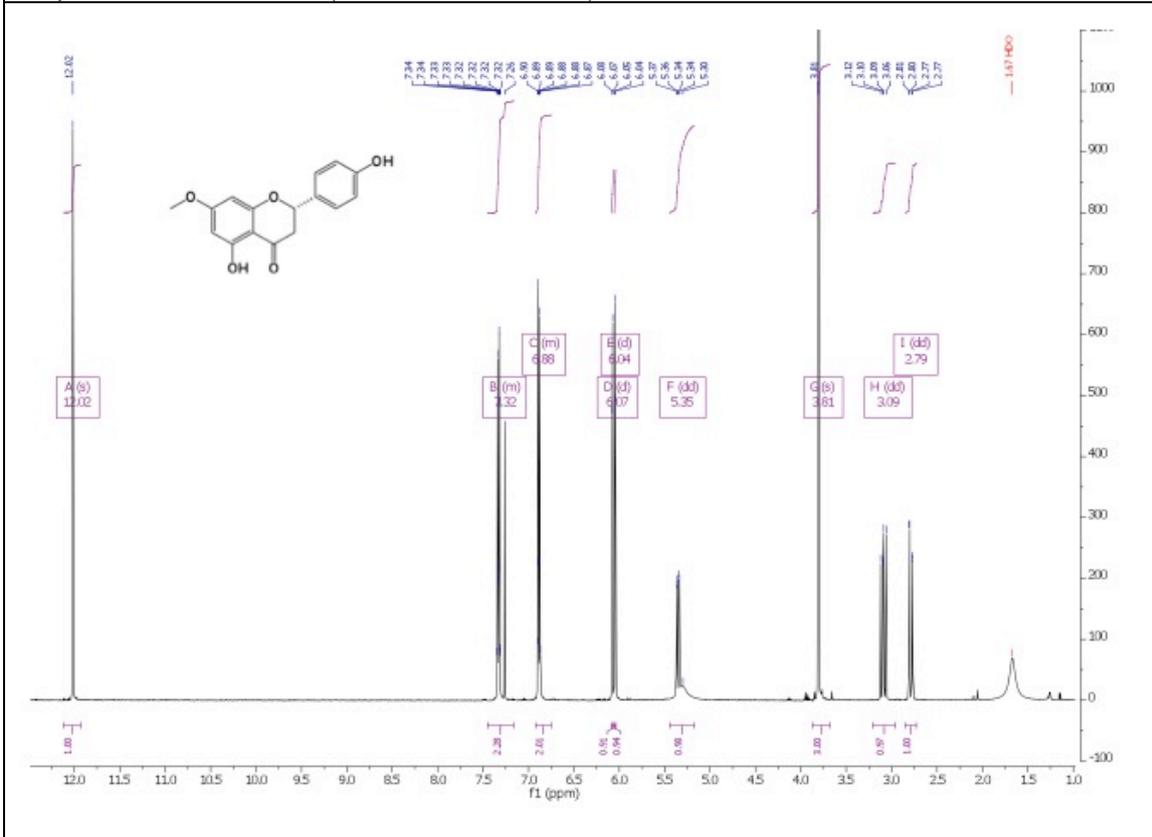
RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 2.79 (1H, dd, J=17.2, 3.0 Hz, H-3b), 3.09 (1H, dd, J=17.2, 13.0 Hz, H-3a), 3.81 (3H, s, 7-OCH₃), 5.35 (1H, dd, J= 13.0, 3.0 Hz, H-2), 6.04 (1H, d, J= 2.3 Hz, H-6), 6.07 (1H, d, J= 2.3 Hz, H-8), 6.88 (2H, d, J= 8.4 Hz H-3',5'), 7.33 (2H, d, J= 8.4 Hz, H-2',6'), 12.02 (1H, s, 5-OH).

RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 196.05 (C4), 168.01 (C7), 164.10 (C5), 162.87 (C9), 156.16 (C4'), 130.51 (C1'), 127.94 (C2', 6'), 115.66 (C3', 5'), 103.13 (C10), 95.11 (C6), 94.25 (C8), 78.95 (C2), 55.67 (7-OCH₃), 43.17 (C3).

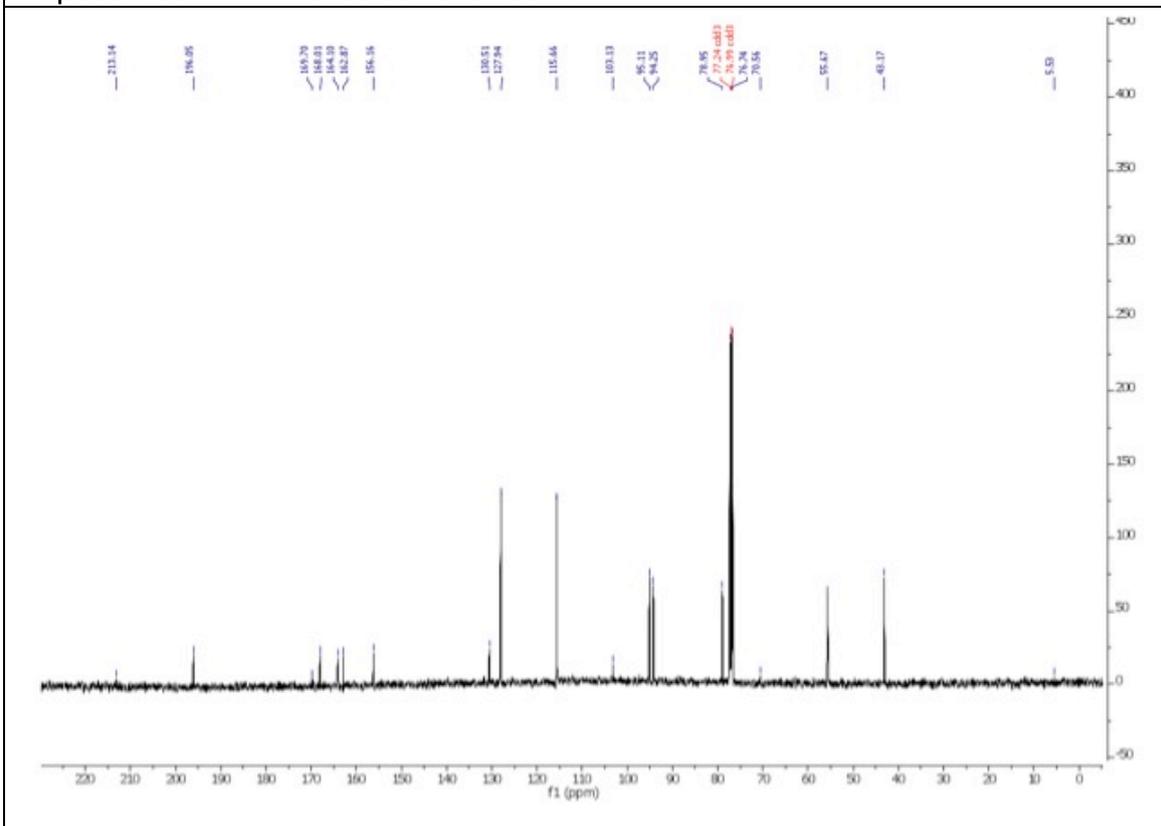
EM [m/z] (%): 286 [M⁺] (100), 180 (25), 167 (67), 138 (14), 121 (25).

11.2 Espectros

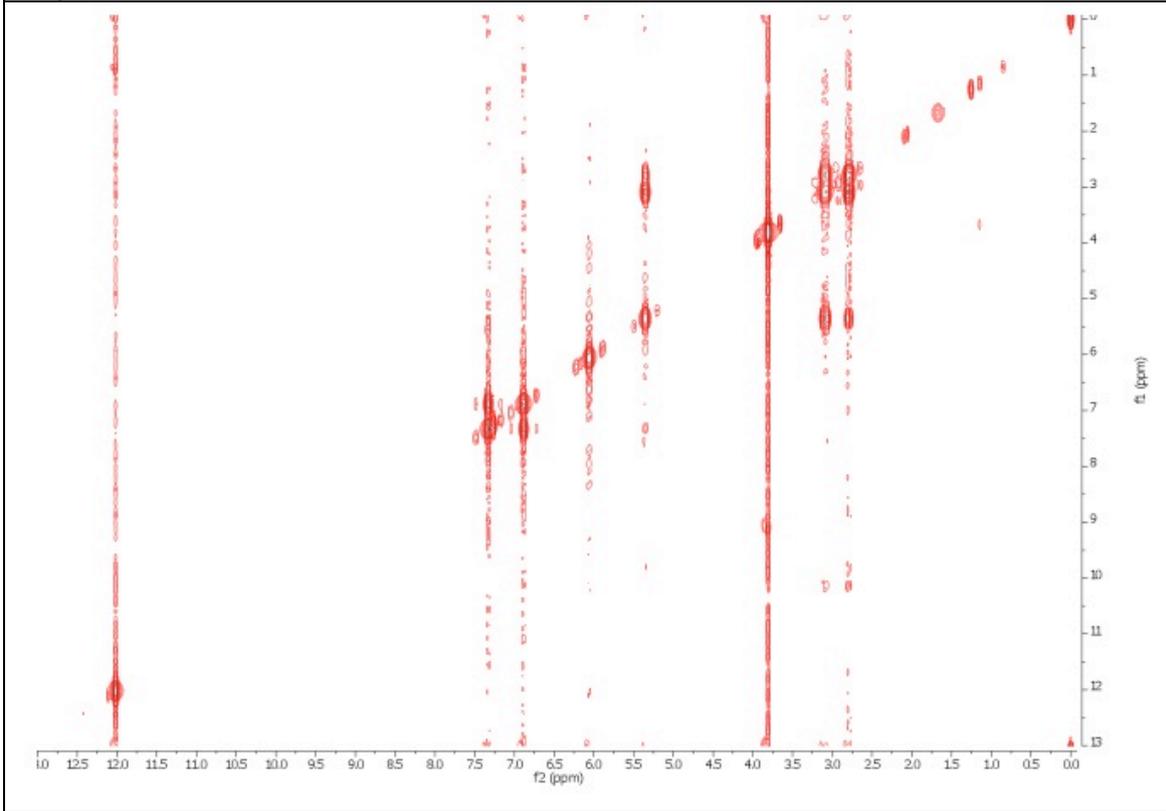
Espectro de RMN ^1H (CDCl $_3$ a 500MHz) de sakuranetina



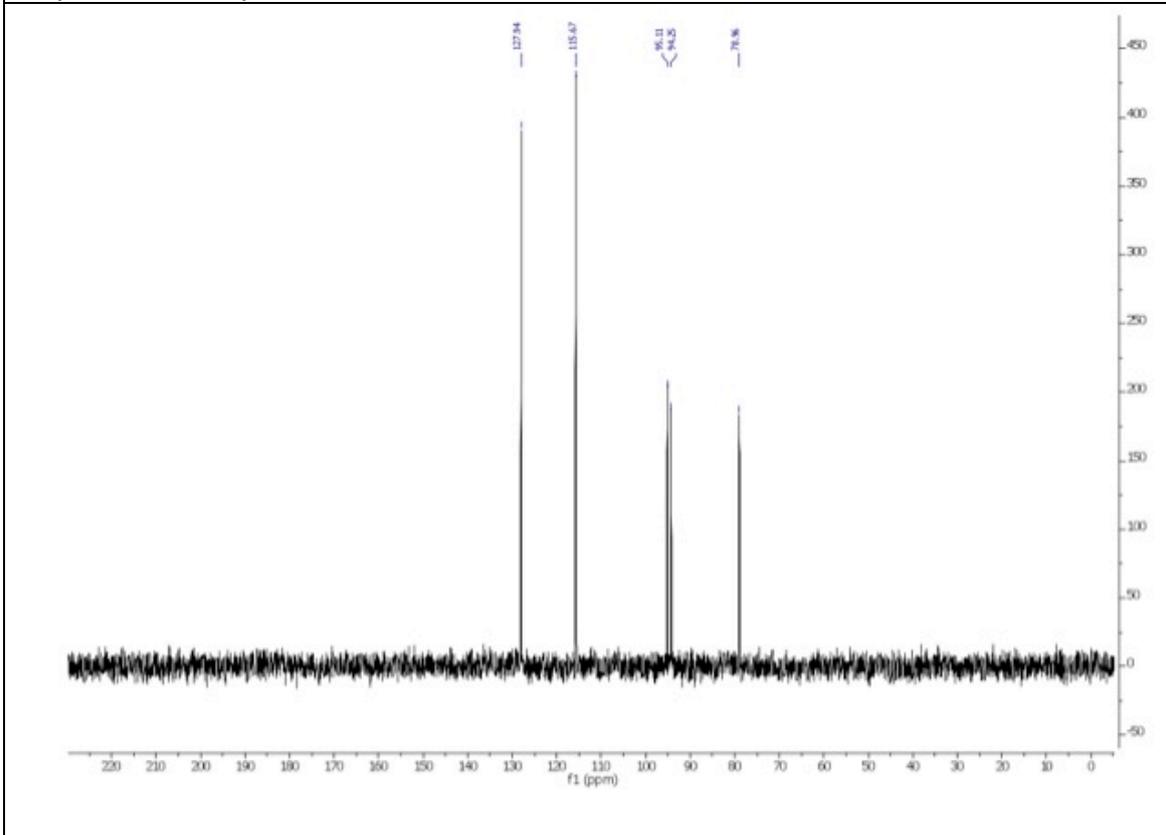
Espectro de RMN ^{13}C de sakuranetina



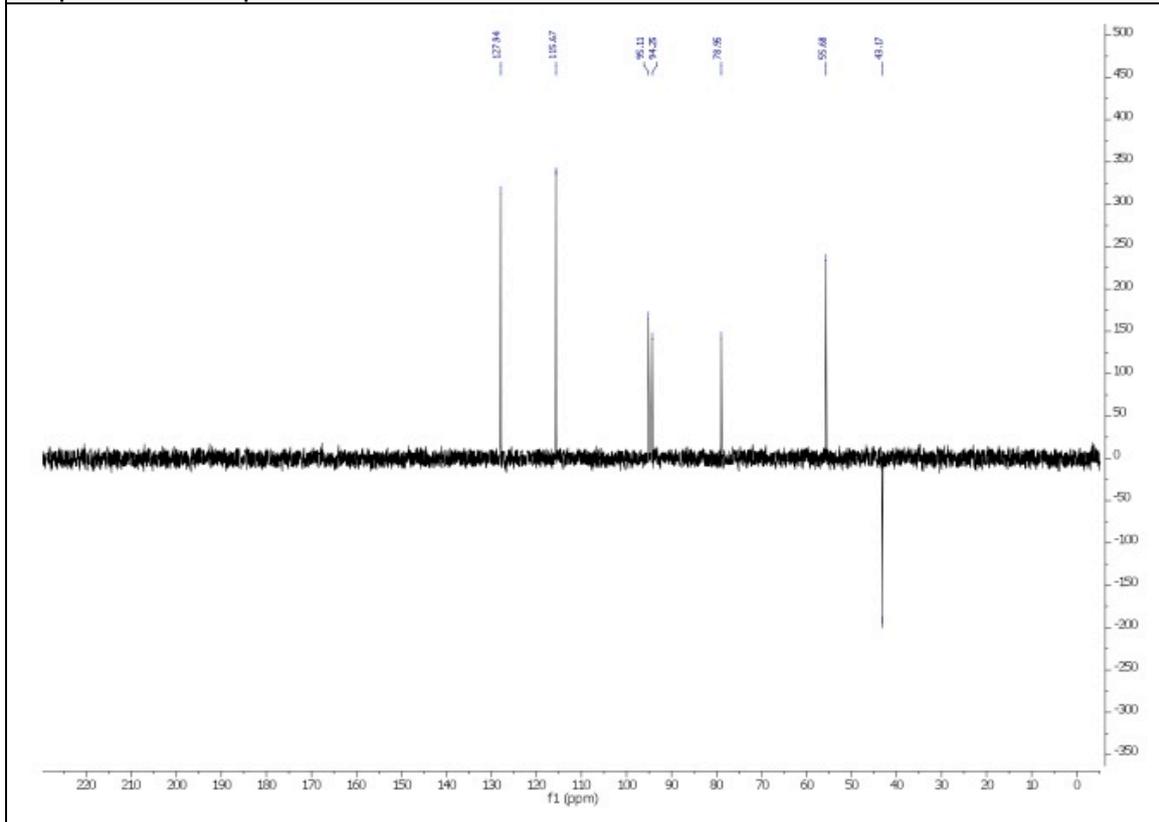
Espectro de COSY de sakuranetina



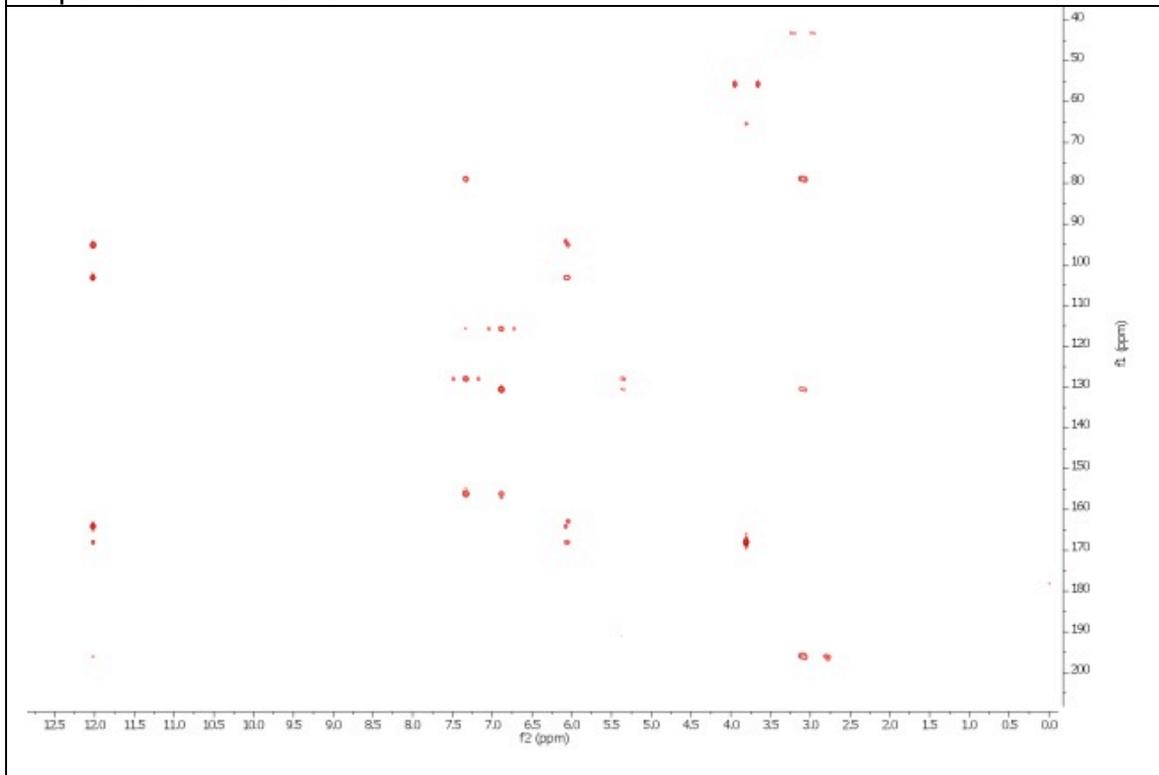
Espectro de Dept90 de sakuranetina



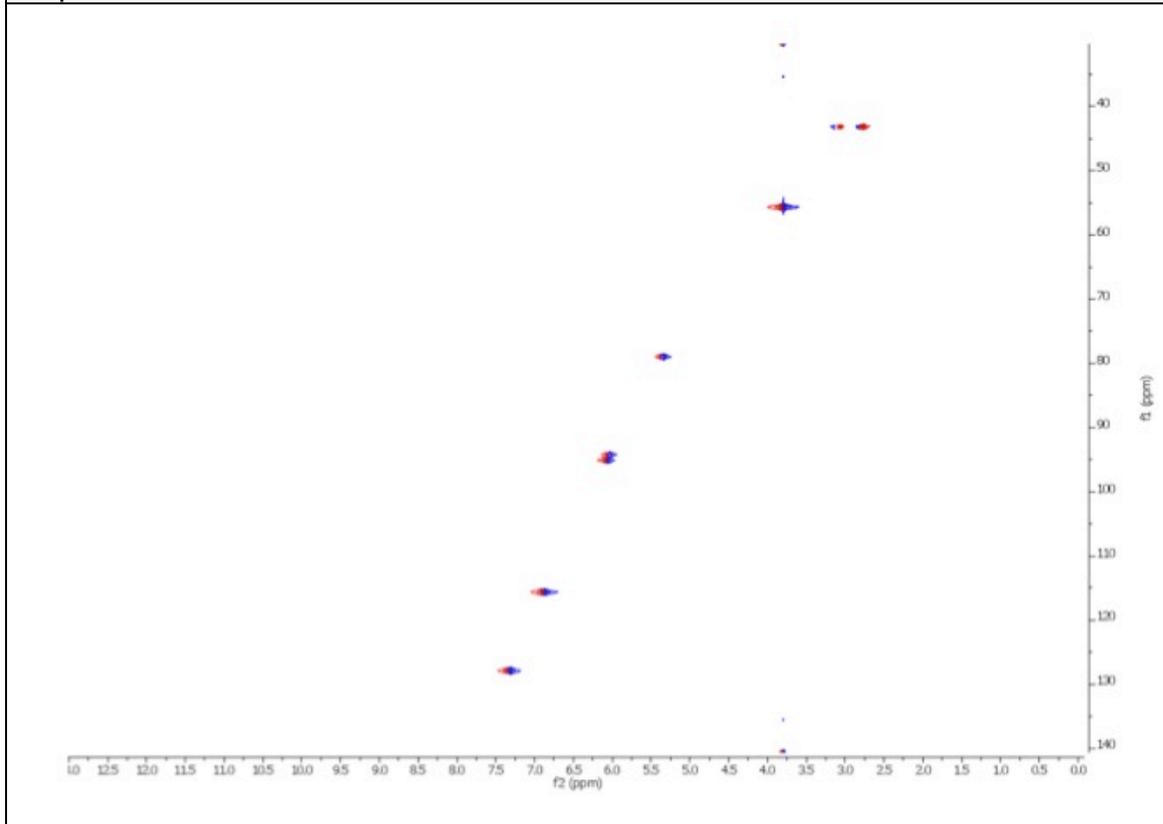
Espectro de Dept135 de sakuranetina



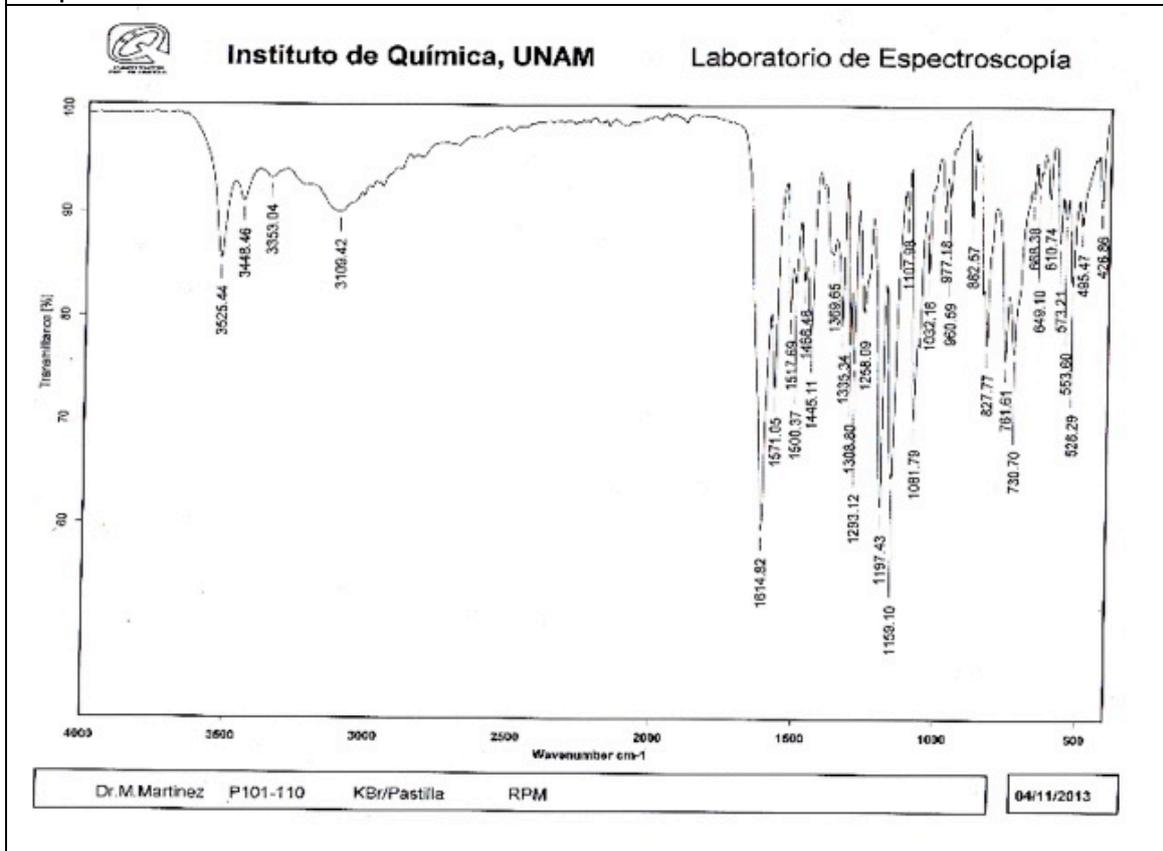
Espectro de HMBC de sakuranetina



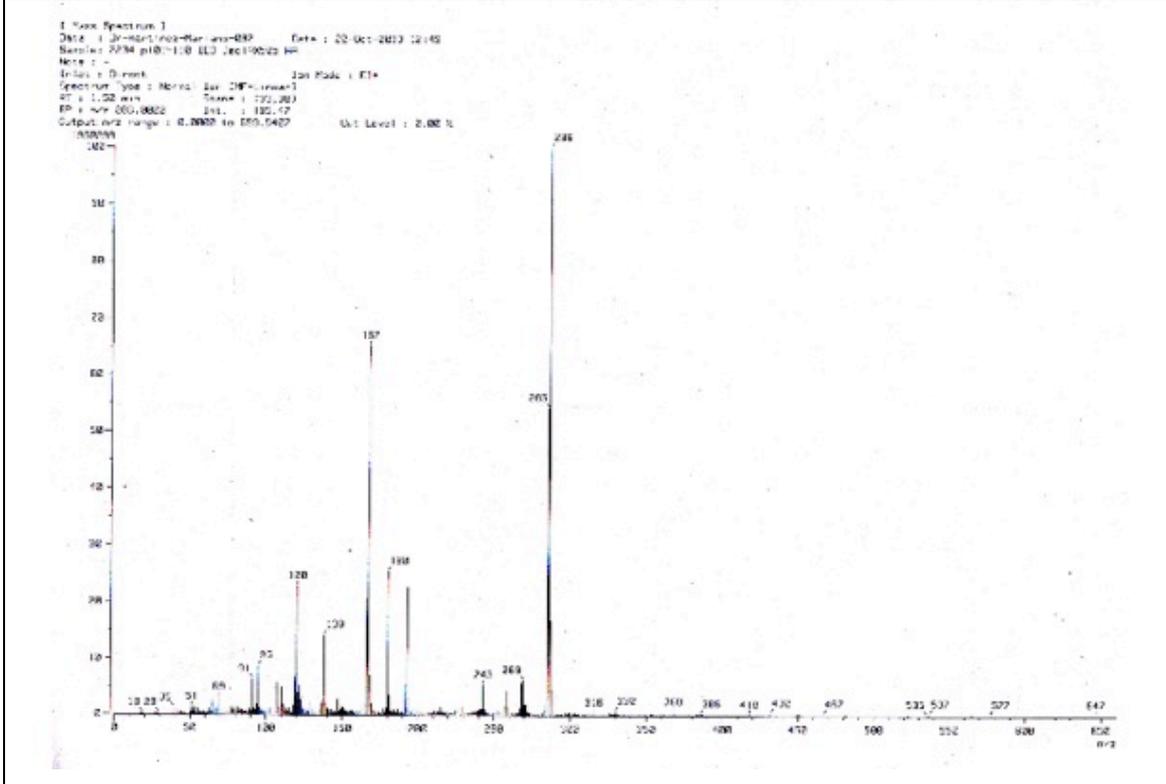
Espectro de HSQC de sakuranetina



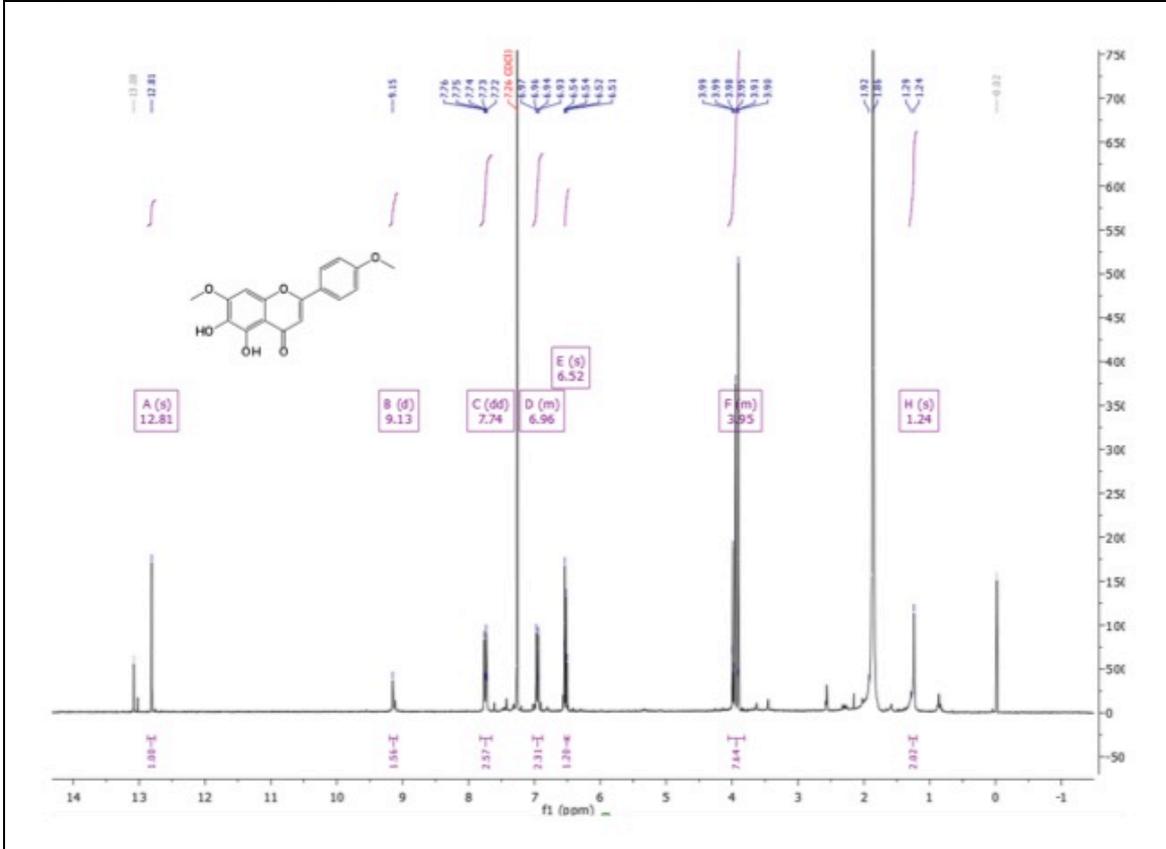
Espectro IR de sakuranetina



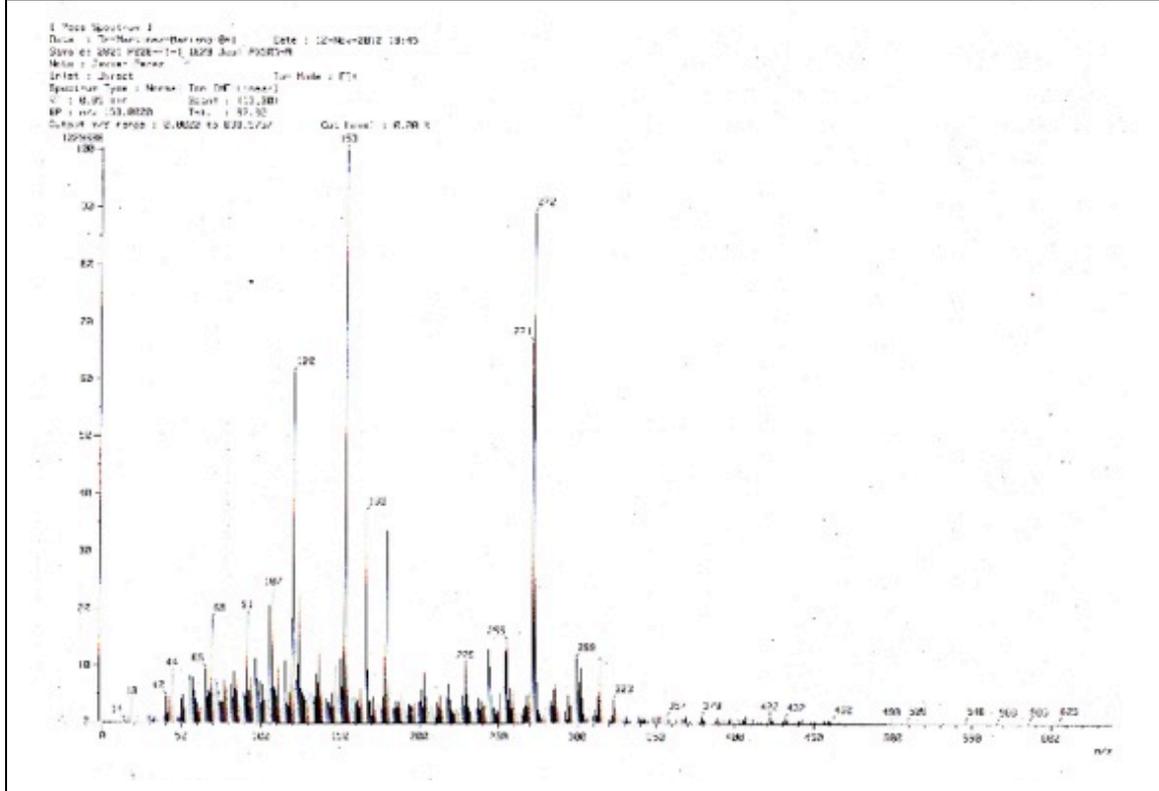
Espectrometría de masas de sakuranetina



Espectro de RMN ¹H (CDCl₃+DMSO a 300MHz) de ladaneína



Espectrometría de masas de **ladaneína**

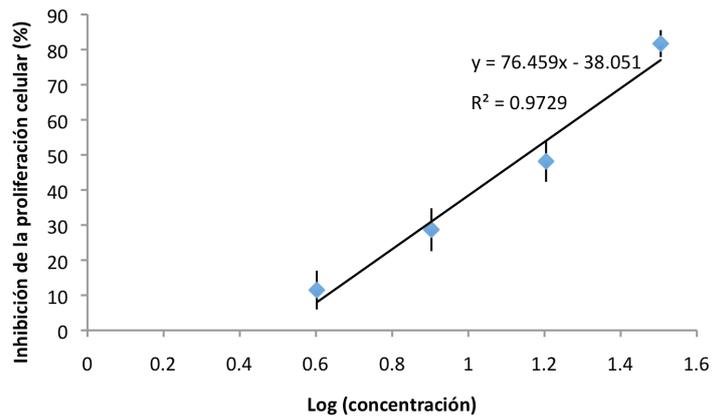


11.3 Modelo de edema auricular en ratón inducido por TPA.

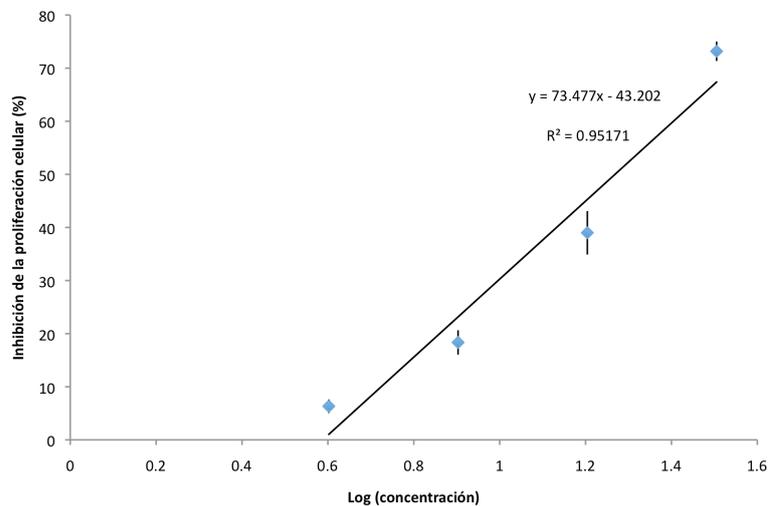
El modelo de edema auricular en ratón inducido por 13-acetato de 12-0-tetradecanoilforbol (TPA) comprende la aplicación tópica de TPA en la oreja del ratón, lo cual induce una inflamación cutánea que consiste en eritema, edema e infiltración de leucocitos polimorfonucleares. El TPA se trata de un éster de forbol que estimula la activación de una variedad de vías de señalización intracelular a través de la activación de PKC, incluidas las MAPKs y NF- κ B, así como la generación de mediadores como son el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucina IL-1 β , quimiocina derivada de queratinocito, proteína inflamatoria de macrófago, prostaglandinas, entre otros (Passos et al., 2013).

11.4 Curvas dosis-respuesta

Para calcular la CI_{50} de **2** en K562, se probaron cuatro diferentes concentraciones de **2**, con tres repeticiones cada una, en esta línea celular y se graficó una curva dosis respuesta.



De igual manera, para calcular la CI_{50} de **2** en PC-3 se realizó la siguiente curva dosis-respuesta.



En ambos casos se usó la ecuación de la recta para calcular la concentración de **2** que se requiere para inhibir la proliferación celular en un 50%.