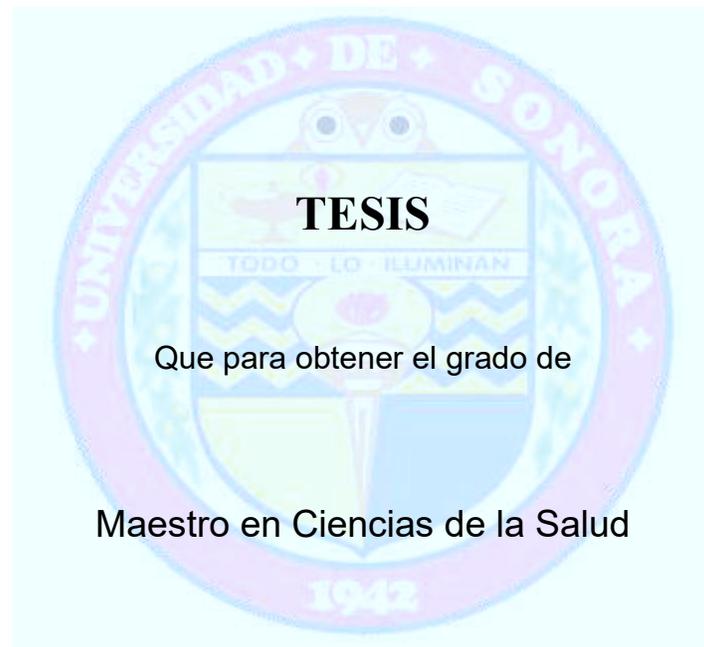


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Identificación de los Compuestos Responsables de la Actividad
Antiproliferativa de *Aloysia sonorensis*



Presenta

Sergio Daniel Morales Chávez

Hermosillo, Sonora

Septiembre, 2012

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Sergio Daniel Morales Chávez**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz

Director Académico



Dr. Ramon Enrique Robles Zepeda

Secretario



Dra. María Alba Guadalupe Corella Madueño

Vocal



Dra. Adriana Garibay Escobar

Suplente

AGRADECIMIENTOS

De la forma más sincera le agradezco a Dios, por ayudarme en los momentos más difíciles, por darme el conocimiento y la fuerza suficiente para superar todos los obstáculos que se me han atravesado en la vida.

A la Universidad de Sonora por darme la oportunidad de continuar con mis estudios en el programa de Maestría en Ciencias de la Salud, en donde pude obtener un conocimiento mas amplio y una mejor visión de mi carrera, así como también me dio la oportunidad de formar nuevos lazos de amistad con personas que seguramente serán parte importante en mi futuro.

Al Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz, quien siempre estuvo presente para ayudarme en cualquier situación, y que me brindó su apoyo y confianza para alcanzar las metas propuestas, muchas gracias maestro.

A mis sinodales, Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda, Dra. María Alba Guadalupe Corella Madueño y a la Dra. Adriana Garibay Escobar, quienes me ofrecieron consejos y me ayudaron para alcanzar una formación adecuada.

Al Ing. Jesús Sánchez Escalante quien nos ayudo con la identificación y colecta de la planta, así como al M.C. Enrique Wenceslao Coronado Aceves quien también nos apoyó durante la colecta.

A la Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo, quien me acepto en su laboratorio en la UNAM, durante mi estancia de investigación.

A mis amigos, Dra. Dora E. Valencia Rivera, M.C. Lilian A. Carrasco Cota, Q.B.C. Mario A. Leyva Peralta y Q.B.C Heriberto Torres Moreno, quienes fueron un gran apoyo durante el trabajo experimental en el laboratorio, y con los cuales compartí grandes experiencias.

DEDICATORIAS

Este trabajo va dedicado a quienes sin su apoyo, confianza y paciencia, no se hubiera podido realizar, Mis Padres.

A mi mamá, quien siempre ha estado a mi lado en todo momento y me ha brindado grandes consejos en tiempos difíciles, los cuales me han ayudado ser la persona que soy ahora, muchas gracias madre mía por darme la sabiduría para continuar avanzando.

A mi papá, quien siempre me mostró que hay que dar la cara a todas las adversidades y nunca retractarse de lo que uno cree, gracias padre mío por enseñarme lo que es el coraje.

A toda mi familia, quienes siempre me dieron ánimos y me apoyaron a continuar por este camino y nunca abandonarlo.

A mis suegros, quienes han estado ahí extendiéndome su mano cuando necesito ayuda y apoyándome a todo momento.

Y de manera especial a mi novia Melissa, quien siempre ha estado a mi lado compartiendo todas mis experiencias, buenas y malas, que siempre me ha apoyado y me ha ayudado a superar cualquier dificultad y me ha dado ese empujoncito que necesito para avanzar. Muchas gracias mi princesa.

Esta tesis se realizó en los laboratorios de Investigación en Química y de Productos Naturales del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora, bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz y en una estancia en el Departamento de Química Analítica de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UNAM) con la Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo, con financiamiento del proyecto 83462 apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	x
OBJETIVOS.....	xi
General.....	xi
Particulares.....	xi
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Estadísticas del Cáncer.....	3
Características Generales de <i>Aloysia sonorensis</i>	4
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
Recolección y Procesamiento de la Planta.....	7
Obtención del Extracto Metanólico Crudo.....	7
Obtención de la Fracción Hexánica y Acetato de Etilo.....	7
Fraccionamiento por Cromatografía.....	8
Cromatografía en Capa Fina (TLC).....	8
Elucidación Estructural.....	9
Líneas Celulares.....	9
Evaluación de la Actividad Antiproliferativa.....	9
Análisis Estadístico.....	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
Extracción y Fraccionamiento.....	11
Perfil de Actividad de las Fracciones con Actividad Antiproliferativa.....	13
Evaluación de la Actividad Antiproliferativa Sobre la Línea Celular Cancerosa RAW.....	15

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa sobre la Línea Celular Cancerosa M12.A ^K .C3F6.....	25
Evaluación de la Actividad Antiproliferativa sobre la Línea Celular Cancerosa HeLa.....	30
Evaluación de la Actividad Antiproliferativa sobre la Línea Celular Normal L-929.....	35
Elucidación Estructural.....	42
CONCLUSIONES.....	55
Perspectivas.....	56
ANEXOS.....	57
REFERENCIAS.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Aloysia sonorensis</i> , perteneciente a la familia Verbenaceae.....	5
2	Perfil de actividad de las subfracciones de hexano sobre la línea celular M12.A ^k .C3F6	12
3	Perfil de actividad de las subfracciones de FH12, FH22 y acetato de etilo sobre la línea celular RAW.....	14
4	Perfil de actividad de las subfracciones de FH12, FH22 y acetato de etilo sobre la línea celular M12.A ^k .C3F6.....	16
5	Perfil de actividad de las subfracciones de FH12, FH22 y acetato de etilo sobre la línea celular HeLa.....	17
6	Efecto de las fracciones de hexano sobre la línea celular RAW.....	20
7	Actividad antiproliferativa de las subfracciones de FH22, FH12 y acetato de etilo sobre la línea celular RAW.....	22
8	Efecto de las subfracciones de FH12, FH22 y acetato de etilo sobre la línea celular RAW.....	23
9	Efecto de las fracciones de hexano sobre la línea celular M12.A ^k .C3F6.....	27
10	Actividad antiproliferativa de las subfracciones de FH22, FH12 y acetato de etilo sobre la línea celular M12.A ^k .C3F6.....	28
11	Efecto de las subfracciones de FH12, FH22 y acetato de etilo sobre la línea celular M12.A ^k .C3F6.....	29
12	Efecto de las fracciones de hexano sobre la línea celular HeLa.....	32

13	Actividad antiproliferativa de las subfracciones de FH22, FH12 y acetato de etilo sobre la línea celular HeLa.....	33
14	Efecto de las subfracciones de FH12, FH22 y acetato de etilo sobre la línea celular HeLa.....	34
15	Efecto de las fracciones de hexano sobre la línea celular normal L-929.....	37
16	Actividad antiproliferativa de las subfracciones de FH22, FH12 y acetato de etilo sobre la línea celular normal L-929.....	39
17	Efecto de las subfracciones de FH12, FH22 y acetato de etilo sobre la línea celular L-929.....	40
18	Espectro de RMN de ^1H de FAc-03 en CDCl_3	44
19	Espectros de RMN de ^{13}C de FAc-03 en CDCl_3	46
20	Espectro de correlación heteronuclear cuántica simple (HSQC) de FAc-03 en CDCl_3	47
21	Espectro de correlación homonuclear (COSY) de FAc-03 en CDCl_3	49
22	Espectro de masas de FAc-03.....	50
23	Estructura propuesta del compuesto principal de FAc-03.....	51
24	Estructura de piperitenona.....	52
25	Espectro de RMN de ^1H de FH12-5 en CDCl_3	54

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
I	Actividad antiproliferativa (IC_{50}) de las fracciones de hexano.....	18

OBJETIVOS

General

Identificar los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa de *Aloysia sonorensis*.

Particulares

- Obtener la fracción hexánica y acetato de etilo de *Aloysia sonorensis* y validar la actividad antiproliferativa sobre la línea celular M12.A^k.C3F6.
- Fraccionar por cromatografía en columna las fracciones de *Aloysia sonorensis* y evaluar la actividad antiproliferativa de las subfracciones.
- Separar los compuestos presentes en las subfracciones activas por medio de técnicas cromatográficas.
- Determinar la estructura de los compuestos activos por medio de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.

RESUMEN

En la actualidad el cáncer se sitúa como una de las principales enfermedades a nivel mundial causando miles de muertes cada año. El número de defunciones por esta enfermedad se ha incrementado con respecto a otros años, causando una alarma a nivel mundial e incrementado el interés por encontrar nuevas fuentes para la elaboración de fármacos anticancerígenos que ayuden a frenar esta enfermedad. Históricamente, las plantas han sido la principal fuente para el descubrimiento de nuevos compuestos con capacidad anticancerígena. *Aloysia sonorensis* es una planta perteneciente a la familia Verbenaceae, que se encuentra en el Estado de Sonora y que ha demostrado capacidad antiproliferativa. En el presente estudio se llevó a cabo la identificación de los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa de *Aloysia sonorensis*. A través de un fraccionamiento biodirigido de las fracciones de hexano y acetato de etilo de *A. sonorensis* se obtuvieron tres fracciones principales con una actividad antiproliferativa importante: FH12-4, FH12-5 y FAc-1, de las cuales FH12-4 demostró una actividad selectiva contra la línea celular RAW con una IC₅₀ de 6.91 µg/mL, la FH12-5 mostró la mayor actividad sobre las diferentes líneas celulares RAW, M12.A^k.C3F6 y HeLa con una IC₅₀ de 2.1, 5.4 y 6.6 µg/mL respectivamente, y en esta fracción se identificaron de manera presuntiva la presencia de los compuestos 1,8 cineol y citral. Por último la FAc-1 presentó una importante actividad sobre las líneas RAW, M12.A^k.C3F6 con una IC₅₀ de 9.4, 8.9 µg/mL, respectivamente. Dentro de las fracciones de acetato de etilo se identificó la piperitenona, un compuesto monoterpeno que no a sido reportado dentro del género *Aloysia*. Estos resultados indican que los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa de *Aloysia sonorensis* son del tipo terpeno y que pueden ser potenciales candidatos para la elaboración de fármacos anticancerígenos.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es uno de los padecimientos más importantes a nivel mundial y una de las principales causas de mortalidad en niños y adultos. Éste constituye un grupo de enfermedades crónico degenerativas provocadas por factores genéticos heredados o externos. Algunos de los principales factores externos que pueden llevar al desarrollo de cáncer son el consumo de tabaco, la obesidad, el consumo de alcohol, la presencia de enfermedades de transmisión sexual como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus del papiloma humano (VPH) (INEGI, 2011).

El cáncer se define como un proceso descontrolado en el crecimiento y diseminación de células que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo, pudiendo invadir el tejido circundante y provocar metástasis en puntos distantes del lugar de origen (OMS, 2000). Las células cancerosas presentan mutaciones que inducen inestabilidad genómica, y por lo tanto, aceleran la tasa de mutaciones del genoma. Algunas de estas mutaciones afectan a genes que codifican para componentes de los mecanismos de control del ciclo celular, así como la fidelidad e integridad de los sistemas de replicación y reparación del ADN (Quezada, 2007; Peralta y col., 1997).

Estas características convierten al cáncer en un padecimiento muy agresivo y mortal si no se detecta en sus etapas tempranas y se tiene un tratamiento adecuado. Los medicamentos utilizados y las terapias de radiación no son cien por ciento efectivos, representan un alto costo económico y producen diversos efectos secundarios que dañan al paciente tanto física como emocionalmente. Por esta razón, es necesaria la búsqueda constante de métodos alternativos que no produzcan estos efectos secundarios (Acosta, 2004).

En los últimos años, los productos naturales han jugado un papel muy importante en el descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas, las cuales son utilizadas en una gran diversidad de enfermedades como infecciones

bacterianas y fúngicas, diabetes, dislipidemia, enfermedades genéticas y cáncer (Abhishek y col, 2011).

Las plantas son una atractiva fuente para el descubriendo de nuevos candidatos terapéuticos debido a que contienen compuestos con una gran diversidad química, los cuales pueden ser potenciales agentes anti-tumorales y anticancerígenos, como la vinblastina y la vincristina, compuestos de tipo alcaloide. En la actualidad alrededor del 60% de los fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer tienen un origen natural (Abhishek y col, 2011).

En Sonora, se encuentran una gran variedad de especies de plantas que son utilizadas en la medicina herbolaria debido a sus propiedades curativas. Dentro de estas especies encontramos a *Aloysia sonorensis*, también llamada "Mariola", en la que recientemente se encontró que contiene compuestos anticancerígenos los cuales podrían ser candidatos para la obtención de nuevos fármacos. En el presente estudio, se llevó a cabo la identificación de los compuestos anticancerígenos de *Aloysia sonorensis*, a través de ensayos biodirigidos.

ANTECEDENTES

Estadísticas del Cáncer

En el año 2008 la Organización Mundial de la Salud (OMS) registró 7.6 millones de muertes por causa de algún tipo de cáncer representado el 13% de las defunciones a nivel mundial. Estas defunciones se debieron principalmente al cáncer de pulmón (primer lugar entre los hombres), estómago, hígado, colon y mama (primer lugar entre las mujeres). De acuerdo con la estimación de la OMS se prevé un aumento de 11.5 millones de muertes para el 2030 (INEGI, 2010).

En México, en el 2008 se registraron un total de 539,535 muertes de las cuales el 52,702 fueron causadas por algún tipo de cáncer y en el 2009 y 2010 se registraron 53,376 y 54,522 muertes respectivamente, indicando un aumento del número de muertes por cáncer considerando años anteriores al 2008 (INEGI, 2011; Sinais, 2012). Entre los principales tipos de cáncer en México que afectan a las mujeres están el cáncer de mama con un 13.4% de los casos seguido por el cáncer de cuello de útero (11.2%) y el cáncer de hígado (7.5%), y para el hombre el principal es el cáncer de próstata con 14.8% de los casos seguido por el cáncer de pulmón (12.8%) y por el cáncer de estómago (8.5%). En general, este padecimiento representa la tercera causa de muerte en mujeres y la cuarta en hombres (INEGI, 2011).

Estas cifras son realmente alarmantes y continúan en un aumento constante, por tal motivo es necesaria la búsqueda de nuevos fármacos que ayuden a detener el avance de esta enfermedad. La utilización de plantas en los tratamientos contra el cáncer ha sido ampliamente aceptada dentro de la población en general y actualmente el 79% de la población mundial recurre a estas prácticas tradicionales. Gracias a esto, las plantas se han considerado a través de la historia como una fuente potencial de antineoplásicos (Arrebola, 2003).

Características Generales de *Aloysia sonorensis*

El Estado de Sonora posee una de las floras más abundantes del noroeste de México, lo cual hace más probable encontrar plantas que posean una actividad biológica. En diversas regiones del Estado, se han encontrado distintas especies de plantas con actividad antiproliferativa, entre éstas, *Aloysia sonorensis* (familia Verbenaceae) (Morales, 2010).

Aloysia sonorensis, es un arbusto denso, con hojas opuestas y en racimos, un tallo gris, con frutos de 1 a 2 cm de largo y flores amarillas, se le encuentra en cualquier temporada del año (fig. 1). Las especies del género de *Aloysia* son utilizadas popularmente como tratamiento para el resfriado, la fiebre, los dolores de estómago y como sedante ligero (Yetman y Devender, 2002).

Los estudios de este género han sido pocos, sin embargo, se han podido identificar los grupos de compuestos que prevalecen en las distintas especies de *Aloysia*, entre los que se encuentran monoterpenos monocíclicos y dicíclicos, diterpenos kaurenos, sesquiterpenos, compuestos polifenólicos como flavonoides y feniletanoides (Da Silva y col., 2006; De Oliveira y col., 2005).

Los estudios que se han realizado sobre el género de *Aloysia* han determinado que diversas especies del mismo, poseen distintas actividades biológicas como antígenotóxicas, antibacteriales, antifúngicas, antioxidantes y antiproliferativas.

Zamorano y col. (2006), demostraron el efecto antígenotóxico de *Aloysia triphylla* contra el daño al DNA inducido por acrilamida. Observaron que en ratones pre-tratados con una infusión de *A. triphylla* se reduce significativamente la capacidad de la acrilamida de producir daños genéticos. Además, en el plasma de los ratones tratados con la infusión se encontró una alta concentración de antioxidantes, lo que sugirió una acción quimio protectora (Zamorano y col., 2006).

A)



B)



Figura 1. *Aloysia sonorensis*, perteneciente a la familia Verbenaceae. (A) Espécimen del herbario de la Universidad de Sonora. (B) Arbusto silvestre, (DICTUS).

Por otro lado, Ibarrola y col. (2005), observaron los efectos ansiolíticos de *Aloysia polystachya* en ratones, describiéndolos como efectos tranquilizantes parecidos a los fármacos ansiolíticos. Sin embargo, esta especie no induce efectos anestésicos (Ibarrola y col., 2005).

En otro estudio, Oliva y col. (2007), evaluaron la citotoxicidad de algunos aceites esenciales de las especies *Aloysia polystachia* y *Aloysia triphylla*, sobre larvas de *Artemia salina*. Sus resultados demostraron que ninguna de estas especies son citotóxicas, mostrando una LC₅₀ de 6450 µg/mL para *A. polystachia* y una LC₅₀ de 1,250 µg/mL para *A. triphylla* (Oliva y col., 2007).

Hister y col. (2009), estudiaron el efecto antiproliferativo de la infusión y de los aceites esenciales de las hojas de *Aloysia gratissima* sobre células de *Allium cepa*. Los resultados mostraron una inhibición del ciclo celular, por lo que sugieren su uso potencial para la búsqueda de compuestos antimetabólicos (Hister y col., 2009).

En el 2010, se analizó la actividad antibacteriana y antiedematogénica de *Aloysia gratissima* y *Aloysia virgata*. Se encontró que la fracción clorofórmica obtenida a partir del extracto etanólico de *A. virgata*, tiene actividad sobre *E. coli* y *S. aureus*. Al evaluar la actividad antiedematogénica, determinaron que el extracto etanólico y la fracción metanólica de ambas plantas, tenían la capacidad de reducir un edema producido por un agente irritante hasta en un 25% (Vandresen y col., 2010).

Recientemente, se determinó que los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa del extracto metanólico crudo de *A. sonorensis* se encuentran en sus fracciones menos polares, fracción hexánica y acetato de etilo (Morales, 2010; Morales 2011). Por lo anterior, es de gran interés identificar y caracterizar los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa presentes en las fracciones menos polares del extracto metanólico de *Aloysia sonorensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y Procesamiento de la Planta

Se recolectó la planta de *Aloysia sonorensis* en el ejido Francisco Villa en el municipio de Guaymas, Sonora, con las coordenadas: N 28°, 06.9331 W 111° 04.3621. La autenticación de la planta se realizó por el Ing. Jesús Sánchez Escalante, taxónomo de la Universidad de Sonora, con el número de colecta 04-018 y almacenada sin número de catálogo en el herbario de la Universidad de Sonora.

Obtención del Extracto Metanólico Crudo

La planta colectada se dejó secar a temperatura ambiente durante un periodo de 15 días y posteriormente se pulverizó. La planta molida se colocó en un recipiente de vidrio y se le adicionó metanol como disolvente, en relación 1:10 (peso/volumen) y se mantuvo por 10 días con agitación periódica. Posteriormente, se realizó la filtración de la planta utilizando papel filtro Whatman. El líquido obtenido se concentró hasta sequedad en un rotavapor a presión reducida (-30 a -40 KPa), a temperatura constante de 48 °C y con una rotación de 80-85 rpm, obteniendo de esta manera el extracto metanólico crudo (Morales, 2010).

Obtención de la Fracción Hexánica y Acetato de Etilo

El fraccionamiento se inició con la adición de hexano al extracto metanólico en relación 1:40 (p:v). Se dejó en agitación constante durante 24 h, después de este periodo se dejó reposar la mezcla por 2 h. La parte no disuelta se separó por decantación y el líquido se filtró con papel Whatman 4. Este proceso se repitió hasta que el disolvente se observó incoloro. Posteriormente, se agregó el solvente acetato de etilo y se repitió el mismo proceso. Las soluciones se

concentraron en un evaporador rotatorio en las condiciones antes mencionadas (Morales, 2011).

Fraccionamiento por Cromatografía

El fraccionamiento de la fracción de hexano se realizó mediante cromatografía en columna gravitacional con sílica gel de 200-400 mesh en una columna de 30 cm de alto y 5 cm de ancho en la cual se agregó 4 g de muestra (proporción 1:30, muestra:sílica). A ésta se le realizó un barrido utilizando los sistemas: hexano al 100%, hexano:acetato de etilo en distintas proporciones (95:5, 9:1, 7:3, 1:1), acetato de etilo al 100%, acetato de etilo:metanol en distintas proporciones (95:5, 9:1, 7:3, 1:1), finalizando con metanol al 100%, el cambio de fase móvil se monitorizó por TLC. Las eluciones se colectaron en volúmenes de 250 mL (anexo 1)

Para el fraccionamiento de las muestras FH12, FH22 y acetato de etilo se realizó la cromatografía en columna a baja presión utilizando sílica gel de 230 – 400 mesh en una columna de 24 cm de alto por 1.1 cm de ancho para FH12 y otra de 21 cm de alto por 2 cm de ancho para FH22 y la fracción de acetato de etilo. Se utilizaron los sistemas hexano/acetato de etilo en distintas proporciones (9:1, 7:3, 1:1), acetato de etilo 100% y metanol 100%, el cambio de fase móvil se monitorizó por TLC. Las eluciones se colectaron en volúmenes de 15 mL (anexo 2 y 3)

Las muestras agregadas se mantuvieron por debajo del 3% de la columna para evitar la saturación.

Cromatografía en Capa Fina (TLC)

Se utilizaron cromatofolios de sílica gel 60 (0.20 mm) F254 (Alltech) con 6 cm de altura y 4 cm de ancho, la fase móvil dependió del sistema que se estaba corriendo en la columna cromatográfica. La revelación de los TLC se llevó a

cabo mediante una lámpara de UV (Spectroline CM-10) con una longitud de onda corta (254 nm) y larga (365 nm).

Elucidación Estructural

La elucidación de los compuestos obtenidos de las sub-fracciones se realizó por resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C en una y dos dimensiones, utilizando un espectrómetro Bruker modelo Avance 400 (Departamento de polímeros de la Universidad de Sonora) y Avance DPX (Departamento de química analítica de la Universidad Autónoma de Nuevo León) que operan a 400 MHz, como referencia interna se utilizó tetrametilsilano y como disolvente cloroformo deuterado.

Líneas Celulares

Se utilizaron las líneas celulares cancerosas, M12.A^k.C3F6 (linfoma de células B murino) y RAW (macrófagos transformados por el virus de la leucemia de Abelson) donadas por el Dr. Emil R. Unanue (Departamento de patología e inmunología de la Universidad de Washington, St. Louis, Mo, USA); HeLa (carcinoma cervical humano) y la línea celular normal L-929 (tejido subcutáneo normal de ratón) las cuales proporcionadas por el Dr. Carlos Velásquez Contreras (Laboratorio de inmunología de la Universidad de Sonora). Los cultivos se mantuvieron en Medio Eagle Modificado de Dulbeco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 5% y en una incubadora Isoterm (Fischer Scientific, USA) a 37 °C, 5% de CO₂ y con una humedad relativa de 80-90%.

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa

Para evaluar el efecto antiproliferativo se realizaron ensayos de viabilidad celular, utilizando el método del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-

difenil tetrazolio (MTT) (Mosmann, 1983). Iniciando con un cultivo en fase de crecimiento logarítmico, se obtuvo una suspensión celular de 200,000 células/mL. Posteriormente, se colocaron 50 μ L (10,000 células/pozo) de la suspensión celular en una placa de 96 pozos de fondo plano y se incubó por un periodo de 24 h para su adherencia. Después, se les adicionó el estímulo a evaluar a diferentes concentraciones y se utilizó dimetil sulfóxido (DMSO) como control de solvente. La placa se incubó por un periodo de 48 h. Durante ese periodo se observó el efecto del estímulo sobre la morfología celular mediante un microscopio invertido (Nikon, eclipse). Transcurridas las 48 h, se añadieron 10 μ L de MTT a cada pozo y se incubó por un periodo de 4 h. Posteriormente, se agregaron 100 μ L de isopropanol ácido y se dejó reposar por diez minutos. Finalmente, se leyó la absorbancia de la solución a 570 nm y 655 nm en un lector de ELISA.

Análisis Estadístico

Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos de cada una de las muestras utilizando la prueba de Tukey de comparación de promedios, con un nivel de significancia de 0.05 en el programa estadístico SPSS 18.

La determinación de la IC_{50} se realizó con el programa Microsoft Excel 2010.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción y Fraccionamiento

A partir de 1.5 kg de planta se realizó la extracción con metanol de los compuestos presentes en *A. sonorensis*. Una vez procesada la muestra se obtuvieron 96 g de un material con consistencia resinosa de color verde-oscuro (extracto metanólico), una vez seco el extracto se sometió al fraccionamiento sólido-líquido con los solventes de hexano y acetato de etilo, obteniendo 7.8 g de un material ceroso de color verde y 2.0 g de una resina de color café-verdoso, respectivamente.

Las fracciones de hexano y acetato de etilo mostraron una actividad antiproliferativa similar a lo reportado anteriormente sobre la línea celular M12.A^k.C3F6 (Morales, 2011)

La fracción hexánica (FH) se sometió a una cromatografía en columna gravitacional, de donde se obtuvieron 27 fracciones diferentes. De éstas se seleccionaron dos fracciones para la separación de sus compuestos por cromatografía en columna de sílica a baja presión, la FH12 y FH22. Estas dos fracciones se seleccionaron debido a su actividad antiproliferativa (fig. 2) y a su diferente naturaleza; donde la FH12 es una fracción de baja polaridad y la FH22 de alta polaridad. Estas propiedades nos indican que ambas fracciones pueden contener compuestos diferentes con importante actividad biológica.

Primeramente se llevó a cabo el fraccionamiento de FH22 y se obtuvieron 10 fracciones diferentes, y de la fracción FH12 se obtuvieron 8 fracciones.

La fracción acetato de etilo se sometió a un tratamiento con carbón activado para eliminar las clorofilas. A partir de la muestra sin clorofilas, se fraccionaron 200 mg en columna de sílica gel (dimensiones: 24 x 1.1 cm) a baja presión y se obtuvieron 6 subfracciones.

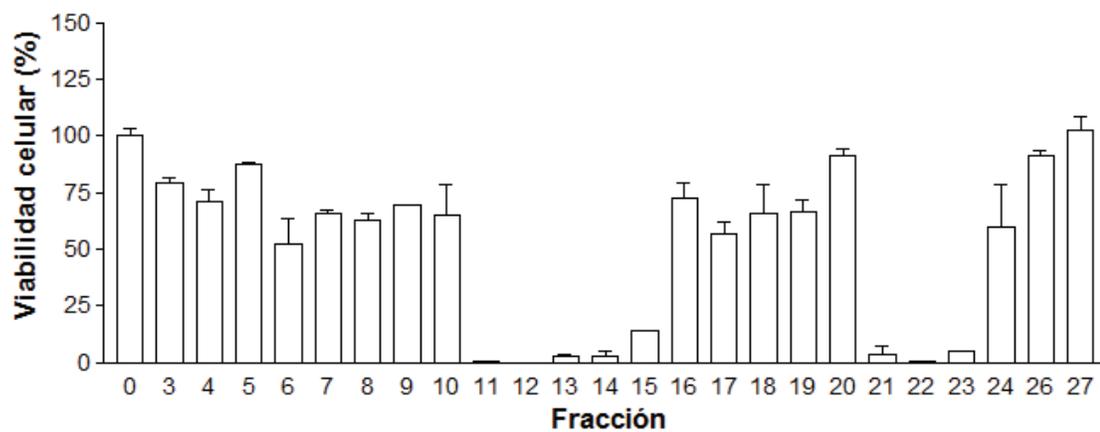


Figura 2. Perfil de actividad de las fracciones de hexano sobre la línea celular M12.A^k.C3F6. La concentración de cada una de las fracciones fue de 12.5 µg/mL. En el eje de las X se indican las fracciones y siendo 0 el control de DMSO, en el eje de las Y el porcentaje de viabilidad celular.

El tratamiento con carbón es utilizado ampliamente para la retención o separación de ciertos compuestos o iones y se basa en la interacción del carbón activado con aquellos compuestos que mantiene una determinada carga eléctrica que hace que sean adsorbidos por las moléculas de carbón.

Una vez aislados los compuestos de las diferentes fracciones de hexano y acetato de etilo, se llevó a cabo el análisis del perfil de actividad de cada uno de esos compuestos así como su evaluación sobre las diferentes líneas celulares, las cuales se mostrarán más adelante.

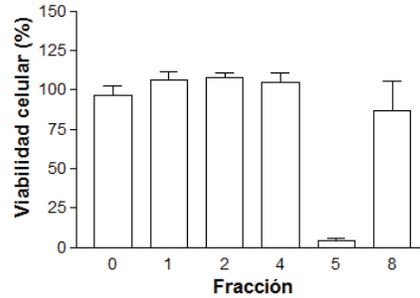
Perfil de Actividad de las Fracciones con Actividad Antiproliferativa

Las 27 fracciones obtenidas de la fracción hexánica se evaluaron sobre la línea celular M12.A^k.C3F6, a una concentración de 12.5 µg/mL, para determinar las fracciones activas, ya que prácticamente todas las fracciones mostraron actividades a las concentraciones de 50 y 100 µg/mL (datos no mostrados). Los resultados del perfil de actividad antiproliferativa indicaron que las fracciones FH11, FH12, FH13, FH14, FH21 y FH22, fueron las más activas (fig. 2).

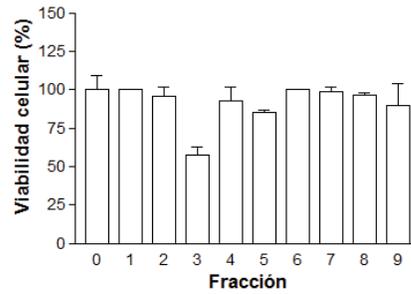
Las fracciones de FH12, FH22 y acetato de etilo se sometieron de igual modo a un perfil de actividad sobre las diferentes líneas celulares a evaluar y se tomaron en cuenta sólo aquellas que mostraron actividad a 12.5 µg/mL sobre cada línea celular en particular. De las 8 fracciones de la FH12, sólo se probaron las fracciones FH12-1, FH12-2, FH12-4, FH12-5 y FH12-8. Las otras fracciones no se probaron debido a la cantidad insuficiente de muestra para realizar una evaluación. De las 10 fracciones de FH22 sólo se probaron la fracción FH22-1 a la FH22-9, y de acetato de etilo se probaron las 6 fracciones, analizando de esta forma un total de 20 muestras distintas.

La primera línea celular para el análisis fue la M12.A^k.C3F6, en donde los resultados demostraron que las fracciones activas fueron para la FH12; la FH12-5 (fig. 3A), de la FH22; la FH22-3 (fig. 3B) y de las fracciones de acetato de etilo la FAc-1 (fig. 3C). En la línea celular RAW las fracciones activas fueron

A)



B)



C)

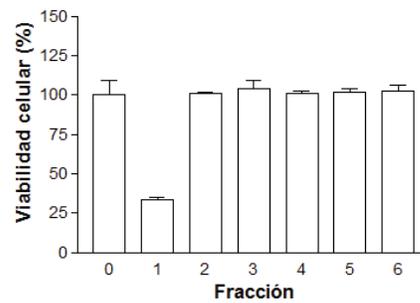


Figura 3. Perfil de actividad de las subfracciones de FH12, FH22 y acetato de etilo sobre la línea celular M12.A^k.C3F6. La concentración de cada una de las fracciones fue de 12.5 µg/mL. A) Fracciones de FH12; B) Fracciones de FH12; C) Fracciones de acetato de etilo. En el eje de las X se muestra enumerada cada una de las fracciones y marcado con 0 el control de DMSO. En el eje de las Y el porcentaje de viabilidad celular.

las fracciones FH12-4 y FH12-5 (fig. 4A) y FH22-3, FH22-4, FH22-5, FH22-6 y FH22-7 (fig. 4B) y de las fracciones de acetato de etilo sólo la FAc-1 fue la activa (fig. 4C). Por último se llevó a cabo el análisis sobre la línea celular HeLa, en donde las fracciones activas para la FH12 sólo fue la FH12-5 (fig. 5A); de la FH22, la FH22-4, FH22-5 y la FH22-7 (fig. 5B); de las fracciones de acetato de etilo ninguna salió activa para esta línea celular, sin embargo se sometió a evaluación la FAc-1 (fig. 5C), para observar el comportamiento entre concentraciones.

Este estudio nos permitió de manera rápida y precisa, identificar y seleccionar las muestras activas sobre cada línea celular y de esta forma se realizó un análisis más concreto y completo.

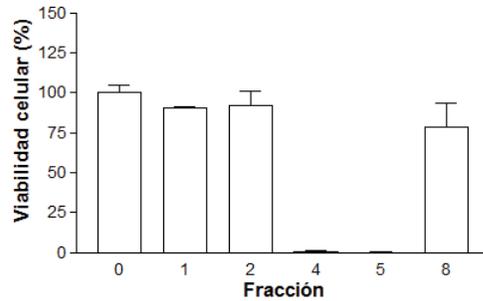
Los resultados reflejan las diferencias entre líneas celulares y cómo algunas son más sensibles que otras. En este estudio la línea celular RAW resultó afectada por 8 fracciones distintas, de éstas sólo algunas mostraron ser activas sobre las otras líneas celulares y en algunos casos en mayor grado.

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa Sobre la Línea Celular Cancerosa RAW

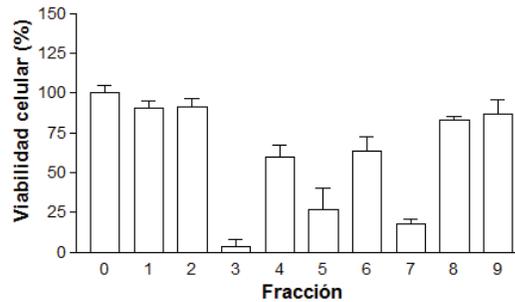
La evaluación de la actividad antiproliferativa se realizó primeramente sobre una línea celular cancerosa, RAW. Los resultados de la evaluación de la actividad antiproliferativa de las fracciones FH11, FH12, FH13, FH14 y FH21 mostraron que la fracción FH12 tiene la mayor actividad sobre esta línea celular con una IC_{50} de 2.84 $\mu\text{g/mL}$, y a la fracción FH22 con la menor actividad en esta línea con una $IC_{50} > 12.5 \mu\text{g/mL}$ (Tabla I).

El análisis estadístico sobre los valores de IC_{50} , muestra que las fracciones FH11 - FH13 y FH13 – FH14 son similares entre sí ($p > 0.05$) (Tabla I). Por otro lado, la actividad de las fracciones FH12, FH21 y FH22 son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) (Tabla I).

A)



B)



C)

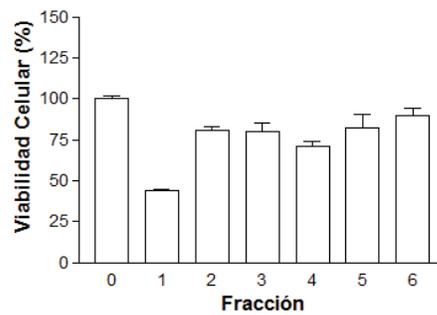
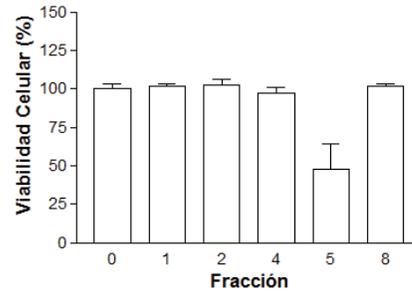
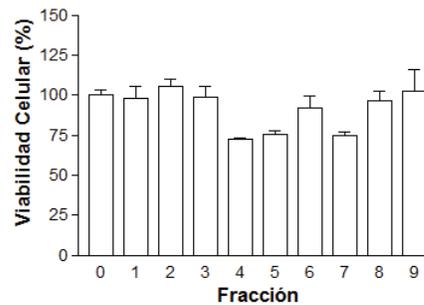


Figura 4. Perfil de actividad de las subfracciones FH12, FH22 y acetato de etilo sobre la línea celular RAW. La concentración de cada una de las fracciones fue de 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A) Fracciones de FH12; B) Fracciones de FH22; C) Fracciones de acetato de etilo. En el eje de las X se muestra enumerada cada una de las fracciones y marcado con 0 el control de DMSO. En el eje de las Y el porcentaje de viabilidad celular.

A)



B)



C)

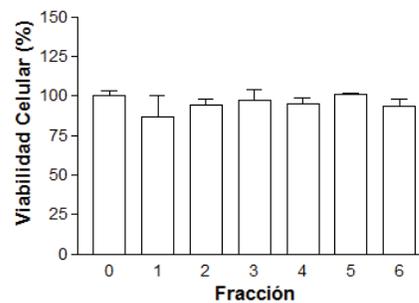


Figura 5. Perfil de actividad de las subfracciones de FH12, FH22 y acetato de etilo sobre la línea celular HeLa. La concentración de cada una de las fracciones fue de 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A) Fracciones de FH12; B) Fracciones de FH22; C) Fracciones de acetato de etilo. En el eje de las X se muestra enumerada cada una de las fracciones y marcado con 0 el control de DMSO. En el eje de las Y el porcentaje de viabilidad celular.

Tabla I. Actividad antiproliferativa (IC₅₀) de las fracciones de hexano.

Fracciones	Líneas Celulares			
	RAW	M12.A ^k .C3F6	HeLa	L - 929
F11	5.13 ± 0.53 ^a	5.44 ± 0.15 ^a	16.18 ± 3.37 ^a	12.69 ± 2.40 ^a
F12	2.84 ± 0.77	10.65 ± 0.33 ^b	12.12 ± 0.32 ^a	14.31 ± 3.27 ^a
F13	5.95 ± 0.27 ^a	7.26 ± 1.40 ^{a,b}	31.82 ± 6.07	33.34 ± 8.66
F14	6.76 ± 0.13 ^{a,b}	7.33 ± 0.46 ^{a,b}	18.73 ± 1.69 ^a	20.16 ± 5.71 ^{a,b}
F21	7.95 ± 0.65 ^b	7.60 ± 1.59 ^{a,b}	16.50 ± 3.79 ^a	22.79 ± 3.63 ^b
F22	14.10 ± 2.50	6.32 ± 0.85 ^a	13.87 ± 1.95 ^a	22.23 ± 1.48 ^b

Los valores de IC₅₀ se presentan en µg/mL ± SD. Los datos de cada línea celular con la misma letra son estadísticamente similares (p>0.05).

En las observaciones al microscopio encontramos que las diferentes fracciones inducen cambios morfológicos similares con un impacto dependiente de su concentración y actividad, el cual es más marcado a las 48 horas de la aplicación del estímulo. De forma general, los cambios producidos por estas fracciones en las primeras 24 horas son la formación de una gran cantidad de vesículas en las células, algunas de éstas muestran vesículas pequeñas como gránulos y otras presentan una vacuolización. Además, se pueden ver células que presentan ampollas de diferentes tamaños (células con la membrana hinchada y transparente como una burbuja de jabón) y algunas otras que se encuentran rodeadas de cuerpos apoptóticos. A las 48 h se presentan una cantidad mayor de células con las morfologías antes descritas, así como también restos de células que se encuentran aglomerados, o células con un tamaño reducido lleno de gránulos. También se encuentra una pequeña cantidad de detrito celular, que corresponden a restos de células muertas (fig. 6).

Los cambios anteriormente descritos, son características generales que se presentan en la apoptosis tales como la formación de vesículas y ampollas (Lizarbe, 2007). Sin embargo, estas características no son exclusivas de la apoptosis, sino que también pueden presentarse en la necrosis. Teniendo en cuenta sólo estas características sería imposible determinar cuál de los dos pudiera ser el mecanismo de acción. Se han descrito otras características que pueden ayudar a elucidar el mecanismo principal como lo son la formación de vacuolas en las células que son indicativos de necrosis (Kumar, Abbas, Fausto, 2005) y la presencia de cuerpos apoptóticos, la cual como su nombre lo indica son propios del proceso de apoptosis. En este caso se presentan ambas características, esto puede deberse a la variedad de compuestos que todavía contienen estas fracciones y algunas de éstas pueden estar induciendo una de las dos acciones, necrosis o apoptosis.

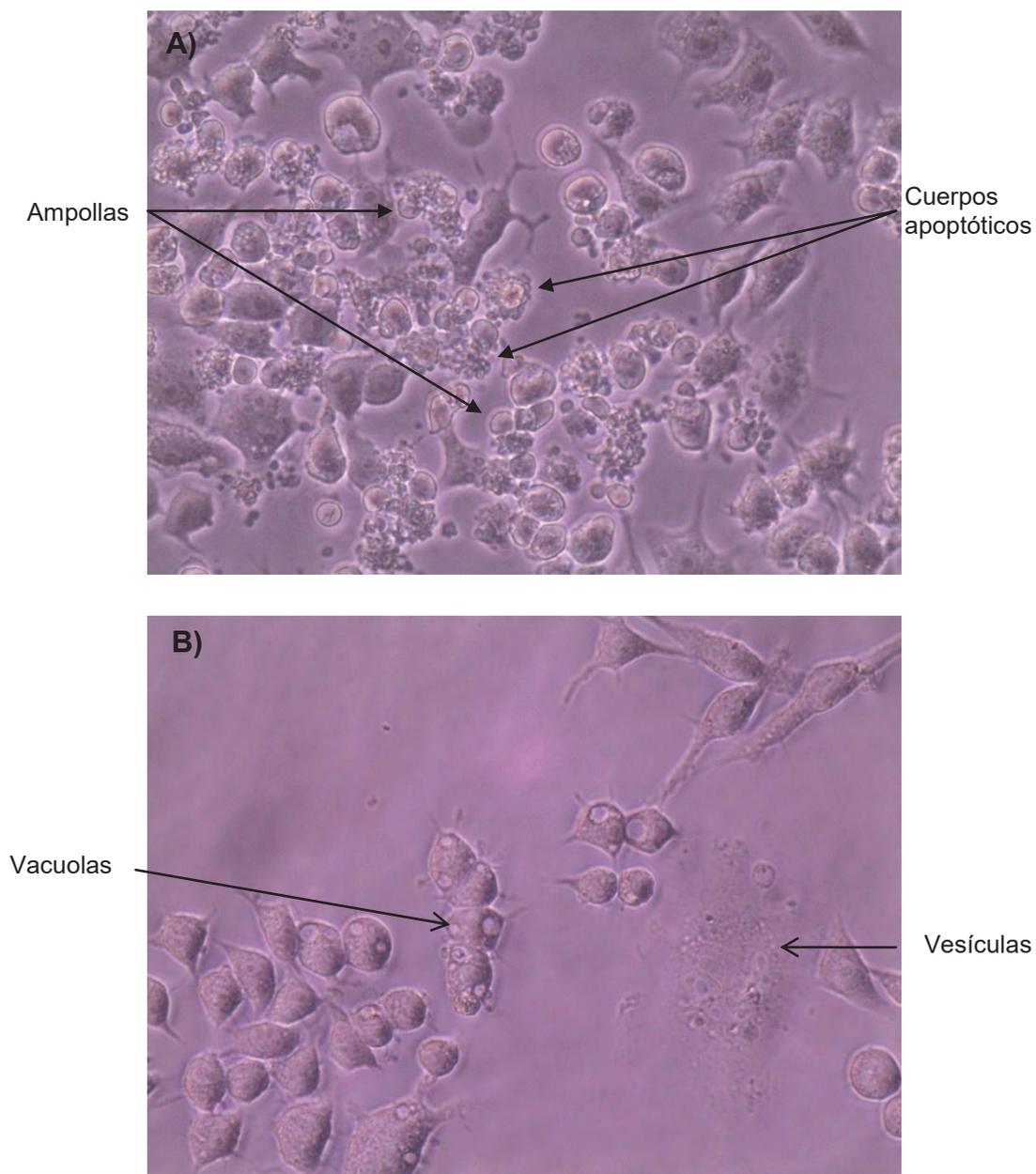


Figura 6. Efecto de las fracciones de hexano sobre la línea celular RAW. Las observaciones se llevaron a cabo a las 24 h, con un microscopio invertido y con un objetivo de 40x. A) Microfotografía de FH12 a 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; B) Microfotografía de FH21 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Se llevó a cabo la evaluación antiproliferativa del subfraccionamiento de FH12 y FH22 así como las de las fracciones de acetato de etilo. En la evaluación de las fracciones de FH22, las que mostraron una mayor actividad fueron la FH22-3 con una IC_{50} de 7.27 $\mu\text{g/mL}$, seguido de FH22-7 con una IC_{50} de 12.36 $\mu\text{g/mL}$ y la FH22-5 con una IC_{50} de 12.68 $\mu\text{g/mL}$, las otras fracciones mostraron una $IC_{50} > 12.5 \mu\text{g/mL}$ (fig. 7). De éstas, la FH22-3 destaca con la mayor actividad, en donde a 12.5 $\mu\text{g/mL}$, inhibe el 95% de la proliferación celular, mientras que las otras fracciones activas sólo inhiben el 50% (fig. 7)

El análisis estadístico indicó que las subfracciones FH22-3, FH22-5 y FH22-7, presentan una actividad estadísticamente significativa hasta la concentración de 6.25 $\mu\text{g/mL}$, en comparación al control de DMSO y la FH22-4 y FH22-6 hasta la concentración de 3.125 $\mu\text{g/mL}$ (fig. 7).

En las observaciones al microscopio a las 24 h, no resaltan características particulares para estas fracciones. Todas mostraron cambios similares, como la aparición de vesículas, vacuolización y cuerpos apoptóticos, principalmente, indicando la presencia de apoptosis y necrosis (fig. 8).

La evaluación de las subfracciones de FH12, muestran una mayor actividad, siendo la más activa la FH12-5 con una IC_{50} de 2.1 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la subfracción FH12-4 muestra una IC_{50} de 6.91 $\mu\text{g/mL}$ (fig. 7).

El análisis estadístico indica que las subfracciones de FH12 en todas sus concentraciones son diferentes estadísticamente al control de DMSO ($p < 0.05$) (fig. 7).

En las observaciones al microscopio a las 24 h estas subfracciones indujeron cambios similares a las subfracciones de la FH22, pero con mayor potencia. Sin embargo, las subfracciones FH12-5 y FH12-4 no mostraron señales de vacuolización pero si la presencia de ampollas, por lo que podría decirse que éstas contienen compuestos con un efecto inductor de apoptosis sobre esta línea celular (fig. 8).

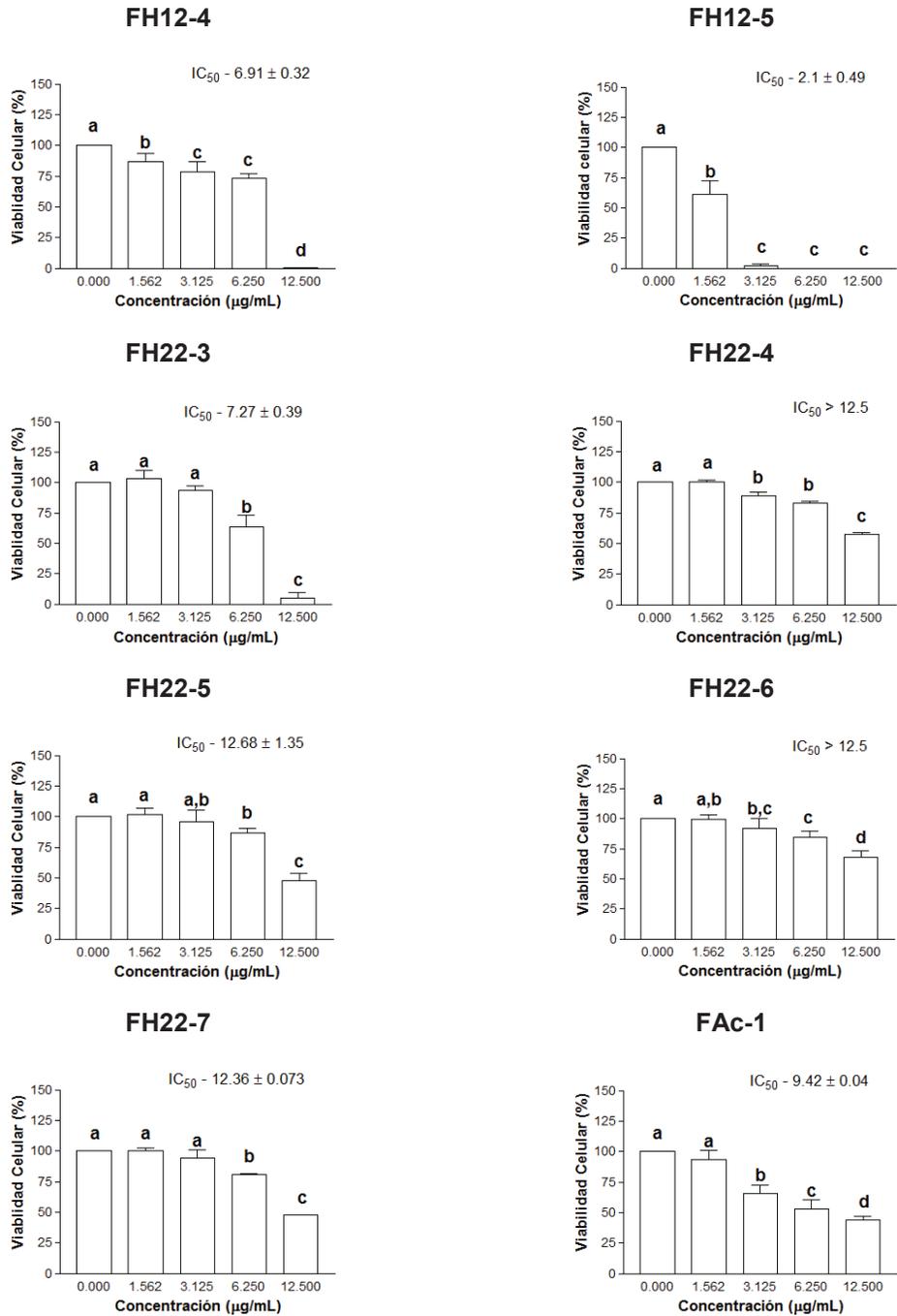


Figura 7. Actividad antiproliferativa de las subfracciones de FH22, FH12 y acetato de etilo sobre la línea celular RAW. En la parte superior derecha se muestra el valor de la IC_{50} de cada gráfica. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales ($p > 0.05$).

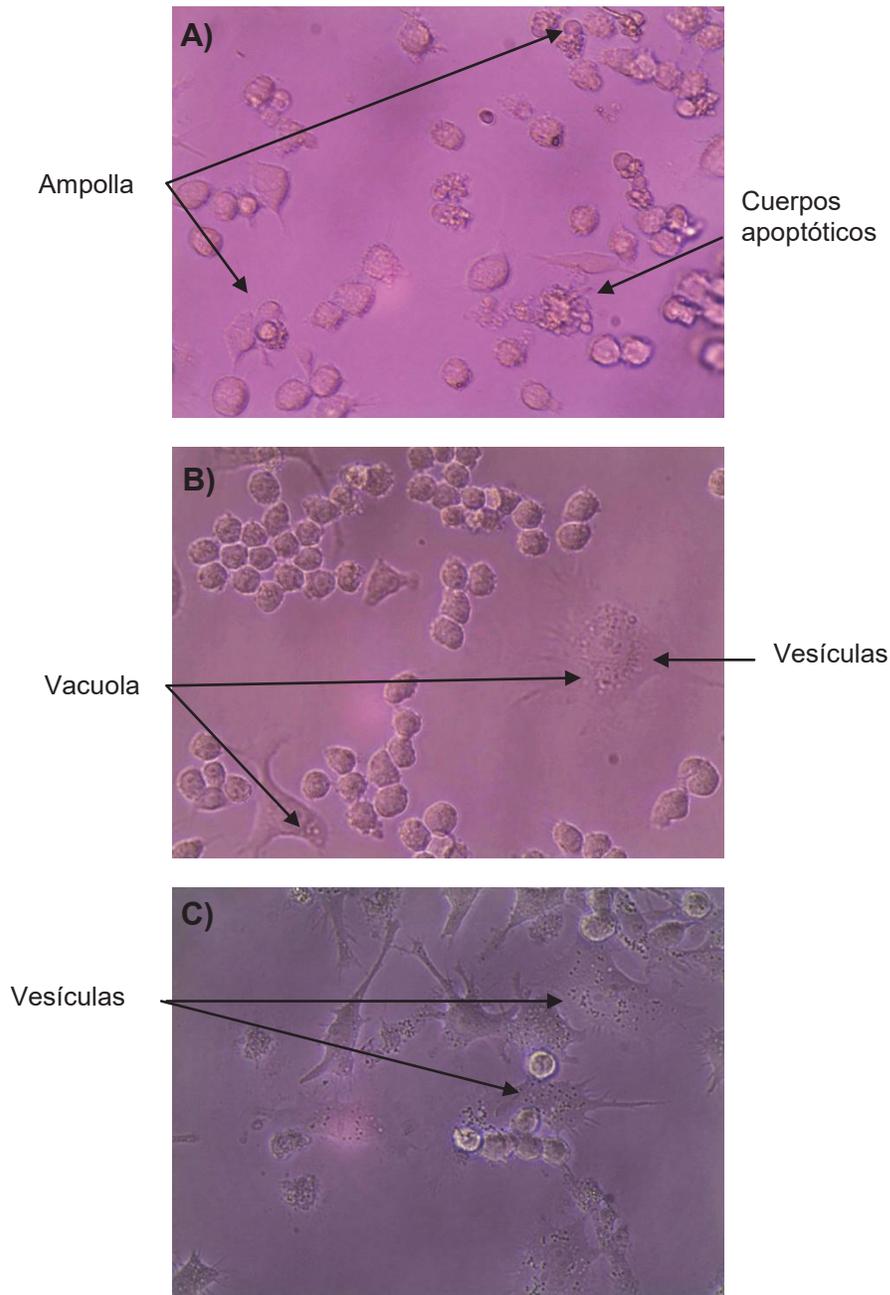


Figura 8. Efecto de las subfracciones de FH12, FH22 y acetato de etilo sobre la línea celular RAW. Las observaciones se realizaron a las 24 h, con un microscopio invertido y con un objetivo de 40x. A) Microfotografía de FH12-5 a 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; B) Microfotografía de FH22-7 a 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C) Microfotografía de FAc-1 a 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Por último, la fracción de acetato de etilo, la FAc-1, mostró tener la actividad más importante de estas fracciones. La FAc-1 mostró tener una gran actividad dosis-dependiente con una IC₅₀ de 9.42 µg/mL (fig. 7).

El análisis estadístico muestra que la actividad de FAc-1 es significativa hasta una concentración de 3.12 µg/mL, a partir de la concentración de 1.56 µg/mL no existe diferencia significativa con el control de DMSO ($p > 0.05$) (fig. 7).

En las observaciones al microscopio a las 24 h se encontró que FAc-1, indujo la formación de una gran cantidad de vesículas muy prominentes sobre todas las células ya sea adheridas o en suspensión, siendo ésta la principal característica que se presenta sobre esta línea celular (fig. 8). La formación de vesículas sólo es indicativo de un efecto sobre la célula, sin embargo, no proporciona la información suficiente para evidenciar un mecanismo de acción.

El efecto de los compuestos es más evidente en la línea celular RAW debido a su alta sensibilidad. En esta evaluación se demostró cuantas fracciones cuentan con una cierta actividad antiproliferativa. Sin embargo, en algunos casos no se presentó actividad dentro de las concentraciones utilizadas, pero es necesario resaltar que estas muestras continúan siendo mezclas de compuestos. La obtención de estos compuestos con un grado mayor de pureza podría proporcionar una actividad superior a la mostrada. Como en el caso de Nagao y col. (2002), quienes al evaluar la actividad antiproliferativa de *Lantana montevidensis*, una especie de la familia Verbenaceae, encontraron que a partir del extracto metanólico obtuvieron fracciones que presentaron actividades por debajo de 3 µg/mL contra la línea celular HeLa. En estas fracciones se identificaron como compuestos de tipo flavonas (Nagao y col. 2002).

Por otro lado, el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) en Estados Unidos indica que para que un compuesto sea considerado como candidato para la producción de fármacos anti-cáncer, es necesario que mantenga una IC₅₀ menor o igual a 4 µg/mL. La FH22-3, FH12-4 y FAc-1 presentaron una

excelente actividad sobre esta línea celular, pero la FH12-5 destaca como el candidato principal para la elaboración de fármacos con una IC_{50} por debajo de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre la línea celular RAW.

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa Sobre la Línea Celular Cancerosa M12.A^K.C3F6

Esta línea celular son células B que pertenecen a un linfoma de células B murino. La evaluación de la actividad antiproliferativa sobre esta línea celular se realizó de la misma forma como se planteó anteriormente, utilizando cuatro concentraciones, 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y utilizando como control DMSO.

Primeramente, se llevó a cabo la evaluación de las fracciones de hexano, en donde los resultados mostraron que la mayoría de las fracciones mantuvieron actividad a altas concentraciones. A una concentración de 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se inhibe alrededor del 100% de la proliferación celular, a excepción de la fracción FH12 que sólo inhibió el 62% de la proliferación celular. Sobre esta línea celular la FH11 fue la que destacó mostrando una IC_{50} de 5.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que la FH12 mostró tener la actividad más baja con una IC_{50} de 10.65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabla I).

En el análisis estadístico de los valores de IC_{50} , mostró que hay una cierta semejanza entre la FH11 y la FH22, y se mantienen como las más activas sobre esta línea celular. Sin embargo, la FH22 también muestra similitud estadística con las fracciones FH13, FH14, FH21 ($p > 0.05$) debido a la dispersión que mantienen (Tabla I).

En las observaciones al microscopio a las 24 h se encontró que las fracciones FH11, FH12, FH13 y FH14, indujeron cambios morfológicos similares sobre esta línea celular, así como la formación de vesículas y vacuolización, además de la formación de ampollas en las células. Se observaron también células destruidas y detrito celular en el medio. Por otra parte, las fracciones

FH21 y FH22, indujeron principalmente la presencia de vesículas pequeñas y menor grado vacuolización en la célula, así como también células en apoptosis en fase final con la presencia de cuerpos apoptóticos (fig. 9).

Estas observaciones muestran que las fracciones FH11, FH12, FH13 y FH14 promueven un efecto de necrosis mientras que las fracciones FH21 y FH22 de apoptosis, como se había presentado anteriormente. Aunque antes se había encontrado que FH11, FH12, FH13 y FH14 inducían un mecanismo apoptótico, no es de extrañarse que el efecto se presente de diferente forma en esta ocasión, ya que esta línea celular M12.A^k.C3F6 es completamente diferente a RAW y responden de diferente forma al contacto con un cierto estímulo.

En la evaluación de las subfracciones de FH12 y FH22 se encontró que la FH12-5 demostró ser la de mayor actividad con una IC₅₀ de 5.44 µg/mL, seguida de FAc-1 con una IC₅₀ de 8.93 µg/mL y por último la FH22-3 con una IC₅₀ de 12.55 µg/mL (fig. 10).

En el análisis estadístico se muestra que las tres subfracciones mantienen una actividad hasta la concentración de 1.56 µg/mL, con una diferencia estadísticamente significativa a la del control de DMSO (fig. 10).

En las observaciones al microscopio a las 24 h se encontró la presencia de células con ampollas, vesículas y detrito celular, para la FH12-5, además la formación de cuerpos apoptóticos y vacuolas. Para la FH22-3 y para la FAc-1 se encontró una gran cantidad de células con vacuolas predominantes, así como también la presencia de células destruidas, células con ampollas, cuerpos apoptóticos y una cierta cantidad de detrito celular, estas características para la FAc-1 indica una acción principal de necrosis y baja apoptosis (fig. 11).

Cabe mencionar que sólo la fracción FH12-5 fue más activa. De forma contraria la FH22-3 mantuvo una baja actividad a 12.5 µg/mL. Sin embargo, en las concentraciones más bajas mostró una actividad igual o mayor a la del FH22.

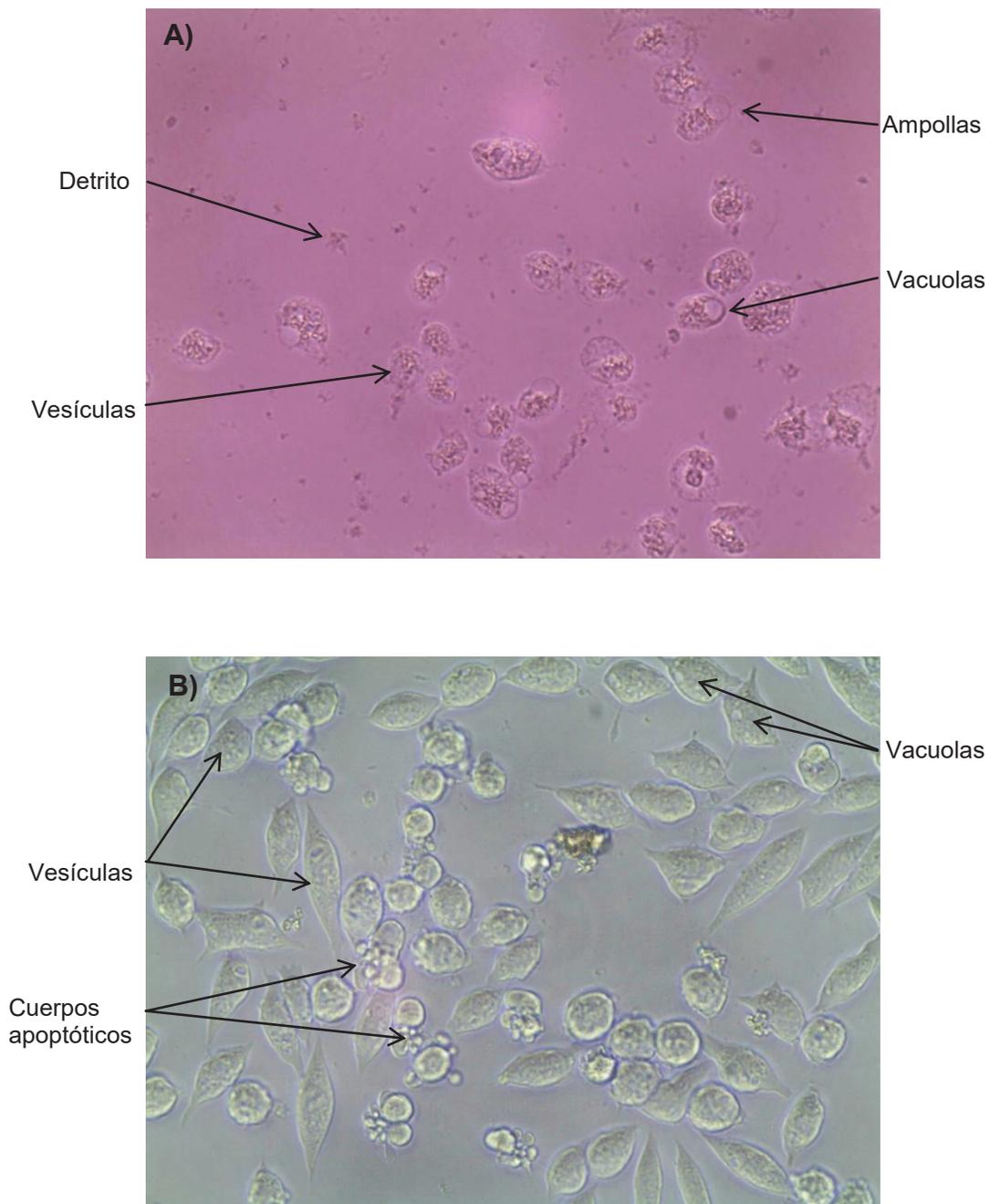


Figura 9. Efecto de las fracciones de hexano sobre la línea celular M12.A^k.C3F6. Las observaciones se realizaron a las 24 h con un microscopio invertido y con un objetivo de 40x. A) Microfotografía de FH11 a 12.5 µg/mL; B) Microfotografía de FH22 12.5 µg/mL.

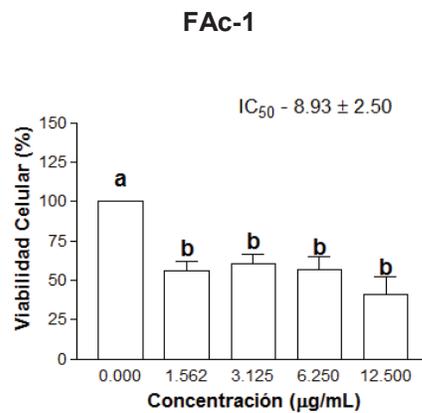
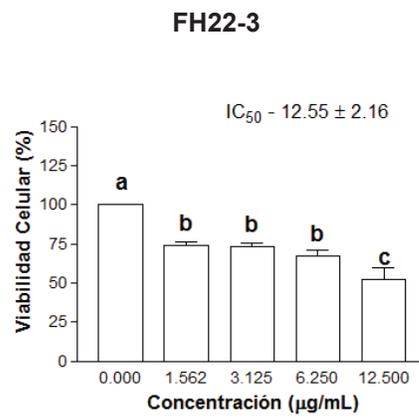
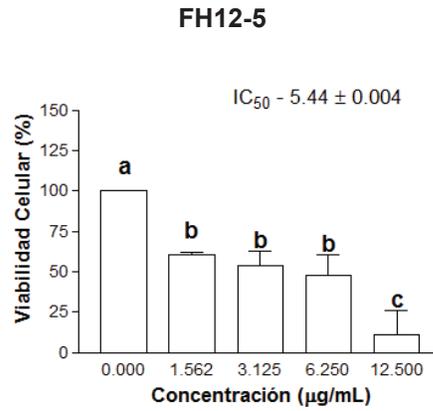


Figura 10. Actividad antiproliferativa de las subfracciones de FH22, FH12 y acetato de etilo sobre la línea celular M12.A^K.C3F6. En la parte superior izquierda se muestra el valor de la IC_{50} de cada gráfica. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales ($p > 0.05$).

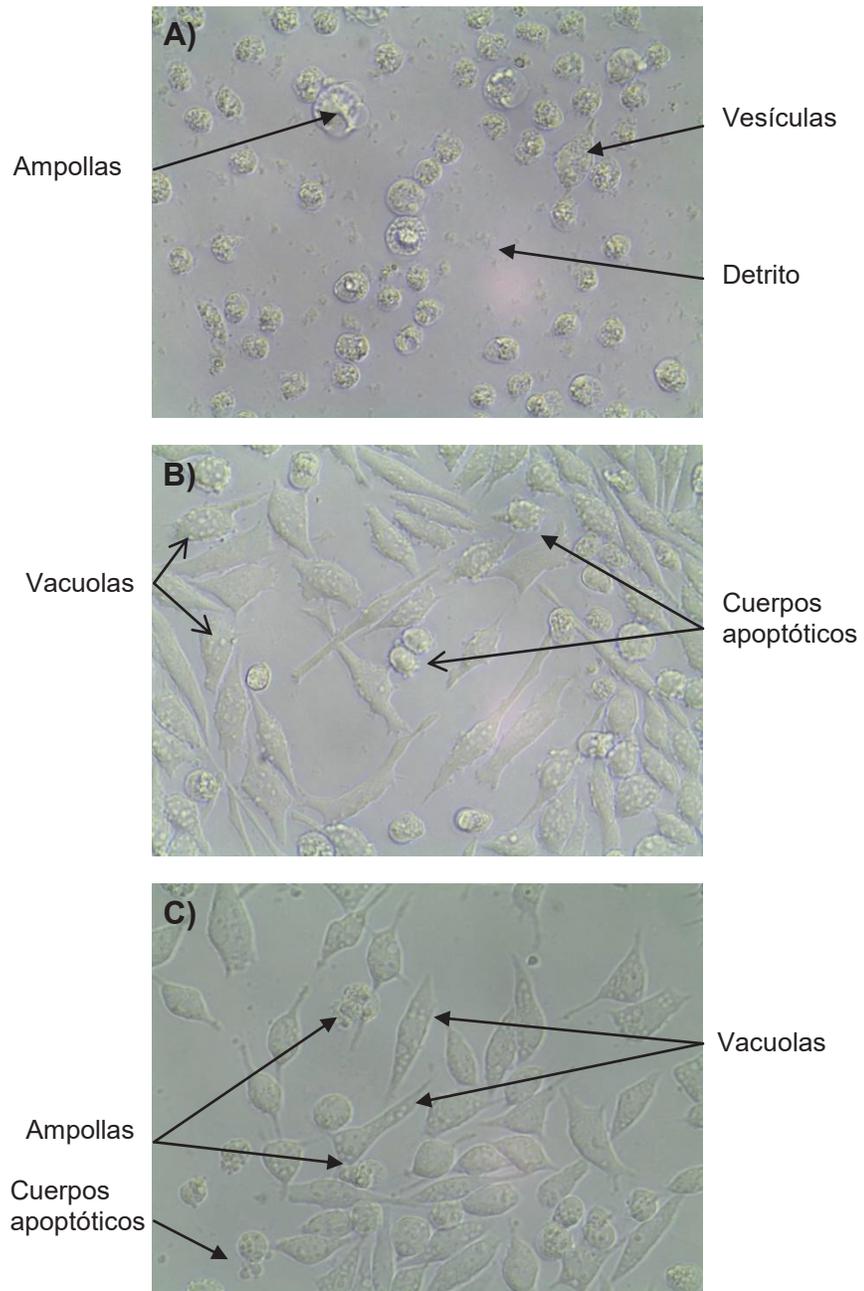


Figura 11. Efecto de las subfracciones de FH12, FH22 y acetato de etilo sobre la línea celular M12.A^K.C3F6. Las observaciones se realizaron a las 24 h, con un microscopio invertido y con un objetivo de 40x. A) Microfotografía de FH12-5 a 12.5 µg/mL; B) Microfotografía de FH22-3 a 12.5 µg/mL; C) Microfotografía de FAc-1 a 12.5 µg/mL.

Una de las razones por la que se presenta este fenómeno pudiera ligarse al hecho de que las fracciones predecesoras, en este caso la FH22, contiene una mayor cantidad de compuestos activos que pudieran trabajar en sinergia sobre esta línea celular y el separar estos compuestos, aunque sea el más activo no asegura una mayor actividad a la de la fracción original.

Zapata y col. (2009), evaluaron la actividad citotóxica del aceite esencial de *Lippia organoides* y sus diferentes componentes, sobre las líneas celulares HeLa (adenocarcinoma cervical humano) y Vero (células de riñón de mono verde africano), encontrando que la actividad de estos componentes principales presentaban una baja actividad sobre ambas líneas celulares en comparación con el aceite esencial que presentaba actividades de más del doble que los componentes, demostrando de esta forma un efecto de sinergia.

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa Sobre la Línea Celular Cancerosa HeLa

La línea celular HeLa, son células del tipo endoteliales provenientes de un carcinoma cervical. Esta línea celular es menos sensible a estímulos externos, en comparación con la línea celular RAW y M12.A^k.C3F6 (León y col., 2006).

Los resultados de la evaluación de las fracciones de hexano sobre esta línea celular mostraron una baja actividad. Sólo la fracción FH12 mostró una actividad promedio inhibiendo el 57% de la proliferación celular a 12.5 µg/mL, con un valor de la IC₅₀ de 12.12 µg/mL, mientras que las otras fracciones mostraron una IC₅₀ > 12.5 µg/mL (Tabla I).

En las observaciones al microscopio, a las 24 h, no se presentaron muchos cambios en las células, sólo se visualiza la presencia de vesículas pequeñas, así como pocas células con ampollas y células muertas. Esto de forma general entre las seis fracciones. A las 48 h, estos cambios fueron más notorios en algunas fracciones como la FH11, FH12 y FH22 mostrando mayor cantidad de células en suspensión y con ampollas.

Sin embargo, el número de células adheridas se mantuvo en cierta proporción (fig. 12)

Los resultados de la evaluación de las subfracciones mostraron nuevamente como la más activa a la FH12-5 con un valor de IC_{50} de 6.64 $\mu\text{g/mL}$, mientras que las otras subfracciones de FH22 y acetato de etilo no produjeron una actividad antiproliferativa por debajo de 12.5 $\mu\text{g/mL}$ (fig. 13).

Con el análisis estadístico se demostró que la subfracción FH12-5 mantiene un actividad antiproliferativa importante hasta la concentración de 3.12 $\mu\text{g/mL}$ en donde se muestra una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control de DMSO ($p < 0.05$). La FH22-4, FH22-5, FH22-7 y FAC-1 sólo indujeron una actividad importante a 12.5 $\mu\text{g/mL}$, mostrando una diferencia estadística al control de DMSO ($p < 0.05$) (fig. 13).

En las observaciones al microscopio, a las 24 h, se encontró que no se producen cambios importantes con la FH22-4, FH22-5, FH22-7 y FAC-1, sólo se presentan la formación de vesículas que, como ya se mencionó antes, sólo es señal de un cierto efecto en la célula, pero no se puede interpretar como un daño irreversible. Por otro lado, en las observaciones para el efecto de la subfracción FH12-5 se encontró un gran daño a las células produciéndose la formación de cuerpos apoptóticos principalmente, así como también la presencia de una gran cantidad de vesículas (fig. 14).

En los estudios de actividad antiproliferativa, la línea celular HeLa ha sido una de las más evaluadas por su alta resistencia a fármacos (León y col. 2006). En el 2009, Arango y col. evaluaron la actividad citotóxica de los compuestos tipo terpénicos de *Lippia alba*, sobre la línea celular HeLa, y se encontró que algunos de los compuestos presentaban una IC_{50} menor de 4 $\mu\text{g/mL}$, como el citral y pirogalol (Arango y col. 2009). La subfracción FH12-5, de *Aloysia sonorensis*, presenta una IC_{50} de 6.64 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea celular HeLa, la cual se asemeja con la actividad de los compuestos de *Lippia alba*, aun a pesar de que la subfracción es una mezcla de compuestos.

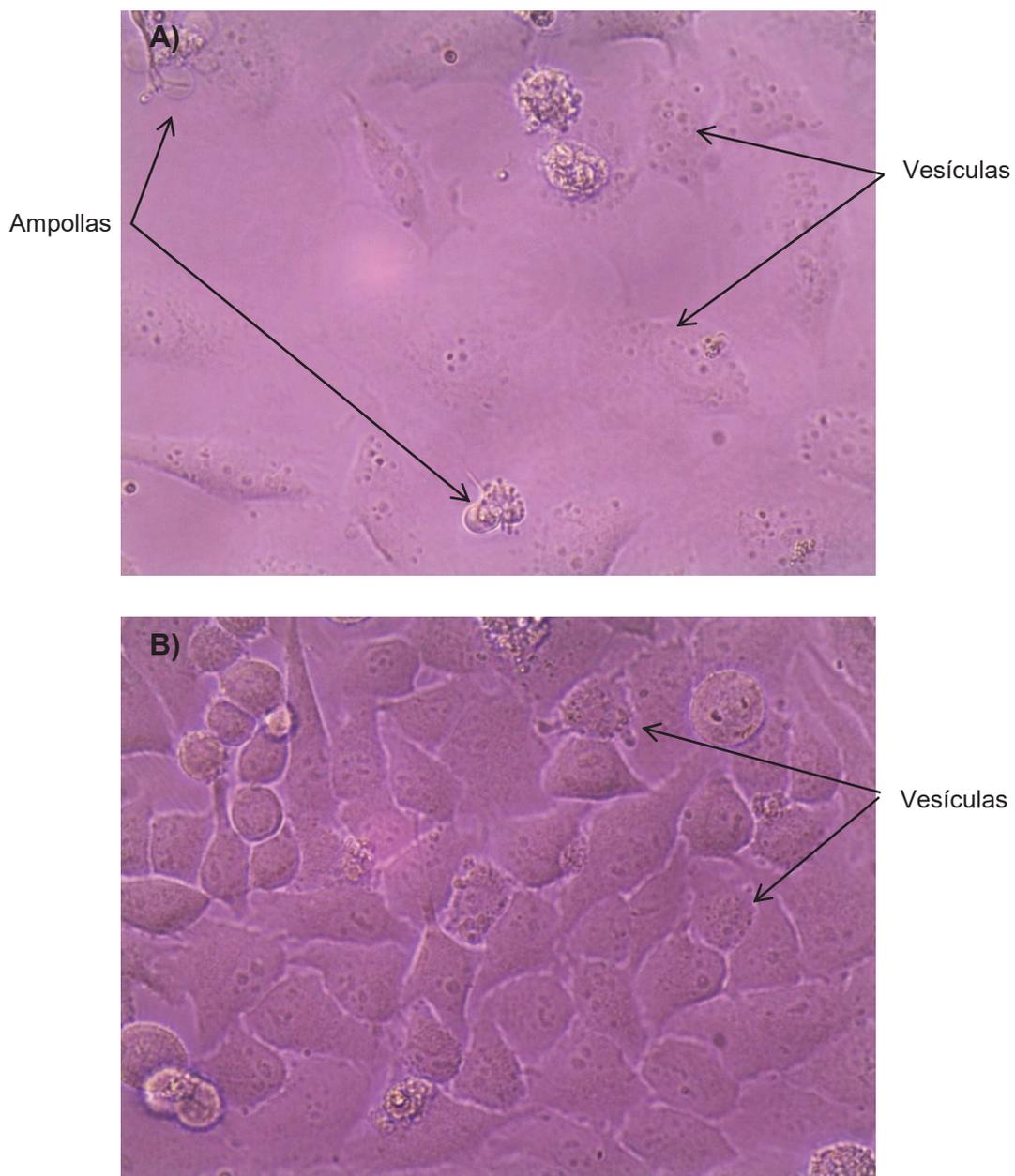


Figura 12. Efecto de las fracciones de hexano sobre la línea celular HeLa. Las observaciones se llevaron a cabo a las 24 h, con un microscopio invertido y con un objetivo de 40x. A) Microfotografía de FH12 a 12.5 µg/mL; B) Microfotografía de FH22 12.5 µg/mL.

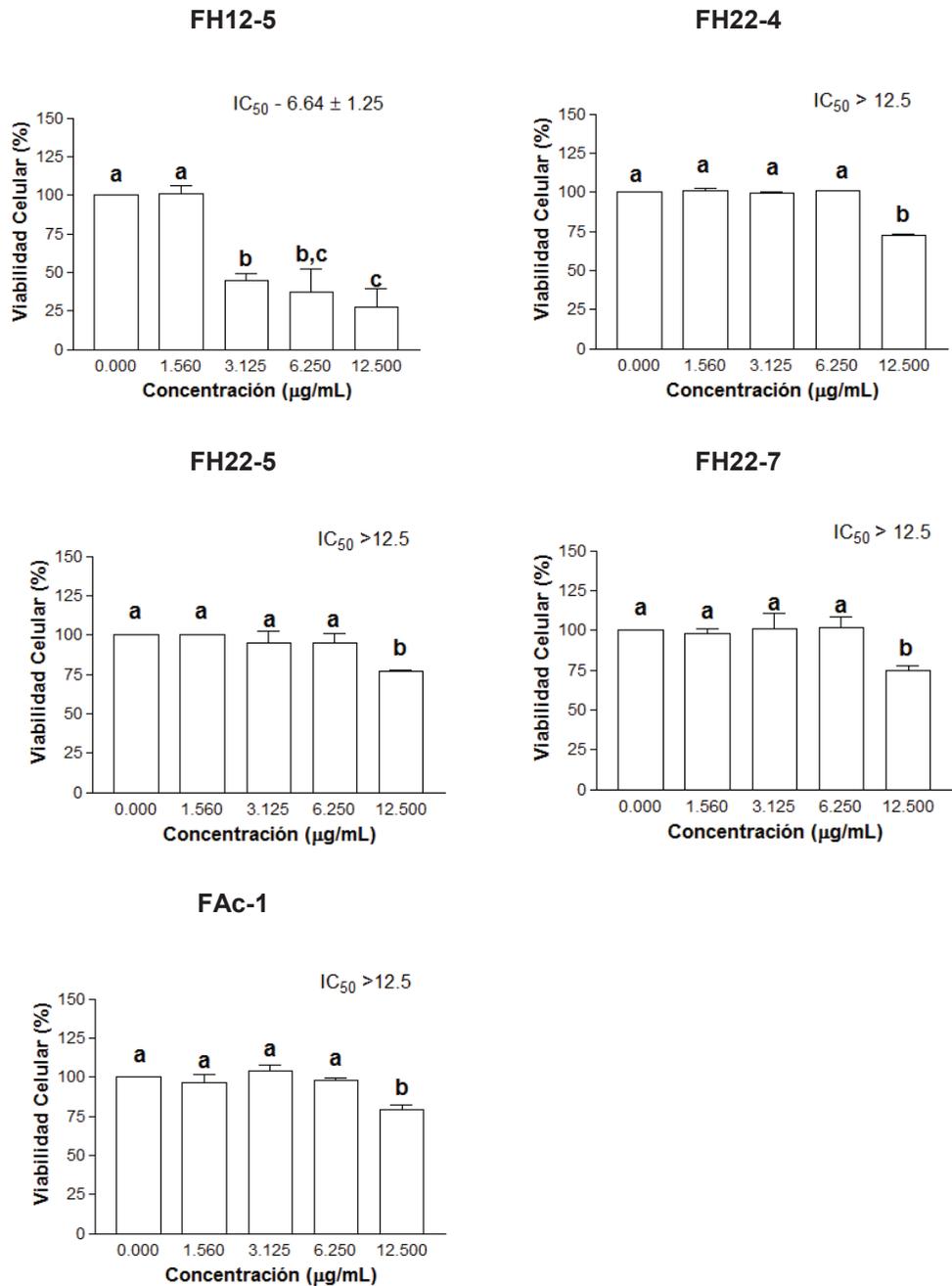


Figura 13. Actividad antiproliferativa de las subfracciones de FH22, FH12 y acetato de etilo sobre la línea celular HeLa. En la parte superior derecha se muestra el valor de la IC_{50} de cada gráfica. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales ($p > 0.05$).

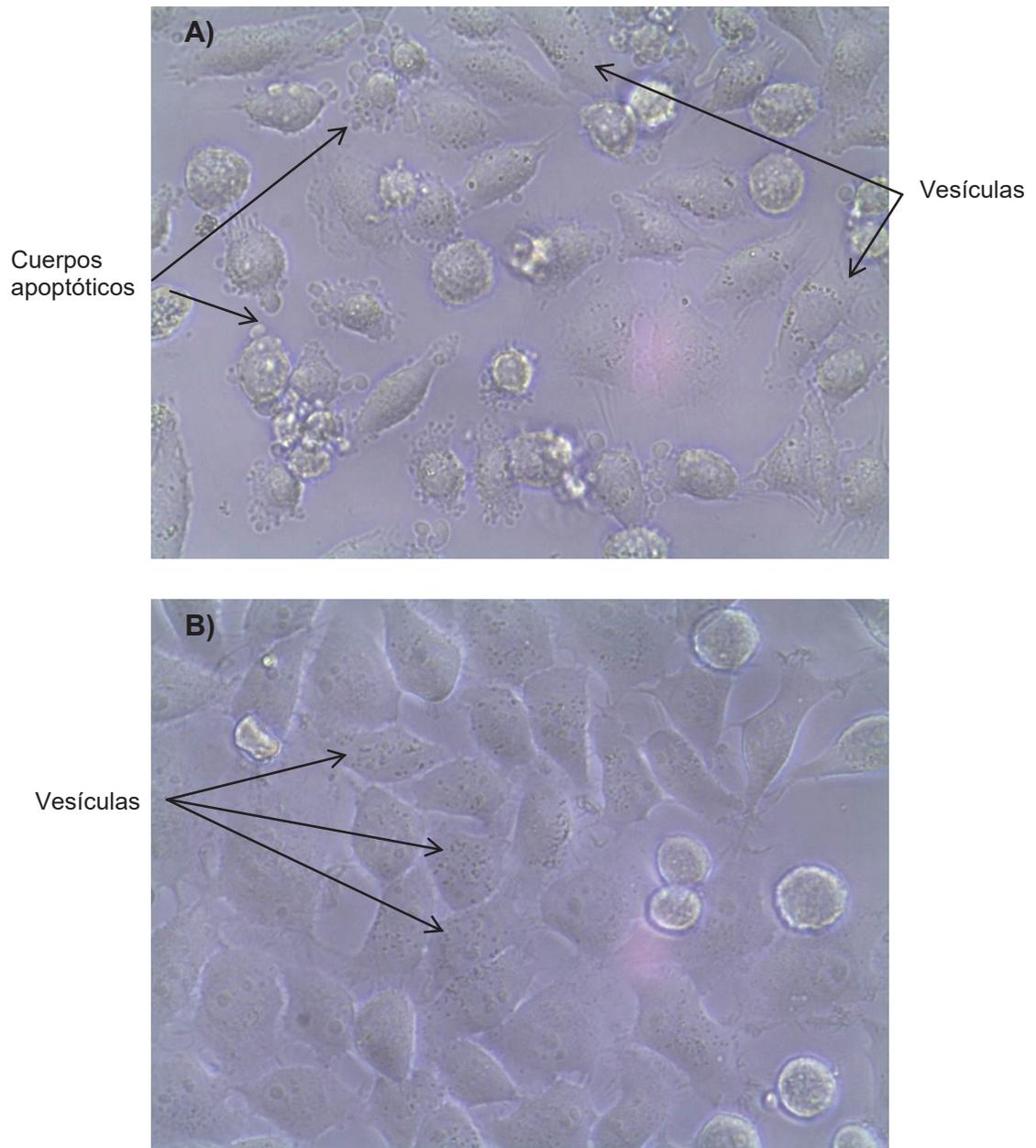


Figura 14. Efecto de las subfracciones de FH12, FH22 y acetato de etilo sobre la línea celular HeLa. Las observaciones se realizaron a las 24 h, con un microscopio invertido y con un objetivo de 40x. A) Microfotografía de FH12-5 a 12.5 µg/mL; B) Microfotografía de FH22-5 a 12.5 µg/mL.

Por otro lado, un aislamiento de los compuestos activos de esta fracción podría magnificar la actividad de dicha fracción sobrepasando la actividad de los compuestos de *L. alba*.

Hasta el momento se puede decir que la actividad antiproliferativa de *A. sonorensis* se encuentra principalmente en la muestra FH12-5, la cual presentó la mayor actividad sobre las tres líneas celulares cancerosas. En las observaciones al microscopio se encontró que esta fracción indujo principalmente apoptosis en dos líneas celulares RAW y HeLa, mientras que en M12.A^k.C3F6 se presentó principalmente como necrosis.

Por último, para generar un mejor estudio es necesaria la evaluación de la actividad citotóxica, debido que aunque sea un compuesto muy activo contra las células de cáncer, esta también podría tener una acción tóxica sobre células normales. Para esto se realizó la evaluación sobre la línea celular normal L-929.

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa Sobre la Línea Celular Normal L-929

Para tener una evaluación de la actividad antiproliferativa completa se realizó una evaluación sobre una línea celular normal L-929 (fibroblastos del tejido subcutáneo de ratón), para determinar si el efecto no era citotóxico sobre una línea celular normal. Algunos compuestos pueden afectar principalmente a las células cancerosas y en menor grado a las células normales. Sin embargo, hay distintos compuestos, como la colchicina, que no discriminan entre células malignas y benignas (Risinger y col., 2009; Clément y col., 2008).

Los resultados de esta evaluación mostraron que las seis fracciones de hexano no tuvieron una actividad antiproliferativa importante dentro de las 48 h en contacto con las células, solamente la fracción FH11 mostró tener una actividad con una IC₅₀ de 12.69 µg/mL, las otras fracciones mantuvieron una IC₅₀ > 12.5 µg/mL (Tabla I).

En las observaciones al microscopio en las primeras 24 h encontramos que los principales cambios producidos en esta línea son la presencia de una gran cantidad de vesículas, células con ampollas, células muertas y detrito celular, estos cambios se presentaron principalmente en las fracciones FH11, FH12, FH13 y FH14, por otro lado en las fracciones FH21 y FH22, se presentó una cierta cantidad de células con vacuolización, a las 48 h estos cambios fueron más notorios a una concentración de 12.5 $\mu\text{g/mL}$ (fig. 15). Estas observaciones muestran que a las 24 horas hubo cambios generales y no específicos para determinar el tipo de muerte celular. Sin embargo, a las 48 h se denotó una inclinación hacia la muerte por necrosis donde se encontró un mayor número de células con ampollas y una gran cantidad de detrito celular. Por otro lado aunque se observaron estos cambios drásticos también hubo una gran cantidad de células adheridas a las 48 h que mostraron vesículas, pero todavía eran células viables.

Estos resultados demuestran el gran potencial de los compuestos presentes en *A. sonorensis*, ya que las seis fracciones no presentaron un gran impacto tóxico sobre esta línea celular normal en las concentraciones evaluadas, solamente las células cancerosas sufrieron un daño importante, lo cual implica un resultado notable.

Entre estas fracciones sobresalen principalmente los resultados mostrados por la fracción FH12, la cual mostró un efecto sobre las tres líneas cancerosas, además de tener la IC_{50} más baja con 2.84 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea celular RAW, y la única en inducir un efecto antiproliferativo sobre la línea HeLa y no afectar de manera importante la línea celular normal L-929.

Por otro lado las fracciones FH11, FH13, FH14 y FH21 mostraron tener un efecto indistinto entre las células RAW y M12.A^k.C3F6, manteniendo una actividad similar sobre estas líneas, mientras que la FH22 sólo mostró actividad importante sobre la línea M12.A^k.C3F6.

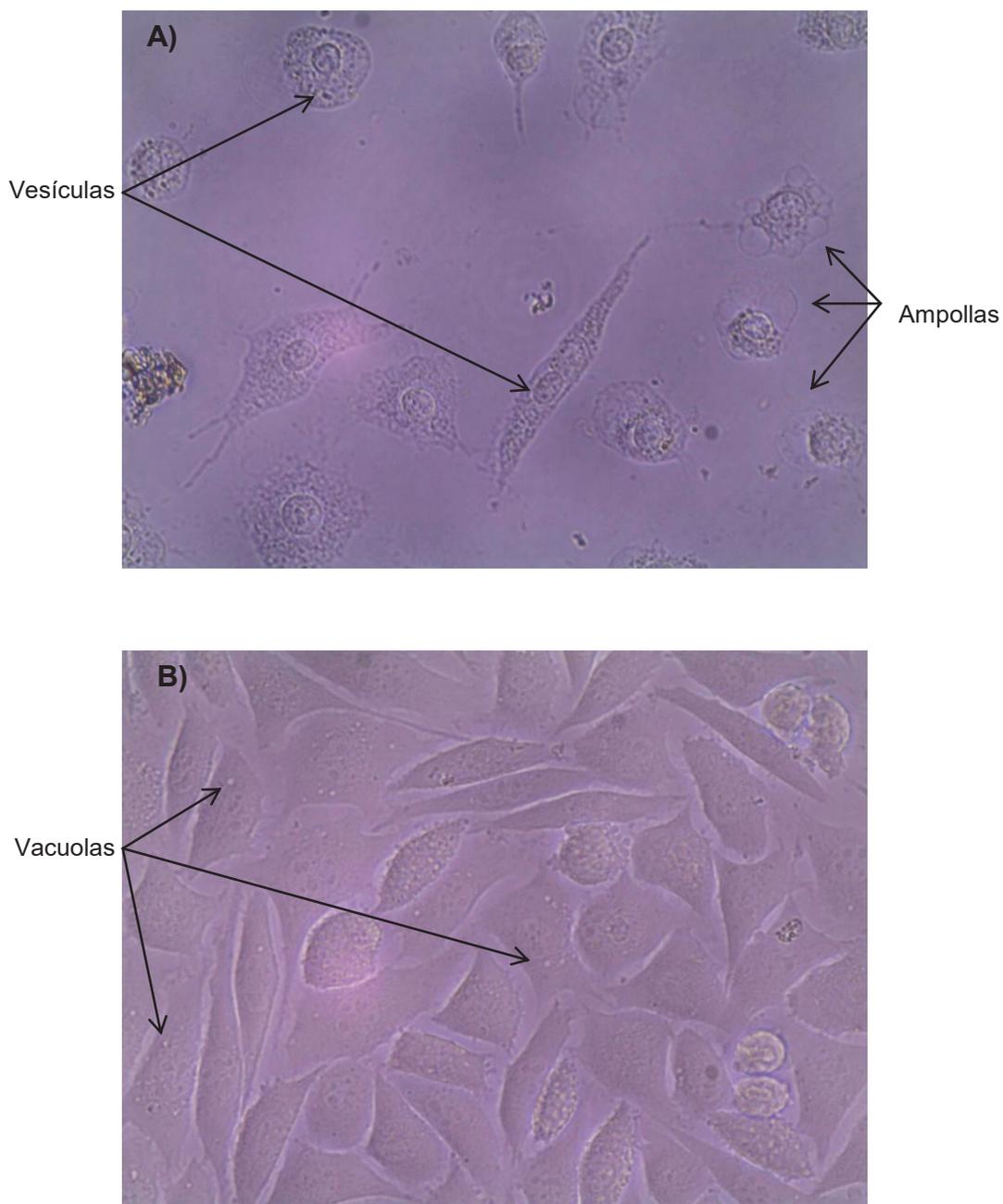


Figura 15. Efecto de las fracciones de hexano sobre la línea celular normal L - 929. Las observaciones se llevaron a cabo a las 24 h, con un microscopio invertido y con un objetivo de 40x. A) Microfotografía de FH12 a 12.5 µg/mL; B) Microfotografía de FH22 12.5 µg/mL.

Estos resultados muestran como las fracciones FH12 y FH22 presentan un cierto efecto de selectividad hacia una línea celular específica, mientras que en otras líneas celulares no muestran un impacto importante. Esto podría deberse a que estos compuestos interactúan con ciertos receptores que se encuentran sólo en líneas celulares específicas.

La fracción FH12 mostró tener una cierta afinidad a receptores que se localizan principalmente en macrófagos (RAW) y que se encuentran distribuidos en menor medida en otro tipo de células, mientras que la FH22 sólo es afín a receptores que se encuentran principalmente en linfocitos B (M12.A^k.C3F6).

En lo que respecta al efecto antiproliferativo de las subfracciones de FH12 y sobre la línea L-929 se encontró que la fracción más tóxica fue la FH12-5 con una IC₅₀ de 4.82 µg/mL. Por otro lado las subfracciones FH12-4, FH22-3, FH22-4, FH22-5, FH22-6, FH22-7 y FAc-1, mantuvieron una IC₅₀ arriba de 12.5 µg/mL (fig. 16).

El análisis estadístico indicó que la subfracción FH12-5 mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) en todas las concentraciones. La FH12-4, FH22-3, FH22-5 y FH22-6 presentaron una diferencia sólo hasta la concentración de 6.25 µg/mL ($p < 0.05$), mientras que FH22-7 y FAc-1 mostraron una diferencia estadísticamente significativa a una concentración de 12.5 µg/mL, con respecto al control de DMSO (fig. 16).

En las observaciones al microscopio, a las 24 h, no se encontraron cambios importantes, sólo la formación de vesículas en las células y menor tamaño, en la mayoría de las fracciones. Sólo la FH12-5 mostró ser tóxica, y se encontró que a una concentración de 12.5 µg/mL la mayoría de las células estaban destruidas o presentaron un tamaño muy reducido y con ampollas, así como también células con vesículas. Estos aspectos morfológicos no ofrecen la suficiente información para indicar un mecanismo de acción dado (fig. 17).

Anteriormente se había comentado acerca de la selectividad que muestra la fracción FH12 hacia la línea celular RAW. Sin embargo, la FH12-5 no mantiene

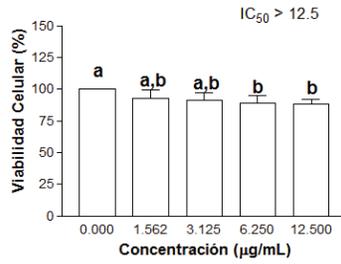
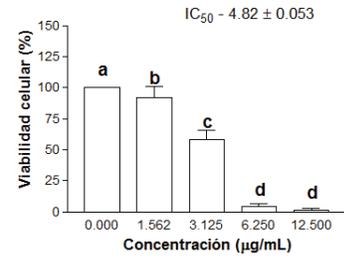
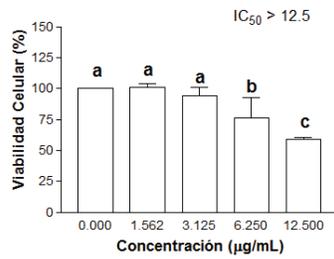
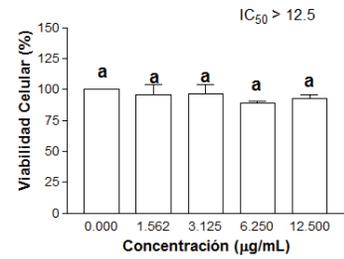
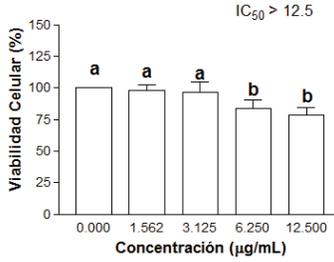
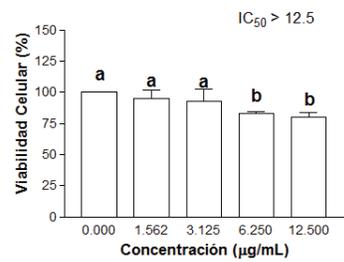
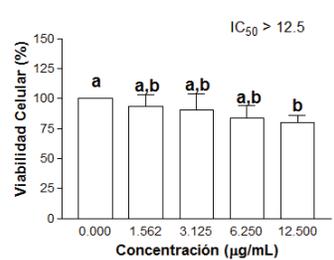
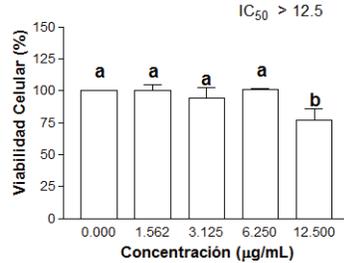
FH12-4**FH12-5****FH22-3****FH22-4****FH22-5****FH22-6****FH22-7****FAC-1**

Figura 16. Actividad antiproliferativa de las subfracciones de FH22, FH12 y acetato de etilo sobre la línea celular normal L-929. En la parte superior derecha se muestra el valor de la IC_{50} de cada gráfica. Barras con la misma letra son estadísticamente iguales ($p > 0.05$).

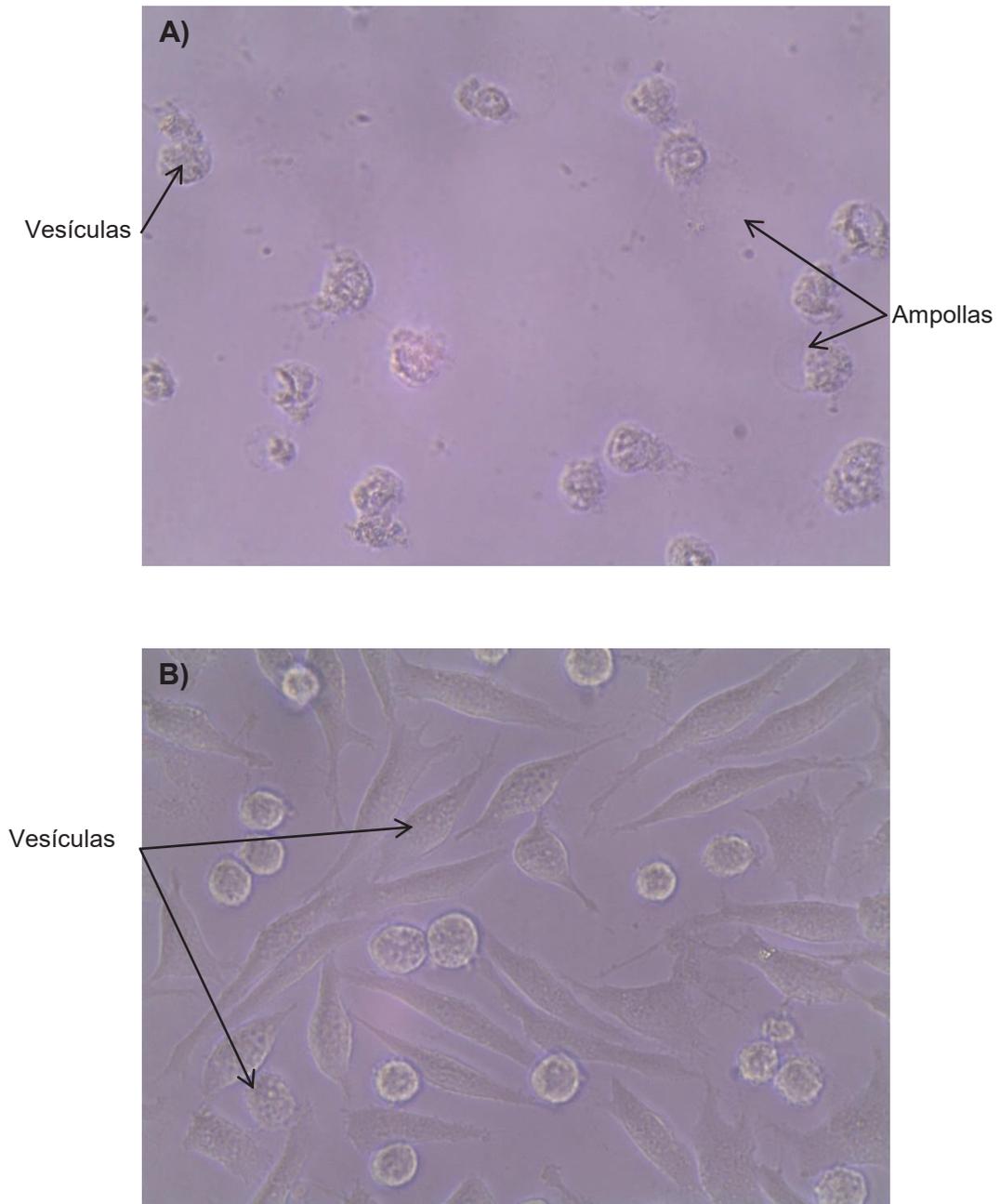


Figura 17. Efecto de las subfracciones de FH12, FH22 y acetato de etilo sobre la línea celular L-929. Las observaciones se llevaron a cabo a las 24 h, con un microscopio invertido y con un objetivo de 40x. A) Microfotografía de FH12-5 a 12.5 µg/mL; B) Microfotografía de FH22-5 a 12.5 µg/mL.

dicha selectividad sino que afecta de igual forma a las diferentes líneas celulares tanto cancerosas como normales. Por otro lado, si nos enfocamos en la actividad de FH12-4 se observa que ésta afecta solamente a la línea celular RAW y no muestra efecto alguno sobre las otras líneas, indicando su selectividad. Dado estos hechos se puede decir que la gran actividad de FH12 sobre RAW, se debe a la actividad en conjunto de ambas fracciones, FH12-4 y FH12-5. Mientras que el efecto sobre las otras líneas celulares, que es en menor grado, se debe a FH12-5, la cual se encuentra en concentraciones menores en esta fracción 12 de hexano (FH12).

Lo anterior sugiere que los compuestos presentes en la fracción FH12 son candidatos potenciales para la elaboración de nuevos fármacos anti-cáncer, en donde una muestra una actividad selectiva y la otra una amplia actividad antiproliferativa.

Por otro lado, también es importante destacar la actividad de la fracción FH22 y sus subfracciones. Estas son muestras de distinta naturaleza en cuanto a polaridad, por lo que los compuestos pueden llegar a ser muy diferentes a los de la fracción FH11, FH12, FH13 o FH14. Estas fracciones polares mostraron una amplia actividad contra la línea RAW principalmente, destacando la FH22-3, e indujeron constantemente apoptosis en las células en las que se probaron, de igual forma es importante repetir el hecho de que éstas todavía son mezclas y no son productos puros por lo que la actividad podría aumentar una vez purificado estos compuestos inductores de apoptosis, además el hecho de que no produjeron toxicidad sobre la línea celular normal, por la que las hace candidato para su estudio.

Por último, se tiene a las fracciones de acetato de etilo donde la FAc-1 demostró una actividad sobre la línea celular RAW y M12.A^k.C3F6, y no afectó de manera importante a la línea celular normal, demostrando de esta forma ser un candidato para estudio y posible elaboración de fármacos.

En los últimos años se han llevado a cabo la búsqueda de nuevos compuestos con capacidad antiproliferativa y de ellos se han derivado candidatos para la elaboración de fármacos, como lo son el eupafolin aislado de *Lippia dulcis* (Abe y col. 2002) el cual es efectivo contra cáncer cervicouterino (HeLa) con una IC_{50} de 1.8 $\mu\text{g/mL}$ y desramnosil isoacteósidoaislado de *Clerodendron bungei* (Nagao y col. 2001) el cual es efectivo contra melanoma murino (B16F10), con una IC_{50} de 2.8 $\mu\text{g/mL}$. Los valores de IC_{50} obtenidos sobre estas líneas celulares los hace candidatos, según la NCI, para la elaboración de fármacos. Por otro lado, el cisplatino es un fármaco utilizado para tratar distintos tipos de cánceres. Está presenta una IC_{50} ~ de 3 $\mu\text{g/mL}$ sobre distintas líneas celulares (Leon y col. 2006). Comparando estas actividades con la de las fracciones de *Aloysia sonorensis* podemos ver que algunas de las fracciones presentan una IC_{50} similar o muy cercana a estas, como la FH12-5, que presentó una IC_{50} de 2.1 $\mu\text{g/mL}$ sobre la línea celular RAW, lo cual lleva a considerar el potencial de los compuestos presentes en *Aloysia sonorensis* como candidatos para la elaboración de fármacos anticancerígenos.

Elucidación Estructural

Una parte fundamental en el estudio de la capacidad antiproliferativa de una planta es la identificación de los compuestos responsable de la actividad biológica. En este trabajo han destacado principalmente los compuestos presentes en las fracciones de hexano y las fracciones de acetato de etilo demostrando una gran capacidad antiproliferativa.

Una vez evaluadas estas fracciones se llevó a cabo la elucidación de sus compuestos a través de análisis de RMN de protón y carbono.

Entre las muestras a analizar se destacan las fracciones de acetato de etilo porque presentan mayor grado de pureza entre las fracciones obtenidas. Se llevó a cabo el análisis de resonancia de protón y carbono de cada una de las

fracciones de acetato de etilo y se observó que algunas muestras todavía permanecían como mezclas complejas y otras contenían contaminantes que no permitían una apropiada elucidación. Sin embargo, la muestra FAc-03, presentó una pureza suficiente para la elucidación estructural por lo cual se le realizaron los análisis de espectroscopia correspondientes, como DEPT y RMN de dos dimensiones, los cuales proporcionaron la información para la elucidación estructural.

Para la identificación del compuesto de la fracción FAc-03, se llevaron a cabo análisis de RMN de ^1H y ^{13}C , DEPT y HSQC (Correlación heteronuclear cuántica simple), todos los análisis se realizaron utilizando como solvente cloroformo deuterado (CDCl_3)

En RMN de ^1H , se encontraron siete diferentes señales que corresponden a hidrógenos distintos en la molécula. La primera con un desplazamiento químico (δ) de 7.25 corresponde al cloroformo deuterado, a partir de ésta se etiqueta cada una de las señales como P_x (protón). La señal P_1 con un $\delta = 5.85$ se presenta en la zona de alquenos, la P_2 con un $\delta = 2.65$, P_3 con un $\delta = 2.3$, el P_4 con un $\delta = 2.1$, P_5 con un $\delta = 1.95$, P_6 con un $\delta = 1.85$ y P_7 con un $\delta = 1.25$ se presentan en la zona de alifáticos. En este análisis también fue posible señalar la relación entre protones, esto a través de su multiplicidad. En este caso sólo las señales, P_2 y P_3 , se presentaron como señales tripletes, mientras que las otras señales se mantuvieron como señales simples o singuletes. Esto nos indica que sólo P_2 y P_3 se encuentran acoplados el uno con el otro, mientras que los otros grupos se encuentran aislados. A través de la integración de las señales es posible conocer el número de hidrógenos que contiene la molécula perteneciente a una determinada señal: P_1 tiene una integración de 1, por lo que es un grupo CH, las señales P_2 y P_3 , integran para 2 cada una, por lo que son grupos metileno CH_2 . Las señales P_4 , P_5 y P_6 integran para 3, cada una por lo que son grupos metileno CH_2 . La última señal P_7 integra para 6 por lo que pueden ser dos CH_3 equivalentes (fig. 18).

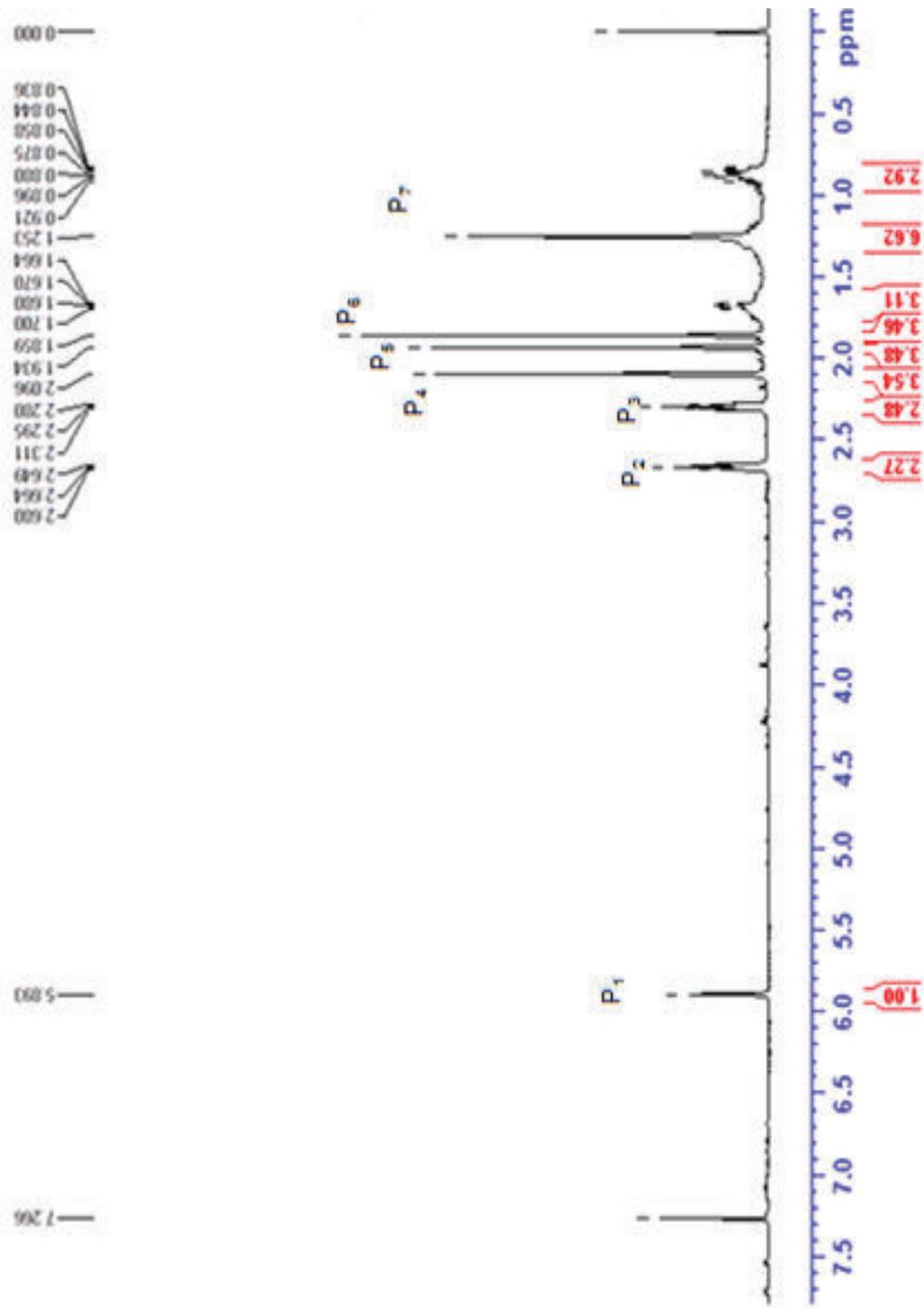


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H de FAc-03 en CDCl_3 .

En RMN de ^{13}C , se puede conocer el número de carbonos presentes en la muestra así como el tipo de carbono (primario, secundario, terciario o cuaternario) al que corresponde cada una de las señales.

En el espectro de carbono se puede identificar doce señales principales, seis en campo alto y seis en campo bajo, las que se encuentran en campo alto, se presentan en la zona de alquenos y aromáticos, mientras que las de campo bajo en la zona de alifáticos. Dentro de los análisis de carbono se encuentra un análisis que nos ayuda a distinguir entre las señales de los metilos(CH_3), etilenos (CH_2) y los metino (CH), este es el estudio de DEPT.

Los espectros de DEPT 135, nos muestra en lados opuestos las señales de CH_2 y las de CH y CH_3 , siendo el de los CH_2 las señales hacia abajo del espectro (fig. 19 A). Para diferenciar las señales de los CH_3 y CH , se utiliza el DEPT 90 en donde sólo visualizamos las señales de los CH (fig. 19 B). Finalmente, aquellas señales que no se mostraron en el DEPT corresponden a carbonos cuaternarios en el espectro de carbono (fig.19 C).

En el espectro de carbono se etiquetan con C_x cada una de las señales importantes; C_1 con un $\delta = 159.6$, C_2 con un $\delta = 142.5$, C_3 con un $\delta = 131.3$, y C_5 con un $\delta = 128.8$, son señales de carbonos cuaternarios (C), la señal C_4 con un $\delta = 129$ es un CH , las señales a campo bajo son las: C_6 con un $\delta = 31.9$, la C_7 con un $\delta = 29.7$, la C_8 con un $\delta = 27.9$, representan al grupo de CH_2 , el C_9 con un $\delta = 23.8$, C_{10} con un $\delta = 22.9$ y el C_{11} con un $\delta = 22.5$ son el grupo de los CH_3 .

Para saber con certeza a qué átomo de carbono está unido cada átomo de hidrógeno, se llevó a cabo el análisis de correlación heteronuclear cuántica simple (HSQC), ^1H - ^{13}C . Este espectro mostró que la señal P_1 está relacionada con la señal C_4 , indicando que corresponde a la señal de un CH , y así como está la P_2 con C_8 , P_3 con C_6 y P_7 con C_7 los cuales corresponden con metilenos y las señales P_4 con C_{10} , P_5 con C_9 y P_6 con C_{11} los cuales son los metilos, con respecto a las señales C_1 , C_2 , C_3 y C_5 éstas no muestran relación con señales de protón debido a que son carbonos cuaternarios (fig. 20).

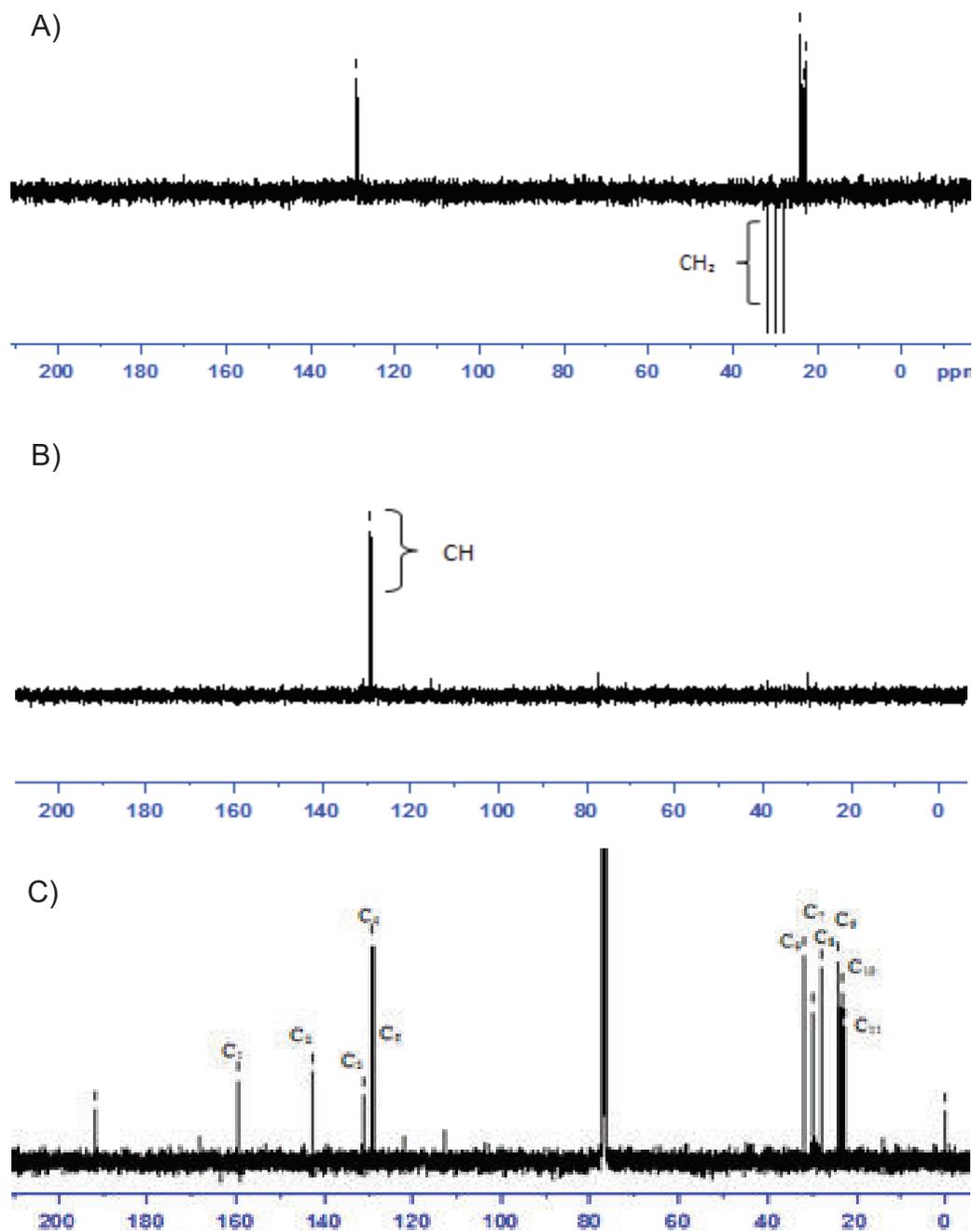


Figura 19. Espectros de RMN de ¹³C de FAc-03 en CDCl₃. A) DEPT 135; B) DEPT 90 y C) completo.

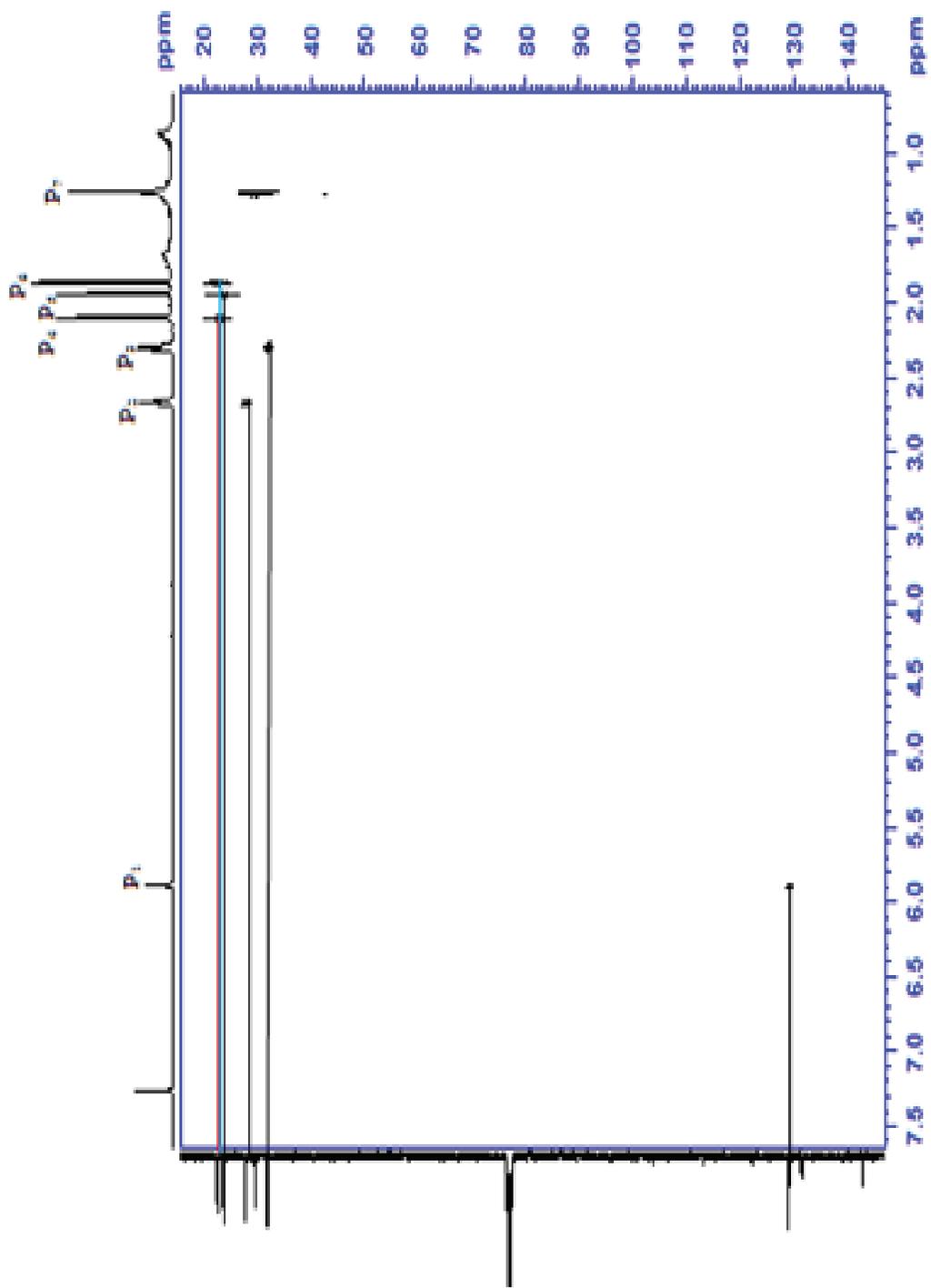


Figura 20. Espectro de correlación heteronuclear cuántica simple (HSQC) de FAc-03 en CDCl_3 .

Con el análisis de correlación homonuclear COSY ^1H - ^1H , identificamos qué señales están acopladas de 3 hasta 5 enlaces. Como podemos observar, en el espectro de COSY la mayoría de las señales presentan un acoplamiento a larga distancia, mientras que sólo P₂ y P₃ se encuentran acoplados entre si (fig. 21).

Una vez analizado los espectros de protón y carbono se puede proponer la fórmula molecular C₁₀H₁₄ con un peso molecular de 134. Para corroborar este dato se realizó una espectrometría de masas de la muestra y se encontró que el ión molecular tiene un peso molecular de 150 (fig. 22). Entre el peso dado por masas y el de la fórmula que se propone existe una diferencia de 16, el cual corresponde a un átomo de oxígeno, dando de esta forma una fórmula de C₁₀H₁₄O.

A partir de la información de COSY, la fórmula y el peso molecular, se puede realizar un esquema de la molécula. Iniciando por P1 el cual se acopla a más de tres enlaces con P3 y P5, los cuales se acoplan entre ellos a más de tres enlaces, P3 también se acopla con P2 a tres enlaces, y P2 se acopla con P4 y P6 a más de tres enlaces, los acoplamiento a más de tres enlaces es debido a la unión de los cuatro carbonos cuaternarios, los cuales se encuentra localizados entre P3, P5 y P1 el cual se encuentra unido a éste con un doble enlace, y a su vez P1 se une a un segundo carbono para mantenerse como CH (P1), por otro lado los otros dos carbonos cuaternarios se encuentran entre P2 y las señales de P4 y P6, que para mantenerse como carbonos cuaternarios están unidos con un doble enlace entre si, el carbono que se une directamente con P2 se une al carbono unido a P1, el cual está unido al oxígeno (fig. 23).

La fórmula molecular y la espectroscopia concuerda para los reportados del compuesto piperitenona (fig. 24), un compuesto terpénico del tipo monoterpeno monocíclico que no se había identificado anteriormente en el género de *Aloysia*, pero si en otros géneros de la familia Verbenaceae como *Lantana* (Dambolena y col., 2010). Este compuesto ha sido estudiado principalmente por su actividad antibacteriana y antifúngica. Sin embargo, no hay estudios relacionados con

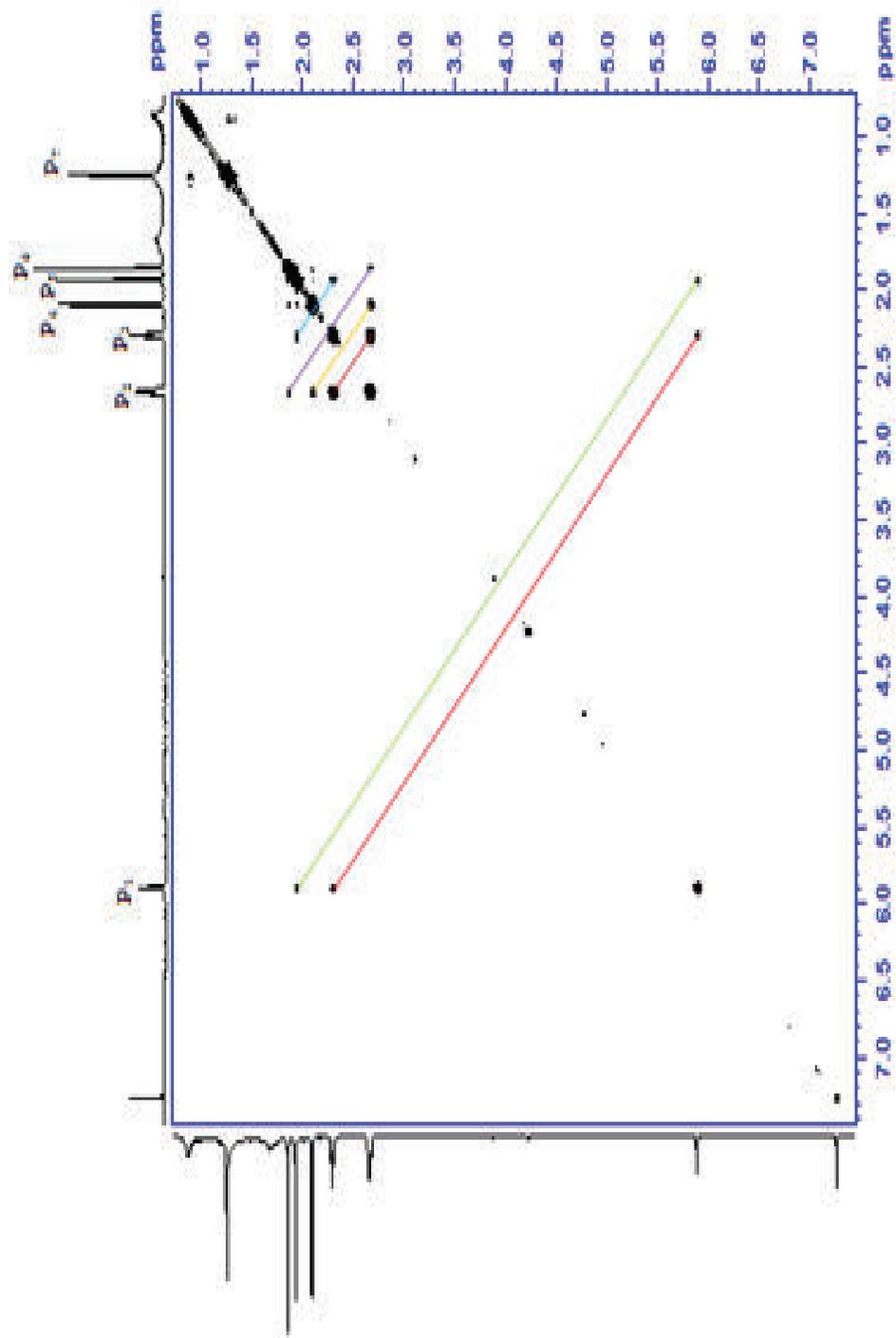


Figura 21. Espectro de correlación homonuclear (COSY) de FAc-03 en CDCl_3 .

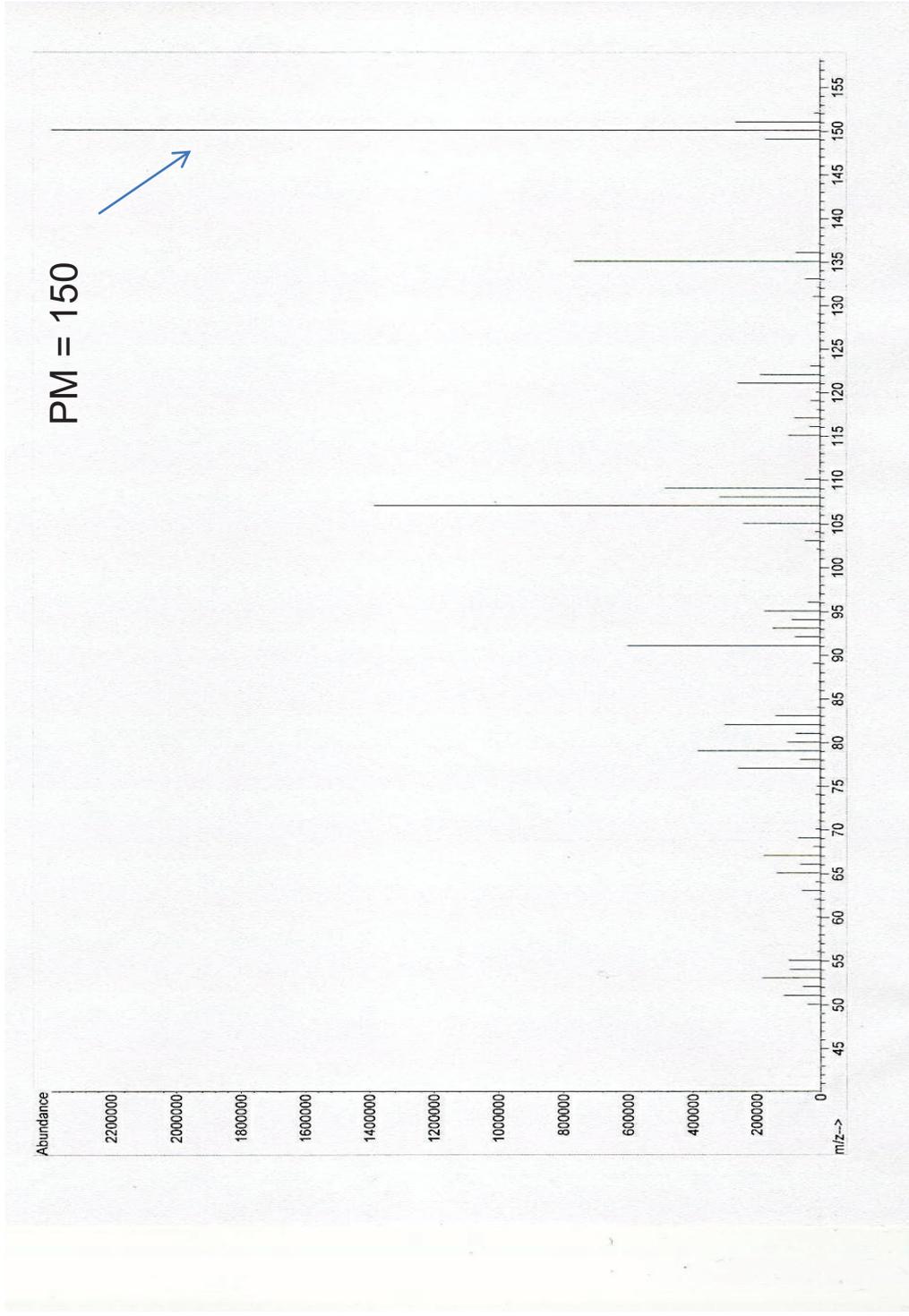


Figura 22. Espectro de masas de FAc-03.

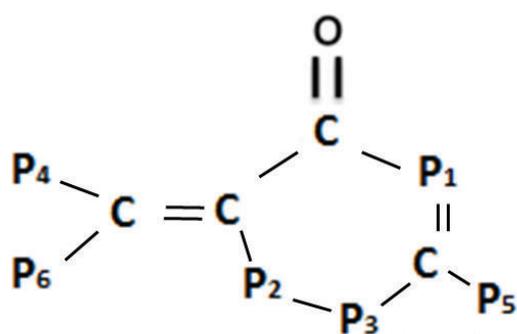


Figura 23. Estructura propuesta del compuesto principal de FAc-03.

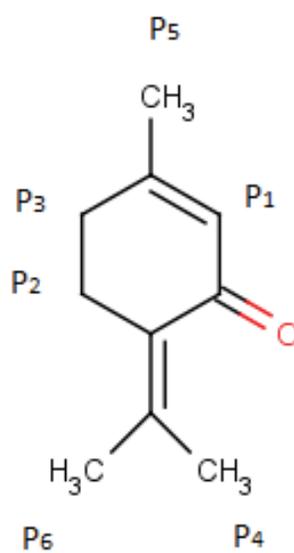


Figura 24. Estructura de piperitenona. Estructura de la piperitenona con las señales del espectro de protón de FAc-03.

actividad anticancerígena.

La piperitenona es un derivado del pirofosfato de linalilo, y a su vez éste es un precursor de algunos terpenos que han sido identificados como potentes agentes anticancerígenos como el 1,8-cineol, el α – terpineol, y el citral (Bashir y col., 2010; Moteki y col., 2002; Dudai y col. 2005).

El 1,8-cineol y el citral se han destacado como compuestos activos inductores de apoptosis en las células de cáncer. Estos compuestos han sido aislados en algunas especies de *Aloysia* como *gratissima*, *triphylla* y *citriodora* (Dambolena y col., 2010; Crabas y col., 2003)

En las evaluaciones la fracción F12-5 la cual muestra la mayor actividad, llevó a cabo su acción a través de la inducción de apoptosis sobre las células cancerosas, esto pudiera sugerir una relación entre el mecanismo de acción y los compuestos que podrían estar presentes en dicha fracción.

El análisis de protón indica que la muestra F12-5 es una mezcla compleja y no es posible elucidar el compuesto principal. Sin embargo, en el espectro de protón de F12-5 pueden observarse ciertas señales que corresponde a estos compuestos activos, el 1,8-cineol y el citral, lo que sugiere que pueden estar presentes en esta mezcla y ser los responsables de la gran actividad antiproliferativa de FH12-5 (fig. 25). En conclusión, los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa de *Aloysia sonorensis* son del tipo monoterpeno monocíclicos.

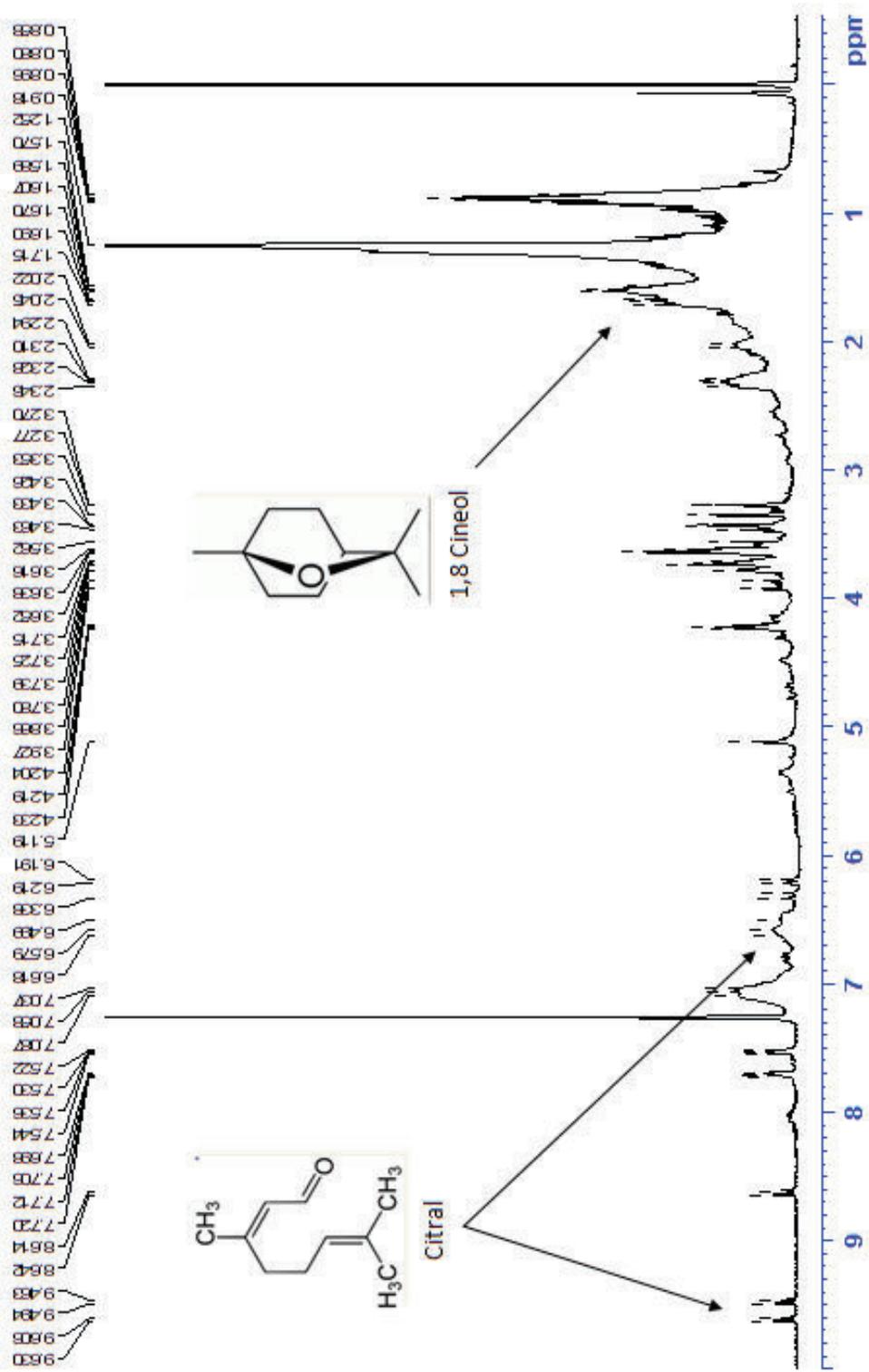


Figura 25. Espectro de ^1H de FH12-5 en CDCl_3 .

CONCLUSIONES

1. La fracción de hexano contiene los principales compuestos responsables de la actividad antiproliferativa de *Aloysia sonorensis*.
2. La evaluación de la actividad antiproliferativa demostró que las fracciones de hexano, presentan una importante actividad antiproliferativa sobre las diferentes líneas celulares cancerosas con IC₅₀ por debajo de 12.5 µg/mL, sobresaliendo la FH12 como la más importante.
3. La fracción FH12 se separa en cinco fracciones principales de las cuales solo dos contienen los compuestos activos de ésta.
4. La FH12-4 presentó una actividad selectiva, afectando de manera principal a la línea celular RAW, mientras que en las otras líneas no tuvo un efecto importante a las concentraciones evaluadas.
5. La FH12-5 demostró ser la fracción con mayor actividad antiproliferativa afectando de manera importante a todas las líneas celulares cancerosas e indujo sobre éstas un efecto de apoptosis.
6. La fracción 1 de acetato de etilo mostró una gran actividad sobre las líneas RAW y M12.A^k.C3F6 y no presentó actividad citotóxica sobre la línea celular normal L-929 a una concentración de 12.5 µg/mL.
7. De las fracciones de acetato de etilo se logró identificar la presencia de piperitenona, un compuesto del tipo monoterpeno, la cual no ha sido reportada anteriormente sobre el género de *Aloysia*.
8. En la fracción FH12-5 se identificaron presuntivamente compuestos como el citral y el 1,8 cineol los cuales son del tipo monoterpeno reportados con capacidad antiproliferativa e inductores de apoptosis.

Perspectivas

1. La identificación de todos los compuestos con capacidad antiproliferativa de *Aloysia sonorensis*.
2. El aislamiento de estos compuestos y su evaluación antiproliferativa sobre diferentes líneas celulares cancerosas.
3. La elucidación del mecanismo de acción de estos compuestos a través de métodos específicos para apoptosis.
4. Llevar a cabo el estudio de la relación de estructura-actividad (SAR: por sus siglas en inglés) de los compuestos activos de *Aloysia sonorensis*.
5. La elaboración de compuestos modificados tomando como molde los compuestos aislados de *Aloysia sonorensis* para obtener compuestos con mayor actividad antiproliferativa y menor toxicidad.
6. La elaboración de compuestos de coordinación con cobre de los compuestos aislado y modificados de *Aloysia sonorensis*, con el fin de optimizar la actividad de dichos compuestos.

ANEXOS

Anexo 1

Columna cromatográfica gravitacional de hexano

Fracciones de hexano (FH)	Nº. elución (250 mL)	Fase Móvil
1	1 – 5	Hexano 100%
2	6 – 9	Hex (9.5:0.5) EtOAc
3	10 – 11	Hex (9.5:0.5) EtOAc
4	12 – 20	Hex (9.5:0.5) EtOAc
5	21 – 28	Hex (9:1) EtOAc
6	29	Hex (9:1) EtOAc
7	30	Hex (9:1) EtOAc
8	31 – 39	Hex (9:1) EtOAc
9	40 – 50	Hex (9:1) EtOAc
10	51 – 69	Hex (9:1) EtOAc
11	70 – 113	Hex (9:1) EtOAc
12	114 – 117	Hex (8:2) EtOAc
13	118 – 120	Hex (8:2) EtOAc
14	121	Hex (8:2) EtOAc
15	122 – 130	Hex (8:2) EtOAc
16	131 – 155	Hex (7:3) EtOAc
17	156 – 166	Hex (6:4) EtOAc
18	167 – 189	Hex (1:1) EtOAc
19	190 – 194	Acetato de etilo 100%
20	195 – 198	Acetato de etilo 100%
21	199 – 210	Acetato de etilo 100%
22	211 – 214	EtOAc (9.5:0.5) MeOH
23	215 – 218	EtOAc (9.5:0.5) MeOH
24	219 – 226	EtOAc (9:1) MeOH
25	227 – 234	EtOAc (8:2) MeOH
26	235 – 250	EtOAc (7:3) MeOH
27	251 – 260	Metanol 100%

Anexo 2

Columna cromatográfica a baja presión de acetato de etilo

Fracción de acetato de etilo (FAc)	Nº. Elución (15 mL)	Fase móvil
1	3 – 4	Hex (9:1) EtOAc
2	11 – 14	Hex (9:1) EtOAc
3	16 – 22	Hex (7:3) EtOAc
4	26 – 27	Hex (1:1) EtOAc
5	28	Acetato de etilo 100%
6	29 - 30	Metanol 100%

Anexo 3

Columna cromatográfica a baja presión de FH12

Fracción de FH12	Nº. Elución (15 mL)	Fase móvil
1	1	Hex (6:4) EtOAc
2	2	Hex (6:4) EtOAc
3	3	Hex (6:4) EtOAc
4	4	Hex (6:4) EtOAc
5	5 – 8	Hex (6:4) EtOAc
6	10 – 11	Hex (6:4) EtOAc
7	14 – 15	Hex (1:1) EtOAc
8	16 – 20	Hex (1:1) EtOAc

Columna cromatográfica a baja presión de FH22

Fracción de FH22	Nº. Elución (15 mL)	Fase móvil
1	1 – 2	EtOAc (9.5:0.5) MeOH
2	8 – 9	EtOAc (9.5:0.5) MeOH
3	18 – 23	EtOAc (9.5:0.5) MeOH
4	26 – 27	EtOAc (9.5:0.5) MeOH
5	39 – 44	EtOAc (9:1) MeOH
6	47 – 53	EtOAc (7:3) MeOH
7	56 – 60	EtOAc (7:3) MeOH
8	62 – 66	EtOAc (7:3) MeOH
9	70	EtOAc (1:1) MeOH
10	71	Metanol 100%

REFERENCIAS

- Abe, F., Nagao, T., Okabe, H. 2002. Antiproliferative constituents in plants 9.¹⁾ aerial parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 25(7) 920—922.
- Abhishek, B., Rohini, S., Malleshappa, N. 2011. Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. *International Journal of Phytomedicine.* 3: 09-26
- Acosta, S. 2004. Efecto antiproliferativo de extractos de miel de abeja y propóleos sonorenses sobre líneas celulares cancerígenas de humano y ratón. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México.
- Arango, A., Ramos, J., Zapata, B., Durán, C., Galvis, L., Stashenko, E. 2009. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104(6): 878-884.
- Arrebola, D., Rosario, L., López, Y., Díaz, D. 2003. Las plantas, fuente de agentes antimutagénicos y quimiopreventivos. *RETEL.* 21:37-51
- Bashir, S., Gali, H., Göransson, H., Larsson, R. 2010. Alpha Terpineol: A Potential Anticancer Agent which Acts through Suppressing NF-κB Signalling. *Anticancer Res.* 30 (6): 1911-1919.
- Crabas, N., Marongiu, B., Piras, A., Pivetta, T., Porcedda, S. 2003. Extraction, separation and isolation of volatiles and dyes from *calendula officinalis* L. and *aloesia triphylla* (L'her.) britton by supercritical CO₂. *J. Essent. Oil Res.* 15: 350-355.
- Clément, M.J., Rathinasamy, K., Adjadj, E., Toma, F., Curmi, P.A., and Panda, D. 2008. Benomyl and colchicine synergistically inhibit cell proliferation and mitosis: evidence of distinct binding sites for these agents in tubulin. *Biochemistry.* 47 (49): 13016–13025.

- Da Silva, C.C, Vandresen, F., De Oliveira, C., Kato, L., Tanaka, C., Ferreira, H. 2006. Chemical composition of *Aloysia gratissima* (Gill. et Hook) Tronc. (Verbenaceae). *Biochem Syst Ecol.* 34: 593-595.
- Dambolena, J., Zunino, M., Lucino, E., Zygodlo, J. 2010. Aromatic plants of northwest Argentina. Constituents of the essential oils of aerial parts of seven *Verbenaceae*: *Lantana* and *Aloysia*. *J. Essent. Oil Res.* 22: 289-293.
- De Oliveira, C.M.A., Da Silva, C.C., Heleno, D.F., Fátima Lemes, G., Elisangela, S. 2005. Kauranes, phenylethanoids and flavone from *Aloysia virgata*. *Biochem Syst Ecol.* 33: 1191-1193.
- Dudai, N., Weinstein, Y., Krup, M., Rabinski, T., Ofir, R. 2005. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. *Planta Med.* 71(5):484-8.
- Hister, C.A.L., Laughinghouse, H.D., Da Silva, C.B., Do Canto Dorow, T.S. and Tedesco, S.B. 2009. Evaluation of the antiproliferative effect of infusion and essential oil of *Aloysia gratissima*. *Pak. J. Bio. Sci.* 12 (24): 1581-1584.
- Ibarrola, H., Ibarrola, D., Montalbetti, Y., Kennedy, M., Heinichen, O., Campuzano, M., Tortoriello, J., Fernández, S., Wasowski, C., Marder, M., Lima, T., Mora, S. 2005. The anxiolytic-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. *J Ethnopharmacol.* 105 (3):400-8.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía. 2011. Instituto nacional de estadísticas y geografía, censo 2008.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía. 2010. Instituto nacional de estadísticas y geografía, censo 2008.
- León, C., Gómez, S., Morantes, S., Cordero, C., Ancízar, F. 2006. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad in vitro. *Biomedical.* 26:161-8

- Lizarbe, M.A. 2007. El suicidio y la muerte celular *Rev.R.Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat.* 101, (2): 1-31
- Morales, S.D. 2010. Evaluación de la actividad antiproliferativa de los extractos metanólicos de *Acalypha pringlei*, *Euphorbia xantii* y *Aloysia sonorensis* sobre las líneas celulares M12.A^k.C3F6 y L-929. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora. Sonora, México.
- Morales, S.D. 2011. Evaluación del efecto antiproliferativo de las fracciones hexánica, acetato de etilo, etanólica y residual del extracto metanólico de *Aloysia sonorensis* sobre las líneas celulares M12.A^k.C3F6, HeLa y L-929. Tesis de especialidad. Universidad de Sonora. Sonora, México.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65: 55-63.
- Moteki, H., Hibasami, H., Yamada, Y., Katsuzaki, H., Imai, K., Komiya, T. 2002. Specific induction of apoptosis by 1,8-cineole in two human leukemia cell lines, but not a in human stomach cancer cell line. *Oncol Rep.* 9(4):757-60.
- Nagao, T., Abe, F., Kinjo, J. Okabe, H. 2002. Antiproliferative constituents in plants 10. flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* BRIQ and consideration of structure–activity relationship. *Biol. Pharm. Bull.* 25(7): 875—879.
- Nagao, T., Abe, F., Okabe, H. 2001. Antiproliferative constituents in the plants 7. leaves of *Clerodendron bungei* and Leaves and Bark of *C. trichotomum*¹⁾. *Biol. Pharm. Bull.* 24(11) 1338—1341.
- Oliva, M., Gallucci, N., Zygadlo, J.A. and Demo, M.S. 2007. Cytotoxic activity of argentinean essential oils on artemia salina. *Pharmaceutical Biology.* 45 (4): 259–262.

- Organización Mundial de la Salud. 2000. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. World Health Organization Geneva.
- Peralta, O., Bahena, M., Díaz C., Madrid, V. 1997. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública, México*. 5:451–452.
- Quezada, M. 2007. El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias. Tesis de Licenciatura. Universidad autónoma de Monterrey.
- Risinger, A.L., Giles, F.J., Mooberry, S.L. 2008. Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer treat rev.* 35 (3):255-261.
- Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N. 2005. Robbins y Cotran Patología estructural y funcional. 7th ed. Elsevier. Madrid, España.
- Vandresen, F., Schmitt, E., Kato, L., Alves de Oliveira, C., Aparecida Bersani Amado, C., Da Silva, C.B. 2010. Constituintes químicos e avaliação das atividades antibacteriana e antiedematogênica de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. e *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., Verbenaceae. *Phcog J.* 20(3): 317-321.
- Yetman, D., Devender, T. 2002. Mayo ethnobotany: land, history, and traditional knowledge in northwest Mexico. Ch. 6 Plant uses. University of California (Ed), p.120. London, England.
- Zapata, B., Durán, C., Stashenko, E., Correa-Royero, J., Betancur-Galvis, L. 2009. Cytotoxic activity of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K and its major constituents. *Salud UIS.* 41: 215-222.
- Zamorano-Ponce, E., Morales, C., Ramos, D., Sepúlveda, C., Cares, S., Rivera, P., Fernández, J., Carballo, M.A. 2006. Anti-genotoxic effect of *Aloysia triphylla* infusion against acrylamide-induced DNA damage as shown by the comet assay technique. *Mutat res-fund mol m.* 603: 145-150.