



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA**

---

**EVALUACIÓN CITOTÓXICA Y ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA RAÍZ DE  
*Verbesina persicifolia***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

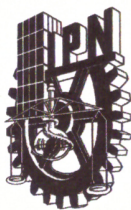
**PRESENTA**

I.Q. MARTÍN BRUNO SALAZAR GONZÁLEZ

**DIRECTORES DE TESIS**

DRA. FABIOLA ELOÍSA JIMÉNEZ MONTEJO

DRA. MARÍA DEL CARMEN GUADALUPE AVELINO FLORES



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetila, Tlaxcala siendo las 10 horas del día 31 del mes de Mayo del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-Tlaxcala para examinar la tesis titulada:  
EVALUACIÓN CITOTÓXICA Y ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA RAÍZ DE *Verbesina persicifolia*

Presentada por el alumno:

Salazar

Apellido paterno

González

Apellido materno

Martín Bruno

Nombre(s)

Con registro:

A	1	4	0	0	6	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencia en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Fabiola Eloísa Jiménez Montejo

Dra. María del Carmen Guadalupe Avelino Flores

Dra. María del Carmen Cruz López

Dra. Silvia Luna Suárez

Dr. Victor Eric López y López

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. María Myrna Solís Oba



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada  
Unidad Tlaxcala  
Dirección



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de Tepetitla, Tlaxcala el día 31 del mes Mayo del año 2016, el que suscribe Martín Bruno Salazar González alumno del Programa de Maestría en Biotecnología Aplicada con número de registro A140062, adscrito a CIBA-Tlaxcala, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Fabiola Eloísa Jiménez Montejo y la Dra. María del Carmen Guadalupe Avelino Florez cede los derechos del trabajo intitulado Evaluación citotóxica y estudio fitoquímico de la raíz de *Verbesina persicifolia*, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección salazarbruno6@gmail.com, fabeljimo@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
I. Q. Martín Bruno Salazar González

Nombre y firma

---

La presente tesis se realizó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de beca 308350, en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional y en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica de Oriente del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIOR-IMSS), gracias al apoyo financiero para estructura otorgado por el fondo de investigación en Salud del IMSS (No. CTFIS/10RD/012/2011).

---

## **AGRADECIMIENTO**

Al CIBA-IPN, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en sus instalaciones.

Al CIBIOR-IMSS, (Atlixco, Metepec); por permitirme hacer una estancia, llevando a cabo los ensayos biológicos dentro de sus laboratorios.

Al Dr. Aarón Mendieta Moctezuma del CIBA por su valioso apoyo en el aislamiento y elucidación estructural de los compuestos obtenidos de ésta especie vegetal.

Al Dr. Julio R. Reyes Leyva por recibirme en el centro de investigación que dirige, CIBIOR-IMSS.

A la Dra. Verónica Vallejo Ruíz, por darme un espacio en su laboratorio de Biología Molecular (BM), en CIBIOR-IMSS; además de sus amables atenciones.

A la Dra. Paola Maycotte González de CIBIOR-IMSS por sus amables asesorías y su tiempo que me otorgo de manera desinteresada.

A la Dra. Lilian Karem Flores Mendoza de CIBIOR por su apoyo en los ensayos de citometría de flujo y los equipos que nos proporcionó.

Al Dr. Juan Carlos de CIBIOR por la asesoría en microscopia.

A la Dra. Lupita de CIBIOR por el material biológico facilitado.

Al Maestro David Medina de CIBIOR por el material biológico facilitado.

A la Q. Tony y al Q. Martín por su apoyo técnico ofrecido en el laboratorio de BM.

A la médica Graciela Castillo de Atlixco, por la hospitalidad brindada en su casa.

Al Lic. En Biotecnología Esteban Cruz Romero por apoyarnos en la colecta de la planta para realizar éste trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de BM e Inmunología por hacer de la estancia en el laboratorio un momento de ameno trabajo.

Olvidaba mencionar a todas las personas que en algún momento nos dan <<ray>> a los estudiantes de CIBA, nos vemos en la necesidad de usar el autostop y llegar a la escuela. Espero no a ver omitido algún nombre, de ser así no fue intencional; mi más sincero agradecimiento a aquellas personas, que, de manera directa o indirecta, me ayudaron en algún momento para la realización de éste trabajo.

---

## DEDICATORIA

Al divino rector, que con absoluta perfección rige todos los procesos de la vida. Que por su inmerecida ayuda puedo culminar una etapa más en mi vida académica. Y a pesar de las adversidades no me ha dejado solo, siempre me ha mostrado qué tan misericordioso puede ser. Para finalizar este párrafo quiero citar unas palabras que escuché en una de mis series favoritas y a pesar de sus irreverencias siempre hay algo de humor y pensamientos exaltables, dice así: << ¡Oh, gloria de las glorias! ¡Oh, divino testamento de la eterna majestad de la creación de Dios! -The Simpson- >>.

A mi tía María Julia que por su ayuda he podido salir adelante, ha sido un ángel en la tierra, para mí; una innegable muestra de amor y compasión divina. Con todo mi corazón muchas gracias. A la memoria de mi bisabuelita que junto con mi tía jamás nos dejaron solos. Sé que te merecías estar en el cielo y espero desde allá no te olvides de nosotros, siempre te recordaré con gratitud y respeto.

A mis hermanos por el apoyo moral que me han demostrado.

A mi sobrina Miranda, la alegría de nuestra casa. Que con su inocencia y ternura nos alegra los días y rompe con la monotonía.

A mi amigo Víctor Ruíz Rosas, por su amistad y su apoyo. Fueron muy amenas las charlas que sostuvimos éste último año. Es un gusto tenerte como amigo.

A la memoria de doña Chabe, que sé estaría muy contenta de verme salir adelante; lamentablemente no está entre nosotros. Gracias a que tuve el honor de conocerla decidí el rumbo que debía seguir mi vida... Dónde quiera que este muchas gracias de todo corazón, siempre la recordaré con mucho cariño.

A Lily y Doña Socorro de SODEXO, muchas gracias por el apoyo que me ofrecieron antes de entrar a la maestría, tuve el gusto de conocerlas en el momento más oportuno; gracias por creer en mí. Lily, hubo momento en los que yo no podía ver el fin, pero siempre me dio ánimos para seguir adelante, gracias.

---

Al profesor Juan Carlos (del Cbtis 212-Tetla) y su esposa, gracias por escucharme y recibirme siempre amablemente en su casa. Profesor Juan Carlos, muchas gracias por desearme siempre lo mejor.

A mi directora de tesis, la Dra. Fabiola. Muchas veces es incomprendida su forma estricta de trabajo, pero sé que se preocupa por formar gente verdaderamente seria y crítica en la investigación, lástima que muchos no lo vean de esa manera. Lamentablemente, muchas personas se dejan llevar por las malas impresiones y no se dan la oportunidad de conocer un poquito a quienes les rodean. Gracias por su camaradería en el laboratorio.

A mi mentora la Dra. Carmen Cruz. Gracias profesora por su inestimable ayuda, gracias por ayudarme a crecer académicamente. Siempre he de recordarla como la persona que me tendió la mano cuando muchas veces estuve perdido. Gracias por permitirme conocerla un poco más y por creer en mí. Es un gusto haber trabajado con usted en el laboratorio.

A mis asesores de tesis, la Dra. Silvia, el Dr. Eric y especialmente a la Dra. Carmen Avelino por instruirme en los ensayos biológicos, gracias por su paciencia y su confianza en mí.

A mi amiga Diana Cuatecontzi, por su apoyo en todo el trayecto transcurrido en CIBA, gracias por asesorarme en los temas que para mi eran demasiados nuevos. Gracias por tu amistad, eres una persona muy valiosa.

A Nidia Diana Corona Motolinia, por la amistad que poco a poco hemos ido creando, ya desde inicio de nuestros estudios. Me dejas agradables recuerdos.

A mis compañeros y amigos de CIBA y CIBIOR. Por su amistad, su tiempo, su apoyo y comprensión. Juntos compartimos agradables momentos ya sea en el laboratorio, en la cafetería, en la calle o en algún bar. Y no sólo agradables momentos, también momentos de incertidumbre, duda y preocupación; porque claro la investigación no es cosa sencilla hay muchas subidas y bajadas, ustedes lo saben muy bien.

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	1
ÍNDICE DE FIGURAS .....	2
ÍNDICE DE TABLAS .....	3
RESUMEN .....	4
ABSTRACT .....	5
1. INTRODUCCIÓN .....	6
2. ANTECEDENTES .....	8
2.1 Tipos de cáncer de mama y cáncer cervicouterino .....	9
2.1.1 Carcinoma ductal in situ .....	10
2.1.2 Carcinoma ductal .....	10
2.1.3 Factores de riesgo .....	10
2.1.4 Cáncer cervicouterino .....	12
2.1.5 Asociación del Virus de Papiloma Humano (VPH) y cáncer .....	12
2.2 Muerte celular y su desregulación en el cáncer .....	13
2.3 Mecanismos de Apoptosis .....	14
a. Ruta intrínseca .....	15
b. Ruta extrínseca .....	15
c. Ruta de ejecución .....	16
2.4 Métodos para la detección de Apoptosis .....	16
2.5 Tumores malignos según el sexo en la población de 20 años y más en México .....	16
2.6 Tratamientos contra el cáncer .....	17
2.7 Plantas medicinales .....	19
2.7.1 Verbena persicifolia .....	19
2.7.1.1 Estudios fitoquímicos de Verbena persicifolia .....	20
3. JUSTIFICACIÓN .....	23
4. OBJETIVOS .....	24
4.1 OBJETIVO GENERAL .....	24
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	24
5 HIPOTESIS .....	25
6. METODOLOGIA .....	26
6.1 Obtención de extractos .....	26
6.2 Preparación del extracto .....	26
6.2.1 Extracto de diclorometano .....	26
6.2.2 Obtención de los compuestos mayoritarios .....	27
6.3 Elucidación estructural de los componentes mayoritarios .....	27
6.4 Evaluación citotóxica a través de líneas celulares .....	27
Línea celular SiHa .....	28
Línea celular T-47D .....	28
Línea celular MCF7 .....	28
Línea celular MCF 10A .....	28
6.4.1 Ensayo preliminar .....	29
6.4.1.1 Ensayo de viabilidad con MTT .....	29
6.4.1.2 Ensayo para evaluar la actividad citotóxica de los compuestos .....	29
6.4.1 Cálculo de la IC <sub>50</sub> .....	29
6.4.2 Curva dosis – respuesta para control negativo .....	29
6.5 Determinación del tipo de muerte celular inducida .....	30
7.1 Recolección, identificación y secado de <i>V. persicifolia</i> .....	31



7.2 Análisis cromatográfico .....	31
7.2.1 Cromatografía en capa fina .....	31
7.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	32
7.2.3 Cromatografía en columna abierta .....	33
Extracto diclorometano (EDCM) .....	33
7.3 Caracterización de compuestos .....	36
7.3.1 Datos espectroscópicos para el compuesto C-1.....	36
7.4. Análisis por RMN de las fracciones evaluadas en la actividad biológica.....	47
7.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA .....	48
7.5.1 Ensayos biológicos preliminares .....	48
8. DISCUSIÓN .....	56
8.2 Evaluación citotóxica del extracto completo de diclorometano .....	57
8.3 Evaluación citotóxica de las fracciones del extracto de diclorometano de raíz .....	58
8.3 Evaluación citotóxica de los compuestos aislados de la fracción cuatro.....	59
8.4 Caracterización del tipo de muerte celular inducida por el compuesto con mayor actividad sobre la línea celular T-47D.....	61
9. CONCLUSIONES.....	62
10. BIBLIOGRAFÍA .....	63
11. ANEXOS.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferencias entre una célula normal y una célula cancerígena.....	9
Figura 2. Organización del genoma del virus del papiloma humano.....	13
Figura 3. <i>Verbesina persicifolia</i> .....	19
Figura 4. 3 $\alpha$ -cinamoiloxi-1 $\beta$ ,4 $\alpha$ -dihidroxiudesm-7,8-eno (1). .....	20
Figura 5. 4 $\alpha$ -(2-fenil)etil-1 $\beta$ ,3 $\alpha$ -dihidroxiudesmano (2). .....	21
Figura 6. Comparación de extractos de hojas y raíz por cromatografía en capa fina. ....	32
Figura 7. Extracto completo diclorometano hojas. ....	32
Figura 8. Extracto completo de diclorometano raíz. ....	33
Figura 9. Columna cromatográfica para el extracto de diclorometano.....	33
Figura 10. Fracciones para estudio de citotoxicidad. ....	33
Figura 11. Análisis cromatográfico por CCF de las fracciones obtenidas. ....	34
Figura 12. Perfil cromatográfico por CCF de las fracciones obtenidas. ....	35
Figura 13. Perfil cromatográfico de los eluatos obtenidos por cromatografía en columna.....	35
Figura 14. Perfil cromatográfico de los eluatos obtenidos por cromatografía en columna.....	36
Figura 15. Espectro de infrarrojo para el compuesto C-1.....	37
Figura 16. Espectro de protón para compuesto C-1 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	38
Figura 17. Espectro de carbono para compuesto C-1 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz). ....	38
Figura 18. Espectro de IR de C-4.....	39
Figura 19. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de C-4 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz). ....	40
Figura 20. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de C-4 (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz). ....	41
Figura 21. Espectro Bidimensional de RMN-HMQC de C-4 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz). ....	42
Figura 22 Espectro Bidimensional de RMN-HMBC de C-4 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz). ....	42
Figura 23. Espectro de infrarrojo para el compuesto C-6.....	43
Figura 24. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de C-6 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz). ....	44
Figura 25. Espectro de protón para compuesto C-7 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	45
Figura 26. Espectro de carbono para compuesto C-7 (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz). ....	46
Figura 27 Espectro de resonancia de la fracción 2 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	47
Figura 28 Espectro de resonancia de la fracción 4 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	47

Figura 29. Cambios morfológicos en las células, al ser expuestas al extracto de diclorometano de raíz. ....	50
Figura 30. Cambios morfológicos en las células, al ser expuestas al extracto de diclorometano de raíz. ....	50
Figura 31. Cambios morfológicos en las células, al ser expuestas a la fracción cuatro. ....	51
Figura 32. Cambios morfológicos en las células, al ser expuestas a la fracción cuatro. ....	52
Figura 33. Morfología de las células al ser expuestas al compuesto C-4. ....	53
Figura 34. Morfología de las células MCF 10A expuestas al compuesto C-4. ....	53
Figura 35. Morfología de las células MCF7 expuestas al compuesto C-1 y C-4. ....	54
Figura 36. Morfología de las células SiHa expuestas al compuesto C-1 y C-4. ....	54
Figura 37. Morfología de las células expuestas al Taxol, como control positivo. ....	55
Figura 38. Espectro RMN- <sup>1</sup> H de la fracción 1 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz). ....	70
Figura 39. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción 3 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz). ....	70
Figura 40. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción 5 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz). ....	71
Figura 41. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción 6 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz). ....	71

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de IC <sub>50</sub> obtenidos para el compuesto 1. ....	20
Tabla 2. Valores de IC <sub>50</sub> obtenidos para el compuesto modificado estructuralmente. ....	21
Tabla 3. Comparación de resultados entre extractos de diclorometano de hoja, raíz y el compuesto 1. ....	21
Tabla 4. Condiciones de purificación de la fracción ocho. ....	34
Tabla 5. Condiciones de purificación de la fracción veintinueve y treinta. ....	35
Tabla 6. Eluatos obtenidos por cromatografía en columna de las fracciones 11-13. ....	36
Tabla 7. Ensayo preliminar de MTT con la línea celular SiHa. ....	48
Tabla 8. Valores obtenidos para la evaluación del extracto de diclorometano. ....	49
Tabla 9. Comparación de la actividad de las fracciones entre las líneas celulares. ....	51
Tabla 10. Resumen general de valores obtenidos para C1, C4 y Taxol. ....	52
Tabla 11. Células T-47D positivas a Anexina V al ser expuestas al compuesto C-4. ....	55

---

## RESUMEN

La especie *Verbesina persicifolia* es una planta considerada maleza sobre la cuál recientemente se han descrito algunos efectos biológicos. En este contexto, en un estudio previo del mismo grupo de trabajo se encontró que un extracto de las hojas de *V. persicifolia* presentó efecto citotóxico. Por ello, surgió el interés de establecer el potencial citotóxico de la especie y se planteó en el presente trabajo, llevar a cabo la evaluación citotóxica del extracto de la raíz de *Verbesina persicifolia*. Se decidió hacer la evaluación sobre tres líneas celulares de cáncer de mama, una línea de cáncer cervicouterino y una línea de células epiteliales de mama, no tumorogénica.

Se encontró que el extracto diclorometánico, presentó mejor efecto citotóxico con porcentajes de inhibición por arriba del 90% en cada una de las diferentes líneas evaluadas. Este resultado, llevó a realizar un fraccionamiento del extracto y seleccionar seis fracciones que cubren el perfil cromatográfico. Las fracciones con compuestos de menor polaridad no presentaron inhibición en la proliferación celular. Solo una de las fracciones, denominada F4 mostró actividad citotóxica, aunque fue menor la actividad mostrada, comparativamente con el extracto total. El análisis cromatográfico en capa fina de esta fracción, sugirió la presencia de al menos tres compuestos mayoritarios. Por lo que se aplicaron diferentes procesos cromatográficos para separar a éstos componentes y llevar a cabo su evaluación sobre líneas celulares.

Se aislaron tres compuestos y dos de ellos fueron evaluados sobre las diferentes líneas celulares. Se observó, entonces que uno de ellos presentó un efecto mayor sobre la línea celular T-47D, con un valor de  $IC_{50}$  de 2.5  $\mu\text{g/mL}$ . Esto sugiere que algunos compuestos del extracto parecen actuar de manera sinérgica. Aunque existe un compuesto que presenta la mayor actividad citotóxica. Al encontrar a este posible principio activo, se planteó determinar el tipo de muerte celular que induce, obteniéndose que hay un porcentaje importante de apoptosis.

Los compuestos aislados del extracto, fueron caracterizados espectroscópicamente para establecer su naturaleza y estructura. Obteniendo como resultado que éstos son derivados sesquiterpénicos con un esqueleto base de eudesmano.

---

## ABSTRACT

The species is a plant *Verbesina persicifolia* considered weeds upon which recently described some biological effects. In this context, in a previous study of the same working group it found that an extract from the leaves of *V. persicifolia* presented cytotoxic effect. Therefore, it arose the interest of establishing the cytotoxic potential of the species and was raised in this work, to carry out the assessment cytotoxic root extract of *Verbesina persicifolia*. It was decided to make the assessment on three cell lines of breast cancer, cervical cancer line and a line of breast epithelial cells, non-tumorigenic. It was found that the extract dichloromethanic presented better cytotoxic effect with inhibition percentages above 90% in each of the different lines evaluated. This result led to make a fractionation of the extract and select six fractions covering the chromatographic profile. Fractions with less polar compounds showed no inhibition in cell proliferation. Only one of the fractions, named F4 showed cytotoxic activity, although activity was lower that shown comparatively with the total extract. Chromatographic analysis of this thin layer fraction, suggested the presence of at least three major compounds. So different chromatographic processes were applied to separate these components and carry out its evaluation of cell lines.

three compounds were isolated and two of them were tested on different cell lines. It was noted then that one of them had a greater effect on T-47D cell line with an  $IC_{50}$  value of 2.5  $\mu\text{g/mL}$ . This suggests that some compounds appear extract act synergistically. Although a compound having greater cytotoxic activity. Possible to find this active ingredient was raised determine the type of cell death inducing give that a significant percentage of apoptosis. Extract isolated compounds were characterized spectroscopically to establish its nature and structure. Resulting in that these are sesquiterpene derivatives having eudesmane base skeleton

---

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardíacas causan más muertes en todo el mundo, además de otros problemas sanitarios, como la malnutrición y las enfermedades parasitarias. Sin embargo, en el contexto de la biología celular, el cáncer tiene una importancia única ya que la familia de enfermedades agrupadas bajo este título refleja alteraciones de las pautas de comportamiento más fundamentales de las células en un organismo pluricelular (Bruce, 2002).

En México en 2012, se estimó que 16 de cada 100,000 mujeres murieron a causa del cáncer de mama, de este modo fue la segunda causa de muerte en ese año (INEGI, 2014). Su incidencia se incrementa rápidamente con la edad desde que comienza la menstruación (Gewefel y col., 2014). La mayor prevalencia ocurre en mujeres mayores de cincuenta años; aunque en los últimos años está aumentando la incidencia en mujeres jóvenes, por lo que esto mantiene preocupado al sector salud (Hussein y col, 2013).

Para poder contrarrestar este problema de salud existen una gran diversidad de tratamientos, pero muchas veces dentro de la evolución de la enfermedad se presenta quimioresistencia, por esa razón es necesaria la búsqueda de nuevos agentes para tratamiento de dicha enfermedad.

La búsqueda incesante de nuevos fármacos, conduce a numerosas investigaciones en todo el mundo. Lamentablemente, no todas se pueden ver reflejadas en un hecho palpable a corto plazo. Nuestro trabajo de investigación nos permite evidenciar una vez más el potencial que tienen las plantas para sintetizar una gran diversidad de metabolitos y sus innumerables aplicaciones biológicas.

Existen innumerables reportes sobre el potencial citotóxico de las plantas, y ejemplo de ello es el taxol, un fármaco muy conocido, ampliamente utilizado en la quimioterapia. Éste compuesto fue aislado hace más de cincuenta años de *Taxus brevifolia* y su aprobación como agente quimioterapéutico, fue en la década de los 80.

Respecto a la especie de estudio del presente trabajo: *Verbesina persicifolia*, existen pocos estudios sobre su potencial citotóxico. No obstante, al ser parte de la familia de las Asteráceas, sobre la cual diferentes reportes han mencionado la presencia de compuestos de origen terpénico con algunas actividades biológicas, incluida la citotoxicidad. Lleva a pensar que ésta especie posea un potencial como fuente de sustancias con actividad citotóxica.

---

En el estudio de la raíz de esta especie se pudieron aislar compuestos de tipo sesquiterpeno y por estudios previos en el grupo de trabajo se ha corroborado que están presentes en las partes aéreas de la planta. Se desconocen las funciones de este tipo de compuestos en la planta, pero probablemente por la similitud estructural con algunas hormonas, ayuden a su desarrollo.

El extracto de raíz de *V. persicifolia* mostró cierta selectividad sobre células T-47D sirven de modelo de estudio en cáncer de mama, son células que presentan receptores hormonales y que son de pronóstico favorable para el paciente. Sin embargo, hay casos que tienen resistencia al tratamiento, especialmente en el caso de la hormonoterapia, sucede que algunos fármacos por razones desconocidas promueven mutaciones en la célula y como consecuencia hay una resistencia al tratamiento. Por esa razón, se continúa en la búsqueda de nuevos agentes.

Uno de los pasos preliminares para esa búsqueda es el estudio de la citotoxicidad de productos naturales y de principio nos permite conocer el potencial de toxicidad de una planta sobre células cancerígenas. Con ese estudio se puede partir para más análisis y proponer sustancias para el tratamiento de esta enfermedad.

De los aspectos a considerar para que un compuesto sea propuesto para el tratamiento de una determinada enfermedad, es necesario saber el tipo de muerte celular inducida, a la célula blanco. Mucho se ha hablado de la apoptosis y su importancia en el tratamiento contra el cáncer, por la <<sencilla>> razón que muchas enfermedades son producto de procesos inflamatorios que a su vez son producidos por una forma desregulada en la muerte celular o bien necrosis. Retomando el asunto de apoptosis pudimos comprobar mediante citometría de flujo que los compuestos aislados de esta planta son capaces de inducir este proceso, por lo tanto, es posible el uso muy a futuro de dichos compuestos como piezas importantes en el tratamiento contra el cáncer. Por demás está decirlo que se necesitan muchos estudios para llegar a ese propósito, pero hemos podido sentar las bases para futuras aplicaciones.

---

## 2. ANTECEDENTES

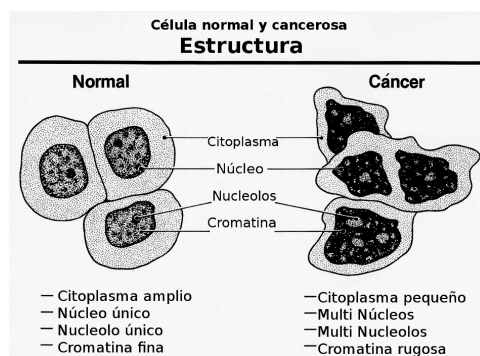
El cáncer representa una de las principales causas de muerte, de manera general en el caso de las mujeres se estima que el cáncer de mama y cervicouterino ocupan las 2 primeras causas a nivel mundial, dependiendo del país y el año se alternan el primer lugar. El cáncer es un claro ejemplo donde ha ocurrido una desregulación en el proceso de muerte de las células, esto quiere decir que algunas células han alterado su ciclo y proliferan de manera descontrolada (Hanahan y col., 2000).

Una célula anormal aislada que no prolifere más que sus vecinas normales no produce ningún daño significativo, pero si su proliferación esta fuera de control, producirá un tumor o neoplasia. Sin embargo, si las células neoplásicas permanecen agrupadas en una masa única, se dice que el tumor es benigno y generalmente puede conseguirse una curación completa extrayendo la masa quirúrgicamente.

Las pérdidas de regulación que dan origen a la mayoría o a todos los casos de cáncer se deben a daños genéticos. En la aparición del cáncer se han implicado mutaciones en dos amplias clases de genes: los protooncogenes y los genes supresores de tumores. Los protooncogenes son activados para volverse oncogenes mediante mutaciones que los hacen excesivamente activos en la promoción del crecimiento (Gelman 2002).

El cáncer suele ser el resultado de mutaciones que aparecen en el curso de la vida durante una exposición a los carcinógenos, que incluyen ciertos químicos y radiación ultravioleta, alterando funciones de factores transcripcionales que al ser activados aceleran los procesos de inflamación, metástasis, angiogénesis; entre otros (Subash y col. 2010). Las mutaciones que lo causan ocurren principalmente en las células somáticas, no en las células de la línea germinal y estas mutaciones no se transmiten a la siguiente generación; salvo en el caso de las mutaciones ocurridas en algunos genes como BRCA1, asociado al cáncer de mama. (McCullough y col., 2007).

Dado que las múltiples mutaciones que conducen a la formación de un tumor pueden requerir años para acumularse, la mayoría de los cánceres no se presentan en etapas tempranas de la vida. Su aparición después de la edad reproductiva puede ser una de las razones por las que las restricciones evolutivas no hayan desarrollado otras formas para suprimirlo. A medida que el cáncer avanza, el tumor se convierte en un <<órgano>> anormal, cada vez mejor adaptado para el crecimiento y la invasión de los tejidos circundantes; por esta razón presentan diferencias morfológicas, como lo muestra la Figura 1.



**Figura 1.** Diferencias entre una célula normal y una célula cancerígena.

Las células cancerosas tienen una relación compleja con la matriz extracelular y la lámina basal para penetrarla y efectuar la metástasis. A medida que la lámina basal se desintegra, algunas células tumorales ingresarán en la sangre, pero menos de 1 de cada 10,000 células que escapan del tumor primario sobreviven para colonizar otro tejido y formar un tumor metastásico secundario (Ellis y col., 2002). Generalmente la mayoría de las mutaciones oncogénicas que inducen cáncer, se producen en células en proceso de división. Cuando esas mutaciones ocurren en células que no se dividen (por ejemplo, neuronas y células musculares), casi nunca inducen cáncer.

Los tumores ya sean primarios o secundarios, necesitan de nuevos vasos sanguíneos para crecer hasta una gran masa; la mayoría de los tumores inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos que invaden el tumor y los alimentan, este es un proceso que se le llama angiogénesis. Los nuevos vasos sanguíneos nutren el tumor en crecimiento, le permiten aumentar el tamaño y, por lo tanto, se incrementa la probabilidad de que produzcan mutación. La presencia de un vaso sanguíneo adyacente también facilita el proceso de metástasis (Subash y col., 2010).

## 2.1 Tipos de cáncer de mama y cáncer cervicouterino

Los diferentes tipos de cáncer van a depender del tejido que afectan y características microscópicas que presenten. En algunos casos un simple tumor puede ser la combinación de estos tipos.

El cáncer de mamá es una enfermedad, evolutivamente compleja, por lo que a pesar de los avances de la oncología moderna, es la primera causa de muerte por neoplasias en la mujer, se estima que alrededor de 500 mil muertes al año ocurren por esta enfermedad y se estima que un 70% de estas muertes ocurre en países en vías de desarrollo (Cárdenas-Sánchez y col., 2013)

El cáncer de mama puede ser clasificado según los diferentes tipos de proteínas que exprese o bien como receptor de hormonas positivo o triple negativo. Además de esta



---

clasificación, está aquella que involucra, el tamaño del tumor, ganglios linfáticos axilares y metástasis a distancia (Cárdenas-Sánchez y col., 2013). De forma general están aquellos a los que se les conoce como Carcinoma ductal *in situ* o intraductal.

### **2.1.1 Carcinoma ductal *in situ***

Se considera un grupo heterogéneo de neoplasias caracterizado por la presencia de células epiteliales malignas que crecen dentro de los conductos mamarios, sin rebasar la membrana basal. Estos carcinomas son inicialmente sospechados a raíz de un hallazgo mastográfico anormal (microcalcificaciones, masa o un área densa asimétrica) o por la existencia de un tumor palpable, o secreción por el pezón.

### **2.1.2 Carcinoma ductal**

Es una lesión poco frecuente y su diagnóstico histológico y diferencial con hiperplasia atípica requiere la intervención de patólogos expertos. En general, no se relaciona con masa palpable o cambios mastográficos específicos. Esta lesión se considera como un marcador de riesgo y no como un cáncer que evolucione hacia la forma invasora de manera directa. Ésta enfermedad en muchos casos puede ser prevenible gracias al diagnóstico en fases iniciales y a los avances del tratamiento sistémico (Rizzo y col., 2008). Los factores de esta enfermedad pueden ser diversos, según el tipo de cáncer van a ser los factores de riesgo (Hulka, 1996).

Existen cuatro tipos de cáncer de mama clasificados en un criterio inmuno-histoquímico, en su perfil deben expresar: receptor de estrógenos/receptor progesterona (ER/PR) y receptor del factor de crecimiento (Her2/neu), positivos (+) o negativos (-) (Adedayo A. y col., 2008). Los grupos son:

ER/PR+, Her2+ = ER+/PR+, Her2+; ER-/PR+, Her2+; ER+/PR-, Her2+

ER/PR+, Her2- = ER+/PR+, Her2-; ER-/PR+, Her2-; ER+/PR-, Her2-

ER/PR-, Her2+ = ER-, PR-, Her2+

ER/PR-, Her2- = ER-, PR-, Her2-

### **2.1.3 Factores de riesgo**

Factores hormonales: el cáncer de mama es un tumor hormonodependiente, por lo que cualquier factor que aumente la exposición a estrógenos, aumenta el riesgo de padecer cáncer de mama. También se ha asociado el estilo de vida al desarrollo del cáncer, por ejemplo, la obesidad genera una mayor predisposición a desarrollar la enfermedad, debido a la expresión incrementada de la enzima aromatasa, que participa en la síntesis de estrógenos endógenos (Serdar y col., 2012). Otro factor de riesgo, son las mutaciones en los genes BCRA1 o BCRA2, se ha reportado que aproximadamente el 13% de las mujeres

---

jóvenes del Reino Unido, poseen mutación en alguno de estos genes, mientras que en mujeres de 40 a 49 años se ha observado solo el 2.2%. (Gewefel y col., 2014). Sin embargo existen más factores: menarquia precoz, menopausia tardía, primer embarazo tardío y no lactancia (Samavat y col., 2015). Hasta el momento no hay estudios definitivos con respecto al papel de los anticonceptivos orales.

Por otra parte, podemos decir que el proceso de metástasis es un proceso complejo con muchos pasos, entre ellos están las mutaciones a genes ya relacionados a esta característica tan interesante del cáncer; uno de los más estudiados es BRCA1.

La invasión de los tejidos no es aleatoria y depende de la naturaleza de la célula y del tejido invadido. La metástasis se facilita en las células tumorales debido a que producen factores de crecimiento y de angiogénesis (inductores de crecimiento de vasos sanguíneos, como el factor de crecimiento vascular endotelial VEGF). En años recientes se ha asociado la metástasis con la formación de nuevos vasos linfáticos (Al-Rawi y col., 2004).

Una única mutación no es suficiente para convertir una célula sana típica en una célula cancerosa que prolifere sin restricciones, porque de ser así no seríamos organismos viables, de esta forma es como entran en juego algunos genes conocidos como supresores tumorales, estos se activan cuando ocurre algún daño el ADN, ejemplos de estos son: *p53*, *myc* o BRCA1 y BRCA2; generalmente su mecanismo de acción, es detener el ciclo celular, hasta que el daño sea reparado. (Cárdenas-Sánchez y col., 2013)

En la mayoría de tipos de cáncer la incidencia se incrementa drásticamente con la edad. Un carcinógeno que induce una mutación desencadenará un cáncer, de esta forma se dice que actúa como un iniciador tumoral. La exposición repetida a ciertas sustancias conocidas como promotores tumorales, que en sí mismos no son mutagénicos, pueden producir cáncer en un tejido que previamente ha sido expuesto a un iniciador tumoral.

Sigue siendo difícil identificar los factores ambientales específicos del riesgo o establecer cómo actúan. Ciertamente, algunos factores actúan como iniciadores tumorales mutagénicos, provocando directamente un cambio genético; otros probablemente actúen como promotores tumorales, ayudando a aumentar la población de las células, a través de sucesivas mutaciones, hasta conseguir un cáncer en pleno desarrollo. Por ello se considera que los agentes cancerígenos del humo del tabaco, el consumo de alcohol, el uso de hormonas exógenas, la obesidad; etc. (Chajès y col., 2013), pertenecen a la primera categoría. Mientras que las hormonas reproductoras que circulan en el organismo durante diferentes etapas de la vida en la mujer podrían pertenecer a la segunda categoría (Samavat y col., 2015).

---

Las células cancerosas pueden ser extirpadas quirúrgicamente o destruidas con agentes citotóxicos o con radiación, pero es difícil erradicar todas y cada una de ellas. La cirugía raramente puede destruir todas las células y los tratamientos que matan a las células cancerosas generalmente son tóxicos para las células normales. Además, puede ocurrir el resurgimiento de la enfermedad; a diferencia de las células normales, pueden desarrollar resistencia a los tóxicos utilizados en su contra. En algunos casos, tratamientos efectivos, están basados en el entendimiento de las causas de un tipo específico de cáncer. Por ejemplo, los estrógenos parecen actuar como promotores naturales del cáncer de mama y el tratamiento con un antagonista de estrógenos, como el fármaco tamoxifeno, es efectivo en la mayoría de pacientes de cáncer de mama, evitando o retardando la recurrencia de la enfermedad (Yang y col., 2013).

Un gran problema del tratamiento contra el cáncer es cómo matar selectivamente las células cancerosas. Algunos tipos de células cancerosas son especialmente vulnerables al ataque selectivo porque dependen de hormonas específicas o porque sus superficies tienen características químicas no usuales que pueden ser reconocidas por anticuerpos.

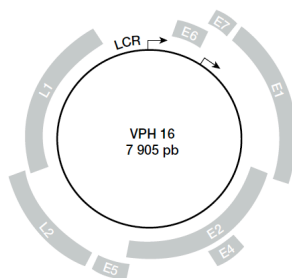
#### **2.1.4 Cáncer cervicouterino**

El cáncer cervicouterino (CaCu), es un problema de salud pública, que pese a ser un modelo de prevención del cáncer, es la segunda causa de cáncer más común en México y la tercera causa de muerte en todo el mundo (Cetina y col., 2014). El cáncer cervicouterino (CaCu) ocupa el tercer lugar en tasas de incidencia a nivel mundial, con un estimado de 530,000 nuevos casos en 2008 (tasa de mortalidad global de 15 por 100,000 mujeres). Más del 85% de la carga global ocurre en países en desarrollo (Torres-Poveda y col., 2014). Sin embargo, en países que poseen una economía consolidada, se ha visto una importante reducción en los casos de incidencia por CaCu, siendo así 10 casos por cada 100,000 mujeres. Caso contrario, en países de América Latina y el Caribe, las tasas anuales de CaCu se mantienen altas, con un índice de 20 casos por cada 100,000 mujeres (Lewis, 2004).

#### **2.1.5 Asociación del Virus de Papiloma Humano (VPH) y cáncer**

La prevalencia, a nivel mundial, del VPH en mujeres con citología normal es aproximadamente de 10%, lo cual indica que es una de las enfermedades de transmisión sexual (ETS) más recurrente. El VPH 16 es el genotipo más común y contribuye con 50-55% de los casos de CaCu (Torres-Poveda y col., 2014). Numerosos estudios epidemiológicos y moleculares establecen la infección persistente con el Virus del Papiloma Humano (VPH) como causa necesaria para el desarrollo del CaCu (Tomassino, 2014). Alrededor de 200 tipos de papiloma virus han sido identificados. Todos los tipos de VPH son virus

epiteliotrópicos que pueden ser clasificados en su capacidad de infectar la mucosa o queratinocitos cutáneos (Conway y col., 2009). El virus del papiloma humano tiene un tamaño aproximado de 50-55 nm, está compuesto por dos proteínas L1 y L2 encapsulando un ADN de doble cadena circular con una longitud de 8,000 pares de bases (bp), que codifica para 7-9 genes (Tomassino, 2014). Las proteínas L1 y L2 son las que albergan el genoma viral (Figura 2). (Manzo-Merino y col., 2014) El pronóstico del CaCu está determinado por el tamaño tumoral, extensión de la invasión micocervical, invasión parametrial, extensión de la pared pelviana, afectación de los ganglios linfáticos y presencia de metástasis a distancia (Machado-Reyes y col., 2014).



**Figura 2.** Organización del genoma del virus del papiloma humano.

El genoma viral está constituido por DNA circular de doble hebra de aproximadamente 9Kb (dependiendo del tipo viral). Está dividido en tres regiones: LCR (región larga de control); región temprana (E) que codifica las oncoproteínas y proteínas que regulan la transcripción y la región tardía (L) que codifica para las proteínas de la cápside (Manzo-Merino y col., 2014).

## **2.2 Muerte celular y su desregulación en el cáncer**

La muerte celular es un proceso crucial para conservar el equilibrio en un organismo, por ejemplo en el desarrollo embrionario y cuando ésta se ve afectada, se presentan diferentes complicaciones. Las anomalías ocurridas en la regulación de la muerte celular pueden ser componentes significativos, para enfermedades como cáncer, síndrome linfo-proliferativo autoinmune, SIDA, isquemia y enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo Parkinson, Alzheimer, Huntington, entre otras (Elmore, 2007)

Durante el desarrollo normal muchas células están diseñadas para la muerte celular programada, también conocida como apoptosis. Muchas alteraciones, incluidos los errores en la mitosis, el daño del DNA y un exceso de células no necesarias para el desarrollo de un órgano en funcionamiento, también pueden desencadenar la apoptosis. El cáncer es un ejemplo donde los mecanismos normales del ciclo celular son disfuncionales, con una sobreproliferación de células (King y col., 1998).

---

De hecho, la anulación de la muerte celular o apoptosis durante la carcinogénesis se piensa que juega un papel importante en la progresión y desarrollo de algunos tipos de cáncer (Kerr y col., 1994). Existen diversos mecanismos por los cuales las células tumorales evaden el proceso de apoptosis.

Las células tumorales pueden adquirir resistencia a la apoptosis por la expresión de proteínas anti-apoptóticas, tal como Bcl-2 o por la desregulación o mutación de proteínas pro-apoptóticas como Bax. Estas proteínas son reguladas por la expresión del gen supresor tumoral *p53* (Miyashita y col., 1994). El supresor tumoral *p53* es un factor de transcripción que regula el ciclo celular y está ampliamente mutado en la tumorigénesis humana (Wang y col., 1997). El gen *p53* puede ser dañado por radiación, agentes químicos y virus tales como virus del papiloma humano (VPH) (Cetina y col, 2014)

### **2.3 Mecanismos de Apoptosis**

Los mecanismos de apoptosis son altamente complejos y sofisticados, implicando una cascada de eventos moleculares dependientes de energía (Elmore, 2007). Hasta el día de hoy se conocen dos principales rutas de apoptosis: la vía intrínseca o ruta mitocondrial y la vía extrínseca o ruta de receptores de muerte. Convergen en una ruta de ejecución, que es la activación de la caspasa 3, dando como resultado la fragmentación del ADN, degradación del citoesqueleto y proteínas nucleares, formación de cuerpos apoptóticos, expresión de ligandos, etc. (Martinvalet y col., 2005)

Las caspasas son sintetizadas como proenzimas inactivas las cuales son activadas cuando se les une un residuo de ácido aspártico, Asp (Cohen 1997). Éstas enzimas tienen actividad proteolítica y son capaces de escindir proteínas en residuos de ácido aspártico. Hasta la fecha se han identificado diez principales tipos de caspasas y éstas están clasificadas en: iniciadoras (caspasa-2,-8,-9,-10), efectoras o ejecutoras (caspasa-3,-6,-7) y caspasas inflamatorias (caspasa-1,-4,-5) (Cohen, 1997; Nirendra y col., 2005). Otra característica bioquímica importante a tomar en cuenta, es la expresión de marcadores de superficie celular, que resultan en el reconocimiento temprano de células apoptóticas para su fagocitosis. Un marcador muy bien conocido es la externalización sobre la superficie celular de la fosfatidilserina (Elmore, 2007). Algunas investigaciones indican que Fas, la caspasa-8 y caspasa-3 están involucradas en la regulación de la externalización de la fosfatidilserina (Ferraro-Peyret y col., 2002).

---

### **a. Ruta intrínseca**

Ésta ruta se caracteriza por los cambios que suceden a la membrana mitocondrial, lo que da como resultado una permeabilidad de ella y una pérdida del potencial de membrana (Saelens y col., 2004). Para llevar a cabo dicha vía se une la procaspasa-9 al factor de activación de apoptosis, Apaf1; así como al Citocromo c formando un apoptosoma (Chinnaiyan, 1999).

El control y la regulación de éstos eventos apoptóticos ocurridos en la mitocondria, están dirigidos por miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (Cory y col., 2002). Algunas de las proteínas pro-apoptóticas son Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad; entre otras. Se piensa que el principal mecanismo de acción de las proteínas Bcl-2 es la regulación del Citocromo C (Elmore, 2007).

Puma y Noxa son dos miembros de la familia de las proteínas Bcl-2 que están también involucradas en la proapoptosis. Puma tiene un papel importante en la apoptosis mediada por *p53*. Noxa es también un candidato mediador de la apoptosis inducida por *p53*. Algunos estudios señalan que puede estar localizada en la mitocondria e interactúa con miembros de la familia Bcl-2, dando como resultado la activación de la caspasa-9 (Oda y col., 2000). La oncoproteína Myc también se ha reportado que potencia la apoptosis a través de mecanismos dependientes e independientes de *p53* (Meyer y col., 2006).

### **b. Ruta extrínseca**

La ruta de señalización extrínseca involucra a receptores transmembranales. Dentro de estos receptores hay algunos que pertenecen a la familia de los factores de necrosis tumoral TNF (Locksley y col., 2001). Éstos dominios transmembranales, son ricos en cisteína, a su vez poseen un dominio citoplasmático, nombrado como dominio de muerte (Elmore, 2007). Hasta el momento se han caracterizado algunos ligandos con sus respectivos receptores, incluidos FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/ DR4 y Apo2L/DR5 (Ashkenazi y col., 1998). Una vez unido el ligando a su receptor dentro de la membrana, se forma un complejo denominado Dominio de Muerte Asociado a Fas (FADD por sus siglas en inglés), en dicho complejo se encuentra un segundo dominio conocido Dominio Efecto de Muerte (DED), teniendo la capacidad de activar a la pro-caspasa-8, ahora este nuevo complejo recibe el nombre de Complejo de Señalización de Inducción de Muerte (DISC) (Arnelle y col, 2008). Una vez creado este complejo se da paso a la activación de la caspasa-3, dando inicio al proceso de apoptosis.

---

### **c. Ruta de ejecución**

Las caspasas de ejecución activan endonucleasas citoplasmáticas, las cuales degradan material nuclear y proteasas que degradan proteínas del núcleo y del citoesqueleto. La caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7 pueden actuar como ejecutoras. La caspasa-3 puede ser activada por cualquiera de las caspasas iniciadoras (caspasa-8, caspasa-9 o caspasa-10). Dicha caspasa puede inducir reorganización del citoesqueleto y desintegración de las células dentro de cuerpos apoptóticos (Elmore, 2007).

### **2.4 Métodos para la detección de Apoptosis**

El proceso de apoptosis, se caracteriza por los cambios que sufren las células en su morfología, otra característica es la disminución del potencial de membrana, activación de caspasas, fragmentación del ADN; entre otras (Cohen, 1997; Häcker, 2000; Elmore, 2007; Liu y col., 2014). Existen diversos métodos para la detección de apoptosis los cuales van desde el análisis de la morfología celular, detección de activación de caspasas, alteraciones en membrana; por mencionar algunas.

El análisis de la morfología celular por medio del uso de microscopias por ejemplo microscopia electrónica de transmisión, son otra vía de detección de apoptosis. (Elmore, 2007). Por otra parte, otro de los ensayos para determinar la inducción de apoptosis, se basa en la detección de caspasas por medio de ensayos fluoruométricos y colorimétricos (Gurtu y col., 1997).

La muerte celular apoptótica está acompañada por un cambio en la estructura de la membrana plasmática por la exposición superficial de fosfatidilserina (Engeland y col., 1998) por lo que esta condición facilita la caracterización de este tipo de muerte celular. De esta forma existen metodologías para la detección de dicho fosfolípido, basadas en la detección de la señal fluorescente emitida por la conjugación de un anticuerpo (Anexina-V) con un fluorocromo, cuando el anticuerpo se une a la fosfatidilserina esta señal puede ser detectada bien por microscopia de fluorescencia o por citometría de flujo. Estas técnicas son de gran sensibilidad porque pueden detectar hasta una sola célula que está en proceso de apoptosis (Elmore, 2007).

### **2.5 Tumores malignos según el sexo en la población de 20 años y más en México**

#### **Morbilidad**

Los tumores malignos que padece la población adulta son diferentes según el sexo. En 2001 para los hombres, la principal causa de morbilidad hospitalaria por cáncer se debió a las neoplasias en órganos digestivos (22.4%); le siguen los tumores en órganos genitales

---

(18.9%), siendo el de próstata el más frecuente; y los de órganos hematopoyéticos (11.9%). En tanto en las mujeres, la principal causa de ingreso hospitalario por tumores malignos se debe al cáncer de mama (26.3%); le siguen las neoplasias en órganos genitales (14.3%) del cuello del útero y del cuerpo del útero principalmente; y de los órganos digestivos (13.6%).

De los egresos (morbilidad hospitalaria) por cáncer en órganos digestivos, entre los varones de más de 20 años, 24.1% correspondieron a personas de entre los 5 y 59 años y 23.3% de 65 y 74 años. Para el caso de los egresos por tumores malignos de los órganos genitales, 27.7% tenían entre 20 y 29 años y 20.7% de 65 y 74 años; de las neoplasias de órganos hematopoyéticos (principalmente leucemia linfocítica y mielocítica), 22.2% son varones de 20 y 29 años y 17.3% de 30 a 39 años.

Para las mujeres el cáncer de mama es la primera causa de morbilidad hospitalaria, de ellas 56.1% son mujeres de 40 a 59 años; situación similar se observa para el cáncer de órganos genitales, 52.9% son de 40 a 59 años; respecto al cáncer en órganos digestivos, son mujeres de 50 a 59 años y de 65 a 74 años quienes lo presentan con mayor frecuencia (26.1 y 21.1% respectivamente).

La tasa de mortalidad hospitalaria por tumores malignos en una población de 20 años y más se incrementa con la edad y, a excepción de las edades entre 65 y 74 años, es más alta en los hombres que en las mujeres. En los varones se observa un incremento constante de egresos hospitalarios por muerte debida al cáncer, al pasar de 5.2 de cada 100 egresos hospitalarios entre los 20 a 29 años a 17.3 en edades de 80 años y más; para las mujeres, la tasa en la población de 20 a 29 años es de 5.0 de cada 100 egresos de mujeres, para después hasta llegar a 16 de cada 100 en el grupo de 80 años y más.

## **2.6 Tratamientos contra el cáncer**

La **cirugía** es a menudo la primera opción de tratamiento si se puede extirpar el tumor del cuerpo. A veces sólo se puede eliminar parte del tumor. Antes o después de la cirugía, se puede usar radiación, quimioterapia o ambas para reducir el tumor. De igual manera en muchos casos se sigue tomando algunos agentes anti-estrógenos para evitar el desarrollo de células cancerosas, pero ello va depender de la naturaleza del tumor (Thurston 2007).

Los médicos usan **quimioterapia** para combatir las células cancerosas. El término quimioterapia se refiere al uso de medicamentos para destruir las células cancerosas. Por lo general, los medicamentos se administran vía intravenosa o se toman vía oral. La quimioterapia adyuvante ha demostrado reducir la recurrencia local en un 30% y la muerte en un 20%. A menudo la quimioterapia es combinada con otros tratamientos para reducir la toxicidad y la resistencia e incrementar la eficacia (Davies 2015).



---

La **radioterapia** utiliza rayos de alta energía (como rayos X) para destruir las células cancerosas y reducir el tamaño de tumores. La radiación puede provenir desde el exterior del cuerpo (radiación externa) o mediante materiales radiactivos colocados directamente en el tumor (radiación interna o implantes radiactivos). El tratamiento con radiación externa es similar a someterse a una radiografía. La mayoría de las pacientes con mastectomía no requieren el uso de radiación, pero el riesgo de reincidencia se incrementa cuando ha habido invasión a los nodos linfáticos (Davies 2015).

## 2.7 Plantas medicinales

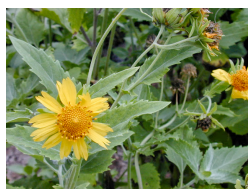
En México, más del 90% de la población en general usa plantas medicinales en una práctica común para el tratamiento de diversas enfermedades (Alonso-Castro y col., 2010). En nuestro país del 30 al 70% de los pacientes diagnosticados con cáncer usan extractos de hierbas como una alternativa terapéutica para muchos tipos de cáncer en áreas urbanas (Alonso-Castro y col., 2010). Como consecuencia, los pacientes a menudo usan remedios a base de hierbas sin prescripción médica o en algunos casos combinados con medicamentos contra el cáncer (Gomez-Martinez y col., 2007).

Éste procedimiento es un tanto riesgoso ya que estos productos pueden modificar, alterar o inhibir el efecto del cual se desee obtener un beneficio; por lo que se ha insistido en no proceder a la automedicación.

Las familias botánicas con el mayor número de especies de plantas que han mostrado efectos antineoplásicos *in vitro* e *in vivo* son *Asteraceae* (Martínez 1989) *Fabaceae* (Mena-Rejon y col., 2008), *Lamiaceae* (Frei y col., 1998). Aunque la familia de las *Asteraceae* posee el mayor número de extractos de plantas estudiados experimentalmente, únicamente *Gymnosperma glutinosum*, *Helianthella quinquenervis*, *Heterotheca inuloides*, *Melampodium paniculatum*, *Montanoa leucantha*, *Smallanthus maculatus*, *Verbesina persicifolia* (Figura 3) y *Viguiera decurren*, se ha reportado que de forma tradicional se utilizan contra algún tratamiento contra el cáncer (Alonso-Castro y col. 2010).

Algunos estudios etnobotánicos indican que, especialmente en los estados de Veracruz, Oaxaca y Puebla, *Verbesina persicifolia* se utiliza para tratar numerosos problemas de salud entre los que se puede mencionar: la inflamación, el dolor, la diabetes y el cáncer, entre otros (Mejía-Flores, 2010).

### 2.7.1 *Verbesina persicifolia*



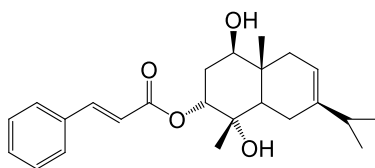
**Figura 3.** *Verbesina persicifolia*.

Es una planta de tipo arbustiva, las hojas son ligeramente alargadas y miden hasta 14 cm de largo. Las flores crecen en grupos formando cabezuelas que se esparcen numerosas en la planta, habita en clima cálido y semicálido, entre los 200 y los 1850 metros sobre el nivel el mar. Asociada a bosques tropicales caducifolios y subcaducifolio además de matorral

xerófilo, se conoce también que esta especie, habita en las zonas húmedas de la Sierra Madre oriental y hasta el sur de México. La familia *Asteraceae* (*Compositae*), es una de las más diversas y la más ampliamente distribuida. Constituye un grupo monofilético, con una serie de tribus cuya delimitación y relación taxonómica aún no es clara (Redonda-Martínez y col., 2011). Ésta familia es una de las más grandes con 1100 géneros y cerca de 2500 especies con distribución cosmopolita, los géneros más grandes son: *Senecio* con 1500 especies, *Vernonia* con 900, *Hieracium* con 800 y *Eupatorium* con 600 especies (Germán-Ramírez 2008). Algunas especies tienen uso ornamental, medicinal y alimenticio. Muchas resultan favorecidas por efecto de la perturbación en las comunidades vegetales y llegan a ser elemento abundante de las primeras etapas sucesionales de dichas comunidades. Un buen número de ellas son conocidas por su marcado comportamiento arvense, como malezas de cultivos y jardines o como ruderales en los caminos (Redonda-Martínez y col., 2011).

### 2.7.1.1 Estudios fitoquímicos de *Verbesina persicifolia*

Son pocos los estudios sobre ésta especie, uno de ellos es el trabajo de Tesis de Mejía Flores en 2007 donde aisló el compuesto sesquiterpénico tipo eudesmano 1 (Figura 4); Los resultados de este autor se muestran en la Tabla 1.

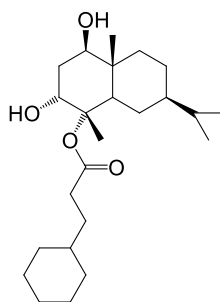


**Figura 4.** 3α-cinamoiloxi-1β,4α-dihidroxi-eudesm-7,8-eno (**1**).

**Tabla 1.** Valores de IC<sub>50</sub> obtenidos para el compuesto **1**.

Línea celular	IC <sub>50</sub> μM	IC <sub>50</sub> μM Cisplatino
U-251 (SNC)	57.1	9.09
PC-3 (Próstata)	29.7	15.94
K-562 (Leucemia)	35.5	15.20
HCT-15 (Colon)	53.1	13.85
MCF7 (Mama)	28.6	13.03
SKUL-1 (Pulmón)	52.29	7.13

De las distintas líneas celulares que evaluó, el compuesto citotóxico aislado presentó una mejor IC<sub>50</sub> contra la línea celular MCF7 que es de cáncer de mama. Este mismo autor, continuando con el estudio, reporta en 2010 la evaluación de un derivado hidrogenado (**2**) de éste producto natural cuya estructura se muestra en la Figura 5.



**Figura 5.** 4 $\alpha$ -(2-fenil)etil-1 $\beta$ ,3 $\alpha$ -dihidroxiudesmano (**2**).

Los resultados se muestran en la Tabla 2 y como puede notarse, se disminuye de manera importante el valor de IC<sub>50</sub> sobretodo en las líneas de cáncer de pulmón y leucemia.

**Tabla 2.** Valores de IC<sub>50</sub> obtenidos para el compuesto **2**.

Línea celular	IC <sub>50</sub> $\mu$ M	IC <sub>50</sub> $\mu$ M Cisplatino
U-251 (SNC)	15.63 $\pm$ 1.3	9.09 $\pm$ 0.88
PC-3 (Próstata)	13.67 $\pm$ 0.01	15.94 $\pm$ 1.2
K-562 (Leucemia)	9.13 $\pm$ 1.3	15.20 $\pm$ 1.4
HCT-15 (Colon)	12.12 $\pm$ 1.1	13.85 $\pm$ 0.79
MCF7 (Mama)	22.13 $\pm$ 1.1	13.03 $\pm$ 1.5
SKUL-1 (Pulmón)	5.79 $\pm$ 0.32	7.13 $\pm$ 0.25

Posteriormente, Avelino Flores en 2013, describe el estudio biodirigido de la especie, en donde aísla el compuesto 1, mismo que reportó Mejía Flores, dicho compuesto presenta actividad citotóxica, teniendo una marcada selectividad por las líneas de cáncer de mama MDA-MB-231 y T-47D. Por estudios de expresión de caspasas y Anexina-V, se establece la inducción de apoptosis de este compuesto. Debido a que el proceso de aislamiento de las hojas, resulta de varios pasos y la abundancia del compuesto es baja, se considera evaluar como fuente de obtención la raíz de la especie. Por ello, realiza un ensayo en donde evalúa los extractos de hojas y raíz, para comparar el efecto citotóxico, encontrando los resultados mostrados en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Efecto citotóxico de extractos de hoja, raíz y el compuesto 1.

Línea celular	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml) $\pm$ SD		
	Extracto hoja	Extracto raíz	Compuesto 1
MCF7	21.9 $\pm$ 2.9	16.3 $\pm$ 0.2	<b>13.6 <math>\pm</math> 1</b>
MDA-MB-231	23.3 $\pm$ 3.9	12.4 $\pm$ 0.8	12.6 $\pm$ 0.6
T-47D	16.0 $\pm$ 1.2	4.95 $\pm$ 0.4	<b>4.5 <math>\pm</math> 0.4</b>

---

Éste resultado es de gran importancia ya que el extracto de raíz presenta un  $IC_{50}$  comparable a uno de los compuestos aislados en las partes aéreas, la hipótesis con este resultado es que los componentes presentes en raíz quizá tengan una estructura similar, al compuesto aislado en las partes aéreas; tipo sesquiterpeno o bien poseen un efecto citotóxico mayor y probablemente estén en una mayor abundancia.

---

### 3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la incidencia del cáncer en México se genera un gran problema de salud en el cual una parte representativa de la población adulta se ve afectada, principalmente mujeres de 40 años en adelante, siendo los tipos de mayor incidencia el cáncer de mama y cáncer cervicouterino (INEGI, 2012). Sin embargo, a partir del 2006 el cáncer de mama ocupa el primer lugar de mortalidad por tumor maligno en las mujeres mayores a 25 años. Por esta razón se pretende encontrar una nueva propuesta de alternativa terapéutica para el tratamiento de cáncer y, debido a que las hojas de *V. persicifolia* presentan actividad antitumoral, se desea evaluar si la raíz posee en mayor abundancia a éste tipo de compuestos (Avelino-Flores 2014). Es importante mencionar que hasta el momento no hay registro de análisis realizados con los extractos de la raíz de *V. persicifolia* en los cuáles se determine su actividad citotóxica.

Cabe mencionar que la búsqueda de sustancias nuevas para combatir esta enfermedad, resulta necesaria, debido a la generación de resistencia de algunos tipos de cáncer a agentes ampliamente utilizados, por ejemplo; taxol, doxorubicina, tamoxifeno, vincristina, 5-fluoruracilo, etc. (Reuter y col., 2010). Además algunos de los compuestos de uso clínico en la actualidad generan efectos colaterales o bien su obtención resulta en un alto costo del fármaco; por ejemplo el taxol (medicamento para el tratamiento contra el cáncer) se obtiene de *Taxus brevifolia* y *Taxus baccata*, para producir 2.5 kg de este compuesto se requieren 2.7 toneladas de la corteza de éstos árboles lo que representa aproximadamente 12,000 árboles con al menos 10 años de crecimiento.

---

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar los compuestos de la raíz de *Verbesina persicifolia* y evaluar su actividad citotóxica.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar y elucidar la estructura de los compuestos presentes en la raíz de *V. persicifolia*.
- Evaluar la actividad citotóxica de los compuestos puros *in vitro*.
- Caracterizar el tipo de muerte inducida por el extracto o compuesto con mejor actividad.

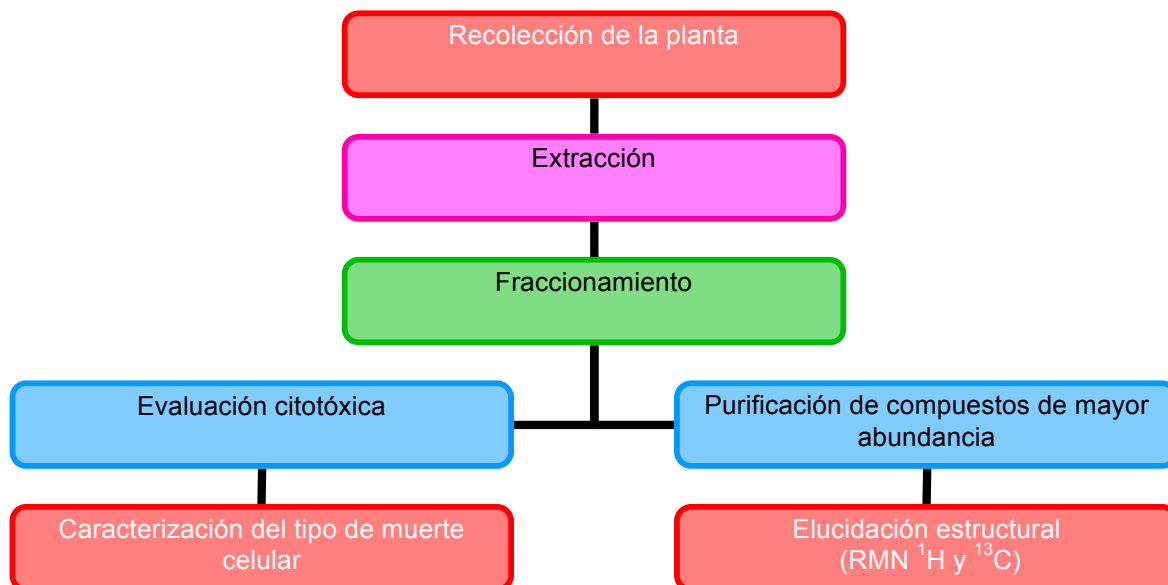
---

## **5 HIPOTESIS**

Si los componentes que están presentes en las raíces son de naturaleza sesquiterpénica y de estructura semejante al aislado en hojas, pueden presentar actividad citotóxica.



## 6. METODOLOGIA



### 6.1 Obtención de extractos

#### a) Recolección, identificación y secado de *V. persicifolia*

Se recolectó la planta de *Verbesina persicifolia* en el municipio de Francisco Z Mena en el estado de Puebla, fue comparada con el espécimen identificado y registrado en el herbario de la BUAP en el trabajo previo, del equipo de trabajo. La planta se secó a la sombra a temperatura ambiente y una vez seca se separó en partes aéreas y raíz. Cada parte vegetal fue molida por separado en un molino mecánico y posteriormente ser extraída.

### 6.2 Preparación del extracto

Se realizó la maceración consecutiva de las partes aéreas de *V. persicifolia* por separado con 3 disolventes de baja a alta polaridad (hexano, cloruro de metileno y metanol), utilizando una proporción 1:3 (planta/disolvente), a temperatura ambiente por 24 h (por duplicado) (Betancur, 1999). Una vez pasado el tiempo de maceración, se filtró con papel filtro (Whatman), se evaporó el exceso de disolvente del filtrado en rota-vapor marca prendo, modelo A402-2, a 45-50°C, bajo presión reducida. El residuo se puso en un desecador a vacío para eliminar residuos del disolvente durante cinco días y fue almacenado para su uso.

#### 6.2.1 Extracto de diclorometano

Basados en el antecedente de Avelino Flores (2014); el extracto que presento actividad citotóxica fue el de diclorometano, para este estudio se realizó el fraccionamiento del extracto completo, las técnicas fueron:

---

### **Cromatografía en capa fina (CCF)**

Se realizó un análisis de cromatografía en capa fina utilizando placas de sílica gel 60 con un indicador de fluorescencia a 254 nm (TLC, sílice gel 60 de aluminio F<sub>254mn</sub>, marca Merck) de 0.02 mm de espesor en soporte de aluminio y se utilizaron diferentes mezclas de disolventes orgánicos, para comparar las fracciones obtenidas.

### **Cromatografía en columna abierta**

Se utilizó gel de sílice de malla 230-400 (Merck) en columnas de vidrio con filtro de vidrio poroso de diferentes diámetros. Las dimensiones de cada columna fueron elegidas con base en la cantidad de muestra a purificar y se utilizaron mezclas de disolventes como fase móvil (hexano, cloruro de metileno, acetato de etilo y metanol).

#### **6.2.2 Obtención de los compuestos mayoritarios**

Para este proceso, en la CCF se eligió la fracción con mayor actividad citotóxica. Ésta fracción fue sometida a separación de sus componentes por cromatografía en columna abierta. El protocolo utilizado para ésta fracción fue:

Fase estacionaria: Gel de sílice 230-400 (Merck)

Fase móvil: Hexano-Acetato de etilo (mezcla de gradiente)

#### **6.3 Elucidación estructural de los componentes mayoritarios**

La cantidad de muestra utilizada para la caracterización por RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C fue de 10 mg. Además, se utilizaron experimentos en dos dimensiones COSY, HMQC y HMBC de los compuestos puros, para establecer correlaciones entre los diversos fragmentos de las moléculas. También se analizaron los compuestos por espectroscopia de infrarrojo; los datos obtenidos fueron comparados con la bibliografía reportada.

Los espectros de RMN se obtuvieron en un espectrofotómetro Varian-Mercury a 500 MHz, para <sup>1</sup>H y 125 MHz para <sup>13</sup>C, los desplazamientos químicos están dados en partes por millón (ppm) y se empleó cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

#### **6.4 Evaluación citotóxica a través de líneas celulares**

Para la evaluación citotóxica se emplearon líneas celulares de cáncer de mama y una línea de cáncer cervicouterino y como control cultivo primario de glándula mamaria de mama, no tumorigénica; del banco de células del Centro de Investigación Biomédica de Oriente – IMSS (CIBIOR).

---

Se emplearon tres medios de cultivo diferentes, los cuales están formulados de acuerdo al tipo de línea celular. A continuación se menciona las líneas celulares empleadas, así como su origen y el medio en dónde se cultivaron.

**Línea celular MDA-MB-231.**

Células epiteliales obtenidas de líquido pleural de un adenocarcinoma metastásico de glándula mamaria en una paciente caucásica de 51 años.

**Línea celular SiHa**

Células humanas de carcinoma escamoso de cérvix (tumor grado II), contiene integrado a su genoma de una a dos copias de papiloma virus tipo 16 y 18, tumorogénicas.

El cultivo se realizó en medio DMEM, 5% SFB; incubadas a 37°C en atmósfera con humedad y CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se levantaron con tripsina-EDTA (Condiciones de cultivo y manejo recomendadas por la ATCC).

**Línea celular T-47D.**

Células epiteliales obtenidas de líquido pleural de un carcinoma ductal infiltrado en la mama, en una paciente caucásica de 54 años.

**Línea celular MCF7**

Células epiteliales obtenidas de líquido pleural de un adenocarcinoma infiltrado en la mama, en una paciente caucásica de 69 años.

El cultivo se realizó en medio RPMI, 10% SFB para células T-47D; y para MFC7, 7% SFB incubadas a 37°C en atmósfera con humedad y CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se levantaron con Tripsina-EDTA (Condiciones de cultivo y manejo recomendadas por la ATCC).

**Línea celular MCF 10A.**

Estas células pertenecen a un cultivo primario de glándula mamaria no tumorogénica; se utilizan con el propósito de evaluar el posible daño que tengan los distintos tratamientos a células sanas.

El cultivo para esta línea se llevó a cabo en medio DMEM/F12; 5% suero fetal de caballo, SFC; factor de crecimiento epidérmico, 100 µL EGF; hidrocortisona, 250 µL; insulina 500 µL; cólera toxina 50 µL; penicilina/ estreptomycin 5 mL; incubadas a 37°C en humedad y CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se levantaron con tripsina-EDTA (Condiciones de cultivo y manejo recomendadas por la ATCC).

---

#### **6.4.1 Ensayo preliminar**

Se colocaron 10,000 células SiHa 200  $\mu$ L por pozo (placa de 96 pozos) las que se preincubaron por 24 h (condiciones de cultivo antes mencionadas), concluido ese tiempo el medio se retiró y será sustituido por medio fresco con cada uno de las fracciones a diferentes concentraciones (0, 5, 10, 25, 50, 75 y 100  $\mu$ g/mL) después de una exposición de 72 h, bajo las mismas condiciones, se evaluó el efecto de los extractos en las células, cuantificando la viabilidad celular con MTT (Avelino-Flores, 2013).

##### **6.4.1.1 Ensayo de viabilidad con MTT**

Para evaluar la citotoxicidad de los extractos sobre las células; se cuantificó la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico MTT (SIGMA). Este método evalúa la actividad metabólica de las células, específicamente en la mitocondria. El reactivo se compone de las sales amarillas de tetrazolium de sodio, que al ser reducidas por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial cambian a formazán, cristales de color azul insolubles en agua. La coloración azul obtenida en el ensayo es proporcional a la actividad celular y por ende la viabilidad de las mismas, la lectura se realizó en un lector Elisa (ELISA Diagnostic Pasteur) a 550 nm con un fondo de 620 nm. Este ensayo es sencillo, económico y requiere de un menor tiempo para su realización, por lo que es muy recomendable para un primer tamizado de actividad y para los fraccionamientos biodirigidos (Avelino-Flores, 2005).

##### **6.4.1.2 Ensayo para evaluar la actividad citotóxica de los compuestos**

Se realizaron 3 tipos de ensayos para la evaluación de la actividad citotóxica, un ensayo preliminar para determinar los extractos con actividad comparable al testigo positivo de selección (taxol), un segundo ensayo de curvas dosis-respuesta con extractos seleccionados sobre la línea celular T-47D, MDA-MB-231 y MCF7 para la determinación de los valores de  $IC_{50}$ . Y un tercer ensayo sobre células de glándula mamaria no tumorigénica con los compuestos aislados del extracto de diclorometano (DCM). Los ensayos se hicieron en tres experimentos independientes, cada uno por triplicado.

##### **6.4.1 Calculo de la $IC_{50}$**

Para el cálculo de la  $IC_{50}$  fue a través de una regresión lineal a partir de dosis respuesta, para cada fracción y compuesto puro, se utilizó el software Kypplot (versión 2.0).

#### **6.4.2 Curva dosis – respuesta para control negativo**

Después de 24 h de incubación, el medio con 10 000 células fue reemplazado con medio fresco (DMEM o RPMI) según sea la línea celular, con diferentes dosis de dimetilsulfóxido (DMSO) 0, 0.025, 0.5, 0.1 y 0.2% en el medio de cultivo, después de 72 horas de exposición con el tratamiento de DMSO se midió la viabilidad con el ensayo colorimétrico de MTT. Esto

---

se hizo para determinar la concentración a la que el DMSO no causa daño o muerte celular. Se utilizó como control negativo, células crecidas en medio sin DMSO.

Nota: Todas las micrografías fueron tomadas con un microscopio de contraste de fases marca Nykon, con una amplificación de 10x.

### **6.5 Determinación del tipo de muerte celular inducida**

Conociendo el compuesto que presentó mejor actividad, sobre alguna línea celular, de las seleccionadas para este estudio, se procede a determinar el tipo de muerte celular inducida. Con este fin se hizo el uso de la citometría de flujo, utilizando el kit Dead cell apoptosis with Annexin V FITC and PI, dónde el kit contiene el reactivo de Anexina V conjugado con el fluorocromo fluoricein-isotiocianato (FITC por sus siglas en inglés) y el reactivo Yoduro de propidio. El primero es utilizado como la detección de células apoptóticas y el segundo para la detección de células necróticas.

La señal fluorescente se midió en un citómetro FACScanto™ II (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Y los resultados se analizaron utilizando el programa FACSDiva™.

---

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Recolección, identificación y secado de *V. persicifolia*

#### a. Recolecta:

Se realizó la colecta de la planta en el poblado de Francisco Z. Mena, del municipio Ahuacatlán, en el Estado de Puebla, en el mes de Mayo. Se seleccionó en base a las características descritas en el trabajo de Avelino Flores, 2013. Se procedió al secado de la raíz por un periodo de 20 días a temperatura ambiente a la sombra, sobre papel.

#### b. Identificación:

El material vegetal seco fue enviado al herbario Universitario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). La especie fue identificada como *Verbesina persicifolia* con número de registro: 31319.

#### c. Extracción:

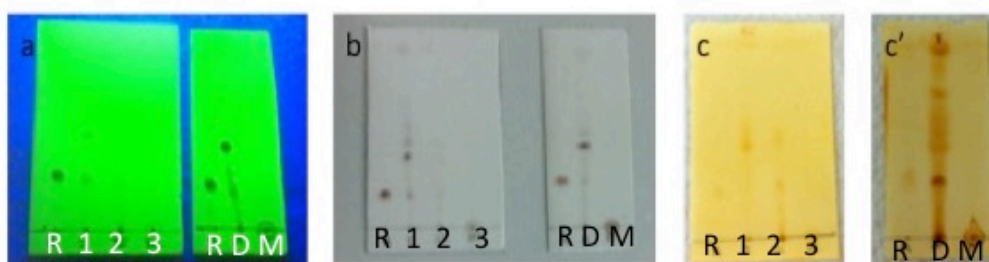
La cantidad empleada para la maceración de la raíz de *V. persicifolia* fue de 2 Kg empleando como disolventes en forma ascendente de polaridad: hexano, diclorometano y metanol. El tiempo de extracción para cada disolvente fue de 24 h (Avelino-Flores, 2014). Una vez finalizado este tiempo, el extracto se filtró con papel filtro (Wathman).

### 7.2 Análisis cromatográfico

#### 7.2.1 Cromatografía en capa fina

Se realizaron placas comparativas para el extracto de hojas y raíz, para conocer la similitud entre extractos. Para estas placas se utilizaron tres distintos reveladores:

El análisis se realizó empleando como reveladores luz ultravioleta de 254 nm, ácido sulfúrico al 5% en etanol y iodo, en el caso de la luz UV por la naturaleza de los componentes, bajo esta longitud de onda ( $\lambda$ ) no se pueden revelar la totalidad de los componentes del extracto. En el caso de ácido sulfúrico, se pueden evidenciar una mayor cantidad de metabolitos en el extracto hexánico probablemente estos compuestos son de naturaleza apolar debido a la polaridad del disolvente empleado. Al usar iodo como revelador en el extracto de diclorometano de la raíz se pueden observar diversos componentes de baja polaridad, a lo largo de la placa cromatográfica. Además, en las placas se puede observar que el compuesto de referencia está presente en el extracto hexánico y diclorometánico; para el extracto metanólico no se pudo visualizar su presencia. Figura 6.



**Figura 6.** Comparación de extractos de hojas y raíz por cromatografía en capa fina.

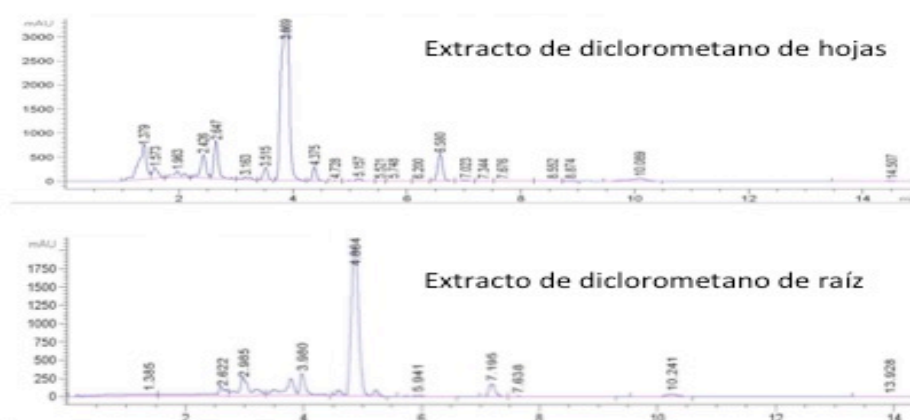
Dónde R= Compuesto 1; 1= Hexánico; 2=Diclorometano; 3= Metanol; extractos de las partes aéreas. D= Diclorometano; M= Metanol; extractos de la raíz.

Reveladores:

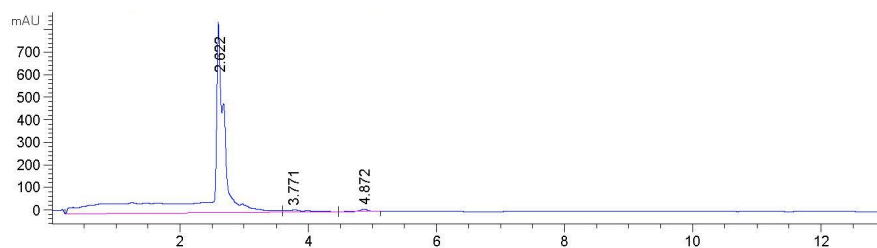
a) Luz ultravioleta a 254 nm; b) Ácido sulfúrico / etanol al 5% y c) Yodo

### 7.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se hizo un análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de los extractos diclorometánicos y metanólicos de hojas y raíz de *V. persicifolia*. En la Figura 7, se muestran los cromatogramas para el extracto diclorometánico y como puede apreciarse, el extracto de hojas presenta un mayor número de componentes en comparación con el extracto de raíz. También resalta que el componente mayoritario del extracto de hojas con tiempo de retención de 3.86 min, se encuentra presente en una baja proporción en el extracto de raíz y que el componente mayoritario de la raíz posee un tiempo de retención de 4.86 min lo cual sugiere una polaridad menor al encontrado en hojas. Para el análisis por HPLC, se empleó una columna de fase reversa (C-18) Zorbax Eclipse a 26°C, como fase móvil se emplearon acetonitrilo-metanol con un flujo de 1mL por minuto, usando un detector de arreglo de diodos (DAD) a  $\lambda$  254 nm.



**Figura 7.** Extractos de hojas y raíz.



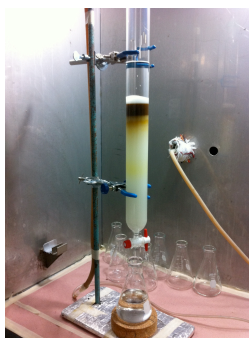
**Figura 8.** Extracto completo de metanolico raíz.

Respecto al análisis de los extractos metanólicos (Figura 8), bajo las condiciones utilizadas de análisis no fue posible apreciar diversos componentes, esto puede deberse a la longitud de onda utilizada para el análisis. Ya que el análisis en cromatografía de capa fina, usando como revelador una solución de  $H_2SO_4$  muestra componentes de alta polaridad que no absorben en el UV. Esto llevó a que sólo se hiciera la separación de los componentes del extracto diclorometanico.

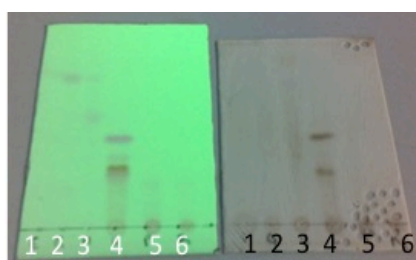
### 7.2.3 Cromatografía en columna abierta

#### Extracto diclorometano (EDCM)

Se sometió a cromatografía en columna al extracto diclorometánico (5 g) de la raíz de *V. persicifolia* (Figura 9), se obtuvieron 45 eluatos, los cuales se agruparon en seis fracciones. Por cromatografía en capa fina se observó que en la (Fracción 4) está enriquecida con un mayor número de compuestos, esto se puede visualizar en la Figura 10.



**Figura 9.** Columna cromatográfica para el extracto de diclorometano.



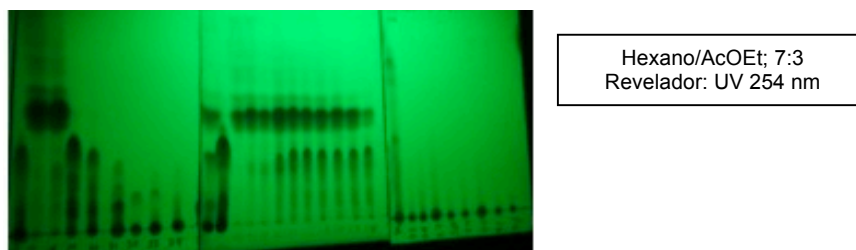
Hexano/AcOEt; 7:3  
Revelador: UV 254 nm y  
 $H_2SO_4$ /EtOH 10%

**Figura 10.** Fracciones para estudio de citotoxicidad.



Posteriormente se hizo una nueva extracción de la raíz partiendo de 2 kg de material vegetal, se maceró con diclorometano y se obtuvieron 20.65 g. Se hizo un fraccionamiento de éste mismo extracto de la siguiente manera:

Mediante cromatografía en columna con sílice gel (70-230 mesh) y empleando como fase móvil mezclas de Hexano/Acetato de etilo. Se obtuvieron 39 eluatos de 350 mL. Posteriormente, el análisis por cromatografía en capa fina (CCF) permitió agrupar los eluatos obtenidos en 24 fracciones ver Figura 11.



**Figura 11.** Análisis cromatográfico por CCF de las fracciones obtenidas.

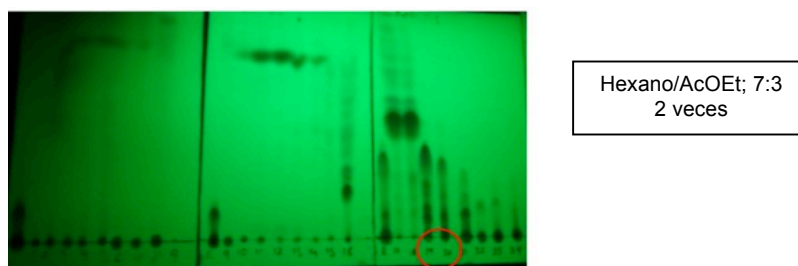
Se tomó la fracción 8 (1.2 g) por ser una fracción abundante y presentar similitud en  $R_f$  de la fracción cuatro que se tomó para la evaluación citotóxica. Se realizó la separación de los componentes por cromatografía en columna en sílica gel (200 g/g) en mezclas de Hexano/AcOEt,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y MeOH, obteniendo 92 eluatos, los cuales se resumen en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Condiciones de purificación de la fracción ocho.

Fase móvil	Mezcla	Eluatos
Hex/AcOEt	9:1	1-10
		11*
Hex/AcOEt	8:2	12-49
		50*
Hex/AcOEt	7:3	51-72
		73*
Hex/AcOEt	6:4	74-81
		82*
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	10	83-86
		87*
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$	95:5	88-92

\*Cambio de fase móvil

Un análisis posterior por CCF permitió ordenar los 92 eluatos en 34 fracciones, observando un compuesto de mayor abundancia en las fracciones 29 y 30; Ver Figura 12.



**Figura 12.** Perfil cromatográfico por CCF de las fracciones obtenidas.

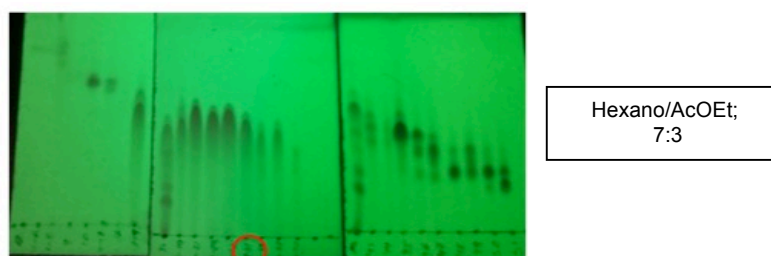
Se realizó un proceso de purificación en cromatografía en columna de las fracciones 29 y 30 (en rojo) Fase estacionaria sílica gel (200 g) con mezclas de Hexano/AcOEt, obteniendo 52 eluatos los cuales se resumen en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Condiciones de purificación de la fracción veintinueve y treinta.

Fase móvil	Mezcla	Eluatos
Hexano	---	---
Hex/AcOEt	9:1	1-6
		7*
Hex/AcOEt	85:15	8-44
		45*
Hex/AcOEt	7:3	46-51

\*Cambio de fase móvil

El análisis por CCF mostró que, los eluatos 29-31 (marcados en rojo) presentan un compuesto mayoritario, Figura 13.



**Figura 13.** Perfil cromatográfico de los eluatos obtenidos por cromatografía en columna.

Dentro del mismo proceso de purificación se obtuvieron los eluatos 10, 11, 32, 33, 48, 50 y 51 con presencia de uno o dos componentes mayoritarios.

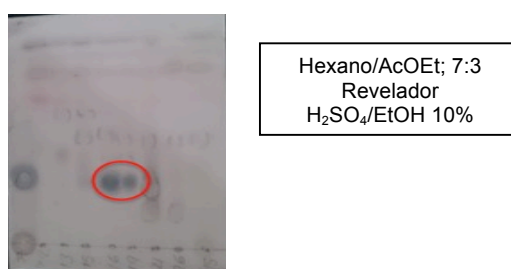
Del eluato 41 se obtuvo un sólido viscoso de color amarillo, el cual por cristalización en presencia de Acetona se obtuvo un sólido de color blanco.

Los eluatos 11-13 se purificaron por cromatografía en columna en sílice (30 g) en mezclas de Hex/CHCl<sub>3</sub>, obteniendo 47 eluatos como se muestra en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Eluatos obtenidos por cromatografía en columna de las fracciones 11-13.

Fase móvil	Mezclas	Eluatos
Hex/ $\text{CHCl}_3$	1:1	1-4
		5*
Hex/ $\text{CHCl}_3$	3:7	6-26
		27*
Hex/ $\text{CHCl}_3$	2:8	28-44
		45*
Acetona	---	46-47

El análisis por CCF mostró que los eluatos 16-20 presentaban el compuesto mayoritario de interés (Figura 14), obteniendo un sólido amarillo el cual se cristalizó en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Acetona, 1:1 para obtener cristales incoloros (Estos cristales en presencia de Hexano se disuelven).



**Figura 14.** Perfil cromatográfico de los eluatos obtenidos por cromatografía en columna.

### 7.3 Caracterización de compuestos

#### 7.3.1 Datos espectroscópicos para el compuesto C-1.

Realizando diversos procesos de purificación, se obtuvo el compuesto **C-1** a través de cromatografía preparativa (20x20 cm) como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó Hexano/Acetato de etilo (7:3 v/v). Se obtuvo un sólido cristalino, pesando 50 mg. La elucidación estructural de **C-1** se realizó por técnicas espectroscópicas de IR, RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ .

El espectro de infrarrojo de **C-1** se muestra en la Figura 15, el cual presenta una banda de absorción en  $3424\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a un grupo hidroxilo. Las bandas de absorción en  $1690\text{-}1709\text{ cm}^{-1}$  corresponde a un carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado; la señal en  $1420\text{ cm}^{-1}$  pertenecen a carbonos insaturados de un anillo aromático. La banda en  $1002\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a un C-H insaturado de tipo vinílico en posición *trans*.

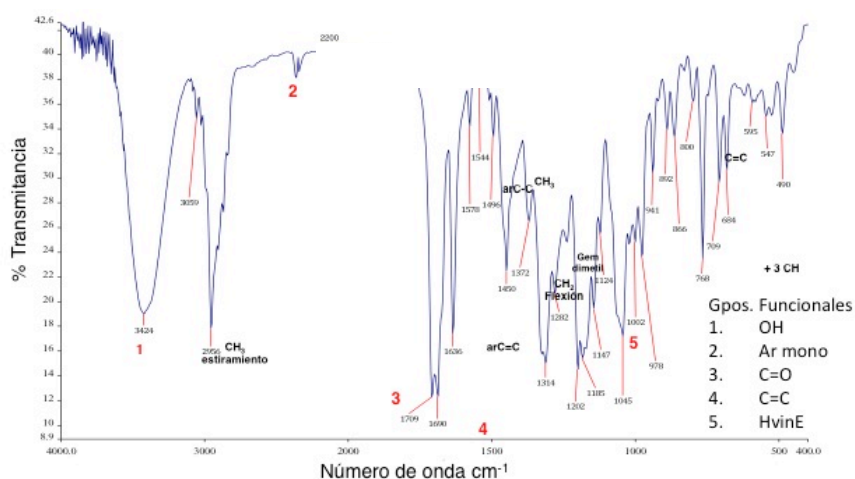


Figura 15. Espectro de infrarrojo para el compuesto C-1.

### a) Análisis por Resonancia Magnética Nuclear

Con base en la literatura y especialmente el antecedente directo de Avelino Flores; en el espectro de resonancia de protón podemos observar diversos tipos de señales, las cuales nos proporcionan una idea de la naturaleza de la (s) molecula (s) aisladas. En campo alto podemos observar señales características de cadenas hidrocarbonadas, metilos, metinos y metilenos; hacia campo bajo se presentan señales propias de bases de oxígeno y protones vinílicos. En la región de protones aromáticos, son apreciables señales características de sistemas ABX y por la cantidad de los protones a los que integran dichas señales, sabemos que es un anillo aromático monosustituido. La señal debida a protones vinílicos poseen una constante de acoplamiento de 15 Hz que indica una disposición *trans* en el doble enlace. Cabe mencionar que la asignación se realizó con ayuda de experimentos COSY, HMQC y HMBC.

Valores de desplazamiento, integración y multiplicidad de las señales correspondientes a los espectros de RMN para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el compuesto C-1 (Figura 16 y 17).

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz),  $\delta$  ppm:** 1.03 (s, 3H, H-14), 1.05 (d,  $J = 2.0$  Hz, 3H, H-12), 1.06 (d,  $J = 2.0$  Hz, 3H, H-13), 1.65 (s, 3H, H-15), 1.84 (td,  $J = 3.5-8.5$  Hz, 1H, H-2 $\alpha$ ), 1.89-1.86 (m, 1H, H-2 $\beta$ ), 1.95-1.92 (dd,  $J = 4.0, 3.5$  Hz, 1H, H $\alpha$ -6), 2.00 (dd, 2H, H-5, H $\alpha$ -9), 2.15 (dd,  $J = 5.5, 6.5$  Hz, 1H, H $\beta$ -9), 2.23 (m, 2H, H-6 $\beta$ , H-11), 3.88 (dd,  $J = 4.5, 16.5$  Hz, 1H, H-1), 4.87 (t, 2H,  $J = 3.0$  Hz, H-3), 4.85 (d, 1H,  $J = 6.0$  Hz, H-8), 6.65 (d,  $J = 15.0$  Hz, 1H, H-2'), 7.38-7.39 (m, 3H, H-3'', H-4'', H-5''), 7.50-7.52 (m, 2H, H-2'', H-6''), 7.63 (d,  $J = 15.0$  Hz, 1H, H-3').

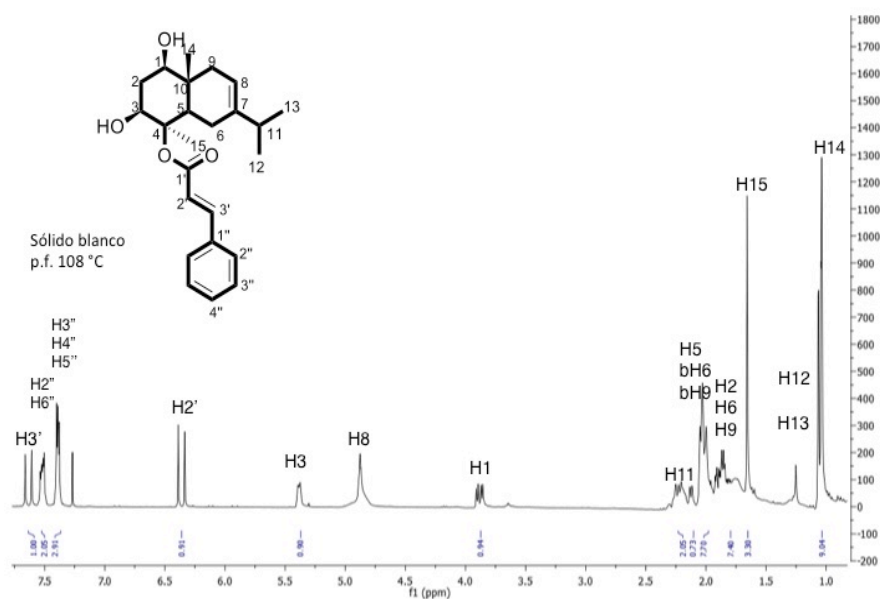


Figura 16. Espectro de protón para compuesto C-1 (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz), δ ppm: 12.1 (C-14), 21.2 (C-12), 21.7 (C-13), 21.8 (C-15), 22.8 (C-6), 33.9 (C-2), 34.9 (C-11), 37.6 (C-10), 40.9 (C-9), 42.6 (C-5), 69.5 (C-3), 73.5 (C-1), 84.1 (C-4), 116.0 (C-8), 119.2 (C-2'), 128 (C-3'', C-5''), 128.9 (C-2'', C-6''), 130.3 (C-4''), 134.2 (C-1'), 141.9 (C-7), 144.7 (C-3'), 166.9 (C=O, C-1').

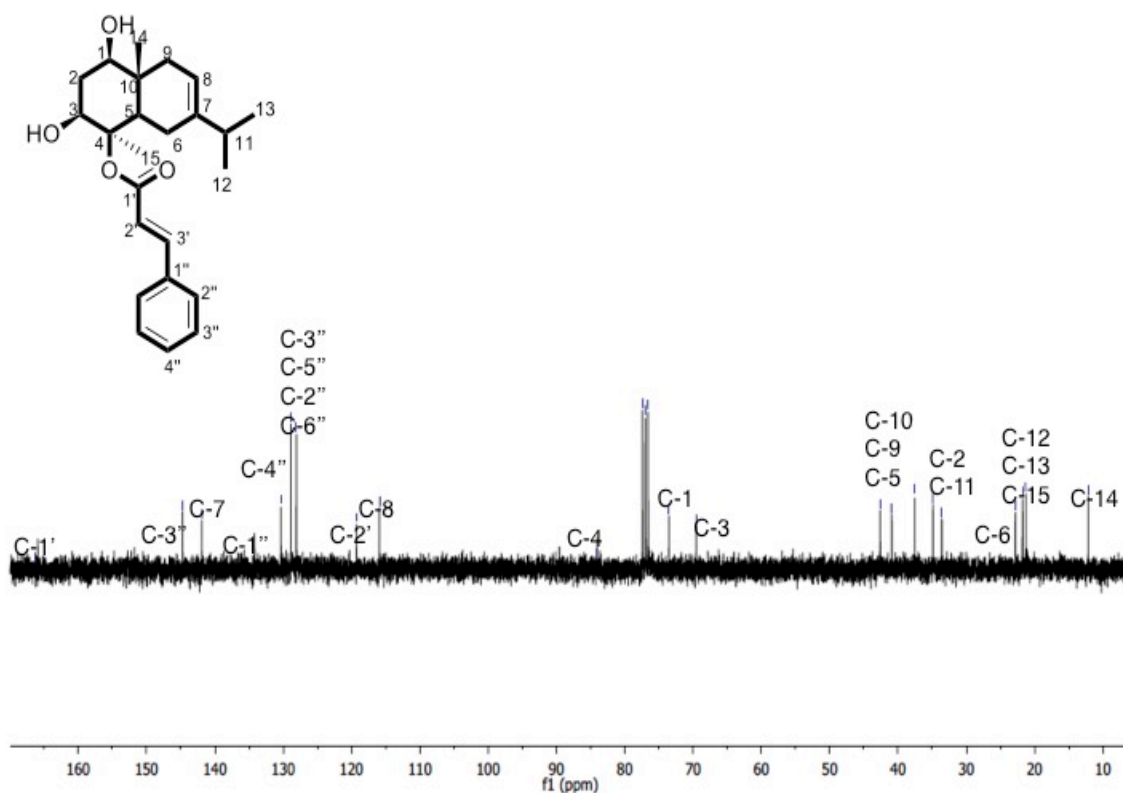


Figura 17. Espectro de carbono para compuesto C-1 (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz).

### 7.3.2 Datos espectroscópicos del compuesto C-4

En el espectro de RMN-1H del compuesto **C-4** se puede observar una gran similitud con las señales del compuesto 1, con algunas importantes diferencias; una de ellas es la señal que aparece en 4.85 ppm, que en el caso anterior pertenece al protón H-8. Otra de las diferencias es que no posee señales para protones base de oxígeno en la región de 4.0 a 5.5 ppm donde aparecieron los protones H-1 y H-3 del compuesto C-1. La diferencia más destacable son los grupos hidroxilos que se encuentran unidos al anillo aromático y unidos a él en los carbonos 6' y 7'. De igual manera muestra protones vinílicos con posición *trans* y una constante de acoplamiento de 15 Hz. La literatura menciona que compuestos sesquiterpénicos tipo eudesmano son característicos dentro del género *Verbesina*.

Éste se obtuvo un sólido de color blanco cristalino (Pf 132°C), pesando 130 mg. En la Figura 18 se observa el espectro de IR de **C-4**, donde se aprecian dos bandas de absorción en 3485 y 3260 cm<sup>-1</sup> que corresponden a grupos hidroxilo, la banda en 1706 cm<sup>-1</sup> pertenece a un éster  $\alpha,\beta$ -insaturado y en 1403 cm<sup>-1</sup> se le atribuye a un grupo C=C de anillo aromático. Se aprecia una banda en 1024 cm<sup>-1</sup> correspondiente a un grupo C=C-H (protón vinílico en posición *trans*).

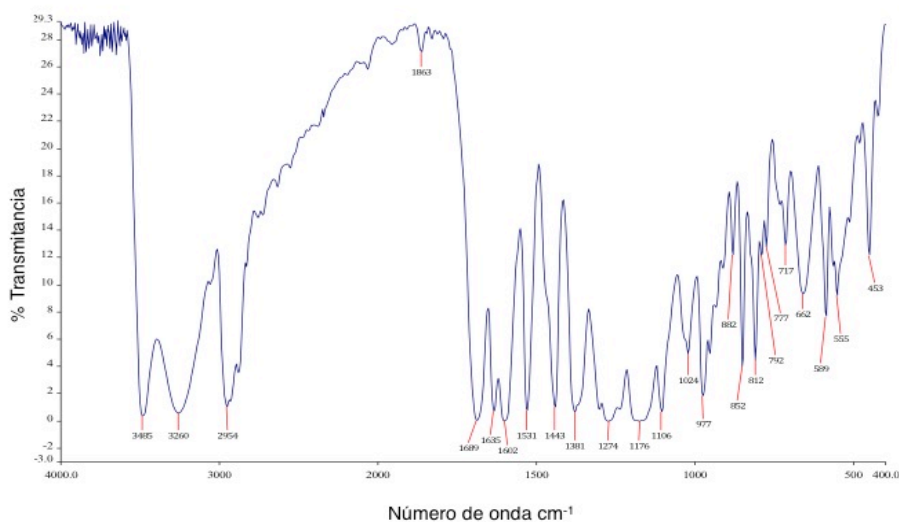
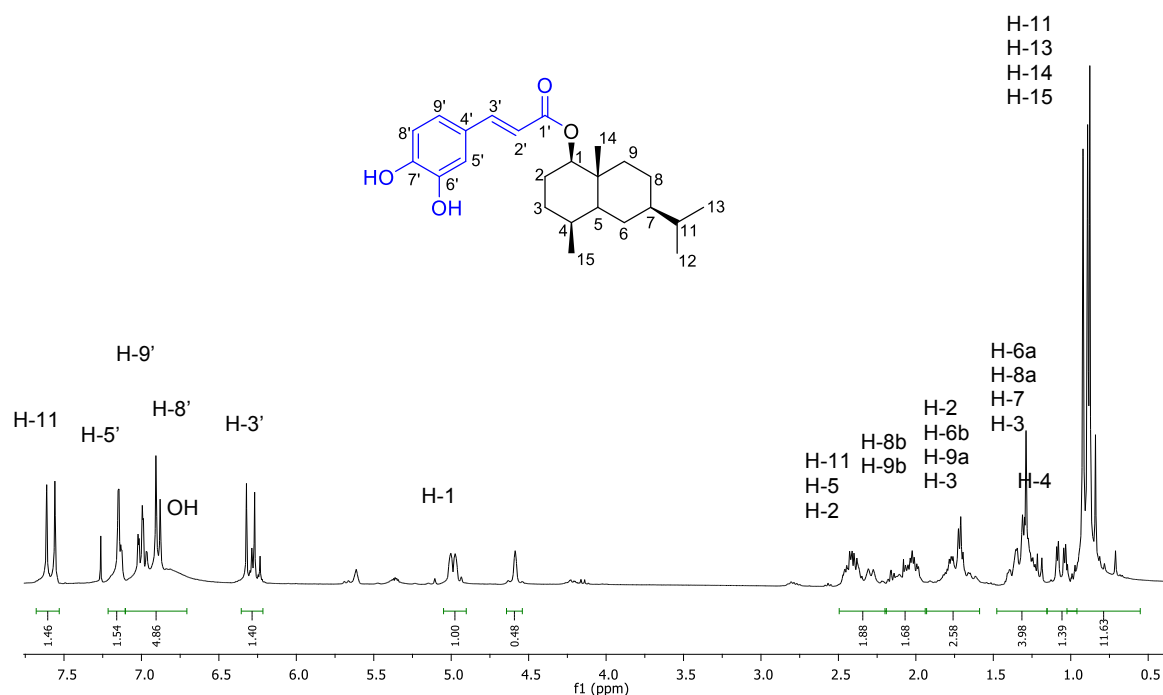


Figura 18. Espectro de IR de **C-4**.

En la Figura 19 se muestra el espectro de RMN-<sup>1</sup>H de **C-4**, donde se observa un conjunto de señales simples entre 0.81-0.97 ppm que corresponden a los protones de los metilo H-14, H-15, H-12 y H-13. En 1.06 ppm aparece una señal doble de dobles ( $J = 3.3, 13.8$  Hz) que corresponde al H-4. La señal múltiple entre 1.17-1.41 ppm se atribuye a los protones H-3a, H-6a, H-7 y H-8a y la señal múltiple entre 1.61-1.84 ppm corresponde a los protones H-2a, H-6b, H-9a y H-3b. Entre 1.96-2.12 ppm se aprecia una señal múltiple asignada a los protones H-8b y H-9b y entre 2.41-2.50 ppm se observan los protones metino de H-5 y H-11. La señal doble ancha en 4.99 ppm pertenece al protón base de oxígeno H-1 y en 6.30 ppm

aparece la señal doble ( $J = 15.9$  Hz) atribuida al protón vinílico H-3'. Las señales de los protones aromáticos se aprecian en 6.89 ppm como una señal doble de dobles ( $J = 1.8$  y  $8.1$  Hz) para H-8', para el protón H-9' se observa una señal triple de dobles ( $J = 1.8, 8.1$  Hz) en 6.99 ppm y la señal doble ( $J = 1.8$  Hz) en 7.15 ppm se atribuye a H-5'. Finalmente, la señal doble ( $J = 15.9$  Hz) en 7.59 pertenece al protón vinílico H-2'.

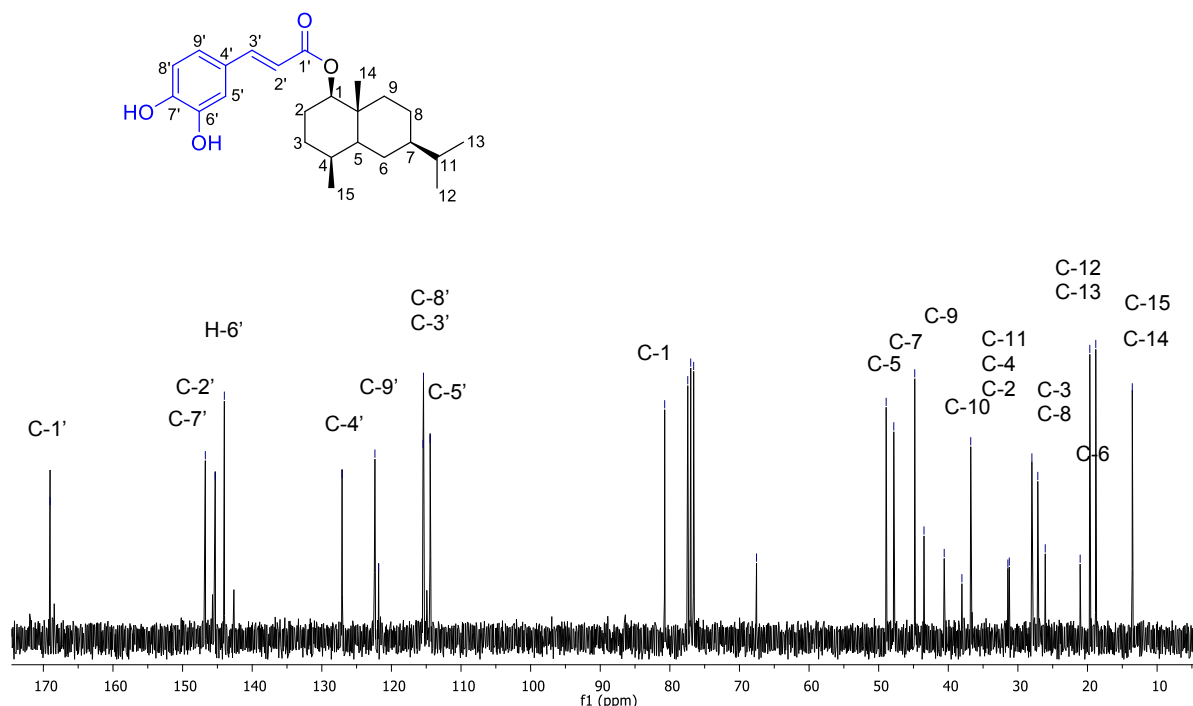
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz),  $\delta$  ppm:** 0.81-0.97 (12 H, m, H-12, H-13, H-14 y H-15), 1.06 (1H, dd,  $J = 3.3, 13.8$  Hz, H-4); 1.17-1.41 (4H, m, H-3a, H-6a, H-7 y H-8a), 1.61-1.84 (4H, m, H-2a, H-6b, H-9a y H-3b), 1.96-2.12 (2H, m, H-8b y H-9b), 2.42-2.50 (3H, m, H-2, H-5 y H-11), 4.99 (1H, da,  $J = 8.4$  Hz, H-1), 6.30 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-3'), 6.89 (dd,  $J = 1.8, 8.1$  Hz, H-8'), 6.99 (td,  $J = 1.8, 8.1$  Hz, H-9'), 7.15 (d,  $J = 1.8$  Hz, H-5'), 7.59 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-2').



**Figura 19.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de **C-4** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de **C-4** (Figura 20), se observan las señales de los carbonos del anillo de eudesmano en campo alto como son los metilos C-14, C-15 y C-12 y C-13 en 13.6, 18.8 y 19.7 ppm, respectivamente. Los carbonos C-4, C-7 y C-5 aparece en 36.8, 47.8 y 48.9 ppm. El carbono base de oxígeno C-1 se observa en 80.7 ppm y las señales de los carbonos aromáticos se aprecian en 114.4, 115.5 y 122.4 ppm para C-5', C-8' y C-9', respectivamente. Las señales de los carbonos vinílicos C-3' y C-2' aparecen en 115.5 y 145.3 ppm, respectivamente. Finalmente, la señal del carbonilo se observa en 169.0 ppm.

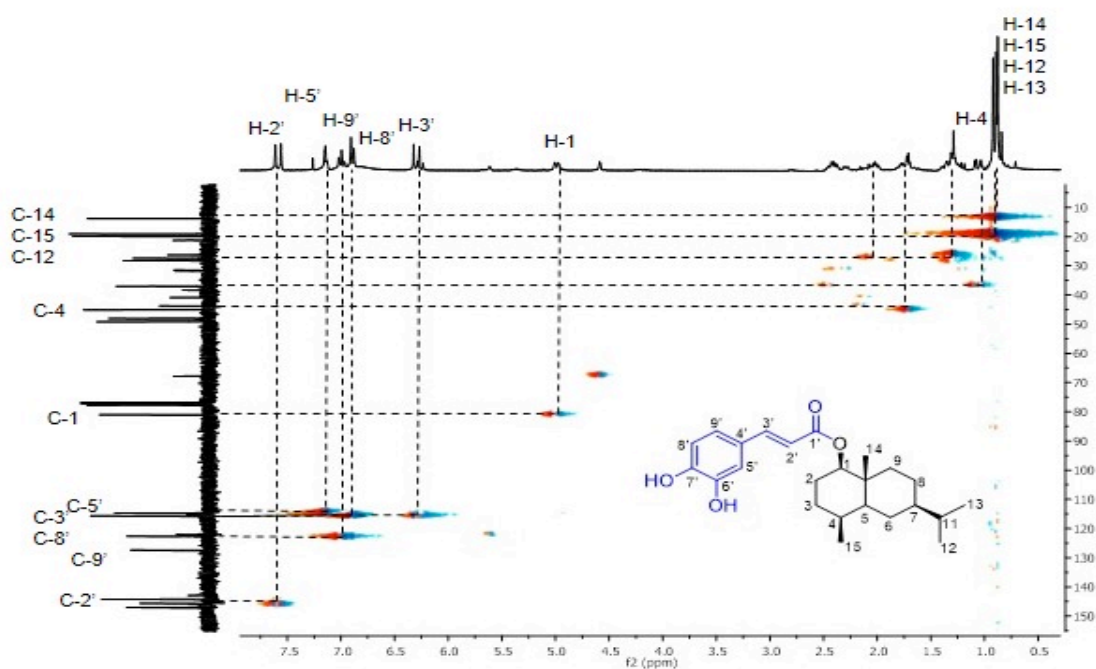
**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz),  $\delta$  ppm:** 13.6 (C-14), 18.8 (C-15), 19.7 (C-12 y C-13), 27.1 (C-6), 28.0 (C-3) y C-8), 36.8 (C-2, C-4 y C-11), 43.5 (C-10), 44.8 (C-9), 47.8 (C-7), 48.9 (C-5), 80.7 (C-1), 114.4 (C-5'), 115.39 (C-3'), 115.5 (C-8'), (C-4'), 122.4 (C-9'), 127.1 (C-4'), 144.0 (C-6'), 145.3 (C-2'), 146.7 (C-7'), 169.0 (C = O, C-1').



**Figura 20.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de **C-4** ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz).

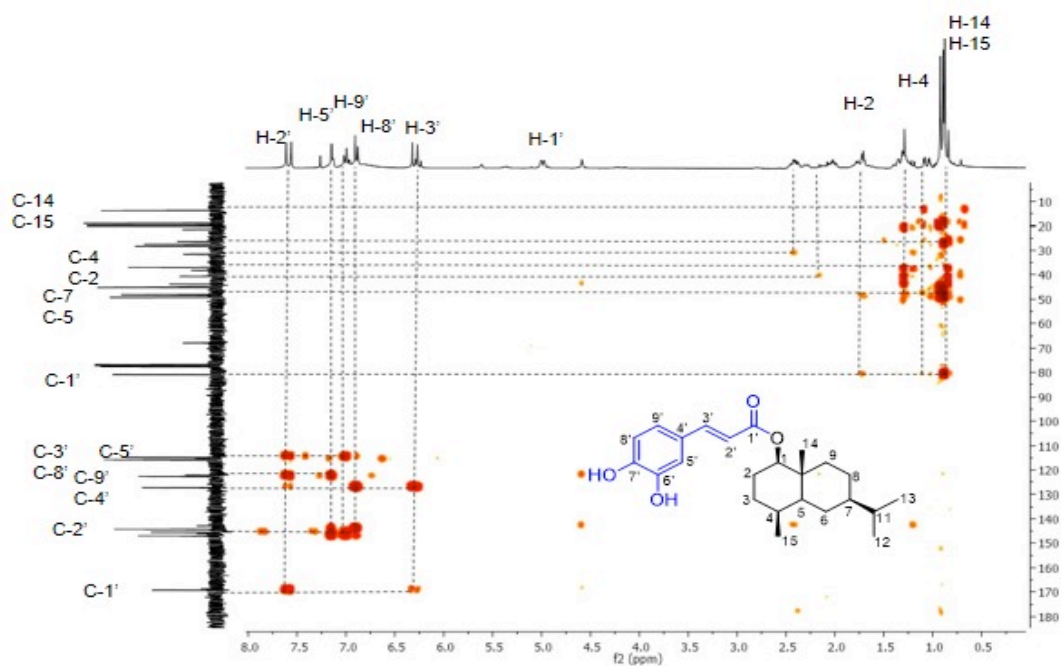
En la Figura 21 se observa el espectro bidimensional HMQC de **C-4**, el cual presenta correlaciones heteronucleares C-H a un solo enlace. Se aprecia la correlación de los carbonos metilo C-14, C-15, C-12 y C-13 con sus respectivos protones H-14, H-15, H-12 y H-13. La señal de los carbonos C-1 y C-4 muestran su correlación con los protones metino H-1 y H-4, respectivamente. También, se aprecian las correlaciones de los aromáticos C-5', C-8' y C-9' con los protones H-5', H-8' y H-9'.





**Figura 21.** Espectro Bidimensional de RMN-HMQC de **C-4** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

En la Figura 22 se observa el espectro bidimensional HMBC de **C-4**, el cual presenta correlaciones heteronucleares C-H a tres enlaces. Se observa la correlación del carbono C-4 con los protones H-15, para el carbono C-5 se aprecia la correlación con los protones H-14 y H-15. La señal del carbono C-1 muestra su correlación con los protones H-2 y H-14. El carbono del carbonilo C-1' muestra correlaciones con los protones H-2', H-3'.



**Figura 22** Espectro Bidimensional de RMN-HMBC de **C-4** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

### 7.3.3 Datos espectroscópicos del compuesto C-6

Se obtuvo como un líquido viscoso pesando 70 mg. El espectro de IR se muestra en la Figura 23, donde se observan dos bandas de absorción  $3411\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a grupos hidroxilo, la banda en  $1654\text{ cm}^{-1}$  corresponde a un grupo éster  $\alpha,\beta$ -insaturado. La banda de absorción en  $1467\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento C=C de un anillo aromático y la banda en  $1026\text{ cm}^{-1}$  se asigna a una señal de estiramiento C-O.

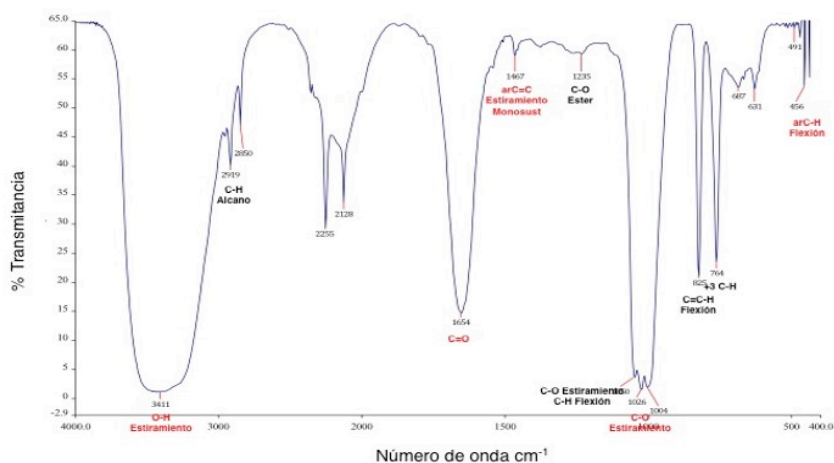


Figura 23. Espectro de infrarrojo para el compuesto C-6.

En la Figura 24 se muestra el espectro de RMN- $^1\text{H}$  de C-6, donde se observan a campo alto las señales simples de los protones de los metilos H-14, H-12 y H-13 entre 1.03-1.06 ppm. Entre 1.25-1.45 ppm se aprecia una señal múltiple atribuida al protón H-2 y en 1.58 ppm aparece la señal simple del metilo H-15. Las señales múltiples 1.58-1.72, 1.85-1.98 y 2.05-2.35 ppm corresponden los protones metilenos del anillo de eudesmano H-2, H-5, H-6 y H-9. Las señales dobles en 3.05 y 3.38 ppm corresponden a los protones base de oxígeno del epóxido H-3 y H-1. En 7.63 ppm aparece la señal doble ( $J = 15.9\text{ Hz}$ ) atribuida al protón vinílico H-3'. Las señales de los protones aromáticos se aprecian en 7.35-7.45 ppm como señal múltiple para los protones H-6' y H-7'; y la señal múltiple en 7.55-7.65 ppm se atribuye a los protones H-5'. Finalmente la señal doble ( $J = 15.9\text{ Hz}$ ) en 6.55 pertenece al protón vinílico H-2'. Consultando con la bibliografía, las señales tienen una semejanza con un epóxido reportado por Jakupovic en 1986. Dicho compuesto no tiene hidroxilos en el anillo A del ciclo de decalina y a diferencia del reportado, el compuesto C-6 posee enlace endocíclico, como el compuesto C-1.

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz),  $\delta$  ppm:** 1.03 (3H, s, H-14), 1.05 (3H, d,  $J = 2.0\text{ Hz}$ , H-12), 1.06 (3H, d,  $J = 2.0\text{ Hz}$ , H-13), 1.58 (3H, s, H-15), 1.84 (1H, td,  $J = 3.5\text{-}8.5\text{ Hz}$ , H-2 $\alpha$ ), 1.89-1.86 (1H, m, H-2 $\beta$ ), 1.95-1.92 (1H, dd,  $J = 4.0, 3.5\text{ Hz}$ , H $\alpha$ -6), 2.00 (H-5, dd, 2H, H $\alpha$ -9); 2.15 (1H, dd,  $J = 5.5, 6.5\text{ Hz}$ , H $\beta$ -9), 2.23 (2H, m, H-6 $\beta$ , H-11), 3.88-3.05 (1H, m,  $J = 15\text{ Hz}$ , H-1); 3.38 (1H, m,  $J = 18\text{ Hz}$ , H-3), 1.03 (3H, s, H-14), 1.06 (6H, d,  $J = 2.0\text{ Hz}$ , H-12 y H-13), 1.58 (3H, s, H-15),

1.58-1.72 (6H, m, H-2, H-6, H-9), 1.85-1.98 (2H, m, H-5), 2.05-2.35 (3 H, m, H-2, H-6 y H-9); 5.38 (1H, m,  $J = 6.0$  Hz, H-8); 6.37 (1H, d,  $J = 15$  Hz, H-2'); 7.38 (3H, t, H3'', H4'', H5''); 7.52 (2H, d, H2'', H6''); 7.63 (1H, d,  $J = 15$  Hz, H3').

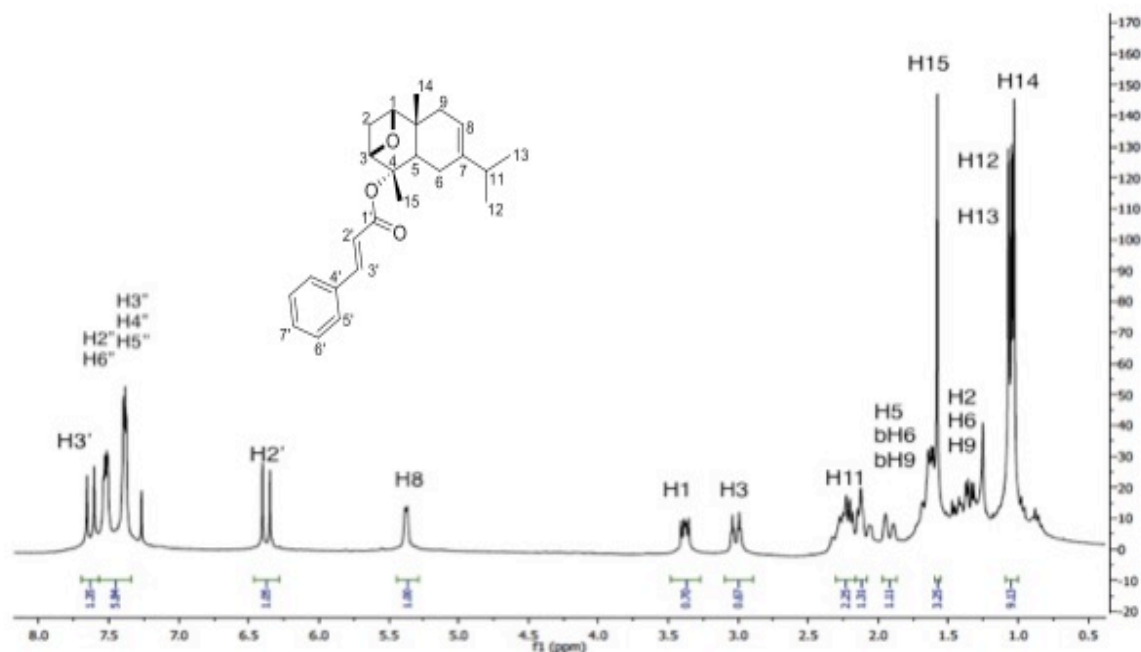


Figura 24. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de **C-6** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

### 7.3.3 Datos espectroscópicos del compuesto C-7

En este compuesto no se presentan las señales propias de compuestos aromáticos, lo que significa que no tiene el fragmento de cinamoilo, sólo está presente el fragmento de sesquiterpeno tipo eudesmano. Se observan a campo alto las señales simples de los protones de los metilos H-14, H12 y H-13 entre 1.02-1.03 ppm. Entre 1.25-1.45 ppm se aprecia una señal múltiple atribuida al protón H-2 y en 1.59 ppm aparece la señal simple del metilo H-15. Las señales múltiples 1.66-1.74, 1.96-2.05 -2.22-2.31 ppm corresponden a los protones del anillo eudesmano H-2, H-5, H-6 y H-9. En campo bajo se muestran señales en 3.53 que corresponde a un protón base de oxígeno; en 5.02 y 5.39 ppm propias de protones vinílicos y en esta molécula corresponden a los protones H-8 y H-3. Este compuesto posee semejanza a lo reportado por Raharivelomanana y col., 1997 para compuestos del género *Laggera* que es una especie perteneciente a la familia de las asteráceas (Germán-Ramírez 2008).

Valores de desplazamiento, integración y multiplicidad de las señales correspondientes a los espectros de RMN para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el compuesto **C-7** (Figura 25 y 26).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz),  $\delta$  ppm: 1.02 (6H, s,  $J=3$  Hz, H-12, H-13); 1.03 (3H, s, H-14); 1.59 (3H, s, H-15); 1.65 (4H, m, H-2, H-6); 1.85 (3H, m, H-5, bH-6, b); 2.02 (8H, t,  $J=15$  Hz, H-5, bH-5, bH-9); 2.19 (2H, m, H-11); 3.53 (dd,  $J=4.5, 16.5$  Hz, 1H, H-1), 5.02 (1H, dd,  $J=3$  Hz, H-8); 5.39 (1H, dd,  $J=3$  Hz, H-3).

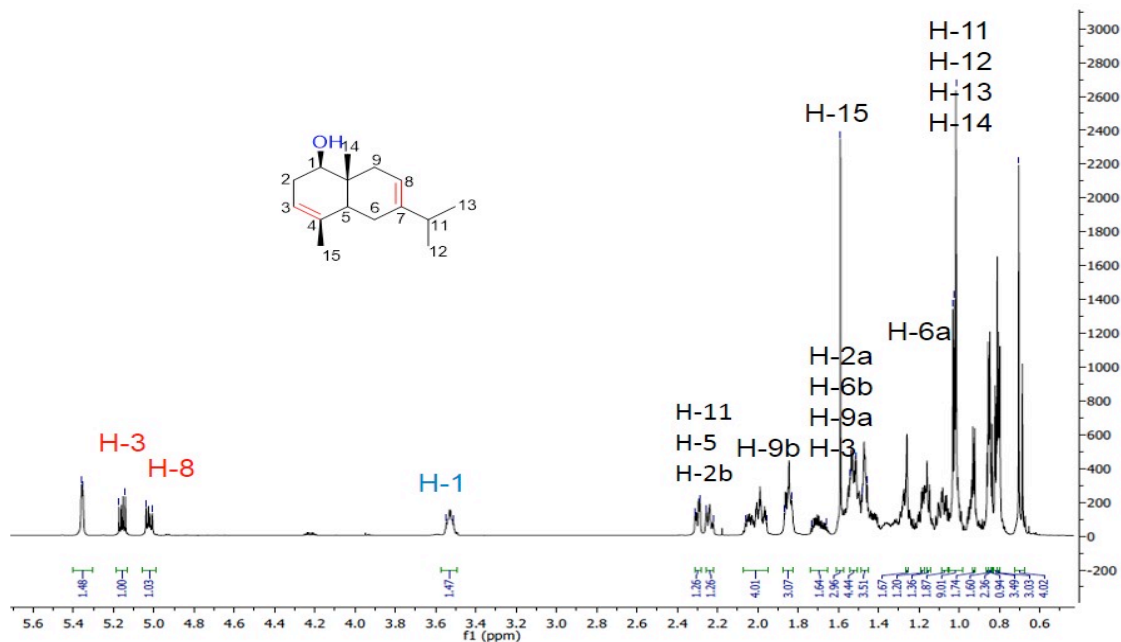


Figura 25. Espectro de protón para compuesto C-7 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz),  $\delta$  ppm: 12.27 (C-14); 19.41 (C-12, C13); 21.10 (C-15); 24.32 (C-6); 33.88 (C-4), 36.29 (C-11), 37.26 (C-9), 42.32 (C-10), 45.71 (C-5), 68.37 (C-2), 71.82 (C-1).

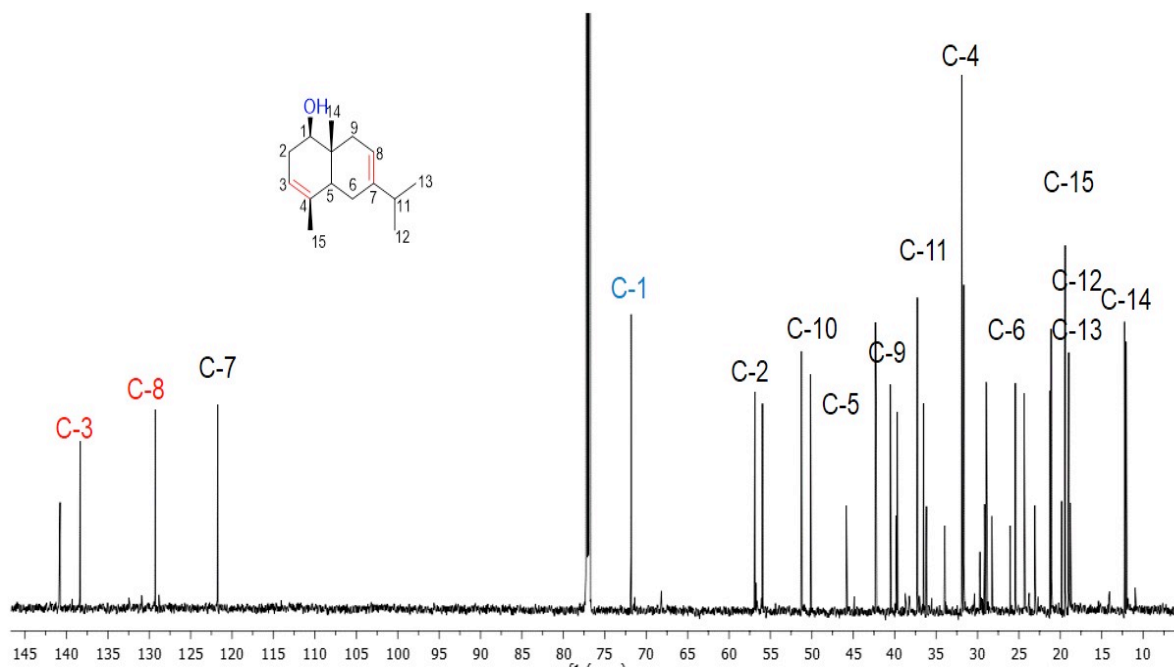
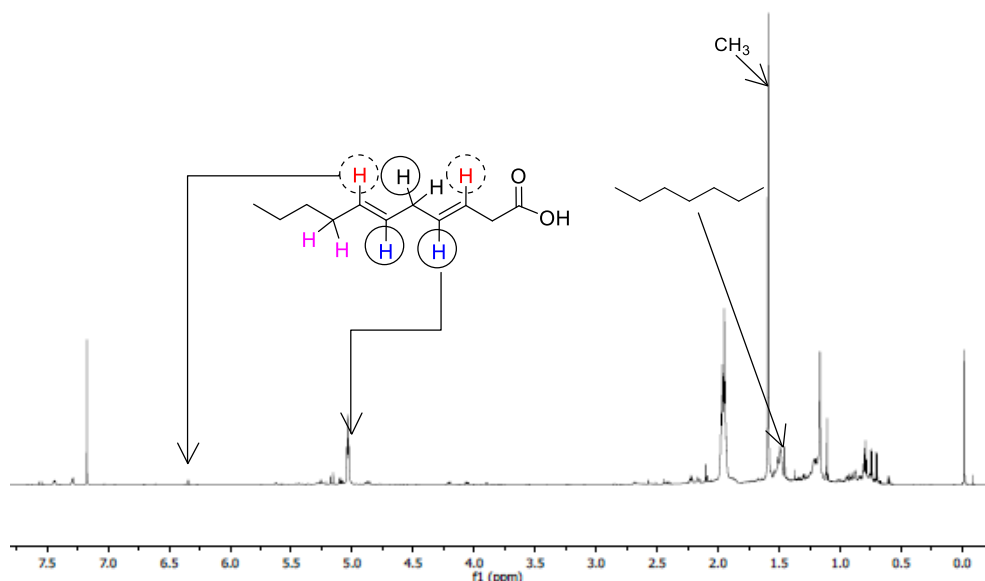


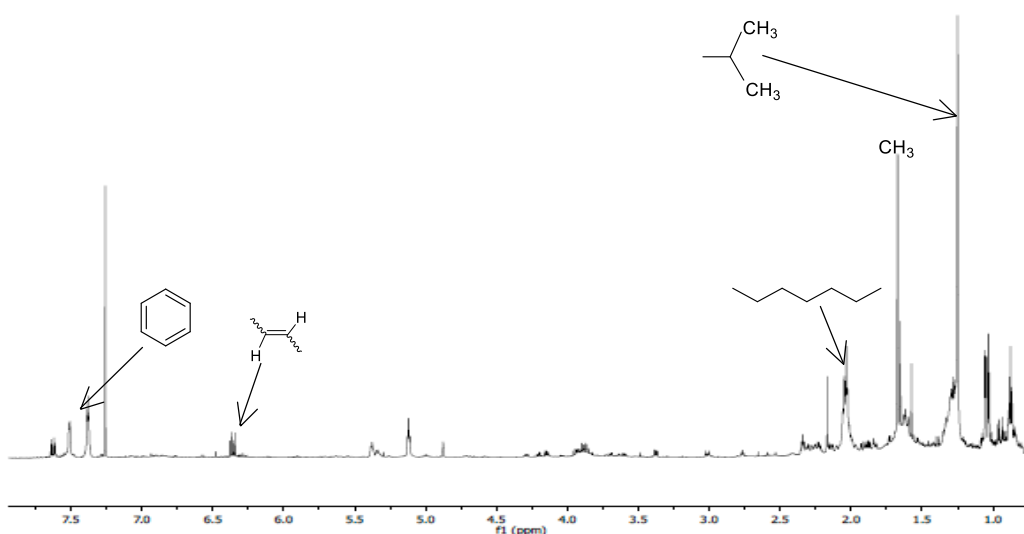
Figura 26. Espectro de carbono para compuesto C-7 (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz).

#### 7.4. Análisis por RMN de las fracciones evaluadas en la actividad biológica

A la par que se realizaban los ensayos biológicos, se hizo una evaluación espectroscópica de las fracciones utilizadas en los ensayos de citotoxicidad. La Fracción dos seleccionada por su muy escasa actividad muestra señales a campo alto propias de ácidos grasos y cadenas alifáticas, más hacia campo bajo observamos una señal con un desplazamiento correspondiente a insaturaciones (Figura 27) y en la Figura 28 corresponde a la fracción 4 que presentó la mayor actividad. En dicho espectro se observa una mayor cantidad de señales; son apreciables señales de cadenas alifáticas, protones bases de oxígeno, protones vinílicos, insaturaciones y señales correspondientes a anillos aromáticos, que éstas últimas hacen la gran diferencia entre el espectro de una fracción y otra.



**Figura 27** Espectro de resonancia de la fracción 2 (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz).



**Figura 28** Espectro de resonancia de la fracción 4 (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz).

## 7.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

### 7.5.1 Ensayos biológicos preliminares

#### a) Preparación de soluciones stock

Para realizar estos ensayos, se preparó una solución stock de cada una de las fracciones a evaluar, de los compuestos y del extracto completo; para esto se pesó 1 mg de cada fracción y se disolvió en 100  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) estéril. Posteriormente, estos 100  $\mu\text{L}$  se disuelven en 990  $\mu\text{L}$  de medio fresco (DMEM o RPMI o DMEM/F12) según la línea celular que se trate.

#### b) Aplicación de tratamiento

Se tripsinizan las células con tripsina-EDTA y se re-suspenden en 7 mL de medio, se realiza el conteo en un hemocitómetro, para cada experimento se utilizan 10,000 células por pozo, realizado el conteo se inicia la siembra de las células en placas de 96 pozos. Sembradas las células se dejan incubar durante 24 h. Al día siguiente se realizó el cambio de medio, con las soluciones stock se prepararon las siguientes diluciones: 5, 10, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{g/mL}$ . Cada tratamiento se aplica por triplicado, en tres experimentos independientes, para cada uno de los tratamientos se aplica un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . Estos tratamientos se dejan incubar durante 72 h, 37°C y una atmosfera de 5% de dióxido de carbono.

#### c) Ensayo de viabilidad por medio de MTT

Transcurrido el tiempo de incubación con los tratamientos, se retiró el medio que contiene el tratamiento, se lavó con solución buffer de fosfatos (PBS) y se aplicó 40  $\mu\text{L}$ /pozo de la solución de MTT, se dejó incubar por dos horas; finalizado este tiempo se disolvieron los cristales formados con dimetilsulfóxido, DMSO (60  $\mu\text{L}$ /pozo) se agitaron las placas a 450 rpm durante 20 min y se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro a 550 nm.

#### d) Calculo de la $\text{IC}_{50}$

En el software (Kyplot v2.0) se introdujeron los datos de: concentración, porcentaje de viabilidad y porcentaje de desviación estándar. Con estos se obtuvieron las siguientes  $\text{IC}_{50}$  para cada una de las fracciones evaluadas en la línea celular SiHa. Ver Tabla 7.

**Tabla 7.** Ensayo preliminar de MTT con la línea celular SiHa

Línea celular	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ DS					
	Fracciones Evaluadas					
	1	2	3	4	5	6
SiHa	>100	>100	>100	33.4 $\pm$ 0.39	99.84 $\pm$ 0.56	74.72 $\pm$ 0.87

#### 7.4.2 Ensayos biológicos con el extracto completo

Para los ensayos de citotoxicidad con el extracto completo se evaluaron las siguientes concentraciones: 5, 10, 25, 50, 75 y 100 µg/mL. El extracto presentó un porcentaje de inhibición de la viabilidad celular por arriba del 90 por ciento en todas las líneas celulares. Todos los ensayos se evaluaron por triplicado y en tres experimentos independientes. Se mencionó en la metodología que se utilizaron tres tipos de células de cáncer de mama y una de cáncer cervicouterino, con el propósito de conocer la selectividad de los compuestos sobre el primer tipo de línea celular. Además, de una línea celular no tumorigénica para conocer la diferencia del efecto entre una línea cancerígena y una que no lo es.

Como se puede observar en la Tabla 8, las células con mayor sensibilidad al extracto fueron MCF7 y T-47D ambas son positivas a receptores de estrógenos.

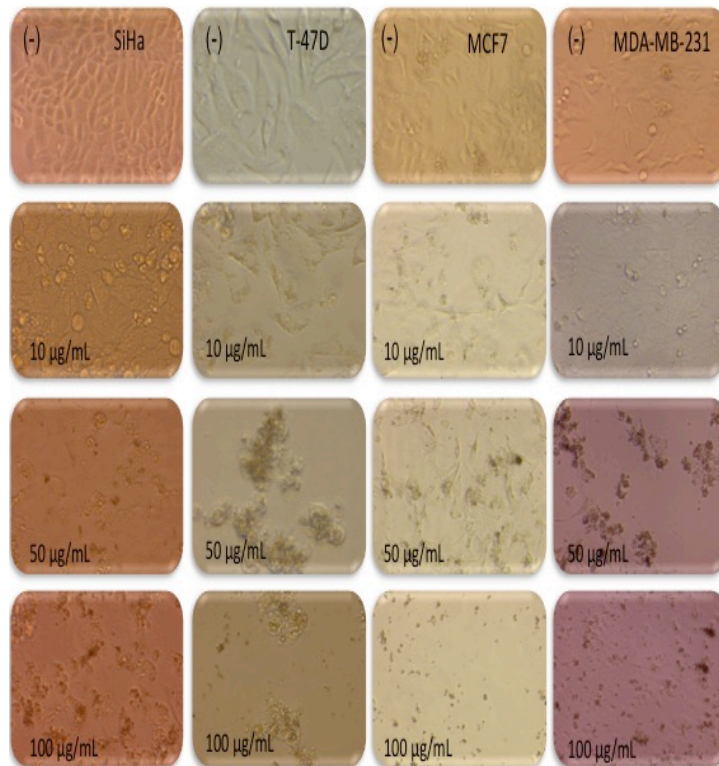
**Tabla 8.** Valores obtenidos para la evaluación del extracto de diclorometano.

IC <sub>50</sub> (µg/mL) ± DS		
Línea celular	Extracto completo	Control positivo Taxol
SiHa	12.76 ± 0.25	11.02 ± 2.18
T-47D	5.24 ± 1.23	5.17 ± 1.30
MDA-MB-231	34.91 ± 5.72	17.42 ± 3.45
MCF7	14.56 ± 0.66	7.34 ± 0.16
MCF 10A	19.93 ± 0.72	24.20 ± 0.68

La línea MDA-MB-231 presentó menor sensibilidad al tratamiento, ésta línea se caracteriza por no presentar receptores hormonales y receptor del factor de crecimiento epidérmico.

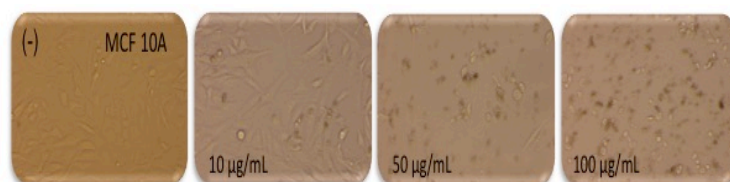
En cada una de las concentraciones evaluadas se observan cambios en la morfología de las células, desde desprendimiento de ellas, redondeo, aglomeración, alargamiento y en la máxima concentración sólo se observa detrito. En la Figura 29 se muestra las células a las concentraciones 10, 50 y 100 µg/mL





**Figura 29.** Efecto del extracto de diclorometano de raíz, sobre diferentes líneas celulares.

Del mismo modo que las células tumorigénicas fueron expuestas al extracto de la raíz, igual se utilizó una línea de células epiteliales de mama para evaluar el efecto de éste y conocer la posible selectividad sobre células sanas y células cancerosas. Como en el caso anterior, las células cambiaron su morfología conforme aumentaba la concentración del extracto, de igual forma algunas células se redondearon, se observó alargamiento de ellas a partir de la concentración de 50 hasta 100 µg/mL y se pudo observar una gran cantidad de detrito celular. En la Figura 30 podemos apreciar los cambios más significativos.



**Figura 30.** Cambios morfológicos en las células MCF 10A, al ser expuestas al extracto de diclorometano de raíz.

#### 7.4.3 Ensayos biológicos con fracciones obtenidas a partir del extracto completo

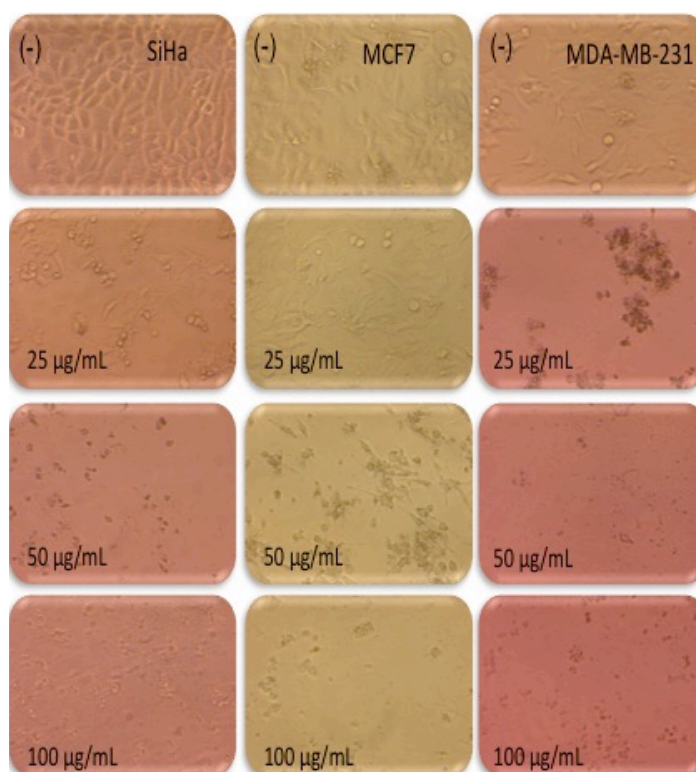
Debido a que el extracto completo presento mayor actividad sobre dos líneas celulares, se realizó el fraccionamiento del mismo, con el propósito de establecer la presencia de un posible principio activo, lo que llevaría a un incremento del efecto citotóxico al estar en forma pura. Pero por los resultados obtenidos, vimos que no se potencia la actividad, en algunos casos ésta se ve disminuida y sólo una fracción presentó mejor actividad sobre la línea

T-47D, aunque comparativamente con el extracto fue ligeramente más alto el valor de IC<sub>50</sub>, esto lo podemos observar en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Efecto citotóxico de fracciones del extracto de raíz de *V. persicifolia*.

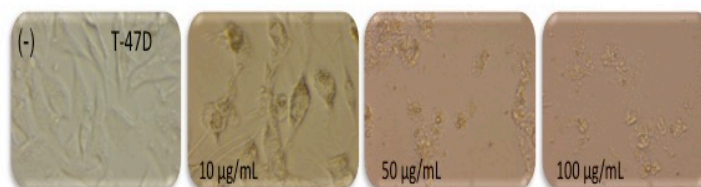
Línea celular	IC <sub>50</sub> (µg/mL) ± DS					
	Fracciones Evaluadas					
	1	2	3	4	5	6
<b>SiHa</b>	>100	>100	>100	<b>33.4 ± 0.39</b>	99.84 ± 0.56	74.72 ± 0.87
<b>T-47D</b>	>100	>100	>100	<b>14.0 ± 0.65</b>	>100	>100
<b>MDA-MB-231</b>	>100	>100	>100	<b>17.0 ± 0.55</b>	98.10 ± 0.55	>100
<b>MCF7</b>	>100	>100	>100	<b>33.07 ± 6.05</b>	>100	94.52 ± 0.87

En las líneas celulares: SiHa, MCF7 y MDA-MB-231 se aprecian cambios significativos en su morfología al ser expuestas a diferentes concentraciones de la fracción 4. Éstos cambios son: alargamiento, aglomeración, generación de restos celulares y detrito en la concentración de 100 µg/mL. Los cambios más representativos se pueden observar en la Figura 31.



**Figura 31.** Cambios morfológicos en las células, al ser expuestas a la fracción cuatro.

En la línea celular T-47D se apreciaron cambios desde las concentraciones más bajas, por lo que fue motivo para continuar con el análisis de ésta fracción y como consecuencia de ello se aislaron algunos compuestos, dos de ellos se evaluaron y los resultados se observaran en el siguiente apartado. En la Figura 32 se puede observar que desde concentraciones bajas las células poseen cambios significativos.



**Figura 32.** Cambios morfológicos en las células, al ser expuestas a la fracción cuatro.

#### 7.4.4 Ensayos biológicos con compuestos obtenidos a partir de la fracción cuatro

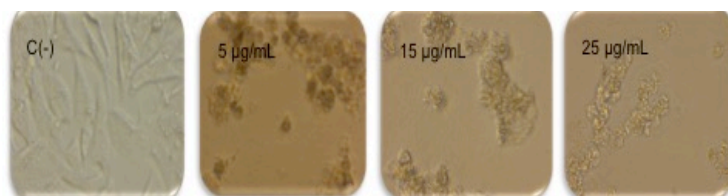
De los compuestos aislados se decidió evaluar dos; uno de ellos corresponde al ya reportado por Avelino y Mejía Flores. Y otro, con características espectroscópicas diferentes; que de manera paralela se trabajó en la elucidación estructural. A este segundo compuesto se le denominó como compuesto cuatro o **C-4** y al primero como **C-1** ambos compuestos se evaluaron en las cinco líneas celulares, por triplicado y en tres experimentos independientes. Ambos compuestos mostraron una marcada actividad en cada una de las líneas. Como control positivo se utilizó taxol, que es un agente quimioterapéutico de amplio uso en la quimioterapia y otra de las razones por las que se tomó como control, es la naturaleza química de éste. El taxol es un alcaloide con un esqueleto diterpenico de taxano. En la Tabla 10 se resume el valor de los  $IC_{50}$  determinados para cada compuesto.

**Tabla 10.** Resumen general de valores obtenidos para C1, C4 y Taxol.

$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ DS			
Línea celular	<b>C-1</b>	<b>C-4</b>	Taxol
SiHa	18.66 $\pm$ 0.34	14.90 $\pm$ 1.03	11.02 $\pm$ 2.18
T-47D	8.47 $\pm$ 1.90	<b>2.5 <math>\pm</math> 0.87</b>	5.17 $\pm$ 1.30
MDA-MB-231	17.21 $\pm$ 0.87	<b>9.04 <math>\pm</math> 0.56</b>	17.42 $\pm$ 3.45
MCF7	18.27 $\pm$ 1.33	19.04 $\pm$ 1.13	7.34 $\pm$ 0.16
MCF 10A	15.96 $\pm$ 0.36	9.14 $\pm$ 0.74	24.20 $\pm$ 0.68

En la Figura 33 se puede ver el efecto del compuesto cuatro sobre las células T-47D; a partir de los 5  $\mu\text{g/mL}$  se observa un cambio muy drástico en la morfología de la célula, se aprecia una aglomeración y un intenso burbujeo en ellas que dan la impresión de formar islas. Este efecto es notorio hasta la concentración de 25  $\mu\text{g/mL}$ . En el ensayo de MTT a partir de la concentración más baja se observó una coloración amarilla en los pozos, indicando que ya no hay una actividad mitocondrial de las células, lo que puede ser un indicio de muerte. Por otra parte, en las células MDA- MB-231 ocurre algo similar, pero la aglomeración de las células comienza con 7.5  $\mu\text{g/mL}$  y a partir de 15  $\mu\text{g/mL}$  se observa una completa disminución celular, mostrando restos membranosos de las células, finalmente en 25  $\mu\text{g/mL}$  sólo podemos ver detrito celular.

## Células T-47D

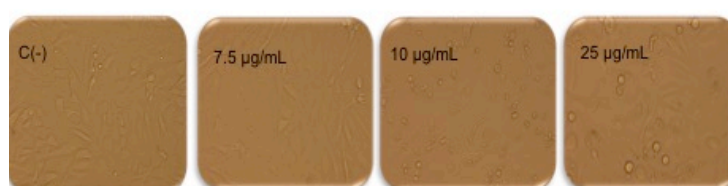


## Células MDA-MB -231



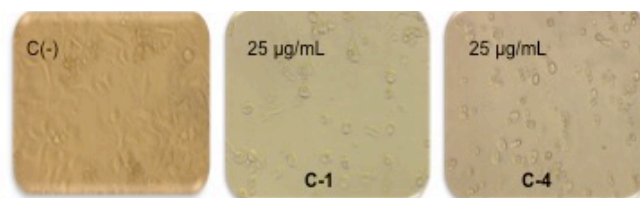
**Figura 33.** Morfología de las células al ser expuestas al compuesto C-4.

Cuando se expuso el compuesto **C-4** a las células epiteliales (MCF 10A) con la concentración mínima, 5 µg/mL no se observan cambios significativos en la células, permanecen iguales al control y siguen así hasta los 7.5 µg/mL, pero con 10 µg/mL se muestran las células redondeadas, en varios campos observados al microscopio parece que el número de células viables ha disminuido, al menos su morfología no es la misma que en el control, pero en 25 µg/mL sucede algo extraño porque pareciera que hay células que se muestran viables o al menos conservan un poco de su morfología original. Si observamos detenidamente en las otras líneas celulares, se observa detrito celular aglomeración de células y no hubo campo alguno en el que se observaran células integra. En la Figura 34 se muestra estos cambios.



**Figura 34.** Morfología de las células MCF 10A expuestas al compuesto C-4.

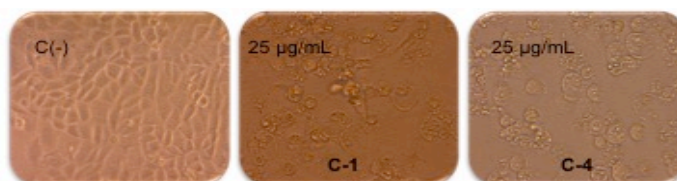
Los compuestos **C-1** y **C-4** también se pusieron en contacto con las células MCF7 pero en esta línea celular mostraron escasa actividad, siendo hasta los 25 µg/mL cuando se muestran muy activos, haciendo que las células se vean totalmente redondeadas y carentes de su morfología original, además se ve reducido el número de células. En concentraciones menores, parece que las células se encuentran estresadas, debido a que están más alargadas que en el control. En la Figura 35 se muestra como las células se ven afectadas hasta la máxima concentración evaluada, 25 µg/mL.



**Figura 35.** Morfología de las células MCF7 expuestas al compuesto C-1 y C-4.

Para saber si estos compuestos mostraban algún tipo de selectividad, se decidió evaluarlos en una línea celular distinta a las de mama y que mejor que una de cáncer cervicouterino, esta es distinta a las otras porque pertenece a otro tipo de tejido y además es un modelo de estudio ya que posee virus del papiloma humano.

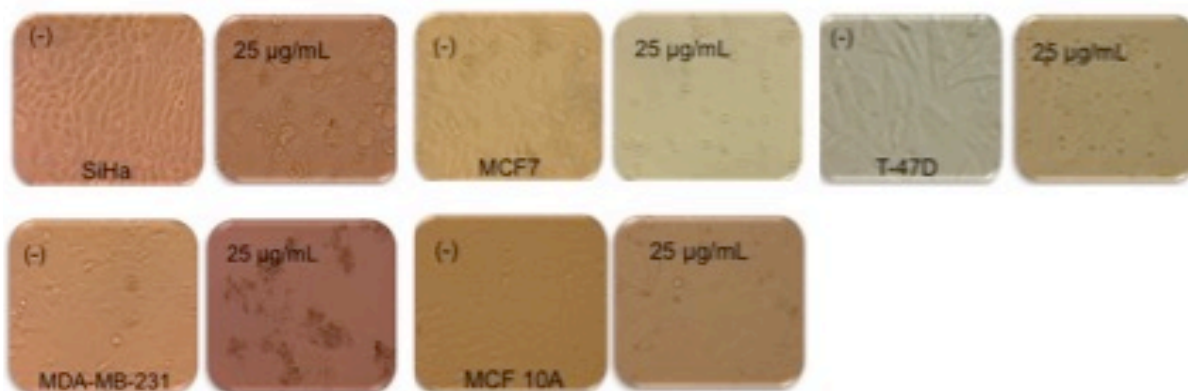
Para esta línea ambos compuestos muestran actividad desde 20 µg/mL cuando las células se exponen a esta concentración se ven muy redondeadas y con muchas burbujas al interior de la célula, con el compuesto **C-1** se observan aglomerados de células, pero de una forma en que no se reconoce la morfología original; para el caso de las células expuestas al compuesto **C-4** se muestran las células muy redondas y otras formando una especie de aro, con proyecciones hacia el interior de la misma hasta los 25 µg/mL continúa el mismo comportamiento. En la Figura 36 se muestra el comportamiento de las células expuestas a dichos compuestos.



**Figura 36.** Morfología de las células SiHa expuestas al compuesto C-1 y C-4.

Cuando las cuatro líneas celulares se expusieron al taxol, se observó efecto desde la concentración de 5 µg/mL y concuerda con lo reportado en la literatura, puesto que este fármaco es ampliamente usado en la quimioterapia contra diversos tipos de cáncer (Barragán-Ruiz y col. 2009). Para el caso de las células SiHa estas se muestran muy redondeadas y en algunos campos se aprecia aglomeración. Cuando las células MCF7 se tratan con taxol comienzan a deformarse con la primera concentración de 5 µg/mL, algunas de ellas se aprecian redondeadas, muy alargadas; cuando aumenta la concentración se observan células en las cuales el núcleo parece abarcar toda el área que corresponde a la célula, evidentemente su membrana tuvo que sufrir un importante cambio para que quedarán deformadas y con el ensayo de MTT se presume que sigue existiendo una viabilidad de las células. Por otro lado, con las células T-47D a partir de los 5 µg/mL las células quedan irreconocibles, se forman agregados y las células pierden por completo su viabilidad, no hay mucho que describir para este caso porque en todas las concentraciones

se formaron los mismos agregados. Con las células MDA-MB-231 sucedió algo similar, pero se ve más marcada la presencia de detrito celular, debido a la destrucción de la membrana o bien a restos de células como producto de algún proceso de muerte. Finalmente, para el caso de las células MCF 10A, a pesar de mostrarse muy activo con las células cancerígenas, con las células MCF 10A tiene una escasa actividad lo que sugiere que no es tan tóxico para este tipo de células no tumorigénica, con las mayores concentraciones evaluadas para este compuesto 20 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se distingue un ligero cambio en la morfología celular, aparecen algunas células redondeadas y otras deformadas. En la Figura 37, se muestran las imágenes más representativas de las células al ser expuestas a este compuesto.



**Figura 37.** Morfología de las células expuestas al Taxol, como control positivo.

### 7.5 Caracterización del tipo de muerte celular inducida por el compuesto C-4

Para el compuesto **C-4** fue determinada la actividad de Anexina V para conocer el tipo de muerte inducida; utilizando citometría de flujo. Estos ensayos se realizaron a tres tiempos: 24, 48 y 72 h. Estos ensayos se efectuaron. En la Tabla 11 podemos observar estos resultados.

**Tabla 11.** Células T-47D positivas a Anexina V al ser expuestas al compuesto C-4.

Concentración	C-4 (% células $\pm$ SD)	
	Apoptosis	Necrosis
<b>2.5 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></b>		
24 h	9.2 $\pm$ 0.6	17.5 $\pm$ 1.4
48 h	5.8 $\pm$ 3.5	17.7 $\pm$ 1.3
72 h	60.4 $\pm$ 4.3	2.4 $\pm$ 0.1
<b>5.0 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math></b>		
24 h	14.0 $\pm$ 2.6	11.6 $\pm$ 0.6
48 h	34.4 $\pm$ 2.8	17.6 $\pm$ 3.0
72 h	82.3 $\pm$ 2.5	1.0 $\pm$ 0.1

---

## 8. DISCUSIÓN

Múltiples estudios han señalado el potencial biológico de especies vegetales que pertenecen a la familia de Asteráceas (*Compositae*). Dentro de las actividades biológicas señaladas están: antioxidante (Wueh Yew y col., 2016); citotóxica (Qian y col., 2015); anti-inflamatoria (Ting y col., 2012); antibacteriana (Mothana y col., 2011); insecticida (Man-Li y col., 2008) entre otras. La especie de *Verbesina persicifolia*, perteneciente a la familia de las Asteráceas, se ha reportado que tiene usos contra algunas enfermedades como lo es el cáncer gastrointestinal, desordenes gastrointestinales y algunos padecimientos relacionados con procesos inflamatorios (Alonso-Castro y col., 2011). Existen diversos estudios que indican que especies vegetales pertenecientes a esta familia tienen una actividad biológica como antihipertensivos, hipoglucémicos, antimicrobianos y citotóxicos (Dewick, 2002). También se ha descrito el uso ornamental de las especies de ésta familia. Respecto al contenido químico, hay reportes sobre la presencia de compuestos acetilénicos, sesquiterpenos, lactonas sesquiterpénicas, guayanólidos y seudoguayanólidos algunos como la helinalina con actividad citotóxica (Germán-Ramírez, 2008). Otro de los estudios sobre esta especie son los realizados por Mejía-Flores en 2010, en el que destaca el aislamiento de un compuesto que fue modificado estructuralmente y evaluado contra diferentes líneas celulares, entre éstas se encuentra la línea tumorigénica MCF7 caracterizada por ser positiva a receptores hormonales. De igual manera (Dalla-Via y col. 2015) demuestran el efecto antiproliferativo de uno de los compuestos aislados en esta planta, además de su efecto anti-inflamatorio evaluado en ratones con un edema inducido.

El principal antecedente, que llevo al estudio del efecto citotóxico de la raíz de esta planta, fue el realizado por (Avelino-Flores 2014) donde determinó el efecto antitumoral de extractos de partes aéreas de la planta y el efecto de uno de sus compuestos. Dentro de los ensayos realizados por este autor destaca un estudio preliminar de extractos de la raíz, en el que el extracto de diclorometano posee un porcentaje de inhibición similar a uno de los compuestos aislado en esta planta; de ahí derivan las preguntas ¿Qué clase de componentes están presentes en la raíz, que reducen de manera significativa la viabilidad celular? ¿Son de la misma naturaleza los componentes presentes en la raíz y en hojas?. Como se puede observar en la Figura 7 del análisis por HPLC, los componentes presentes en las partes aéreas y la raíz, son de naturaleza similar, debido a la semejanza entre los tiempos de retención de los componentes. Es necesario mencionar que con dicho análisis se puede observar un menor número de componentes en la raíz, lo cual es muy congruente con la función de cada parte vegetal. Es decir, las hojas poseen estructuras especializadas en las que se lleva a cabo fotosíntesis y se requieren de moléculas que capturen la luz solar como los pigmentos, por ello se observa una mayor diversidad de estructuras.

---

## 8.2 Evaluación citotóxica del extracto completo de diclorometano

Aún cuando se obtuvieron extractos con disolventes de polaridad creciente, sólo el obtenido con diclorometano presentó efecto citotóxico. Se sabe que el diclorometano es un disolvente cuya polaridad permite la disolución de compuestos de polaridad intermedia, como algunos terpenos (Avelino-Flores, 2005). Este extracto, presentó inhibición de la proliferación celular en todas las líneas celulares evaluadas; con porcentajes de inhibición de hasta el 100%. La línea celular más sensible a este extracto fue la T-47D con valor de  $IC_{50}$  de 5.24  $\mu\text{g/mL}$ ; se ha reportado que ésta línea es positiva a receptores de estrógeno y progesterona (Holliday y col., 2011), al igual que la línea MCF7; lo que lleva a pensar que los compuestos presentes en el extracto pudieran tener un efecto sobre posibles receptores hormonales. Por otra parte, como lo hemos señalado con anterioridad se selecciono una línea celular de cáncer escamoso de cérvix (SiHa) que expresan el subtipo 16 y 18 del virus del papiloma humano, conocidos como virus de alto riesgo para el desarrollo de cáncer cervicouterino (Conway y col., 2009; Tomassino, 2014). Esta señalado en la bibliografía, que este tipo de cáncer no es de tipo hormonodependiente (Pérez-Montiel y col. 2014). Y se evaluó el efecto sobre ésta línea para obtener más información sobre la posible participación de receptores hormonales.

Las células que tuvieron menor sensibilidad al extracto fueron las MDA-MB-231, ésta línea es un modelo de estudio para pacientes triple negativo, es decir  $ER^-$ ,  $PR^-$  y  $HER2^-$  y si bien se observó un menor efecto y el valor de  $IC_{50}$  esta por arriba de los 25  $\mu\text{g/mL}$ , surgieron las siguientes interrogantes ¿Los compuestos presentes en el extracto, tendrán un efecto sobre los receptores hormonales, siendo así, por qué no se observa el mismo efecto sobre las células MCF7, que tambien poseen receptores hormonales?. Una posible respuesta podría ser los niveles de expresión del receptor de progesterona, ya que con base en un estudio de Western Blot realizado por Domenici en 2014, se observa que la línea celular MCF7 posee un menor nivel de expresión de receptores a progesterona; lo que sugeriria probablemente que los compuestos de dicho extracto estén actuando como un antagonista de estos receptores. Sin embargo, en cada una de las concentraciones evaluadas se observaron cambios en la morfología de la célula, por ejemplo: células despegadas, aglomeración, alargamiento de éstas y a la máxima concentración (100  $\mu\text{g/mL}$ ) no quedan rastros de alguna célula integra, sólo se puede observar una gran cantidad de detrito celular y en el ensayo de reducción del MTT se puede cuantificar únicamente la absorbancia de dicho reactivo, entonces es un indicativo más del efecto citotóxico de este extracto.



---

### 8.3 Evaluación citotóxica de las fracciones del extracto de diclorometano de raíz

Se decidió hacer un fraccionamiento del extracto para obtener fracciones enriquecidas con compuestos de una determinada polaridad. Se evaluaron seis fracciones que incluyen a los compuestos presentes en el extracto. Se observó que fracciones de baja polaridad (F1-F3), cuyos componentes principales, con base en los análisis de RMN, son de naturaleza lipídica como ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos; mostraron una escasa actividad citotóxica, ya que eran necesarios más de 100  $\mu\text{g/mL}$ , para observar una leve pérdida de viabilidad. De forma sorprendente la fracción cuatro, enriquecida con compuestos de polaridad media, corroborado por cromatografía en capa fina, cuyo espectro de RMN indica la presencia de anillos aromáticos y dobles enlaces, presentó mejor actividad frente a las diferentes líneas; esperábamos que esta actividad se incrementara con la polaridad de las fracciones, pero no sucedió de este modo. Las fracciones 5 y 6, sólo presentaron efecto sobre la línea SiHa, observándose una pérdida de la morfología normal de la célula tipo huso, parecen hinchadas, estresadas y con mucho detrito celular en el medio. A pesar de ello, únicamente la fracción seis tuvo una  $\text{IC}_{50}$  por debajo de 100  $\mu\text{g/mL}$  (74.72  $\mu\text{g/mL}$ ) en esta línea celular. Probablemente las células estén sufriendo alguna alteración a nivel de ciclo celular, para conocer la respuesta se podría hacer un análisis de su ciclo por medio de un experimento de citometría y conocer en qué fase se encuentran las células.

La fracción número cuatro, como lo hemos mencionado fue la que presento mejor actividad, por ello fue sometida a diferentes procesos cromatográficos para separar a sus componentes. Se aislaron cuatro componentes mayoritarios, de los cuales dos se evaluaron en las líneas celulares. El compuesto que presento actividad citotóxica en las diferentes líneas, fue utilizado en el ensayo para evaluar el tipo de muerte que induce en la línea celular T-47D, que fue la más susceptible.

---

### 8.3 Evaluación citotóxica de los compuestos aislados de la fracción cuatro

Diversos reportes señalan el aislamiento y la actividad citotóxica de compuestos terpenoides y particularmente de sesquiterpenos, (Heejung y col., 2011; Somwong y col., 2012). Estos compuestos no están restringidos a una determinada familia. Numerosos reportes señalan el aislamiento de terpenos a partir de especies botánicas pertenecientes a la familia de Solanáceas (Fang y col., 2013, Gui-Sheng y col., 2013); Juglandáceas (Heejung y col., 2011); Moráceas (Somwong y col., 2012); Anonáceas (S. Bomfim y col., 2013); etc. Estos compuestos son sintetizados en los plástidos de la célula vegetal o el citosol y como precursor tienen al farnesil pirofosfato, FPP; (Sallaud y col., 2009). Xu y col. En 2010 reportan la actividad citotóxica de sesquiterpenos glucosilados tipo eudesmano, sobre la línea celular Hep-G2 y HeLa con 0.018 y 0.012  $\mu\text{M}$  respectivamente; con este ejemplo podemos observar el potencial citotóxico. El compuesto descrito por estos autores posee dos fragmentos estructurales de naturaleza muy diferente, uno de ellos es un residuo de carbohidrato que incrementa su polaridad y la presencia de grupos hidroxilo favorece la formación de puentes de hidrógeno con otras moléculas. Por otra parte, también posee una estructura hidrocarbonada cíclica de polaridad baja. Wang y col., en 2013; determinaron que la actividad de sesquiterpenos que carecen del fragmento de carbohidrato está por arriba de los 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Lo que sugiere que no es sólo el esqueleto de sesquiterpeno el involucrado en la actividad biológica. Al respecto, el compuesto aislado por Mejía en 2010 y Avelino en 2013, posee la estructura hidrocarbonada de eudesmano, pero como sustituyente en la posición 4, un fragmento éster del ácido cinámico. A pesar de que no son las mismas líneas celulares, es notorio que la presencia de este fragmento de ácido fenólico favorece la actividad citotóxica.

Gui-Sheng reporta la actividad citotóxica de dos sesquiterpenos que estructuralmente son muy semejantes, salvo por la posición de un grupo hidroxilo; el primero se encuentra unido al carbono ocho y el segundo al carbono once. Este cambio de posición disminuye la  $\text{IC}_{50}$  de dicho compuesto. Guo-Cai y col., en 2013 reportan el aislamiento de sesquiterpenos tipo eudesmano y su evaluación citotóxica, donde se muestran activos a una concentración mayor a los 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Evaluados en seis líneas celulares; algo a destacar en este estudio es que los compuestos no tienen un fragmento adicional, como lo es el caso de Wang y col. Por lo que podríamos decir que estos compuestos necesitan un fragmento adicional para mostrarse activos, a una concentración menor a los 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sin embargo, parece que mucho va depender del tipo celular porque en el estudio de Diogo S. Bomfim en 2013 las moléculas reportadas presentan valores de  $\text{IC}_{50}$  por debajo de los 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; la principal diferencia entre los compuestos reportados, es la presencia de un doble enlace, en dos moléculas es endocíclico y en otra exocíclico.

---

Cuando las células SiHa fueron expuestas al compuesto C-4 mostraron una morfología muy semejante a la que presentaron al ser expuestas al antitumoral paclitaxel. Observándose redondeadas en todas las concentraciones. Esta observación llevo a suponer que podrían estar actuando de la misma manera. Se conoce que el taxol actúa a nivel de los microtúbulos, inhibe su polimerización y despolimerización, como consecuencia de esto se ve afectada la división celular y la célula entra en un estado de senescencia o muerte. También el hecho de que el compuesto **C-4**, presente valores de IC<sub>50</sub> similares a los del taxol, lleva a suponer que podría estar afectando a los microtúbulos. No obstante, es necesario llevar a cabo otros experimentos que permitan discernir sobre este posible mecanismo de acción.

Estudios realizados por Li en 2013 determinaron que el  $\beta$ -eudesmol, un compuesto que consta solo de la cadena hidrocarbonada característica del eudesmano, con un doble enlace exocíclico en la posición 4 y un grupo hidroxilo en el isopropilo, induce apoptosis a través de la activación de caspasa 9, por una vía apoptótica mitocondrial por regulación de citocromo c en la línea celular HL60. Otros estudios ponen en evidencia que derivados del eudesmano alteran el potencial mitocondrial (Diogo S. Bomfim y col., 2013) o bien inactivan el Factor Nuclear Kappa B, (NF- $\kappa$ B) (Li y col., 2012), llevando también a apoptosis. Por tal motivo, en el presente trabajo se decidió evaluar la inducción de apoptosis mediante el análisis de la externalización de la fosfatidilserina (Elmore, 2007).

Al encontrar que el compuesto **C-4**, presenta un efecto citotóxico mayor que el taxol, el fármaco de uso clínico, fue necesario evaluar a ambos compuestos en células no tumorogénicas, encontrándose para las células epiteliales de mama una IC<sub>50</sub> de 9.14  $\mu$ g/mL, mientras que taxol presentó una IC<sub>50</sub> de 24.20  $\mu$ g/mL. Pero si observamos la Tabla 5 se necesitan menos de 5  $\mu$ g/mL para disminuir la viabilidad celular sobre la línea T-47D y menos de 10  $\mu$ g/mL para la línea celular MDA-MB-231. Esto indica que el compuesto afecta de igual manera a células tumorales que no tumorales. No obstante, el hecho de requerir una dosis menor para las células T-47D, sugiere que podría ser utilizado en tumores con células de este tipo. Por supuesto deben hacerse más estudios de toxicidad *in vivo* y de biodisponibilidad.

---

#### 8.4 Caracterización del tipo de muerte celular inducida por el compuesto C-4 sobre la línea celular T-47D

Por el análisis de citometría de flujo pudimos observar que el compuesto **C-4** con una estructura de sesquiterpeno tipo eudesmano, induce apoptosis en las células T-47D y es dependiente de la concentración y tiempo de exposición de la célula al tratamiento. Como lo señala Elmore en su revisión sobre apoptosis, la externalización de la fosfatidilserina, a la superficie de la membrana celular, es un claro indicio de inducción de apoptosis. Por otro lado, esta externalización se ve relacionada a la ruta intrínseca en la muerte celular por apoptosis, además la inducción de caspasas se ve ampliamente relacionado a este proceso. Es así como lo señala Beibei y col., 2013, en la vía intrínseca, el estrés celular incrementa la permeabilidad de la membrana mitocondrial, seguida por la desregularización del citocromo c, formación del apoptosoma con Apaf-1. Una de las formas de activación de la ruta intrínseca ocurre cuando hay daño en el ADN o los microtúbulos, como los inducidos por quimioterapia y radioterapia (Pazo-Cid y col., 2012). De manera indirecta podemos proponer que el compuesto **C-4** también podría inducir la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) porque el compuesto guarda especial similitud con otros compuestos ampliamente reportados, denominados lactonas sesquiterpénicas. Sin embargo, no se tiene una idea clara sobre la manera en como estos compuestos inducen la generación de ROS (Beibei y col., 2013). La actividad de la caspasa 8 a menudo esta relacionada con la translocación de Bid (una proteína pro-apoptótica), la cual juega un papel importante en el proceso de muerte.

---

## 9. CONCLUSIONES

El extracto completo de diclorometano, presentó citotoxicidad comparable por lo reportado por Avelino Flores en 2013; demostrando ser una fuente importante de compuestos con potencial citotóxico.

Las fracciones derivadas del extracto no mejoraron el valor de  $IC_{50}$  que se esperaba al tener fracciones enriquecidas con un determinado tipo de compuestos, lo que indica un efecto sinérgico de los componentes. Las fracciones con menor polaridad no mostraron efecto citotóxico alguno. Sin embargo, se encontró una fracción que fue separada en sus componentes y uno de ellos presentó valores de  $IC_{50}$  menores a la fracción y el extracto, por lo que está relacionado con el efecto citotóxico y podría ser uno de los principios activos del extracto.

El compuesto citotóxico **C-1** (1,4-dihidroxi 6- $\beta$ -cinamoiloxi eudesmano); reportado por Avelino, 2014 está presente en el extracto diclorometánico de la raíz de *V. persicifolia*, pero con una menor proporción comparado con extracto de hojas, lo que indica que este compuesto no es el único responsable de la citotoxicidad del extracto.

El compuesto **C-4** mostró una mejor actividad sobre la línea celular T-47D, lo que sugiere que los componentes del extracto que posean estructura de derivado de eudesmano poseen efecto citotóxico.

Con los ensayos de citometría de flujo se determinó que éste compuesto sesquiterpénico tipo eudesmano puede inducir muerte por apoptosis, lo que resulta acorde a lo descrito para estos derivados, por lo que podría ser considerado para más experimentos los cuales ayuden a conocer su potencial como agente citotóxico.

---

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Adedayo A. Onitilo, Jessica M Engel, Robert T. Greenlee y Bickol N Mukesh. «Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival.» *Clinical Medicine & Research*, 2008: 4-13.
- Al-Rawi M.A.A., R.E. Mansel y W.G. Jiang. «Molecular and cellular mechanism of lymphangiogenesis.» *The journal of Cancer Surgery*, 2004: 117-121.
- Alonso-Castro Angel Josabad, Maria Luisa Villareal, Luis A. Salazar-Olivo, Maricela Gomez-Sanchez, Fabiola Dominguez y Alejandro Garcia-Carranca. «Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies.» *Journal of Ethnopharmacology*, 2010: 945-972.
- Ashkenazi Avi y Vishva M Dixit. «Death Receptors: Signaling and Modulation.» *Science*, 1998: 1305-1308.
- Avelino-Flores María del Carmen Guadalupe «Evaluación de la Actividad Antitumoral y Estudio Fitoquímico de *Turnera diffusa* y *Verbesina persicifolia*.» Tlaxcala, 2014.
- Avelino-Flores María del Carmen Guadalupe. «Evaluación de la actividad antiproliferativa de extractos de cinco plantas de la región de Cuetzalan, Puebla, sobre una línea celular de cáncer cervicouterino.» 2005. 1-78.
- Barragán-Ruiz José Adelfo, Becerra-Alcantará Geomar Ivonne, González-López Nelly Judith, Maitnero-Ratchelous Fernando Enríque, Mijares-Martínez Alberto, Patlán-Pérez Rosa María, Pérez-Puente Ancizar y Silva-Juan Alejandro *Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Mama en Segundo y Tercer nivel de Atención*. DF., 2009.
- Beibei Zheng, Lahao Wu, Lisha Ma, Shanshan Liu, Lin Li, Weidong Xie y Xia Li «Telekin Induces Apoptosis Associated with the Mitochondria-Mediated Pathway in Human Hepatocellular Carcinoma Cells.» *Biol. Pharm. Bull*, 2013: 1118-1125.
- Bruce Alberts. *Biología molecular de la célula*. Barcelona: Omega, 2002.
- Cetina Pérez Lucely y Ochoa-Carrillo Francisco Javier. «Cáncer cervicouterino, aún un reto por vencer.» *Gaceta Mexicana de Oncología*, 2014: 1-3.
- Chajès Véronique e Isabelle Romieu. «Nutrition and breast cancer.» *Maturitas*, 2013: 7-11.
- Chinnaiyan Arul M. «The apoptosome: Heart and Soul of the Cell Death Machine.» *Neoplasia*, 1999: 5-15.
- Cohen Gerald M. «Caspases: the executioners of apoptosis.» *Biochem*, 1997: 1-16.
- Conway M.J. y C. Meyers. «Replication and Assembly of Human Papillomaviruses.» *Critical reviews in oral biology & medicine* , 2009: 307-317.
- Cory Suzanne y Jerry M Adams. «The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch.» *Cancer*, 2002: 647-656.
- Dalla Via L., M. Mejía, A.N. García-Argáez, A. Braga, A. Toninello y M. Martínez-Vázquez. «Anti-inflammatory and antiproliferative evaluation of 4B-cinnamoyloxy, 1b,3A-dihydroxyeudesm-7,8-ene from *Verbesina persicifolia* and derivatives.» *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2015: 5816-5828.

---

Davies Eleri Lloyd. «Breast cancer.» *Common cancers*, 2015: 1-5.

Dewick Paul M. «The Mevalonate and Deoxyxylulose phosphate pathways: Terpenoids and Steroids.» En *Medicinal Natural Products*, de Paul M Dewick, 167-285. England: John Wiley & Sons, 2002.

Domenici Giacomo, Rábano Miriam, Piva Marco, Iriondo Oihana, Zabalza Ignacio, López-Ruiz y Del Mar Vivanco María. «Respuesta hormonal de las células madre de mama y resistencia a tamoxifeno.» *Revista de Senología y Patología Mamaria*, 2014: 149-156.

Elmore Susan. «Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.» *Toxicol Pathol*, 2007: 495-516.

Ellis Lee M., Garth L. Nicolson e Isaiah Fidler. *Conceptos y mecanismos relacionados con las metástasis del cáncer de mama*. Vol. X, de *La mama*, de Kirby I. Bland y Edward M. Copeland III, 571-593. Florida: Médica Panamericana, 2002.

Engeland van Manon, Nieland Luc J.W., Ramaekers Frans C.S., Schutte Bert y Reutelingsperger Chris P.M. «Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure.» *Cytometry*, 1998: 1-9.

Fang Yao, Song Qin-Lan, Zhang Lei, Li Gui-Sheng, y Dai Sheng-Jun. «Three new cytotoxic sesquiterpenoids from *Solanum lyratum*.» *Phytochemistry Letters*, 2013: 453-456.

Ferraro-Peyret Carole, Quemeneur Laurence, Flacher Monique, Revillard Jean-Pierre y Genestier Laurent. «Caspase-Independent Phosphatidylserine Exposure During Apoptosis of Primary T Lymphocytes.» *The Journal of Immunology*, 2002: 4805-4810.

Frei B., Heinrich M., Bork P.M., Jaki B., Kato T., Kuhnt M., Schmitt J., Schühly W., Wolken C. y Sticher O. «Multiple screening of medicinal plants from Oaxaca, Mexico: ethnobotany and bioassays as a basis for phytochemical investigation.» *Phytomedicine*, 1998: 177-186.

Gelmann Edward P. *Oncogenes en el cáncer de mama humano*. Vol. X, de *La Mama*, de Kirby I. Bland y Edward M. Copeland III, 510-528. Florida: Médica Panamericana, 2002.

Germán-Ramírez María Teresa. *Los principales grupos de vegetales*. Vol. II, de *Las Plantas Medicinales - Una Visión Multidisciplinaria*, de José Waizel-Bucay, 269-320. México, Df.: Instituto Politécnico Nacional - Dirección de Publicaciones, 2008.

Gewefel Hanan y Bodour Salhia. «Breast Cancer in Adolescent and Young Adult Women.» *Clinical Breast Cancer*, 2014: 390-395.

Gomez-Martinez Ricardo, Tlacuilo-Parra Alberto y Garibaldi-Covarrubias Roberto. «Use of Complementary and Alternative Medicine in Children with Cancer in Occidental, Mexico.» *Pediatric Blood Cancer*, 2007: 820-823.

Gui-Sheng, Li, Yao Fang, Zhang Lei, Yue Xi-Dian, y Dai Sheng-Jun. «Two new cytotoxic sesquiterpenoids from *Solanum lyratum*.» *Chinese Chemical Letters*, 2013: 1030-1032.

Guo-Cai Wang, Guo-Qiang Li, Hua-Wei Geng, Tao Li, Jiao-Jiao Xu, Fang Ma, Xia Wu, Wen-Cai Ye y Yao-Lan Li. «Eudesmane-type sesquiterpene derivatives from *Laggera alata*.» *Phytochemistry*, 2013: 201-207.

Gurtu Vanessa, Kain Steven R. y Zhang Guohong. «Fluorometric and Colorimetric Detection of Caspase Activity with Apoptosis.» *Analytical Biochemistry*, 1997: 98-102.

---

Hanahan Douglas y Robert A. Weinberg. «The Hallmarks of Cancer.» *Cell*, 2000: 57-70.

Heejung Yang, Hyun-Jong Cho, So Hee Sim, Young Keun Chung, Dae-Duk Kim, Sang Hyun Sung, Jinwoong Kim y Young Choong Kim. «Cytotoxic terpenoid from *Juglans sinensis* leaves and twigs.» *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012: 2079-2083.

Hulka BS. «Epidemiology of suceptibility to breast cancer.» *Progress in Clinical and Biological Research*, 1996: 159-174.

Hussein A. Assi, Katia E. Khoury, Haifa Dbouk, Lana E. Khalil, Tarek H. Mouhieddine y Nagi S. El Saghir. «Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women.» *Journal of Thoracic Disease*, 2013: 52-58.

INEGI. «Estadísticas a propósito de día mundial contra el cáncer.» 31 de Enero de 2014: 1-11.

J. Cárdenas-Sánchez, A. Erazo-Valle, E. Maafs-Molina, E. Bargalló-Rocha y A. Poitevin. «Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer.» *Gaceta Mexicana de Oncología*, 2013.

Jakupovic, J., E. Ellmauerer, Y. Jia, F. Bohlmann, X. A. Domínguez, y G. Schmeda-Hirschmann. «Further Eudesmane Derivatives from *Verbesina* Species.» *Planta Medica*, 1986: 39-42.

K L King y Cidlowski JA. «Cell cycle regulation and apoptosis.» *Annual reviews of physiology*, 1998: 601-617.

Kerr JFR, Clay M Winterford y Brian V Harmon. «Apoptosis Its Significance in Cancer and Cancer Therapy.» *Cancer*, 1994: 2013-2026.

L. Briemann Harry, William N. Setzer, Peter B. Kaufman, Ara Kirakosyan y Leland J. Cseke. «Phytochemicals: The Chemical Components of Plants.» En *Natural Products from Plants*, de Harry L. Briemann, William N. Setzer, Peter B. Kaufman, Ara Kirakosyan y Leland J. Cseke, 1-50. United States of America: Taylor & Francis Group, 2006.

L. Holliday Deborah y Varie Speirs. «Choosing the right cell line for breast cancer research.» *Breast Cancer Research*, 2011: 1-7.

Lewis, MJ. «Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe. Washintong, D.C.» *Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS)*, 2004: 40.

Li Yanchun, Te Li, Caixia Miao, Jianchun Li, Wei Xiao y Enlong Ma. « $\beta$ -Eudesmol Induces JNK-Dependent Apoptosis through the Mitochondrial in HL60 Cells.» *Phytotherapy Research*, 2012: 338-343.

Locksley Richard M, Nigel Killen y Michael J Lenardo. «The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology.» *Cell*, 2001: 487-501.

Machado-Reyes M., R. Jiménez-Lima, A. Blanco-Salazar y N. Chavaro-Vicuña. «Estadificación y evaluación inicial del cáncer cervicouterino.» *Gaceta Mexicana de Oncología*, 2014: 53-58.

Man-Li Zhang, Wu Ming, Zhang Jian-Jiam, Irwin Dianne, Gu Yu-Cheng, y Shi Qian-Wen. «Chemical constituents of plants from the *Genus Eupatorium* .» *Chemistry & Biodiversity*, 2008: 40-55.



- 
- Manzo-Merino J., R. Jiménez-Lima y A. Cruz-Gregorio. «Biología molecular del cáncer cervicouterino.» *Gaceta mexicana de oncología*, 2014: 18-24.
- Martínez Maximino. En *Las Plantas Medicinales de México*, 656. Botas, 1989.
- Martinvalet Denis, Pengcheng Zhu y Judy Lieberman. «Granzyme A Induces Caspase-Independent Mitochondrial Damage, a Required First Step for Apoptosis.» *Immunity*, 2005: 355-370.
- McCullough Shaun D. yanfen Hu y Rong Li. «BRCA1 in initiation, invasion, and metastasis of Breast Cancer: A perspective from the tumor microenvironment.» Vol. 11 En *Metastasis of breast Cancer - Biology and Treatment 11*, editado por Robert E. Mansel , Oystein Fodstad y Wen G. Jiang , 31-46. The Netherlands: Springer, 2007.
- Mejía-Flores Marcela. «Evaluación genotóxica de extractos y compuestos obtenidos de *Verbena persicifolia* DC.» 20-24. Distrito Federal, 2010.
- Melet Arnelle, Keli Song Octavian Bucur, Zainab Jagani, Grassian Alexandra R y Roya Khosravi-Far. «Apoptotic Pathways in Tumor Progression and Theraphy.» En *Programmed celldeath in cancer progression and therapy*, de Khosravi-Far Roya y White Eileen, 46-87. Springer, 2008.
- Mena-Rejon G. E., Caamal-Fuentes Z., Cantillo-Ciau R., Cedillo-Rivera J., Flores-Guido y R Moo-Puc. «In vitro cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine.» *Journal of Ethnopharmacology*, 2008: 462-465.
- Meyer Natalie, Sam S Kim y Linda Z Penn. «The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis.» 2006: 275-287.
- Miyashita T., Krajewski S., Krajewska M., Wang HG., Lin HK., Liebermann DA., Hoffman B. y Reed JC. «Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo.» *Oncogene*, 1994: 1799-1805.
- Mothana Ramzi A. A., Sabine Kriegisch, Manuela Harms, Kristian Wende, y Ulrike Lindequist. «Assessment of selected Yemeni medicinal plants for their in vitro antimicrobial, anticancer, and antioxidant activities.» *Pharmaceutical Biology*, 2011: 200-210.
- Nirendra K Rai, Tripathi Kamiakar y Sharma Deborshi. «Apoptosis: A Basic Physiologic Process in Wound Healing.» *The International Journal of Lower Extremity Wounds* 2005: 138-144.
- Oda E., Ohki R., Murasawa H., Nemoto J., Shibue T., Yamashita T., Tokino T., Taniguchi T., Tanaka N. «Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis.» 2000: 1053-1058.
- Pathom Somwong, Suttisri Rutt, y Buakeaw Anumart. «New sesquiterpenes and phenolic compund from *Ficus foveolata*.» *Fitoterapia*, 2013: 1-7.
- Pazo-Cid R.A., Álvarez-Alejandro M., Cebollero de Miguel A., Agustín M.J., Martínez-Lostao L., Anel-Bernal A., Pérez-Gracia J.L. y Antón-Torres A. «Apoptosis, cáncer & Co.» *Revista Internacional de Grupos en Oncología*, 2012: 23-28.
- Pérez-Montiel D., Alvarado-Cabrero I., Chablé-Montero F., Arrazola-González J.A., Vilches-Cisneros N., Barrón-Rodríguez L.P. y Chanona-Vilchis J.G. «Patología del cáncer cervicouterino.» *Gaceta Mexicana de Oncología*, 2014: 33-38.

- 
- Qian Wu, Li Hua, Lee So Yoon, Lee Hwa Jin, y Ryu Jae-Ha. «New cytotoxic sesquiterpenoids from *Sigesbeckia glabrescens*.» *Molecules*, 2015: 2850-2856.
- Raharivelomanana Phila, Jean-Pierre Bianchini, Armand R.P. Ramanoelina, Jean R.E. Rasoarahona, Robert Faure, y Aime Cambon. «Eudesmane sesquiterpenes from *Laggera alata*.» *Phytochemistry*, 1997: 1085-1088.
- Redonda-Martínez Rosario y José Luis Villaseñor-Ríos. «*Asteraceae*.» En *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*, 1-4. CONABIO, 2011.
- Reuter Simone, Subash C. Gupta, Madan M. Chaturvedi y Bharat B. Aggarwal. «Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked.» *Free Radical Biology & Medicine*, 2010: 1603-1616.
- Rizzo P, C Osipo, K Foreman, T Golde y L Miele. «Rational targeting of Notch signaling in cancer.» *Oncogene*, 2008: 5124-5131.
- S. Bomfim Diogo, C. Ferraz Rosana P., C. Nanashara Carvalho, P. Soares Milena B., B. Pinheiro María L., V. Costa Emmanoel, P. Bezerra Daniel P. «Eudesmol Isomers Induce Caspase-Mediated Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells.» *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2013: 300-306.
- Saelens Xavier, Nele Festjens, Lieselotte Vande Walle, Maria van Gurp, Geert van Loo y Peter Vandennebeele. «Toxic proteins released from mitochondria in cell death.» *Oncogene*, 2004: 2861-2874.
- Sallaud Christophe, Rontein Denis, Onillo Sandrine, Jabès Françoise, Duffé Philippe, Giacalone Cécile, Thoraval Samuel, Escoffier Camille, Herbette Gaëtan, Leonhardt Nathalie, Causse Mathilde y Tissier Alain «A Novel Pathway for Sesquiterpene Biosynthesis from Z,Z-Farnesyl Pyrophosphate in the Wild *Tomato Solanum habrochaites*.» *The Plant Cell*, 2009: 301-317.
- Samavat Hamed y Mindy S Kurzer. «Estrogen metabolism and breast cancer.» *Cancer letters*, 2015: 231-243.
- Seoung-Hee Jeong, Koo Sung-Ja, Ryu Shin-Yong, Park Hee-Junh y Lee Kyung-Tae. «Induction of Apoptosis by Yomogin in Human Promyelocytic Leukemic HL-60 Cells.» *Biol. Pharm. Bull*, 2004: 1106-1111.
- Serdar E Bulun Moy Irene, Dong Chen, David C Brooks y Hong Zhao. «Aromatase, breast cancer and obesity: a complex interaction.» *Trends Endocrinol Metab*, 2012: 1-14.
- Subash C Gupta, Kim Ji Kye, Prasad Sahdeo y Aggarwal Bharat B. «Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals.» *Cancer Metastasis Rev.*, 2010: 405-434.
- Thurston David E. «Introduction to Cancer.» En *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs*, de David E. Thurston, 12-14. CRC Press, 2007.
- Ting Zhang, Gong Ting, Yang Yan, Chen Ruo-Yun, y Yu De-Quan. «Two new eudesmanolides from *Inula racemosa* and their bioactivities.» *Phytochemistry Letters*, 2012: 229-232.

---

Tomassino Massimo. «The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis.» *Seminars in Cancer Biology*, 2014: 13-21.

Torres-Poveda K.J., A. Cruz-Valdez y V. Madrid-Marina. «Epidemiología del cáncer cervicouterino.» *Revista Mexicana de Oncología*, 2014: 4-17.

Wang Guo-Cai, Li Guo-Qiang, Geng Hua-Wei, Tao Li, Xu Jiao-Jiao, Ma Fang, Wu Xia, Wen-Cai Ye, Yao-Lan Li «Eudesmane-type sesquiterpene derivatives from *Laggera alata*.» *Phytochemistry*, 2013: 201-207.

Wang, Xin W y Harris Curtis C. «p53 Tumor-Supressor Gene: Clues to Molecular Carcinogenesis.» *Journal of Cellular Physiology*, 1997: 247-255.

Wen Hui Xu, Liang Qian, Liang Zong Suo, y Li Xing Cong. «Two new eudesmane derivatives from *Verbesina virginica*.» *Chinese Chemical Letters*, 2010: 693-695.

Wuen Yew Teoh, Wahab Norhanom Abdul, Moses Richardason Jaime Stella, y Sim Kae Shin. «Evaluation of antioxidant properties, cytotoxicity and acute oral toxicity of *Gynura procumbens* (Compositae).» *Sains Malaysiana*, 2016: 229-235.

Xu Xinya, Haihui Xie, Jing Hao yueming Jiang y Xiaoyi Wei. «Eudesmane sesquiterpene glucosides from *lychee seed* and their cytotoxic activity.» *Food Chemistry*, 2010: 1123-1126.

---

## 11. ANEXOS

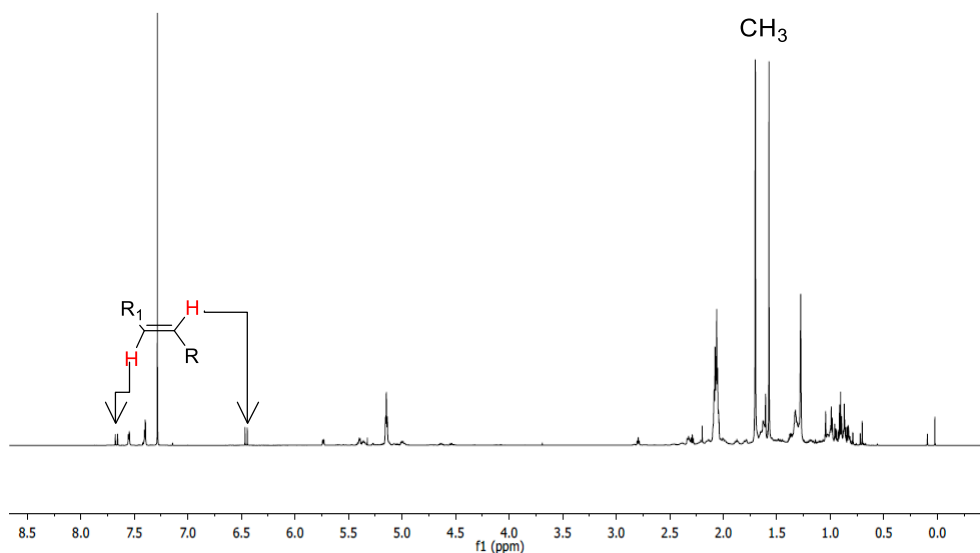
### Protocolo para ensayo de evaluación citotóxica por ensayo de MTT

1. Se sembraron 10,000 células por pozo en placas ELISA de 96 pozos.
2. Se dejan incubar las células por 24 h y al día siguiente es removido el medio de cultivo.
3. Se preparan las diluciones a las concentraciones a evaluar, con un volumen final de 200  $\mu$ L.
4. Nuevamente las células son incubadas con los tratamientos por 72 h a 37°C y una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>.
5. Finalizado el periodo de incubación es retirado el medio y las células son lavadas con 50  $\mu$ L de buffer de fosfatos PBS pH 7.3.
6. Se remueve el PBS y se agregan 40  $\mu$ L del reactivo MTT a una concentración de 5  $\mu$ g/mL disuelto en 10 mL de PBS.
7. Se incuban las células por 2 horas.
8. Se agregan 60  $\mu$ L de DMSO y se agitan en un agitador mecánico de placas a 450 rpm durante veinte minutos.
9. Leer la absorbancia de la placa a 550 nm.

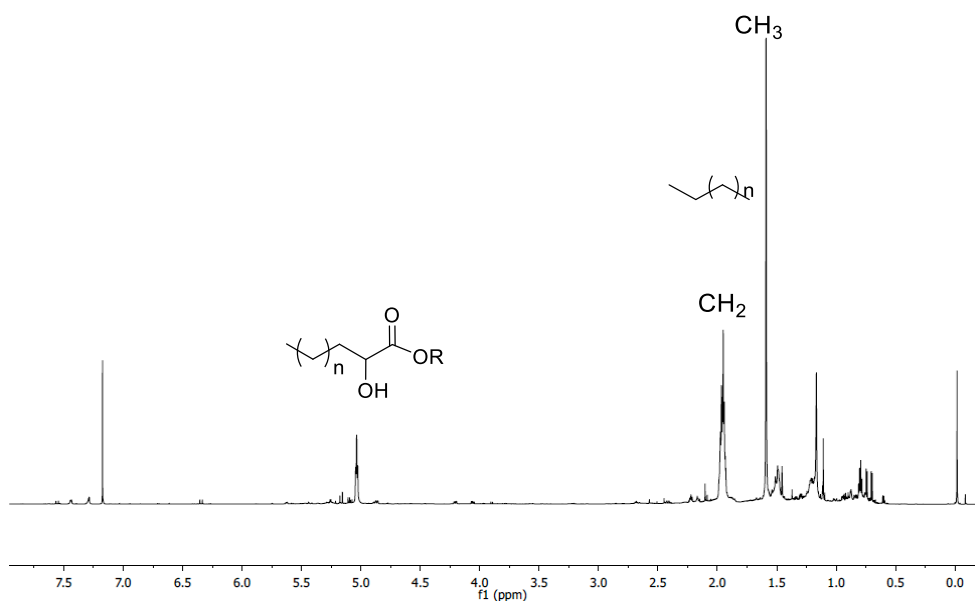
### Protocolo para ensayo de evaluación de inducción de Apoptosis a través de Anexina V/Yoduro de propidio

1. Se sembraron 50,000 células en placas ELISA de 24 pozos.
2. Se dejan incubar las células por 24 h y al día siguiente es removido el medio de cultivo.
3. Se preparan las diluciones a las concentraciones a evaluar, con un volumen final de 1000  $\mu$ L.
4. Nuevamente las células son incubadas con los tratamientos por 24, 48 o 72 h a 37°C y una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>.
5. El medio con el tratamiento fue removido y colectado en tubos de ensaye de 5 mL se centrifugaron los tubos a 1200 rpm por 5 minutos.
6. El sobrenadante es decantado.
7. En el kit de Anexina se indica el procesamiento para preparar una solución amortiguadora, para el posterior tratamiento a las células.
8. Mientras las células eran centrifugadas, las que quedaron adheridas en la placa fueron tripsinizadas con 60  $\mu$ L de tripsina 1x.
9. Las células con la tripsina se incubaron por 8 minutos.
10. Después de la incubarlas fueron lavadas con 300  $\mu$ L de PBS (frío) / 1% de suero fetal bovino.
11. El PBS del paso anterior fue colectado en los tubos de ensaye del paso 5 y se agregaron 3300  $\mu$ L de PBS del paso 10 y se centrifugaron las células a 1200 rpm por cinco minutos.
12. Finalizado el tiempo del paso anterior, se decantó el sobrenadante y a las células se les agrego 1  $\mu$ L de yoduro de propidio y 2  $\mu$ L de Anexina y se incubaron por quince minutos en la oscuridad y en frío.
13. Por último las células fueron analizadas en el citometro de flujo.

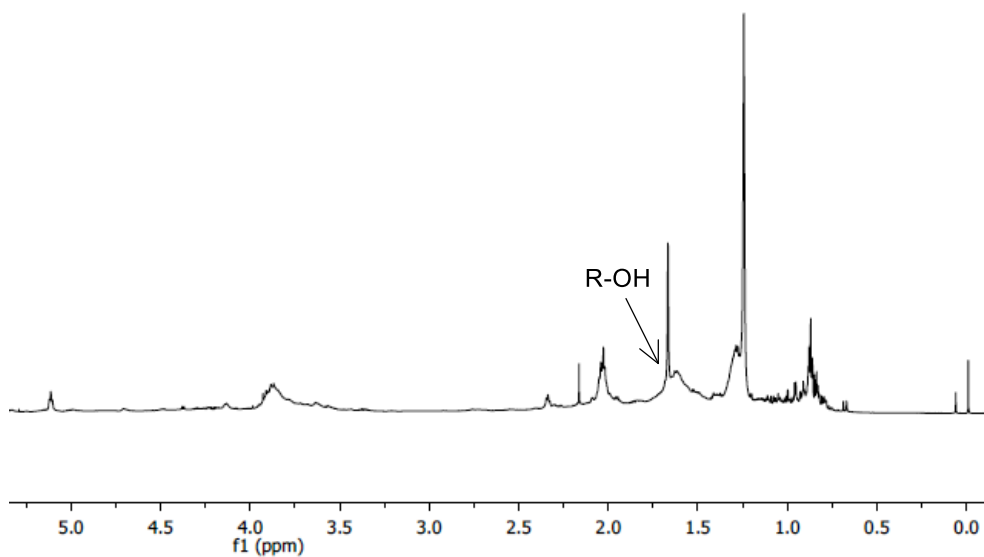
**Espectros de resonancia** de fracciones con nula o escasa actividad citotóxica en los ensayos biológicos. En el apartado de resultados se muestra la fracción dos y la cuatro. La primera con nula actividad y la segunda con <<mejor>> actividad en las diferentes líneas celulares utilizadas; y de la que se purificaron compuestos.



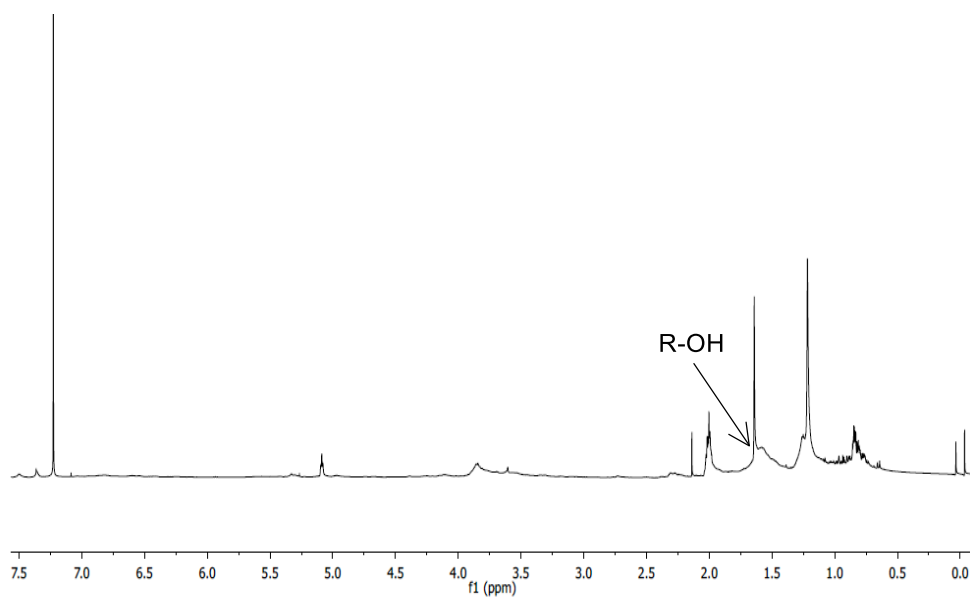
**Figura 38.** Espectro RMN-<sup>1</sup>H de la Fracción 1 (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz).



**Figura 39.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la Fracción 3 (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz).



**Figura 40.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la Fracción 5 (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz).



**Figura 41.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la Fracción 6 (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz).