

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

Determinación de la Actividad, Antioxidante, Antiinflamatoria,
Antiproliferativa y Perfil Químico de Extractos de *Ziziphus obtusifolia*

TESIS

Que para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias
(Químico Biológicas y de la Salud)

Presenta:

Edna Delia Molina Romo

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



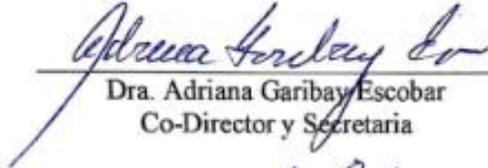
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador Designado para revisar el Trabajo de Tesis de **Edna Delia Molina Romo**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda
Director



Dra. Adriana Garibay Escobar
Co-Director y Secretaria



Dr. Eduardo Ruiz Bustos
Vocal



Dra. Olivia Valenzuela Antelo
Vocal



Dr. Javier Hernández Martínez
Vocal

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A la memoria de mis padres: Rómulo Molina Romero y María Elena Romo Ramírez

A mis hermanos: Luly, Daniel, Maty y Amanda

A mis hijos: Jesús Edel, Edna María y Saúl Ricardo

A mi nieto: Miguel Ángel

A quien un día leerá este escrito

Con especial gratitud a:

- Dios por permitirme ser, hacer y estar.
- Universidad de Sonora y Departamento de Ciencias Químico Biológicas por su apoyo y confianza.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme apoyo económico durante el estudio del posgrado.
- Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda, mi Director, por su apoyo y guía en todo momento. Por toda la paciencia y la fe depositada en mi persona.
- Dra. Adriana Garibay Escobar, Dra. Olivia Valenzuela Antelo, Dr. Eduardo Ruiz Bustos, Dr. Javier Hernández Martínez; quienes formaron parte del comité sinodal, por su enseñanza y dedicación invaluable.
- Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras por todo su apoyo desde la coordinación del posgrado.
- M.C. Denia Abril que siempre me dedicó su amable y profesional atención.
- Dr. Javier Hernández Martínez y personal del Laboratorio de química de productos naturales de la Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica (SARA) de la Universidad Veracruzana, donde realice estancia de investigación.
- M.C. Martha Judith Valdez y M.C. Lucila Rascón por su apoyo en el trabajo de laboratorio.
- M.C. Liliana Pérez, Dra. Carmen María López Saiz, Dr. Víctor Manuel Ocaño, por su orientación científica
- Dr. Heriberto Torres Moreno por su amistad, enseñanza y apoyo.
- A Dr, Efraín Alday Noriega por todas las experiencias compartidas durante la estancia de Xico, por todas sus observaciones y consejos, por su amistad.
- Dr. Wagner Vilegas y compañeros del laboratorio de investigación en Química Universidad Estadual Paulista en Sao Vicente, Brasil, donde realice la segunda estancia de investigación.
- A todos mis compañeros maestros del Departamento de Ciencias Químico Biológicas, por sus palabras de ánimo.
- A los estudiantes de posgrado con quienes compartí bellos momentos durante nuestro trabajo en los Laboratorios de Productos Naturales, de Química e Inmunología.

INDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
OBJETIVOS	ix
General.....	ix
Particulares.....	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Panorama Mundial del Cáncer.....	4
Estadísticas.....	4
Biología del Cáncer.....	5
Desarrollo del Cáncer.....	5
Ciclo Celular.....	6
Muerte Celular por Apoptosis.....	8
Cambios Bioquímicos en la Apoptosis.....	9
Actividad Antioxidante.....	10
Inflamación.....	12
Producción de Óxido Nítrico Durante la Inflamación.....	13
La Etnobotánica en el Desarrollo de Nuevos Fármacos.....	14
Metabolitos Secundarios.....	15
Triterpenos y su Biosíntesis.....	16
Flavonoides.....	18
Saponinas.....	19
Compuestos Fenólicos.....	19
Glicósidos.....	19

Alcaloides.....	19
Metabolitos Secundarios como Antiinflamatorios.....	20
Plantas de Género <i>Ziziphus</i> con Actividad Antiproliferativa.....	20
<i>Ziziphus obtusifolia</i>	23
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Colecta y Preparación del material vegetal de <i>Ziziphus obtusifolia</i>	25
Actividad Antioxidante.....	25
Método DPPH.....	27
Método FRAP.....	27
Actividad Antiinflamatoria.....	28
Cultivo Celular.....	28
Actividad Citotóxica.....	28
Cuantificación de la Producción de Óxido Nítrico.....	29
Preparación de Extractos Metanólico y fracción de <i>n</i> -hexano de <i>Ziziphus obtusifolia</i>	29
Obtención de las Fracciones del Extracto Metanólico de <i>Ziziphus obtusifolia</i>	30
Fraccionamiento de Extracto Crudo de Hexano por HPLC.....	30
Fraccionamiento por Cromatografía en Columna de la Fracción <i>n</i> -hexano del Extracto Metanólico.....	32
Evaluación de la Actividad Antiproliferativa.....	32
Líneas Celulares.....	32
Ensayo de Viabilidad Celular.....	32
Actividad Apoptótica del Extracto Metanólico y su Fracción de <i>n</i> -hexano...	33
Inducción de la Apoptosis.....	33
Efecto de los Extractos Sobre el Potencial de Membrana Mitocondrial...	34
Evaluación de la Actividad Antiproliferativa de Subfracciones.....	35
Preparación de los Tratamientos a Evaluar.....	35
Obtención del Perfil Químico de Extractos Hidroalcohólicos.....	35

Preparación de Muestras.....	35
Condiciones Instrumentales de HPLC-MS.....	36
RESULTADOS	37
Evaluación de la Actividad Antioxidante por los Métodos DPPH y FRAP...	37
Método DPPH.....	37
Método FRAP.....	37
Actividad Antiinflamatoria.....	40
Efecto de los Extractos Sobre la Producción de NO.....	40
Ensayo de Actividad Antiproliferativa de Extracto Metanólico.....	43
Actividad Apoptótica del Extractos Metanólico y su Fracción de <i>n</i> -hexano..	46
Tinción con Anexina V-FITC y PI.....	46
Despolarización del Potencial de Membrana Mitocondrial.....	46
Fraccionamiento del extracto crudo de <i>n</i> -hexano por RP-HPLC.....	50
Actividad Antiproliferativa de Fracciones y Subfracciones de Extracto Crudo de <i>n</i> -hexano.....	50
Perfil Químico de la Fracción H3 y Subfracciones.....	55
Perfil Químico determinado por HPLC-MS de Extractos Hidroalcohólicos de <i>Ziziphus obtusifolia</i>	55
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	66
REFERENCIAS	67

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Colecta de especímenes de <i>Ziziphus obtusifolia</i> en el Estado de Sonora, México.....	26
II	Características de los disolventes utilizados para el fraccionamiento del extracto metanólico crudo.....	31
III	Actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de <i>Ziziphus obtusifolia</i> por el método de DPPH.....	38
IV	Actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos por el método de FRAP.....	39
V	Inhibición del porcentaje de producción de óxido nítrico causado por los extractos hidroalcohólicos.....	42
VI	Actividad antiproliferativa de fracciones de solventes obtenidas del extracto metanólico determinada mediante MTT.....	44
VII	Actividad antiproliferativa de las fracciones cromatográficas de la fracción de <i>n</i> -hexano obtenida por columna abierta con sílica gel determinada mediante MTT.....	45
VIII	Porcentaje de células HeLa en apoptosis inducida por los tratamientos con extracto metanólico y su fracción de <i>n</i> -hexano....	47
IX	Condiciones de elusión del equipo HPLC para fraccionar el extracto crudo de <i>n</i> -hexano.....	52
X	Condiciones para subfraccionar a la fracción H3 del extracto crudo de <i>n</i> -hexano mediante HPLC.....	53
XI	Actividad antiproliferativa mediante MTT en la línea celular HeLa del extracto crudo de <i>n</i> -hexano, fracciones y subfracciones de H3.....	54
XII	Metabolitos del extracto crudo de <i>n</i> -hexano.	56

XIII	Compuestos encontrados en los extractos hidroalcohólicos de las partes aéreas de especímenes de <i>Ziziphus obtusifolia</i> de diferentes regiones del Estado de Sonora.....	57
-------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Proceso de carcinogénesis	7
2	Vías de activación de la apoptosis.....	11
3	Partes aéreas de <i>Ziziphus obtusifolia</i>	24
4	Efecto del tratamiento con extracto de Hermosillo en distintas concentraciones y LPS sobre la producción de óxido nítrico en células RAW 264.7.....	41
5	Apoptosis inducida por el extracto metanólico y su fracción de <i>n</i> -hexano.....	48
6	Despolarización de la membrana mitocondrial de células HeLa, causada por el efecto de los extractos metanólico y fracción de <i>n</i> -hexano de <i>Ziziphus obtusifolia</i>	49
7	Proceso de fraccionamiento del extracto crudo de <i>n</i> -hexano por RP-HPLC y evaluación de actividad antiproliferativa.....	51
8	Compuestos encontrados en los extractos de <i>Ziziphus obtusifolia</i>	62
9	Actividad de los compuestos en el proceso de carcinogénesis.....	65

OBJETIVOS

General

Determinar la actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiproliferativa y el perfil químico de extractos de *Ziziphus obtusifolia* recolectada de diferentes zonas del estado de Sonora.

Particulares

- a) Evaluar la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de *Ziziphus obtusifolia* mediante los métodos DPPH y FRAP.
- b) Determinar la actividad antiinflamatoria de extractos hidroalcohólicos de *Ziziphus obtusifolia*, mediante la reducción de la producción de óxido nítrico en cultivo celular utilizando células RAW 264.7.
- c) Evaluar la actividad antiproliferativa y apoptótica del extracto metanólico de *Ziziphus obtusifolia* y sus fracciones, mediante el método de MTT.
- d)** Determinar el perfil químico de extractos hidroalcohólicos de *Ziziphus obtusifolia* mediante HPLC-MS y relacionarlo con sus actividades biológicas.

RESUMEN

Los casos de cáncer han aumentado exponencialmente en los últimos años, siendo la segunda causa de muerte en el mundo. Se requieren tratamientos más selectivos y eficaces; las fuentes más prometedoras en estudio son los productos naturales, principalmente del reino vegetal. *Ziziphus obtusifolia*, planta nativa del estado de Sonora, México, ha sido utilizada en la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades, incluyendo al cáncer (López Hinojosa, 1998). Ante la escasa información acerca de esta planta, el objetivo del presente trabajo fue determinar actividades biológicas (antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa) y perfil químico de extractos de 13 especímenes de *Z. obtusifolia* colectados de diferentes localidades del Estado de Sonora, ubicadas en el norte, centro y sur del territorio. Se determinó la actividad antioxidante por los métodos DPPH y FRAP. Los resultados obtenidos de la determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), mostraron que el extracto con mayor actividad fue el de Carbó-Rayón (IC₅₀ 0.53 mg/mL), en comparación con el control de ácido ascórbico (IC₅₀ de 0.27 mg/mL). Por el método de FRAP, el extracto más activo fue el de Caborca (0.018 μmol ET/g), significativamente superior a los demás extractos (p<0.05). La actividad antiinflamatoria determinada por la reducción de la producción de óxido nítrico (NO), por el sobrenadante de cultivos de células RAW 264.7 estimuladas con extractos y LPS, utilizando el reactivo de Griess, mostró que la mayoría de los extractos presentaban actividad con una IC₅₀ menor a 200 μg/mL. El perfil químico se obtuvo por HPLC-MS, identificando triterpenos, flavonoides y saponinas, mediante sus patrones de fragmentación. Por otro lado, se preparó un extracto metanólico y sus fracciones con solventes, probando la actividad antiproliferativa mediante el método de MTT, siendo la fracción de *n*-hexano la más activa en un panel de líneas celulares. Asimismo, se determinó la actividad apoptótica de estos dos extractos mediante tinciones con anexina V-FITC, PI y JC1, resultando ser más activa la fracción de *n*-hexano que el extracto metanólico. En el presente trabajo se identificaron extractos de *Z. obtusifolia*,

constituidos por triterpenos, fenoles, flavonoides y saponinas entre otros, con actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiproliferativa y apoptótica.

INTRODUCCIÓN

Debido a que el cáncer representa un grave problema de salud pública y los tratamientos actuales son insuficientes, es necesario llevar a cabo investigaciones para la generación de nuevos tratamientos, mejor dirigidos y con menores efectos colaterales. Esta enfermedad está asociada a una inflamación crónica, la cual es una reacción natural que desencadena un organismo para proteger un sitio del cuerpo ante la invasión de un agente infeccioso, toxina, daño físico, químico o traumático. En general, las enfermedades crónicas inflamatorias están también entre las primeras causas de morbilidad en el mundo (Ray y col., 2015).

Durante la inflamación, las células secretan citocinas y se producen sustancias, entre ellas los radicales libres, generados como resultado de reacciones propias del organismo y frecuentemente neutralizados de manera natural mediante componentes antioxidantes endógenos como enzimas catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glutatión, superóxido dismutasa, ubiquinona o coenzima-Q y exógenos como vitamina C, vitamina E, beta carotenos, flavonoides, etc. (Ray y col., 2015). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (NOS) son ejemplos de radicales libres, y su concentración desequilibrada está implicada en diversas patologías, entre ellas las neoplasias. Dentro de dichas especies reactivas está el óxido nítrico (NO), molécula de vida corta producida con ayuda de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a partir del aminoácido arginina; entre sus funciones está la de mantener la homeostasis vascular y actuar como neurotransmisor. Por otro lado, un incremento en la concentración de NO favorece la generación de un ambiente propicio para el desarrollo de tumores (Coussens y Werb, 2002).

Tradicionalmente se ha encontrado utilidad en las plantas como tratamiento para padecimientos proinflamatorios, ya que son una fuente muy importante de metabolitos secundarios, que cuando se estudian sus propiedades farmacológicas y mecanismo de acción, pueden llegar a ser el principio activo de fármacos de patente. La validación científica del potencial terapéutico de moléculas candidatas a fármacos, así como de

extractos vegetales con finalidad farmacológica, inicialmente son evaluados mediante ensayos *in vitro*. La capacidad antiinflamatoria de una sustancia puede ser evaluada mediante la cuantificación de NO, que es producido por macrófagos estimulados *in vitro* con lipopolisacarido (LPS), donde la disminución de la concentración NO en el cultivo celular se interpreta como la actividad antiinflamatoria del estímulo (Paulino y col., 2008). Una de las estrategias utilizadas para identificar sustancias con potencial inhibitorio en células cancerosas *in vitro*, se basa en la evaluación de actividad antiproliferativa mediante metodologías como la reducción de sales de tetrazolio (MTT, entre otras). Estos ensayos son las primeras pruebas que se realizan cuando se investiga si los compuestos químicos en cuestión, pueden ser considerados candidatos terapéuticos contra el cáncer y procesos inflamatorios relacionados, para posteriormente determinar los mecanismos moleculares que se activan en modelos biológicos *in vitro* o *in vivo*, con estos tratamientos a determinadas concentraciones, como por ejemplo conocer si el efecto sería la activación de una vía de apoptosis, en la cual ocurren eventos tales como la translocación de la fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana celular a la cara externa y la despolarización de la membrana mitocondrial. Estos efectos pueden detectarse con metodologías que emplean citometría de flujo, con ayuda de tinciones con anexina V-FITC, PI y JC-1 entre otras (Bunel y col., 2014).

Las propiedades farmacológicas de los productos naturales, se deben en gran medida a los compuestos que los constituyen, específicamente los relacionados al metabolismo secundario presente en las plantas. Estos metabolitos, generalmente varían de una especie a otra, incluso en la misma especie, dependiendo del ambiente en el que la planta se encuentre. El estudio del perfil químico de las plantas proporciona la información necesaria para saber a qué compuestos atribuir sus propiedades y se lleva a cabo mediante metodologías de HPLC-MS (Cannell, 1998).

Ziziphus obtusifolia (*Z. obtusifolia*), conocida comúnmente como Bachata o Jutuki, es una planta con usos medicinales en etnias del estado de Sonora, México, como las tribus Yaqui y Mayo, quienes la utilizan para tratar diversos padecimientos incluyendo diabetes, gonorrea, infecciones estomacales, sífilis, efectos de la embolia y cáncer (Martin

y col., 1998; Yetman y Van Devender, 2002). En la investigación de productos naturales con efectos anticancerígenos se han estudiado algunas plantas, entre ellas las del género *Ziziphus* como por ejemplo: *Ziziphus jujube*, *Z. mauritiana* y *Z. nummularia*, que son utilizadas en China y Japón desde la antigüedad por tener efectos tales como: hipoglucemiante, hipotensor, antiinflamatorio, antimicrobiano, antioxidante, antitumoral y útil en padecimientos hepáticos y como estimulante del sistema inmune (Dureja y Dhiman, 2012).

A pesar de que se reconocen actividades farmacológicas de *Z. obtusifolia* en la medicina tradicional, no existen estudios de sus principios activos o de sus actividades biológicas, que la validen científicamente como una fuente de compuestos con potencial terapéutico. Por lo que el presente estudio tuvo como objetivo estudiar la actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiproliferativa y el perfil químico de esta planta.

ANTECEDENTES

Panorama Mundial del Cáncer

Estadísticas

El cáncer representa un grave problema de salud pública y de acuerdo con los reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), los tipos de cáncer con mayor incidencia en el mundo son el de pulmón, hígado y colorrectal (OMS, 2017); el tabaquismo es el causante de aproximadamente el 22% de las muertes por cáncer pulmonar (Siegel y col., 2017). Se estima que el 80% de los casos de cáncer en adultos son prevenibles (OPS, 2015). Entre otras causas están las infecciones como la hepatitis B y C, el virus de papiloma humano que desencadenan la formación de tumores malignos (OMS, 2017). En el mundo la incidencia de cáncer infantil es de 12.45 casos por cada 100 000 personas en edades de 0 a 14 años, principalmente asociado a la herencia, exposición a sustancias químicas, radiaciones ionizantes, o a medicamentos ingeridos por la madre durante la gestación (OPS, 2015). El cáncer de mama es el más frecuente y la mayor causa de muerte en mujeres, con alrededor de 1.5 millones de casos cada año (OMS, 2015). Según el INEGI en 2016, en México, el cáncer de mama fue la principal causa de mortalidad en mujeres de 20 años o más.

Durante el 2014, hubo mayor presencia de cáncer de órganos hematopoyéticos en varones, con un 59.2% en comparación con las mujeres. El segundo lugar lo ocupan los tumores de sistema linfático y tejidos afines (8.6%), después el de hueso y cartílagos de articulaciones (6.8%), el cual ocupa el segundo lugar en mujeres (6%), mientras que en el tercer lugar para mujeres están las neoplasias de sistema linfático y tejidos afines, las de encéfalo y otras partes del sistema nervioso central (5.9%) (OPS, 2015). El cáncer de órganos genitales tiene la segunda tasa más alta de mortalidad en México por tumores malignos en varones de 20 años (INEGI, 2016).

Biología del Cáncer

Desarrollo del Cáncer

El tiempo que tarda el cáncer en desarrollarse en humanos puede abarcar varios años. El proceso de carcinogénesis comienza cuando una célula normal se transforma mediante la activación de protooncogenes y la supresión de genes como p53. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres categorías de agentes externos, a saber: carcinógenos físicos como radiaciones (ultravioleta e ionizantes), carcinógenos químicos como los asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) o el arsénico (contaminante del agua), carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos. La célula transformada comienza a exhibir las propiedades de una célula cancerosa. Tal transformación las hace independientes a señales de crecimiento y resistentes a las señales de detener el crecimiento, lo que resulta en una proliferación incontenible (Figura 1). Además, estas células son capaces de evadir la muerte celular programada o apoptosis, dando como resultado el crecimiento tumoral.

Todo proceso de transformación en algunas células puede tomar de 10 a 20 años. La incidencia del cáncer aumenta con la edad, muy probablemente por la acumulación de factores de riesgo. La acumulación general de estos se combina con la tendencia que tienen los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad (OMS, 2017). El crecimiento del tumor es ayudado por la angiogénesis, que no solo proporciona nutrición al tumor, sino que también permite su invasión a los tejidos circundantes y su metástasis a tejidos distantes. La metástasis es generalmente letal (Yadav y col., 2010).

Algunos tipos de cáncer, a pesar de ser diseminados como leucemias y linfomas en niños, tienen tasas de curación elevadas si se tratan adecuadamente (Ferlay y col., 2010). Sin embargo, una de las preocupaciones principales con este tratamiento es la manifestación de toxicidad y efectos secundarios graves. Por otra parte la multirresistencia contra los medicamentos del cáncer es un desafío aún mayor (Umthong y col., 2011).

Ciclo Celular

El ciclo celular de los mamíferos es altamente organizado y regulado, proceso que garantiza la duplicación del material y división celular. Esta organización involucra señales reguladoras del crecimiento, así como señales de proteínas que monitorean la integridad genética para determinar la ausencia de daño genético. La proliferación depende de la progresión a través de cuatro fases distintas de la célula que conforman el ciclo: G1, S, G2 y M (Otto y Sicinski, 2017).

Las fases G1, S y G2 forman colectivamente la interfase. El contenido de ADN de células animales en fase G1 es $2N$ (siendo N el número de cromosomas), también conocido como diploide, mientras que el contenido de ADN de estas células en fase G2 es $4N$ (tetraploide). El contenido de ADN de una célula en la fase S varía entre $2N$ y $4N$, dependiendo de la etapa de replicación del ADN. La fase M a su vez se compone de dos procesos: mitosis (los cromosomas son igualmente divididos entre las dos células hijas) y la citocinesis (o división celular, en la cual el citoplasma de la célula se divide para formar dos células hijas independientes). Típicamente, el tiempo requerido para un solo ciclo celular durante la proliferación de células humanas en cultivo es de 24 horas. De estas, la fase M tarda aproximadamente una hora y la interfase, las 23 horas restantes (Yang, 2012).

El ciclo celular está regulado por varias quinasas dependientes de ciclina (CDK) que actúan en complejo con su correspondiente ciclina. Las actividades de las CDK implicadas en la regulación del ciclo celular están estrechamente controladas, ya que al ser inducidas por señales mitogénicas, deben también ser inhibidas por la activación de los puntos de control del ciclo celular en respuesta al daño del ADN. La activación aberrante de proteínas CDK, es frecuente en cánceres humanos (Otto y Sicinski, 2017).

El cáncer se caracteriza por una actividad aberrante del ciclo celular. Esto ocurre ya sea como resultado de mutaciones en el flujo ascendente en las vías de señalización, o por lesiones genéticas en genes que codifican a proteínas del ciclo.

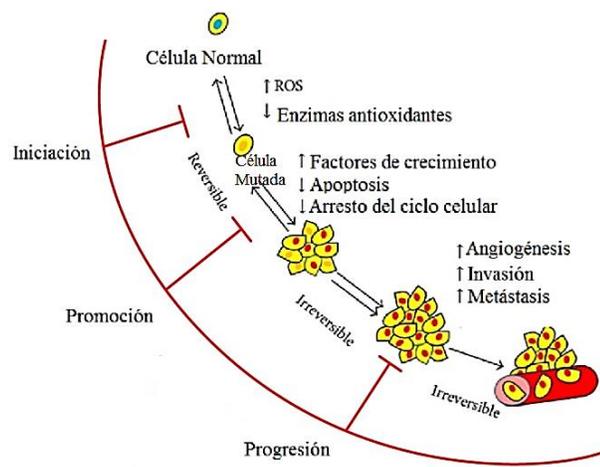


Figura 1. Proceso de carcinogénesis (Trejo-Solis y col., 2013).

Muerte Celular por Apoptosis

La apoptosis es el proceso de la muerte celular programada más estudiado, que se produce en casi todos los tejidos, siendo importante para el desarrollo normal y la homeostasis tisular. Presenta cambios morfológicos como: contracción celular, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos (Kerr y col., 1972; Zhang y col., 2017).

Mientras que la apoptosis puede ser inducida por una variedad de estímulos y condiciones fisiológicas o patológicas, está mediada por la vía del receptor de muerte extrínseca o por la vía mitocondrial intrínseca (Elmore, 2007). La vía extrínseca implica el reclutamiento y la activación de la pro caspasa-8, la cual ya activa, estimula directamente a las caspasas efectoras como la caspasa-3 para iniciar el proceso de ejecución (Onal y col., 2016).

La ruta apoptótica intrínseca está mediada por la escisión de BID, que se transloca posteriormente a la mitocondria y activa miembros de la familia BCL-2 y BAX (proteína X asociada a BCL-2) y BAK (antagonista de BCL-2). Tras la activación, BAX y BAK inducen la permeabilización mitocondrial de la membrana externa y la liberación del contenido mitocondrial pro-apoptótico en el citoplasma, como citocromo c y otras proteínas intermembranales mitocondriales solubles (Pradelli y col., 2010). El citocromo c liberado promueve la oligomerización de APAF-1 (factor 1 activador del péptido apoptótico), una proteína adaptadora que contiene un dominio de reclutamiento de caspasas. Una APAF-1 heptamérica recluta a procaspasa-9 inducida por la proximidad, que a su vez escinde y activa a las caspasas efectoras (Figura 1) (Jiang y Wang, 2004). La convergencia entre las vías extrínseca e intrínseca puede ocurrir ya que ambas pueden usar el mismo mecanismo de ejecución para provocar la muerte celular. La vía de ejecución común se inicia mediante la escisión de caspasas efectoras: caspasa-3,-6,-7 y da como resultado la fragmentación del ADN, la reorganización del citoesqueleto, la condensación del citoplasma y la formación de los cuerpos apoptóticos (Degterev y Yuan, 2008; Elmore, 2007; Li e Yuan, 2008; Zhang y col., 2017).

Cambios Bioquímicos en la Apoptosis

Existen tres tipos principales de cambios bioquímicos que pueden verse en la apoptosis: activación de las caspasas, rotura de ADN y otras proteínas y cambios de la membrana y en este último cambio, es cuando ocurre la despolarización de la membrana mitocondrial que puede evidenciarse mediante la tinción con JC-1 que se describirá más adelante. El último cambio es cuando ocurre el reconocimiento por parte de las células fagocíticas.

Inicialmente, durante la apoptosis hay expresión de fosfatidilserina (PS) en las capas externas de la membrana celular, que han hecho una translocación desde la capa más interna. Esta fase de la apoptosis puede evidenciarse *in vitro* en el laboratorio mediante la tinción con anexina V-FITC de células estimuladas con el compuesto o extracto de interés. Cuando la externalización de la PS sucede *in vivo* permite el reconocimiento temprano de células muertas por los macrófagos, lo que resulta en fagocitosis. Esto es seguido de una rotura característica del ADN en piezas grandes, por parte de las endonucleasas.

Otra característica específica de la apoptosis es la activación de un grupo de enzimas de la familia de la cisteína-proteasas. La “c” de caspasa se refiere a cisteína-proteasa en tanto el “aspasa” se refiere a la propiedad única de la enzima de romper siempre después de residuos aspárticos. Las caspasas activadas degradan muchas proteínas celulares vitales y rompen la estructura nuclear y el citoesqueleto, también activan a las DNAsas que degradan al ADN nuclear. Aunque los cambios bioquímicos explican en parte algunos de los cambios morfológicos de la apoptosis, es importante notar que el análisis bioquímico de la fragmentación del ADN o la activación de las caspasas no deberían ser usados para definir a un proceso apoptótico, ya que puede ocurrir apoptosis sin fragmentación del ADN y puede ser caspasa-independiente (Onal y col., 2016).

En algunas células, el tratamiento de drogas y otros estímulos pueden desencadenar una compleja serie de reacciones bioquímicas que parecen constituir un programa de suicidio celular, culminando en apoptosis (Figura 2), que en condiciones

normales, juega un papel importante en el desarrollo temprano de la homeostasis de los tejidos adultos. La apoptosis, es hasta ahora conocida por ser desencadenada por tres estímulos principales: Por receptores de la superficie de la célula tales como FAS, la respuesta al estrés mitocondrial, y a células T citotóxicas (Elmore, 2007).

El receptor FAS (CD95) es un mediador de señalización de apoptosis por el ligando de FAS que se expresa en la superficie celular. La unión de FAS a FAS-ligando activa la señalización apoptótica a través de la activación de las caspasas. La caspasa-8 es la iniciadora que degrada y activa otras caspasas ejecutoras (Figura 2) (Zimmermann y col., 2001).

Actividad Antioxidante

El cuerpo humano tiene sistemas naturales de protección contra los radicales libres y el estrés oxidativo diseñados para proteger la salud. El riesgo de enfermedades infecciosas o cáncer se incrementa a medida que el sistema inmune se debilita a través de procesos como el envejecimiento entre otros. Las células son bombardeadas por radicales libres, normalmente para proteger de virus, bacterias y sustancias extrañas. Cuando nuestras defensas antioxidantes son adecuadas, el daño causado por los radicales libres se repara sin muchas consecuencias. Sin embargo, cuando se genera una cantidad excesiva de radicales libres, puede dañar proteínas (incluyendo enzimas), lípidos y el ADN, llegando a alterar la señalización celular y causar una variedad de enfermedades.

Los radicales de oxígeno (ROS) no sólo se generan en las mitocondrias; los neutrófilos y macrófagos los producen a través de una membrana plasmática unida a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida (NADPH)-oxidasa. Los radicales se generan para matar células y bacterias. La NADPH-oxidasa no es exclusiva de estas células, sin embargo se demostró que los paneles de líneas celulares tumorales humanas producen grandes cantidades de peróxido de hidrógeno *in vitro* (Halliwell y Cross, 1994).

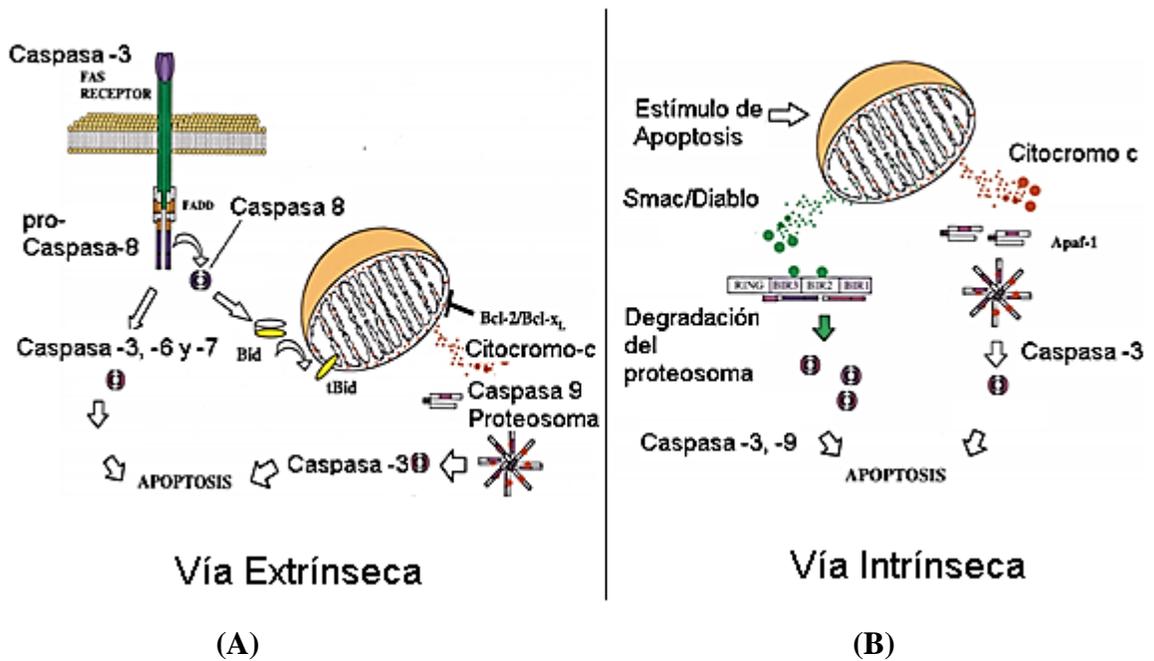


Figura 2. Vías de activación de la apoptosis.

La vía extrínseca (A) se inicia mediante la unión de un ligando de muerte a un receptor especializado, y termina con la activación de la caspasa-8. La vía intrínseca (B) se inicia a partir de señales intracelulares, participa en aquellas muertes, como las debidas a radiaciones. Aquí juegan un papel fundamental las proteínas Bcl-2 que se encuentran en la mitocondria. La vía por estrés del retículo endoplasmático se activa cuando este último sufre alguna alteración, se pone en funcionamiento la procaspasa-12 la cual se conecta con otras caspases induciendo la apoptosis (Zimmermann y col., 2001).

Los radicales libres de oxígeno son poderosos agentes dañinos del ADN que pueden causar sustitución de bases, pérdida de segmentos y fragmentación de las cadenas que pueden inactivar genes supresores de tumores o aumentar la expresión de protooncogenes, eventos iniciales críticos en la carcinogénesis. Además la oxidación de lípidos y proteínas celulares puede afectar adversamente varios pasos del proceso carcinogénico a través de cambios en una variedad de funciones reguladoras celulares, incluyendo la transducción de señales y la expresión génica (McKeown, 1999).

El proceso inflamatorio induce estrés oxidativo y reduce la capacidad antioxidante celular. Los radicales libres producidos en exceso, reaccionan con los ácidos grasos de la membrana celular y se afecta la función de las proteínas permanentemente. Además, los radicales libres pueden producir mutación y daño en el ADN que puede ser un factor predisponente para el cáncer y relacionado con los trastornos de la edad. Los radicales libres en las enfermedades humanas pueden ayudar a los investigadores a considerar a los antioxidantes como agentes adecuados en la medicina preventiva, especialmente para cáncer y procesos de envejecimiento (Khanna y col., 2014).

Entre las fuentes ricas en antioxidantes están las frutas y las verduras. Los antioxidantes son compuestos como la vitamina C, tocoferol, compuestos fenólicos, β -caroteno. Los compuestos fenólicos son poderosos antioxidantes en virtud de las propiedades de donación de hidrógeno de sus grupos hidroxilo, así como por la donación de electrones para detener reacciones en cadena de radicales libres que emergen del estrés oxidativo (Koley y col., 2016).

Inflamación

La inflamación es una respuesta biológica compleja con eventos fisiopatológicos mediados por varias moléculas de señalización producidas por los leucocitos, macrófagos y mastocitos (Sengar y col., 2015). Durante el proceso inflamatorio mejora la permeabilidad vascular aunada a la migración de los elementos formes de la sangre y en el sitio inflamado hay edema, eritema y dolor. Varios mediadores inflamatorios como el NO, prostaglandina-2, interleucinas y el factor de necrosis tumoral- α , juegan un papel

importante en su desarrollo (Dewanjee y col., 2013). La inflamación es la principal causa de morbilidad en todo el mundo (Ray y col., 2015). Si no se trata, puede conducir a diversas enfermedades asociadas, como artritis, aterosclerosis e incluso cáncer. La inflamación es una reacción natural a la invasión por un agente infeccioso, toxina o daño físico, químico o traumático. Un propósito de la inflamación es proteger el sitio de una lesión. Algunas de las afecciones inflamatorias se pueden reconocer por su sufijo “itis”: artritis, apendicitis, gastritis, laringitis, pancreatitis, dermatitis, meningitis, peritonitis. Dos condiciones inflamatorias con terminación distinta son asma (generalmente causada por una alergia a una sustancia ingerida) y neumonía, una reacción inflamatoria a los microorganismos invasores de los pulmones. Algunas de las condiciones anteriores son muy serias y si no se controlan causan la muerte (Khanna y col., 2014).

El proceso inflamatorio a menudo se asocia con el daño causado por los radicales libres y estrés oxidativo y puede no causar dolor, ya que algunos órganos internos no transmiten dolor. La inflamación crónica es una condición patológica caracterizada por actividad continua de respuesta inflamatoria y destrucción tisular. Muchas de las células que incluyen macrófagos, neutrófilos y eosinófilos están involucrados directamente o en la producción de citocinas en la patología de la inflamación crónica, que puede ser una causa de cáncer y procesos rápidos de envejecimiento. Por otra parte, muchos estudios sugieren que la inflamación crónica podría tener un papel importante en una variedad de enfermedades relacionadas con la edad, incluida la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y enfermedades autoinmunes (Ray y col., 2015).

Producción de Óxido Nítrico Durante la Inflamación

El NO es una molécula de vida corta producida por la enzima conocida como óxido nítrico sintasa (NOS), en una reacción que convierte la arginina y el oxígeno en citrulina y NO. Hay tres isoformas de la enzima: neuronal, inducible y endotelial, pudiéndose cada una expresar en una variedad de tejidos y tipos de células. El NO tiene un papel en el cáncer, fisiopatología del miocardio, patologías del sistema nervioso central y en otras enfermedades como la inflamación y el asma, enfermedades hepáticas crónicas,

enfermedad inflamatoria del intestino, artritis, enfermedades cardiovasculares, del páncreas, pulmón, riñón. Es una molécula presente en lugares en los que desempeña actividades como son: el mantenimiento de la homeostasis vascular, en la lucha contra las infecciones, actuando como neurotransmisor y tiene un papel importante en el cáncer. Juega un papel en la modulación fisiológica del tono de la arteria coronaria y la función del miocardio.

Durante mucho tiempo se ha sabido que hay una relación entre la inflamación crónica y los radicales libres, el estrés celular y la tumorigénesis (Coussens y Werb, 2002). Los tejidos malignos están infiltrados por leucocitos que secretan descontroladamente citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento, enzimas que degradan la matriz, radicales libres y oxidantes. Esto crea un microambiente que puede mejorar la proliferación celular, supervivencia y migración, así como la angiogénesis, promoviendo el desarrollo de tumores (Kanwar y col., 2009; Kanwar y col. 2008; Wink y col., 2008). Por todo lo anterior es que la producción de NO tiene gran interés entre los investigadores de todo el mundo (Ray y col., 2015).

La Etnobotánica en el Desarrollo de Nuevos Fármacos

La Etnobotánica es importante para la investigación farmacológica y desarrollo de nuevos fármacos, no sólo cuando los constituyentes de plantas se utilizan directamente como agentes terapéuticos, sino también cuando se utilizan como materiales de partida para la síntesis o como modelos para compuestos farmacológicamente activos (Li y Vederas, 2009). Hace alrededor de 200 años, la morfina fue el primer compuesto puro farmacológicamente activo, opioide que se extrae a partir de semillas de las vainas de amapola *Papaver somniferum*. Este descubrimiento demostró que los compuestos aislados a partir de plantas se pueden purificar y administrar en dosis precisas (Hartmann, 2007; Rousseaux y Schachter, 2003).

Hoy, más del 60% de los tratamientos para el cáncer que están en el mercado procede de productos naturales, muchos de los cuales se han mejorado con la química combinatoria. Terapéuticos contra el cáncer de plantas incluyen a paclitaxel, aislado del

árbol de tejo del Pacífico; camptotecina, derivado del "árbol feliz" *Camptotheca acuminata*, entre otros (Brower, 2008).

Los primeros agentes anticancerígenos derivados de plantas fueron los llamados vinca alcaloides, vinblastina y vincristina. Estas drogas se descubrieron durante la investigación de la planta *Catharantus roseus* como fuente potencial de agentes hipoglucemiantes, siendo también las principales drogas usadas para el tratamiento de los linfomas de Hodgkin y leucemia infantil. Los análogos sintéticos más recientes de las vincas alcaloides son vinorelbina y vindesina. El mecanismo de acción de estos fármacos es interaccionar con la tubulina de las células cancerosas, deteniendo la mitosis en metafase, y evitando el crecimiento del tumor (Rodriguez y col., 2011).

La contribución extraordinaria de los productos naturales a avances de la medicina y una variedad de disciplinas científicas va en aumento; el descubrimiento de constituyentes que inhiban el crecimiento de células cancerosas es una necesidad. Entre ellos se incluyen lactonas esteroidales, saponinas, saponinas triterpénicas, terpenos, benzofuranos, péptidos cíclicos. Actualmente, aún no se ha evaluado la presencia de compuestos antineoplásicos en la mayoría de las plantas terrestres. Estudios previos se han hecho en flavonoides y otros tipos de compuestos fenólicos (Pettit y col., 2008).

Hay una búsqueda de fuentes vegetales ricas en compuestos fenólicos para mejorar la salud humana. Las especies de *Ziziphus* de la familia Rhamnaceae, son ampliamente utilizadas como medicina en países asiáticos, particularmente Taiwán y China, para el tratamiento de alergias, estreñimiento, problemas urinarios, depresión, bronquitis crónica, insomnio y enfermedades hepáticas (Li y col., 2005). Las semillas de *Ziziphus jujuba* Lamk son efectivas en mejorar la diabetes, composición lipídica del suero y tienen propiedades antiinflamatorias (Al-Reza y col., 2010).

Metabolitos Secundarios

Cualquier molécula biológica es un producto natural, pero el término es generalmente reservado a los metabolitos secundarios, moléculas producidas por un organismo que no

son estrictamente necesarias para su supervivencia, a diferencia de las macromoléculas más prevalentes tales como proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos que componen la maquinaria básica para los procesos más fundamentales de la vida. Los metabolitos secundarios son un grupo muy amplio, que comprende los productos del metabolismo generados como resultado de limitación de nutrientes, o como mecanismos de defensa, moléculas reguladoras, etc. Son a menudo únicos de una especie en particular o grupo de organismos, mientras que muchos actúan como anti apetentes, atrayentes sexuales, o agentes antibióticos, aunque muchos no tienen ningún papel biológico aparente.

El aislamiento de productos naturales difiere de las macromoléculas ya que los productos naturales son más pequeños y químicamente más diversos (Cannell, 1998).

Triterpenos y su Biosíntesis

Para la biosíntesis de isoprenoides, la planta parte de la formación de isopentenilo difosfato (IPP) y de difosfato de dimetilalilo (DMAPP) que ocurre al condensarse 3 moléculas de acetyl-CoA, reacciones catalizadas por las enzimas tiolasa y la hidroximetilglutaril-CoA sintasa. El producto resultante, el 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) es reducido por la HMG-CoA reductasa, para formar el ácido mevalónico (MVA). Dos fosforilaciones secuenciales dependientes de ATP del ácido mevalónico y una fosforilación/descarboxilación y eliminación, generan como producto final el IPP, el cual a su vez puede ser isomerizado por la IPP isomerasa para generar el isómero alílico DMAPP (Buchanan y col., 2015).

Dos moléculas de IPP y una molécula de DMAPP se ensamblan y forman el farnesil pirofosfato (FPP) con intervención de la enzima farnesil pirofosfato sintasa. El FPP es el bloque de construcción de varios terpenos dependientes de la vía del MVA, incluidos los tri y los sesquiterpenos. El primer paso comprometido en la biosíntesis de triterpenos es la condensación de dos moléculas de FPP con la intervención de la enzima escualeno sintasa para producir el primer triterpeno, el escualeno. Esta molécula luego se activa por epoxidación con la enzima escualeno epoxidasa, resultando el 2,3-oxidoescualeno.

La primera ramificación en la biosíntesis de triterpenos es la ciclización del 2,3-oxidoescualeno por la oxidoescualeno ciclasa, enzimas en uno de los más de cien esqueletos triterpénicos conocidos, como el cicloartenol para la síntesis primaria del esterol de amirina para triterpenos más especializados. Esta ciclación y posterior redistribución de especies carbocatiónicas y finalmente termina por desprotonación o adición de agua. Como excepción, los compuestos de la clase específica de triterpenos, se ciclan directamente del escualeno por la escualeno ciclasas. Las cadenas principales generadas se funcionalizan adicionalmente mediante oxidaciones catalizadas por enzimas del citocromo P450, lo que mejora aún más su diversidad en estructuras y actividades biológicas. Estas reacciones incluyen reacciones de hidroxilación simples, pero también reacciones de oxidación más complicadas tales como ciclación adicional, epoxidación, apertura del anillo o desalquilación.

Finalmente, los triterpenos se pueden modificar mediante la adición de azúcares, además de azúcar u otros grupos químicos a los carbonos activados. Las sustituciones típicas incluyen glicosilación por enzimas, pero también pueden agregarse otros grupos y pueden realizarse modificaciones químicas como por ejemplo aciltransferasas, metiltransferasas y diferentes oxidorreductasas. Los triterpenos glicosilados se conocen como saponinas triterpénicas (Miettinen y col., 2017).

Los terpenos constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios, en él se encuentran las hormonas, carotenoides, quinonas y esteroides. Los terpenos cuentan con múltiples efectos biológicos en los humanos, entre los cuales destacan la actividad antitumoral, la actividad antiviral y antimicrobiana, actividad antiinflamatoria y anestésica, así como el efecto contra el VIH (Yu y col., 2006). Los fitoesteroides se sintetizan a partir de 2,3-oxidoescualeno a través de cicloartenol generado por el cicloartenol sintasa, seguida de reacciones enzimáticas. Esta vía contiene muchos diferentes tipos de enzimas y resultados en la producción de esteroides tales como estigmasterol, β -sitosterol y campesterol, que son los esteroides vegetales más comúnmente consumidos. Usando parcialmente las mismas enzimas, pero en una vía paralela, las plantas también sintetizan colesterol (Lung y col., 2017), que a su vez puede servir como

punto de partida para los esteroides y glicoalcaloides en algunas especies. Considerando que el estigmasterol y β -sitosterol son los fitosteroles que están involucrados en estructura y función de las membranas celulares, campesterol es el punto de partida de la biosíntesis de brasinoesteroides, que son las únicas hormonas vegetales de tipo esteroidal, con funciones principales en el crecimiento, desarrollo y respuestas al estrés (Belkhadir y Jaillais, 2015; Lozano-Duran y Zipfel, 2015).

En 1856, Rudolf Virchow demostró por primera vez que la inflamación es el factor predisponente para varios tipos de cáncer. Hoy los datos sugieren que al menos uno de cada siete tumores malignos diagnosticados tuvo antes una inflamación crónica o infección. El reconocimiento de este hecho ha llevado a tener un mayor interés en la investigación de dianas moleculares implicadas en las vías inflamatorias que desencadenan en cáncer y encontrar nuevos marcadores que frenen la progresión de esta enfermedad. Los métodos convencionales de tratamiento del cáncer incluyen la cirugía, quimioterapia y/o radioterapia; el modo de tratamiento depende en gran medida del tipo de cáncer que tenga el paciente. Se necesitan urgentemente terapias innovadoras para enfocarse en varios pasos de la progresión del cáncer o procesos implicados en la supervivencia de las células cancerosas y metástasis a otras partes del cuerpo (Yadav y col., 2010).

Flavonoides

Son compuestos polifenoles que se encuentran en plantas y alimentos. Alrededor de 4000 flavonoides diferentes han sido categorizados en flavonoles, flavones, catequinas, flavononas, antocianidinas e isoflavonoides. Tienen diversas propiedades tales como antimicrobiana, antiviral, anti-ulcerogénica, citotóxica, antineoplásica, mutagénica, anti-inflamatoria, antioxidante, anti-hepatotóxica, antihipertensiva, hipolipidémica y antiplaquetaria. Se conocen por actuar en la respuesta inflamatoria por algunas rutas. Bloquean moléculas como COX, citocinas, factor nuclear κ B (NF- κ B) y metaloproteinasas de la matriz (Li y col., 2006).

Saponinas

Son esteroides o triterpenos glicosados ampliamente distribuidos en el reino vegetal e incluye un gran número de compuestos activos. Las saponinas se han aislado de cerca de 50 plantas y han mostrado actividad anti-inflamatoria en algunos modelos experimentales en ratones y ratas (Li y col., 2006).

Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos abarcan un amplio grupo de sustancias de plantas que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos. Las sustancias fenólicas suelen ser solubles en agua y la mayoría se encuentran combinados con glicósidos. Entre los compuestos más conocidos de este grupo se encuentran los flavonoides, los fenilpropanoides, lignanos y taninos. Los flavonoides han sido reconocidos por poseer actividades antiinflamatorias, antioxidantes, antialérgicas, hepatoprotectoras, antitrombóticas, antivirales, y anti-carcinogénicas (Parche y col., 2016).

Glicósidos

Los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos. Se ha reportado que los compuestos digotoxina y digoxina aislados de *Digitalis purpurea* son utilizadas contra la insuficiencia cardiaca congestiva (Ávalos y col., 2009).

Alcaloides

Los alcaloides son una gran familia de más de 15,000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos, aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos. El conocimiento de estos

compuestos continúa desarrollándose y se han descubierto múltiples usos de los alcaloides en beneficio de la salud de los humanos, presentan acción antitumoral, sedativa, antibacteriana, analgésica, antiinflamatoria, anti leucémicas y para el tratamiento del glaucoma. Inhiben o regulan importantes mediadores de inflamación como el factor nuclear κ B, COX-2 e iNOS. Souto y col. (2011) evaluaron la actividad antiinflamatoria de alcaloides e informó 40 de estos compuestos con actividad significativa. La actividad antioxidante de los alcaloides también se han presentado en diferentes modelos experimentales o condiciones patológicas (Czapski y col., 2014).

Metabolitos Secundarios Como Antiinflamatorios

Los metabolitos secundarios producidos por las plantas han proporcionado una importante fuente de medicamentos desde la antigüedad, y actualmente alrededor de la mitad de los medicamentos utilizados se derivan de fuentes naturales. Muchos de estos componentes herbales se recetan ampliamente para el tratamiento de afecciones inflamatorias.

Algunos compuestos fenólicos tienen propiedades antiinflamatorias, como son flavonoides, taninos condensados y galotaninos, los cuales han mostrado inhibir algunas dianas moleculares de mediadores pro-inflamatorios (Fawole y col., 2009).

Los taninos condensados son esencialmente derivados de (+) galocatequina, (-) epicatequina, (+) catequina y epigalocatequina, y sus derivados a través de enlaces carbono-carbono. Las proantocianidinas son metabolitos de plantas ampliamente disponibles en frutas, vegetales, nueces, semillas, flores y corteza. Estos compuestos tienen actividades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antimicrobianas, antialérgicas, antihipertensivas y cardioprotectoras, actividades que se atribuyen a sus fuertes actividad antioxidante. Son antagonistas de receptores de hormonas y de enzimas como las COX (ciclooxigenasas) (Fawole y col., 2009).

Plantas del Género *Ziziphus* con Actividad Antiproliferativa

El género *Ziziphus* pertenece a la familia de las Rhamnaceae del orden de los Rosales, con aproximadamente 60 géneros y más de 850 especies. Consiste en alrededor de 100

especies de árboles y arbustos de hoja caduca o perene en todo el mundo y puede crecer como arbusto o árbol con ramas espinosas. El género *Ziziphus* es conocido por sus propiedades medicinales, y varias plantas de este género son utilizadas por sus propiedades medicinales en India, China y Japón. Se les usa por sus propiedades como agente hipoglucemiante, hipotensor, antiinflamatorio, antimicrobiano, antioxidante, antitumoral, es útil para tratar padecimientos hepáticos y como estimulante del sistema inmune. Algunas especies como *Z. mauritiana* y *Z. nummularia* se encuentran en casi todos los continentes en lugares secos, particularmente al noreste de India. Sus frutos son muy nutritivos, por lo general se comen frescos, o se aplican en cortadas y úlceras. También se usan para tratar dolencias pulmonares y fiebre, para curación de heridas recientes y para la disentería. Las hojas se aplican como cataplasmas y son útiles en problemas hepáticos, asma y fiebre. Los materiales vegetales son baratos y contribuyen significativamente a la mejora de la salud humana en términos de curación y prevención de enfermedades. Las raíces y hojas se usan para tratar problemas biliares y el dolor de cabeza. La corteza se usa para tratar forúnculos y es efectiva para la diarrea. Se cree que la fruta purifica la sangre y ayuda a la digestión (Dureja y Dhiman, 2012).

Ziziphus nummularia es amarga y refrescante; se emplea para tratar tos, enfermedad hepática, dolor de cabeza, disentería y diarrea (Rastogi y Dhawan, 1982); las hojas son antipiréticas y reducen la obesidad, la fruta es refrescante, ayuda a la digestión, afrodisíaca, laxante, elimina la crisis hepática, sensación de calor, vómito (Veeresh y Veeresh, 2010), y también es utilizada en el tratamiento de tuberculosis y enfermedades de la sangre. Las semillas curan enfermedades oculares y también la leucorrea (Preeti y Tripathi, 2014).

Muchos estudios científicos han demostrado las actividades farmacológicas de los constituyentes de las especies de *Ziziphus*, entre los que se encuentra su efecto hipnótico-sedante y antiansiolítico. La más estudiada de todas las plantas del género es *Z. jujube*. Cuando se estudió el extracto de semillas de *Z. jujube*, su efecto contra el cáncer se observó cuando se utilizó la fruta en líneas celulares. Se aislaron triterpenos de tipo lupano que mostraron alta actividad citotóxica, el ácido 3-*O*-*p*-coumaroilalftólico fue uno de los

compuestos aislados y se encontró que eran mejores que los triterpenos no coumarónicos. Este resultado sugiere que el cumarilo en la posición de C-3 del triterpeno de tipo lupano puede jugar un papel importante en la mejora de la actividad citotóxica (Peng y col., 2000).

Se han estudiado *Z. jujube* y *Z. mauritiana*, y se encontró relación con actividad antiproliferativa. Choi y col. (2011), analizaron compuestos fenólicos y flavonoides presentes en extractos del fruto de *Z. jujube* sobre algunas líneas celulares incluyendo HeLa, evaluando la actividad antiproliferativa mediante la reducción del MTT, encontrando actividad de los compuestos de forma dependiente de la dosis. Sun y col. (2013), aislaron ácido betulínico del fruto de *Z. jujube*, lo caracterizaron mediante resonancia magnética nuclear, luego lo probaron en células de cáncer de mama MCF7, observando la aparición de cuerpos apoptóticos y al realizar la tinción con anexina V-FITC, corroboraron que este compuesto induce la apoptosis. El análisis de genes reveló que se inhibe a Bcl2 y se promueve a Bax de manera dependiente de la dosis, por lo que el compuesto induce la apoptosis por la vía intrínseca.

En un estudio realizado por Takada y Aggarwal en 2003, se aisló de *Z. mauritiana* al ácido betulínico y se investigó su efecto sobre células cancerosas, encontrándose un aumento de apoptosis ocasionada por este compuesto, a través del factor de necrosis tumoral (TNF). Sus resultados indican que este compuesto inhibe la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) y este a su vez regula la expresión génica inducida por agentes carcinógenos y estímulos inflamatorios. Esto puede proporcionar una base molecular para la capacidad de este compuesto para mediar la apoptosis, suprimir la inflamación, y modular la respuesta inmune.

Ziziphus mauritiana es un árbol que tiene usos medicinales contra muchas dolencias y enfermedades. En un estudio realizado por Mishra y col. en 2011, se investigó el potencial contra el cáncer del extracto de semilla del fruto de esta planta *in vitro* frente a diferentes líneas celulares (H-60, Molt-4, HeLa, y línea celular normal de HGF), mediante el ensayo de MTT, así como prueba *in vivo* contra el carcinoma ascítico de Erlich en ratones albinos suizos. Se encontró que el extracto inhibió marcadamente la

proliferación de células HL-60. La tinción con anexina V-FITC y PI en células L-60 tratadas indicó inducción de la apoptosis por el extracto de una manera dependiente de la dosis. El extracto también mostró potencial contra el cáncer *in vivo*. Se trató el carcinoma de ascítico de Ehrlich de los ratones albinos suizos con varias concentraciones de extracto de la planta y reduciéndose significativamente el volumen del tumor (Mishra y col., 2011).

Ziziphus obtusifolia

Conocida también con los nombres de Bachata, Jutiki, Gray thorn, *Z. obtusifolia* es un arbusto perteneciente a la familia *Rhamnaceae*. La mayor parte del año no tiene hojas y sus tallos tienen numerosas espinas agudas que pueden medir 10 cm o más. Alcanza una altura aproximada de 3 a 4 m, tiene tallos de color verde grisáceo, debido a una cobertura cerosa blanquecina (Figura 3), hojas ovales y flores pequeñas de 5 pétalos de color amarillo verdosas y frutos pequeños redondos (7-8 mm de diámetro) de color negro azulado en su etapa de madurez, con una capa cerosa que los recubre y una semilla en su interior. Se le encuentra principalmente en zonas áridas del estado de Sonora y Arizona.

En un estudio realizado por Moran-Palacio y col. (2014), se determinó en *Z. obtusifolia* el contenido de proteínas (6.4%) y aminoácidos. Sin embargo, hasta el momento no se encuentran reportes de compuestos químicos identificados de esta planta, por lo que su uso en la medicina tradicional por las etnias sonorenses es hasta hoy empírico, consumiéndose en forma de decocción, como remedio para cáncer, gonorrea, infecciones estomacales, sífilis, y para tratar efectos de la embolia (Johnson y col., 1996; Martin y col., 1998; Yetman y Van Devender, 2002).

El Cuerpo Académico de Biología y Bioquímica de la Universidad de Sonora (CAAB), inició hace unos años la investigación de *Z. obtusifolia*, planta de uso medicinal en la farmacopea de etnias sonorenses (Jonhson y col., 1996). Se encontró que su extracto metanólico y fracciones, tienen actividad antiproliferativa en un panel de líneas celulares murinas y humanas. Al tratarse de una planta medicinal de uso popular, se decidió continuar su estudio, y para el presente se planteó la determinación de su actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiproliferativa y perfil químico.



Figura 3. Partes aéreas de *Ziziphus obtusifolia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y Preparación del Material Vegetal de *Ziziphus obtusifolia*

Para los ensayos de actividad antiproliferativa y apoptótica, un espécimen de *Z. obtusifolia* se colectó en Hermosillo, Sonora, México (29°5'0.92'' N, 111°3'0.22'' W) durante el mes de noviembre de 2014. El Ing. Jesús Sánchez Escalante, taxónomo del Herbario de la Universidad de Sonora, identificó el espécimen como *Ziziphus obtusifolia* variedad *canescens* y fue catalogado con el número 20365 en el herbario, donde quedó depositado un ejemplar. Las partes aéreas de las plantas se secaron a temperatura ambiente a la sombra, y fueron trituradas en una licuadora industrial marca JR y el polvo se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Para la localización de los especímenes en los distintos puntos del estado de Sonora se consultó la página electrónica <http://swiodiversity.org/seinet/>, donde se encuentran registros de colectas realizadas con anterioridad. Las plantas se colectaron del 16 de abril al 5 de mayo de 2016.

Las colectas se llevaron a cabo en los principales puntos del estado de Sonora, México, incluyendo las localidades de: Arizpe, Imuris, Caborca, Magdalena, Santa Ana, Estación Llano, Hermosillo, Guaymas, Bacum, Navojoa y Carbó-Rayón. De igual forma, las plantas fueron autenticadas en el herbario de la Universidad de Sonora en donde quedaron depositados ejemplares de los especímenes catalogados con los números del 28812 a 28824 (Tabla I).

Actividad Antioxidante

Los extractos hidroalcohólicos se prepararon con el polvo seco las plantas colectadas de las distintas localidades del estado de Sonora, de la forma ya descrita (en una relación 1/10 w/v), utilizando como solvente una mezcla etanol:agua en proporción 7:3. Estos extractos una vez evaporados, fueron utilizados para determinar la actividad antioxidante, antiinflamatoria y el perfil químico de la planta.

Tabla I. Colecta de especímenes de *Ziziphus obtusifolia* en el Estado de Sonora, México.

Localidad	Coordenadas	Observaciones	Número de catálogo en Herbario
Arizpe	N 30°48'05.95", O 110°01'36.37"	Suelo pedregoso	23824
Imuris	N 30°48'09.80", O 110°49'12.60"	Suelo arenoso	23812
Magdalena 1	N 30°38'20.04", O 110°59'17.98"	Suelo pedregoso	23820
Magdalena 2	N 30°38'04.99", O 110°59'08.98"	Suelo pedregoso	23823
Santa Ana	N 30°29'24.95", O 111°03'21.38"	Suelo arenoso	23816
Caborca	N 30°41'45.94', 'O 112°06'52.99"	Lecho de río	23813
Llano	N 30°20'00.87", O 111°07'22.89"	Suelo arenoso	23817
Carbó-Rayón	N 29°38'31.99", O 110°32'06.99"	Suelo arenoso	23815
Hermosillo	N 29°41'57.78", O 111°03'03.87"	Suelo arenoso cerca de arroyo	23814
Guaymas	N 27°57'47.14", O 111°06'03.57"	Playa	23818
Campo 60	N 27°35'57.23", O 110°41'53.05"	Suelo arenoso	23821
Bacum	N 27°26'48.13", O 110°06'18.47"	Junto a canal de riego	23819
Navojoa	N 27°06'19.62", O 109°26'30.94"	Suelo arenoso	23822

Método DPPH

Uno de los métodos para evaluar la actividad antioxidante de los extractos fue mediante el uso del radical libre DPPH, previamente reportado por Cheel y col. (2010), con algunas modificaciones. Brevemente, en una placa 96 pozos de ELISA marca Costar Corning N.Y. USA, 20 μL de extractos a varias concentraciones (125, 250, 500, 1000, 2000 $\mu\text{g/mL}$), se añadieron a cada pozo. Luego, se agregaron 200 μL de una solución de 0.06 nM DPPH Sigma en metanol ajustando la absorbancia a 0.7 a una longitud de onda de 515 nm. Se usó Trolox como control y una solución blanco, preparada de la misma manera que las mezclas de prueba, usando metanol en lugar de extracto o Trolox. Las placas se incubaron por 30 min en la oscuridad y a temperatura ambiente. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 515 nm. Los resultados se expresaron en IC_{50} . Todos los ensayos se hicieron por triplicado. El grado de decoloración indicó que los compuestos contenidos en los extractos actuaron sobre el radical. La actividad antioxidante se calculó como el porcentaje del efecto inhibitorio (IE%) del DPPH. $\text{IE}\% = 100 \times (A_{515} \text{ control} - A_{515} \text{ muestra}) / A_{515} \text{ control}$, y se expresó como IC_{50} . El valor de IC_{50} se define como la concentración ($\mu\text{g/mL}$) de un extracto o compuesto que neutraliza el radical DPPH en un 50%.

Método FRAP

La actividad antioxidante también se determinó midiendo la capacidad para reducir el hierro (método FRAP por sus siglas en Inglés), usando el método de Benzie y Strain (1996). Brevemente, un buffer de acetato 300 mM a pH 3.6 y 10 mM de 4,6-tripiryridyl-S-triazine (TPTZ) se usaron en una solución 40 mM HCl de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. La solución de trabajo de FRAP se preparó mezclando buffer de acetato, solución de TPTZ y solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en proporción 10:1:1. La temperatura de la solución de trabajo fue de 37 °C y se preparó al momento de usarse. En una placa de ELISA de 96 pozos (Costar, Corning, N.Y. USA). Se colocaron 20 μL de extracto y 280 μL de reactivo de FRAP. Se incubó por 30 min en la oscuridad a 37 °C. En este método el complejo férrico (Fe^{+3} -TPTZ) se redujo a complejo ferroso (Fe^{+2} -TPTZ) en presencia de un antioxidante en condiciones ácidas.

La actividad antioxidante se expresó en 1 mol Fe⁺²/g extracto, usando la absorbancia obtenida del extracto y una curva de Trolox. La lectura de absorbancia del complejo se realizó a 590 nm en un lector de microplacas (iMark microplate absorbance reader, Bio-Rad, Laboratories, México, D.F.). Los resultados se expresaron en µmol ET/g.

Actividad Antiinflamatoria

Cultivo Celular

En este estudio se usaron células RAW 264.7 (macrófagos transformados por el virus de leucemia de Abelson) que fueron amablemente donadas por la Dr. Emil Unanue (Departamento de Patología e Inmunología, de la Universidad de Washington en St Louis MO). Las células se cultivaron en DMEM (Medio Eagle modificado de Dulbecco) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado con calor y penicilina (100 U/mL) y en condiciones de incubación de 5% de CO₂, a 37 °C y 95% de humedad relativa en una incubadora isotérmica marca Fisher Scientific, USA (Torres-Moreno, 2015).

Actividad Citotóxica

La actividad citotóxica de los extractos se evaluó mediante el método de MTT. Una suspensión de 200,000 células/mL (RAW 264.7) con una viabilidad mayor del 90% se depositó en una placa de 96 pozos (Costar, Corning, N.Y. USA) y se incubó por 48 h. Los extractos fueron disueltos en DMSO y resuspendidos en medio de cultivo. Las células se estimularon con estas diluciones y con LPS (1 µg/mL) por 20 h. Después, se añadieron 5 mg/mL de MTT (3-(Bromuro de 4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a las células y se incubaron por 4 h. Finalmente, los cristales de formazán se resuspendieron con isopropanol ácido y se obtuvo la absorbancia a 570 y 630 nm en un lector de microplacas (iMARK microplate absorbance reader Bio-Rad, Laboratories, México, D.F.). Las concentraciones de los extractos donde la viabilidad fue de 90% o más se consideraron como no citotóxicas (Torres-Moreno, 2015).

Cuantificación de la Producción de Óxido Nítrico

Para la determinación de producción de NO se utilizó el reactivo de Griess (Fox, 1979). Una suspensión de 500,000 cel/mL se depositó en una placa de 96 pozos (cada pozo con 50,000 células contenidas en 100 μ L) (Costar, Corning, N.Y. USA), y se incubaron durante 24 horas para su adaptación. Después las células se estimularon o no con LPS (1 μ g/mL) y en presencia o ausencia de los extractos de *Z. obtusifolia* y se dejó el estímulo durante 20 h. Después en otra placa de 96 pozos, 100 μ L del sobrenadante se mezclaron con un volumen igual de reactivo de Griess y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente en obscuridad. Seguidamente se obtuvo la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas (iMARK microplate absorbance reader, Bio-Rad, Laboratories, México, D.F.). Una curva estándar de nitritos se usó para determinar los niveles de NO producidos por las células y se utilizó al éster fenético del ácido cafeico (CAPE) como control positivo (Paulino y col., 2008).

Preparación de Extractos Metanólico y Fracción de *n*-hexano de *Ziziphus obtusifolia*

El extracto metanólico de *Z. obtusifolia* se preparó con el polvo seco de las partes aéreas de la planta (en proporción 1/10 w/v) en metanol y se dejó en maceración por 10 días con agitación periódica (Jiménez-Estrada y col., 2013). El extracto se filtró con papel Whatman No. 1 y se concentró en un evaporador rotatorio a 40 °C bajo presión reducida. Después se fraccionó con solventes con polaridad ascendente: *n*-hexano, acetato de etilo y finalmente etanol. Luego las soluciones stock se prepararon a una concentración de 80 mg/mL en dimetil sulfóxido (DMSO). Las concentraciones de prueba se prepararon en medio de cultivo. Con este extracto y su fracción de *n*-hexano se determinó la actividad antiproliferativa y apoptótica de la planta.

Con el mismo espécimen se preparó un extracto crudo utilizando como solvente *n*-hexano, de la forma ya descrita. Este extracto se fraccionó posteriormente mediante una columna semi-preparativa por HPLC.

Obtención de las Fracciones del Extracto Metanólico de *Ziziphus obtusifolia*

La primera fracción que se preparó fue la de *n*-hexano, para esto a aproximadamente 50 g del extracto metanólico de *Z. obtusifolia* se adicionaron 150 mL de *n*-hexano, manteniéndose en agitación constante en placa magnética y protegido de la luz por 10 horas. Este procedimiento se repitió renovando el disolvente hasta que la mezcla no produjo color. Posteriormente, la parte soluble se filtró sobre papel Whatman No. 1 y se concentró por medio de evaporador rotatorio bajo las condiciones que se mencionaron anteriormente. La parte insoluble en hexano se procesó de igual forma con acetato de etilo, para generar la fracción perteneciente al acetato de etilo. La parte insoluble en el disolvente anterior (acetato de etilo), se sometió al mismo procedimiento utilizando como disolvente el etanol, obteniéndose la fracción etanólica. La parte insoluble en etanol se etiquetó como fracción metanólica residual. Una vez generadas las cuatro fracciones se procedió a evaluar la actividad antiproliferativa de cada una de ellas sobre las líneas celulares M12.C3F6, RAW 264.5, A-549, L-929 y HeLa bajo la metodología descrita previamente. Para de esta manera identificar las fracciones de solventes del extracto metanólico con actividad antiproliferativa.

Fraccionamiento del Extracto Crudo de *n*-hexano por HPLC

El extracto de *n*-hexano fue fraccionado en un equipo de HPLC marca Agilent Technologies 1260 infinity equipado con un detector de fotodiodos, una columna semi-preparativa marca Zorbax Eclipse XDB-C18 (tamaño de partícula de 5 µm, 25° x 9.4 mm d.i.) y con un “loop” de inyección de 20 µL. La temperatura de columna de 20 °C. Las alícuotas de 100 µL se inyectaron en la columna y la elusión de componentes se realizó utilizando un flujo de 2 mL/min y fue continuamente monitorizado por arreglo de diodos (DAD) a 300 nm. Los solventes utilizados fueron metanol, hexano y acetato de etilo grado HPLC. Las fracciones obtenidas se evaporaron en un evaporador rotatorio y a baja presión y se evaluó posteriormente la actividad antiproliferativa.

Tabla II. Características de los disolventes utilizados para el fraccionamiento del extracto metanólico crudo.

Disolvente	Índice de polaridad	Punto de ebullición (°C)	Viscosidad (cPoise)	Solubilidad en agua (%w/w)
1) <i>n</i> -hexano	0.0	69	0.33	0.001
2) acetato de etilo	4.4	77	0.45	8.7
3) etanol	5.2	78	1.20	100

Fraccionamiento por Cromatografía en Columna de la Fracción *n*-hexano del Extracto Metanólico

A partir de 5 g de muestra, se realizó el fraccionamiento por cromatografía en columna de vidrio (70 x 4.5 cm), con fase estacionaria de sílica gel (150 g) de una medida de 200 a 400 mesh marca SIGMA (Arroyo y col., 2005). Como fase móvil se emplearon diferentes sistemas de eluyentes de polaridad creciente: *n*-hexano; *n*-hexano/acetato de etilo en proporciones (8:2, 1:1); acetato de etilo; acetato de etilo/metanol (9:1, 1:1); metanol y agua. Las fracciones recolectadas (250 mL c/u), una vez concentradas, se continuó con cromatografía en capa fina, empleando como adsorbente sílica gel (60 GF254). Los cromatofolios se observaron con luz UV a 254 y 365 nm y se revelaron con sulfato cérico [Ce(SO₄)₂] y calor (110 °C por 1 min).

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa

Líneas Celulares

Se emplearon las siguientes líneas celulares: HeLa (carcinoma de cérvix humano), RAW-264.5 (macrófagos murinos provenientes de tumor inducido con el virus de leucemia de Abelson), L929 (tejido conectivo subcutáneo normal de ratón), adquiridas del ATCC (American Type Culture Collection; Rockville, MD, EUA). Asimismo, se utilizó la línea celular M12.C3F6 (linfoma murino de células B). Las líneas celulares se propagaron como cultivos en monocapa en cajas de cultivo de 125 cm², en el medio Eagle Modificado de Dulbecco, DMEM (Invitrogen, USA), suplementado (D5F) con 5% de suero fetal bovino (Sigma St. Louis, MO), previamente inactivado. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad en incubadora (Fisher Scientific).

Ensayo de Viabilidad Celular

La prueba de actividad antiproliferativa se llevó a cabo mediante en ensayo de reducción del MTT con breves modificaciones (Mosmann, 1983; Rascón-Valenzuela y col., 2015).

Brevemente, una suspensión celular con 1×10^4 células por pozo, contenida en 50 μL , se colocó en pocillos de una placa de 96-pozos y se incubó durante 24 h a 37 °C en una atmósfera de 5% CO_2 . Posteriormente, 50 μL de extractos a diferentes concentraciones se añadieron a cada pozo y la placa se incubó durante 48 h. Previamente, los extractos fueron disueltos en DMSO y subsecuentemente se diluyeron en medio de cultivo. A las 44 h de incubación las células se lavaron con PBS 1X, después 100 μL de medio de cultivo y 10 μL de una solución de 5 mg/mL de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dimetiltetrazolio), se añadieron a cada pozo. Las células viables redujeron la sal de tetrazolio a cristales de formazán, los cuales se disolvieron en alcohol isopropílico acidificado, se registraron absorbancias a 570 y 630 nm en un lector de microplacas (iMark microplate absorbance reader, Bio-Rad, Laboratories, México, D.F.).

Las células viables se expresaron en porcentajes, donde la densidad óptica medida de las células tratadas con DMSO se consideró como el 100% de proliferación. La actividad antiproliferativa del extracto y fracciones se reportó como valores de IC_{50} valores calculados con GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, INC., La Jolla, CA). Los tratamientos se compararon utilizando ANOVA de una vía para diferencia significativa.

Actividad Apoptótica del Extracto Metanólico y su Fracción de *n*-hexano

Inducción de Apoptosis

Con base a resultados obtenidos por Hernández y col en 2007, donde sugieren que la actividad citotóxica es mediada por apoptosis, se realizó de manera simultánea una tinción anexina V-FITC y PI, la cual permitió discriminar si la muerte celular inducida por los extractos metanólico y de *n*-hexano fue mediada por apoptosis o necrosis. Este método se llevó a cabo como lo describieron previamente Rascón Valenzuela y col. (2015). Células HeLa (4.5×10^5 células/mL) se colocaron en una placa de cultivo de 12 pozos (Costar, Corning, N.Y. USA) y se incubaron por 24 h., y se estimularon por 24 h con el extracto metanólico (0.4 mg/mL) o su fracción de hexano (0.2 mg/mL). Se utilizó CAPE (120 mM) como control positivo de apoptosis. Entonces el estímulo se removió y después de su tripsinización, las células se lavaron con PBS 1X frío tres veces mediante centrifugación

a 200xg, 7 min, 4 °C, re-suspendiendo el botón celular en una solución de anexina V-FITC y en una solución reguladora de unión (PI) con incubación subsecuente de 10 min en la oscuridad y a temperatura ambiente. Después, las células se lavaron dos veces con PBS 1X, re-suspendiendo y analizando por citometría de flujo dentro de 1 h en un citómetro FACS Canto II (BD Systems, San Jose, CA) (Rascón Valenzuela y col., 2015; Valencia y col., 2012).

Efecto de los Extractos Sobre el Potencial de Membrana Mitocondrial

Con el fin de medir el colapso electroquímico del gradiente a través de la membrana mitocondrial, se realizó la tinción con el colorante catiónico JC-1, un autofluorocromo dual utilizando células HeLa previamente tratadas con los extractos metanólico y de *n*-hexano de *Ziziphus obtusifolia*. Se utilizó éster fenético del ácido cafeico (CAPE) como control positivo de inducción de apoptosis. El JC-1 en células sanas se acumula en las mitocondrias en forma de JC-agregados, emitiendo una fluorescencia roja, mientras que en células que han sufrido pérdida de potencial de la membrana mitocondrial este se libera hacia el citosol en forma de monómeros exhibiendo una fluorescencia verde (Valencia y col., 2012). Se detectó el cambio de potencial de membrana mitocondrial usando citometría de flujo.

Una suspensión de células Hela de 4.5×10^5 células/mL se colocaron en una placa de ELISA de 12 pozos (Costar, Corning, N.Y. USA) y se incubaron por 24 h. Seguidamente se estimularon con extracto metanólico (0.4 mg/mL) y su fracción de *n*-hexano (0.2 mg/mL) por 24 h. Después las células se tripsinizaron y lavaron dos veces con PBS 1X, la solución de JC-1 (5 mg/mL) se añadió y las células se incubaron a 37 °C en la oscuridad por 15 min. Finalmente, las células se lavaron dos veces con PBS IX, se re-suspendieron en medio de cultivo y se analizaron inmediatamente por citometría de flujo. Como control positivo del cambio del potencial de membrana mitocondrial se usó una solución de CAPE de 120 mM (Rascón Valenzuela y col., 2015).

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa de Subfracciones

La evaluación se determinó bajo la misma metodología que se utilizó con los extractos crudos y las fracciones de diferentes disolventes.

Preparación de los Tratamientos a Evaluar

Se prepararon soluciones stock de los extractos utilizando dimetilsulfóxido (DMSO). Al momento de ser adicionadas a las células se hicieron las diluciones correspondientes en medio de cultivo. Cada tratamiento se evaluó en 4 diluciones seriadas, con 100 µg/mL como concentración máxima para las subfracciones y 800 µg/mL como concentración máxima para fracciones de solventes y extracto crudo. La concentración final de DMSO no fue mayor a 0.5%, para evitar interferencia de este disolvente en los resultados. En todas las valoraciones se empleó la droga hidrocloreto de doxorubicina como control positivo de actividad citotóxica, y se evaluó el efecto del DMSO empleado como vehículo. Los controles y tratamientos se evaluaron por triplicado para cada concentración y se realizaron al menos tres repeticiones de cada evaluación.

Obtención del Perfil Químico de los Extractos Hidroalcohólicos

Preparación de las Muestras

Cada muestra fue disuelta en metanol:H₂O (9:1, v/v) con ayuda de ultrasonido por 5 min. Se realizó una limpieza para remover posibles contaminantes, la cual se llevó a cabo utilizando cartuchos Chromabond C₁₈ (500 mg de fase estacionaria) que se activaron previamente usando 5 mL de metanol y se equilibraron usando 5 mL de metanol:H₂O (9:1, v/v). Posteriormente se añadieron las muestras a cada cartucho y los compuestos se eluyeron con 3 mL de metanol:H₂O (9:1, v/v). Después las muestras se filtraron a través de filtro GHP de 0.22 µm y se evaporó el solvente. Para inyectar las muestras se prepararon soluciones de 5 ppm disuelto en metanol grado HPLC.

Condiciones Instrumentales de HPLC-MS

Los extractos se analizaron por espectrometría de masas por infusión directa de la muestra en un equipo Thermo Scientific LTQ XL con analizador de trampa de electrones linear equipado con una Fuente de ionización por electrospray (ESI), ambos en modo positivo y negativo (Thermo, San José, CA, USA). Se utilizó un tubo capilar de sílice fundido a 280° C, un voltaje de pulverización de 5,00 kV, un voltaje capilar de -35 V, una lente de tubo de -100 V y un flujo de 5 µL/min. El análisis de exploración completa se registró en el intervalo m/z de 100-2000. Las fragmentaciones en múltiples etapas (ESI-MS_n) se realizaron mediante el método de disociación inducida por colisión (CID) contra el helio para la activación de iones. El primer evento fue un espectro de masas de exploración completa para adquirir datos sobre los iones en ese rango m/z . El segundo evento de exploración fue un experimento MS/MS realizado utilizando un análisis dependiente de datos sobre las moléculas disociadas de los compuestos de interés con una energía de colisión de 30% y un tiempo de activación de 30 min. Los iones de producto se sometieron entonces a una fragmentación adicional en las mismas condiciones, hasta que no se observaron más fragmentos. La adquisición se hizo de 100-2000 m/z . Se utilizó el software Xcalibur versión 1.3 (Thermo Finningan) para adquirir y procesar los datos (Mininel y col., 2014).

RESULTADOS

Evaluación de la Actividad Antioxidante por los Métodos DPPH y FRAP

Método DPPH

En esta investigación se encontró que los extractos etanólicos de *Z. obtusifolia* que presentaron la mejor capacidad antioxidante (IC_{50} : mg/mL) por el método de DPPH fueron los extractos de: fruto Carbó-Rayón (0.25 mg/mL), Carbó-Rayón (0.53 mg/mL), Caborca (1.06 mg/mL), Hermosillo (1.19 mg/mL), Bácum (1.25 mg/mL) e Imuris (1.39 mg/mL). Estos resultados indican la presencia de compuestos antioxidantes en los extractos de *Z. obtusifolia* capaces de reaccionar con el radical DPPH. En este estudio se utilizó como control al ácido ascórbico, el cual tuvo una actividad con valor de IC_{50} : 0.276 ± 0.04 mg/mL (a una concentración de 70 μ M), que en comparación con la actividad antioxidante del extracto del fruto de Carbó-Rayón (IC_{50} : 0.25 ± 0.04 mg/mL), resultó ser similar; adicionalmente el extracto de partes aéreas de Carbó-Rayón (0.53 ± 0.03 mg/mL) presentó una actividad elevada próxima al control del ácido ascórbico ($p > 0.05$) (Tabla III). En el análisis de varianza, resultó que todos los extractos tuvieron diferencia significativa con respecto al control de ácido ascórbico ($p < 0.05$), excepto el del fruto.

Método FRAP

En este estudio se encontró que los extractos con mayor actividad antioxidante fueron: Caborca: 0.18 μ mol ET/g, Navojoa 0.71 μ mol ET/g, Hermosillo 0.74 μ mol ET/g y 2.6 μ mol ET/g para los extractos de Imuris, Santa Ana y Carbó-Rayón (Tabla IV).

Como puede observarse en la Tabla IV, el extracto más activo en esta prueba fue el de la región de Caborca, el cual tuvo una diferencia significativa en el análisis de varianza con respecto a las actividades de los demás extractos ($p < 0.05$).

Tabla III. Actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de *Ziziphus obtusifolia* por el método de DPPH.

Extracto hidroalcohólico	DPPH IC₅₀ (mg/mL)
Arizpe	2.49±0.07
Imuris	1.39±0.12
Magdalena 1	2.57±0.03
Magdalena 2	2.28±0.18
Santa Ana	3.69±0.02
Caborca	1.06±0.03
Llano	ND
Carbó-Rayón	0.53±0.03
Fruto Carbó-Rayón	0.25±0.04*
Hermosillo	1.19±0.11
Guaymas	ND
Campo 60	1.47±0.06
Bácum	1.25±0.05
Ácido ascórbico	0.28±0.04

ND: IC₅₀ no tuvo actividad a la máxima concentración probada (4 mg/mL).

Ácido ascórbico en concentración de 70 µM.

* No hubo diferencia significativa con respecto al control de ácido ascórbico.

Tabla IV. Actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos por el método de FRAP.

Extracto Hidroalcohólico	μmol ET/g
Arizpe	1.2±0.06
Imuris	2.62±0.10
Magdalena 1	1.31±0.10
Magdalena 2	ND
Santa Ana	2.63±0.02
Caborca	0.18±0.03*
Llano	ND
Carbó-Rayón	2.6±0.06
Fruto Carbó-Rayón	4.0±0.07
Hermosillo	0.74±0.06
Guaymas	1.47±0.14
Campo 60	1.50±0.08
Bácum	7.39±0.14
Navojoa	0.71±0.13

*p < 0.05; ND: No tuvo actividad a la máxima concentración probada.

Actividad antiinflamatoria de *Ziziphus obtusifolia*

Efecto de los Extractos Sobre la Producción de NO

La capacidad antiinflamatoria de *Z. obtusifolia* se evaluó midiendo el efecto de los extractos hidroalcohólicos sobre la reducción de la producción de NO en células RAW 264.7 que se activaron con LPS.

Primero, se determinó que a la concentración máxima evaluada (400 $\mu\text{g/mL}$), el extracto no ejercía actividad citotóxica. Se usaron como controles células con y sin estimular con LPS respectivamente. Los macrófagos estimulados tratados con LPS aumentaron la producción de NO en comparación con las células no tratadas (Figura 4). El tiempo de estimulación fue de 20 h. Después de este tiempo, el nitrito acumulado en el medio de cultivo se cuantificó mediante la reacción de Griess y se estimó la eficacia de los extractos para reducir la producción de NO. La producción de NO se redujo notablemente y fue dependiente de la concentración del extracto (Figura 4). Los valores IC_{50} de 118, 121, 122 y 130 $\mu\text{g/mL}$ fueron para los extractos de: Hermosillo, Imuris, Carbó-Rayón y Magdalena I, respectivamente (Tabla V).

Los extractos de Guaymas y Arizpe no tuvieron actividad antiinflamatoria a la concentración más alta analizada. Utilizamos CAPE como control positivo y se determinó una IC_{50} de 3.25 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla V).

En esta prueba de reducción de la producción de NO, los extractos tuvieron actividad antiinflamatoria (IC_{50} entre 118 – 277 $\mu\text{g/mL}$). La mayoría de los extractos fueron activos, y no presentaron una diferencia significativa entre los valores de IC_{50} .

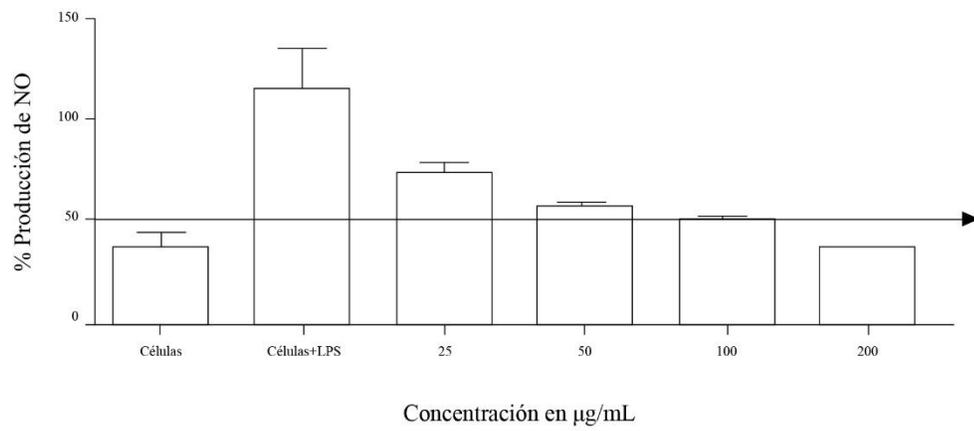


Figura 4. Efecto del tratamiento con extracto de Hermosillo en distintas concentraciones y LPS sobre la producción de óxido nítrico en células RAW 264.7. La flecha indica la IC_{50} .

Tabla V. Inhibición del porcentaje de producción de óxido nítrico causado por los extractos hidroalcohólicos.

Extracto o control	IC₅₀ (µg/mL)
Arizpe	ND
Imuris	121.1±8.0
Magdalena I	130.6±9.0
Magdalena 2	185.4±8.0
Santa Ana	147.5±8.0
Caborca	134.3±10
LLano	277.1±9.0
Carbó-Rayón	122.3±5.0
Hermosillo	118.2±7.0
Guaymas	ND
Campo 60	144.0±8.0
Bácum	152.6±10
Navojoa	139.8±7.0
CAPE	3.25±0.5

ND: IC₅₀ no detectada a la concentración probada.

Ensayo de Actividad Antiproliferativa del Extracto Metanólico

Del extracto metanólico de *Z. obtusifolia* colectado en Hermosillo, Son., en noviembre de 2014, se preparó el estímulo usando concentraciones de 50 a 400 µg/mL, para evaluar la actividad antiproliferativa mediante el método de MTT, en las líneas celulares: HeLa, A-549 L-929, RAW-264.5 y M12.C3F6, obteniéndose las IC₅₀. La línea celular RAW 264.7, fue la que presentó la menor IC₅₀ (187.8±4 µg/mL), como se observa en la Tabla VI. Se prosiguió con el fraccionamiento del extracto metanólico usando consecutivamente *n*-hexano, después acetato de etilo y finalmente etanol. A continuación se evaluaron las fracciones obtenidas y se encontró que la fracción de *n*-hexano mostró la mayor actividad antiproliferativa obteniéndose valores de IC₅₀ de 90.4±0.3 y 94±2 µg/mL, frente a las líneas celulares cancerosas RAW 264.7 y M12.C3.F6, respectivamente (Tabla VI), y mostró valores de IC₅₀ de 165 y 187 µg/mL contra las líneas celulares HeLa y A549, respectivamente. Para la fracción acetato de etilo se obtuvieron valores de IC₅₀ 72.5±1.8 µg/mL y 142±1.5 µg/mL, en las líneas RAW 264.7 y M12.C3.F6, respectivamente, mientras que las fracciones de etanol y residual tuvieron valores de IC₅₀ > 400 µg/mL.

Con base en estos resultados, se procedió a realizar la separación cromatográfica en sílica gel de la fracción de *n*-hexano, para posteriormente evaluar la actividad antiproliferativa de las fracciones obtenidas usando para el estímulo concentraciones de 6.5 a 50 µg/mL. Como resultado se obtuvo la más baja IC₅₀ para la subfracciones: F64 contra RAW 264.7 con <6.25 µg/mL, F113 contra HeLa y RAW 264.7 (18.3 y 17.6 µg/mL respectivamente). Las células L-929 no fueron afectadas con el tratamiento de las fracciones cromatográficas de *n*-hexano a las concentraciones probadas (Tabla VII).

Tabla VI. Actividad antiproliferativa de fracciones de solventes obtenidas del extracto metanólico determinada mediante MTT.

	Líneas celulares (IC₅₀ en µg/mL)				
	HeLa	A549	RAW 264.7	M12.C3.F6	L-929
Extracto metanólico	396±11.3	ND	187.8±4.0	223±2.5	ND
Fracción <i>n</i> -hexano	165.5±2.7	187.7±7.0	90.4±0.3	94±2.0	105.1±4.8
Fracción acetato de etilo	203.9±0.8	315.7±8.1	72.5±1.8	142±1.5	254.7±14.0
Fracción etanol	ND	ND	382.5±17.0	ND	ND
Fracción residual	ND	ND	ND	318±2.0	ND

IC₅₀ representa 50% concentración inhibitoria (µg/ml, media ±SD, *n*=3).

ND= Actividad no detectada a la más alta concentración probada (400 µg/mL).

Tabla VII. Actividad antiproliferativa de las fracciones cromatográficas de la fracción de *n*-hexano obtenida por columna abierta con sílica gel determinada mediante MTT.

	Líneas celulares (IC₅₀ en µg/mL media ±SD)				
	HeLa	A549	RAW 264.7	M12.C3.F6	L-929
F19	27.4±0.8	40±5	20.2±0.4	>50	ND
F44	40.5±2	ND	ND	33±0.3	ND
F61	39.4±2.8	ND	20.9±2.8	43.7±1.4	ND
F64	29.5±2.1	36.8±0.6	<6.2	22.9±0.3	ND
F113	18.3±1.6	ND	17.6±1	32.9±0.7	ND

IC₅₀ representa 50% concentración inhibitoria (µg/ml, media ±SD, *n*=3).

ND = No detectada a la más alta concentración probada (50 µg/mL).

F19, 44, 61, 64 y 113 = Fracciones cromatográficas de la fracción de *n*-hexano.

Actividad Apoptótica de Extractos Metanólico y su Fracción de *n*-hexano

Tinción con Anexina V-FITC y PI

Cuando la fosfatidil serina (PS) se localiza en la cara externa de las células, se considera un evento apoptótico, porque su localización usual es en la cara interna de la membrana citoplasmática. En el presente estudio, este evento se determinó en células HeLa tratadas con el extracto metanólico y su fracción de *n*-hexano, utilizando anexina V-FITC y PI mediante el análisis por citometría de flujo.

El porcentaje de eventos de apoptosis temprana se incrementó en células HeLa de 1.4% en células no tratadas a 1.9%, cuando las células fueron tratadas con extracto metanólico (0.4 mg/mL), y a 3.5% cuando fueron tratadas con la fracción de *n*-hexano (0.2 mg/mL). El tratamiento con la fracción de *n*-hexano resultó significativamente más efectivo que el del extracto metanólico y CAPE (se utilizó una concentración de 120 μ M), con porcentajes de apoptosis total de 26.2, 22.3 y 21.8 % respectivamente ($p < 0.05$) (Tabla VIII). Las células tratadas con estos extractos murieron por apoptosis y eventos tempranos de este proceso fueron detectados; como se muestra en la Figura 5. Más células murieron por apoptosis tardía en células tratadas que en las no tratadas.

Despolarización del Potencial de Membrana Mitocondrial

La despolarización del potencial de membrana mitocondrial se detectó por la disminución en la relación de la fluorescencia rojo/verde para células HeLa tratadas con estos extractos comparando con el control como se muestra en la Figura 5. Se puede observar en esta figura que el tratamiento con la fracción de *n*-hexano (0.2 mg/dL) tuvo mayor efecto en la relación rojo/verde (87% menos que en el control), lo cual indica despolarización de la membrana mitocondrial (Figura 6).

Tabla VIII. Porcentaje de células HeLa en apoptosis inducida por los tratamientos con extracto metanólico y su fracción de *n*-hexano.

	Células vivas	Células muertas	Apoptosis temprana	Apoptosis tardía	Total de células apoptóticas
Solvente control DMSO	96.3±0.14	0.7±0	1.4±2.8	1.6±0.14	3.0
Extracto metanólico	67.4±6.1	10.6±1.5	1.96±1.9	20.3±4.3	22.3*
Fracción <i>n</i> -hexano	61.4±5.7	12.1±1.47	3.5±1.1	22.9±5.5	26.4*
CAPE	64.5±3.7	13.5±1.7	2.5±0.07	19.3±1.8	21.8*

Cultivo celular tratado con 0.4 ó 0.2 mg/mL de extracto metanólico y fracción de *n*-hexano en DMSO.

Control positivo de apoptosis: CAPE (120 µM). *p < 0.05.

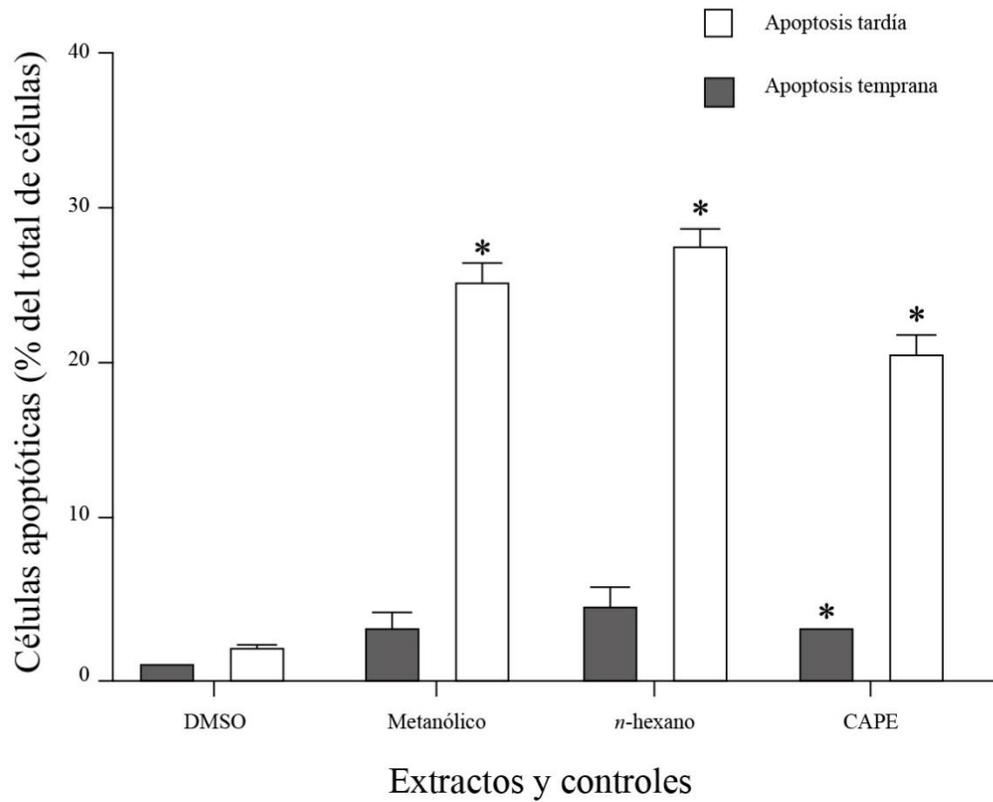


Figura 5. Apoptosis inducida por el extracto metanólico y su fracción de *n*-hexano.

n=3, se usaron células HeLa

Concentraciones utilizadas: Control positivo CAPE (120 μ M), extracto metanólico (0.4 mg/mL), fracción de *n*-hexano (0.2 mg/mL) y DMSO como control negativo.

* Significancia estadística en la comparación con el control negativo, $p < 0.05$.

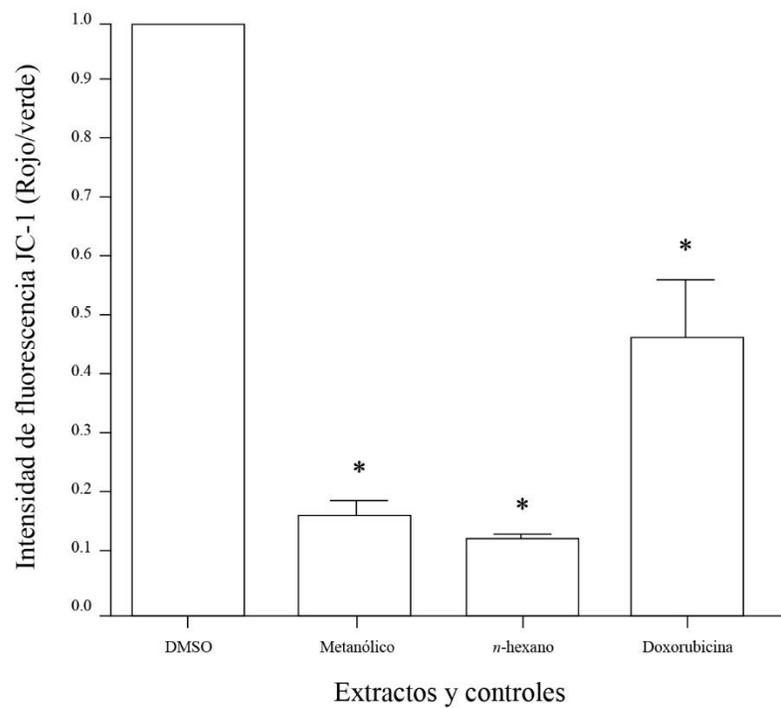


Figura 6. Despolarización de la membrana mitocondrial de células HeLa, causada por el efecto de los extractos metanólico y fracción de *n*-hexano de *Ziziphus obtusifolia*.

Fraccionamiento del Extracto de *n*-hexano Crudo por RP-HPLC

El extracto crudo de *n*-hexano fue fraccionado por HPLC semi-preparativa en 14 diferentes fracciones (Figura 7). Las fracciones fueron obtenidas cada 3 min en un colector automatizado. Las alícuotas de 100 μ L se inyectaron en la columna. La elusión de los componentes se realizó utilizando un flujo de 2 mL/min y fue continuamente monitorizado por arreglo de diodos (DAD Agilent Technologies) a 300 nm. La temperatura de la columna se mantuvo a 20 °C. Los solventes utilizados fueron: metanol (A), *n*-hexano (B) y acetato de etilo (C). Se programó el equipo de tal forma que cada inyección se sometía a las condiciones de elusión que se muestran en la Tabla IX.

Con 3 min de re-equilibrio a las condiciones iniciales antes de inyectar de nuevo. Las fracciones se colectaron de forma automatizada utilizando un colector de fracciones Agilent Technologies con un flujo de 2 mL/min para su posterior caracterización.

Después de determinar la actividad antiproliferativa de estas fracciones por el método de MTT, se decidió fraccionar H3 y se programó el instrumento de HPLC equipado con la columna de fase reversa como se muestra en la Tabla X.

Actividad Antiproliferativa de Fracciones y Subfracciones del Extracto Crudo de *n*-Hexano

Se evaluó la actividad antiproliferativa en la línea celular HeLa, misma que fue expresada como IC₅₀. Las fracciones más activas en esta prueba fueron H3 y H5, siendo sus IC₅₀ de 29.58 y 36.22 μ g/mL respectivamente. Se realizó un fraccionamiento subsecuente de H3, por ser la fracción con mayor rendimiento, obteniéndose 14 fracciones que fueron evaluadas nuevamente. Las fracciones activas fueron H3-4, H3-5, H3-6, H3-7, H3-8 y las IC₅₀ se muestran en la Tabla XI. Como puede observarse, la actividad antiproliferativa disminuye al fraccionar a H3, y puede deberse a que los compuestos actúan de forma sinérgica.

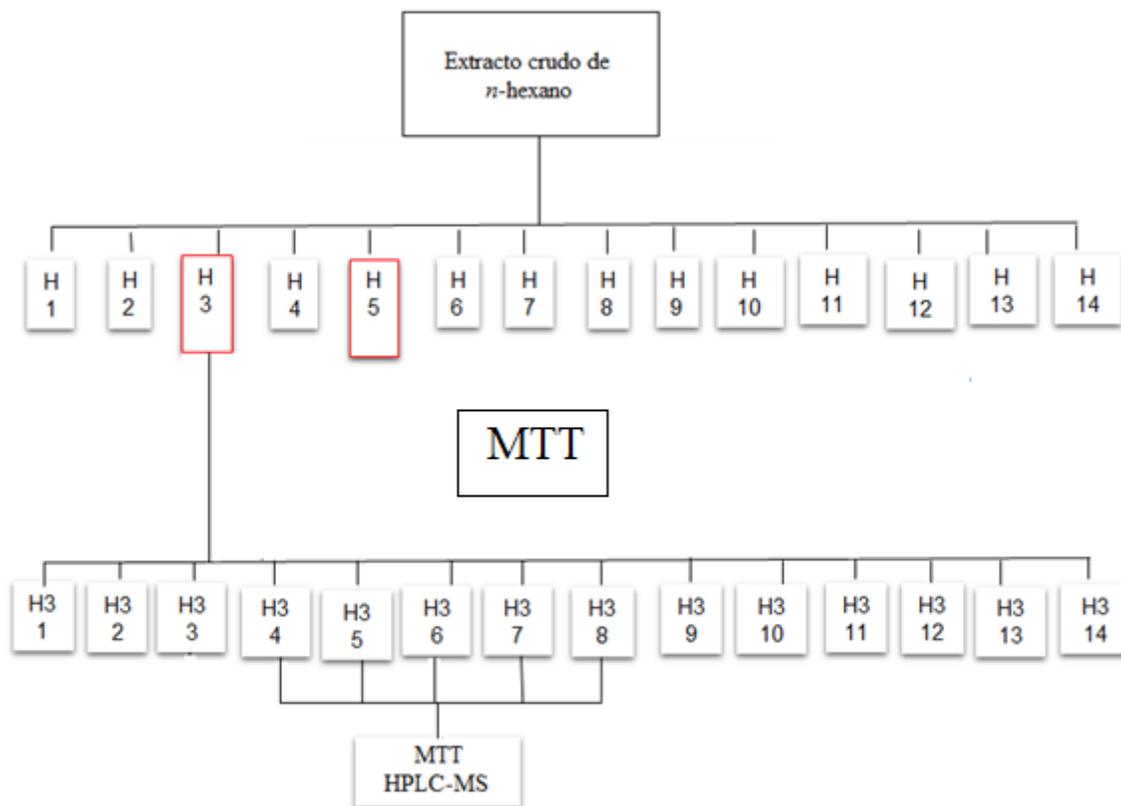


Figura 7. Proceso de fraccionamiento del extracto crudo de *n*-hexano por RP-HPLC y evaluación de actividad antiproliferativa.

Tabla IX. Condiciones de elusión del equipo de HPLC para fraccionar el extracto crudo de *n*-hexano.

Min	% Metanol	% Hexano	% Acetato de etilo
0	100	0	0
10	100	0	0
12	70	0	30
14	50	0	50
24	30	0	70
29	0	0	100
30	0	0	100
34	0	50	50
40	0	30	70

Tabla X. Condiciones para subfraccionar a la fracción H3 del extracto crudo de *n*-hexano mediante HPLC.

Min	% Metanol	% Acetato de etilo
0	100	0
15	100	0
20	70	30
23	70	30

Tabla XI. Actividad antiproliferativa mediante MTT en la línea celular HeLa del extracto crudo de *n*-hexano, fracciones y subfracciones de H3.

Extracto o fracción	IC₅₀ µg/mL en HeLa
Extracto crudo de <i>n</i> -hexano	61.0±3.0
H5	32.2±2.07
H3	29.6±2.47
H3-4	54.3±2.64
H3-5	50.7±0.63
H3-6	46.5±0.40
H3-7	51.3±2.13
H3-8	49.6±0.69

IC₅₀ representa 50% concentración inhibitoria (µg/mL, media ±SD, *n*=3).

H3 y H5: Fracciones cromatográficas del extracto n de *n*-hexano.

H3-4 a H3-8: Subfracciones de H3.

Perfil Químico de la Fracción H3 y Subfracciones

Para identificar a los metabolitos secundarios de esta parte apolar de *Ziziphus obtusifolia*, se realizó HPLC-MS en un equipo Thermo Scientific LTQ XL, mediante APCI en modo positivo. Como se puede observar en la Tabla XII, se identificaron mezclas de compuestos triterpenos al comparar con los patrones de fragmentación reportados en la bibliografía de Mo y col., realizada en 2013 (Tabla XIII).

Perfil Químico Determinado por HPLC-MS de Extractos Hidroalcohólicos de *Ziziphus obtusifolia*

El perfil químico de los extractos hidroalcohólicos de distintas regiones del estado de Sonora, se obtuvo mediante HPLC-MS. Una solución de 5 ppm de cada extracto tratado se inyectó en el equipo para obtener el espectro de masas. Los datos fueron tratados con ayuda del programa Xcalibur Software-ThermoFisher Scientific y se compararon los resultados de análisis de iones con los reportes de la bibliografía (Tabla XIII).

A continuación, se presenta el perfil químico del extracto hidroalcohólico de Carbó-Rayón. La planta fue localizada a un lado de la carretera Carbó-Rayón, de ahí el nombre que se le asignó. Este extracto tuvo de las mejores actividades antioxidantes y antiinflamatorias.

Triterpenos: Brassicasterol, Estigmasterol, Lupeol, Ácido oleanólico, Ácido ceanoténico, Ácido betulínico y Lupenona.

Flavonoides: Quercetina-3-*O*- β -D-xilosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnósido, Quercetina-3-*O*-rutinósido, Kaempferol 3-*O*-rutinósido o Kaempferol 3-*O*-robinobiósido y Quercetina-3-ramnósido.

Por otro lado, a continuación, se muestra el perfil químico del extracto hidroalcohólico de Hermosillo con la mayor actividad antiinflamatoria.

Terpenos: Brassicasterol, Estigmasterol, Lupeol, Ácido oleanólico, Ácido cenoténico, Ácido betulínico, Ácido pomónico y Lupenona.

Flavonoides: Quercetina-3-*O*-malonil-glucósido y Quercetina-3-ramnósido.

Tabla XII. Metabolitos del extracto crudo de *n*-hexano.

Extracto o fracción	Compuestos identificados de acuerdo a su patrón de fragmentación
H3	β -sitosterol, campesterol, brassicasterol, estigmasterol, lupeol, ácido oleanólico, lupenona, quercetina-3- <i>O</i> -malonil glucósido.
H3-4	Estigmasterol.
H3-5	Brassicasterol, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol, lupeol.
H3-6	Brassicasterol, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol, lupeol.
H3-7	Campesterol.
H3-8	Lupeol.

(Mo y col., 2013).

Tabla XIII. Compuestos encontrados en extractos hidroalcohólicos de las partes aéreas de especímenes de *Ziziphus obtusifolia* de diferentes puntos del Estado de Sonora.

APCI[M-H] ⁺	MS/MS m/z	Extracto	Posible compuesto	Referencia
381	297	A,C,C60,CR,S,F,G,H,I,M1,M2,N	Brassicasterol	Mo y col., 2013
383	161	B,C,C60,CR,S,F,I,M1,M2,LL,N	Campesterol	Mo y col., 2013
395	297	A,B,C,C60,CR,S,F,G,H,I,M1,LL,N	Estigmasterol	Mo y col., 2013
397	161	B,C,C60,CR,S,F,G,I,M1,M2,LL,N	β-sitosterol	Mo y col., 2013
409	137	B,C,C60,CR,S,F,G,H,I,M1,M2,LL,N	Lupeol	Naumoska y col., 2015
425	407	A,B,C,C60,CR,S,F,G,H,I,M1,M2,LL,N	Lupenona	Naumoska y col., 2015
457	439	A,B,C,C60,CR,S,F,G,H,M1,LL,N	Ácido oleanólico	Guo y col., 2010
551	301	B,C,C60,S,F,G,H,I,M1,M2,LL,N	Quercetina-3- <i>O</i> -malonil glucosido	Shui y Peng, 2004
1068,1045+Na	339	I,M1	Jujubosido B	Liao y col., 2012
APCI[M-H]⁻				
453	435;392;218;185	B,C,C60,CR,S,F,G,H,I,M1,M2,N	Ácido ceanoténico	
455.25	437;411;227	B,C,C60,CR,S,F,G,H,I,M1,M2,LL,N	Ácido oleanólico, ursólico o betulínico	Guo y col., 2011
469	451;352;340	B,C,C60,S,F,G,H,I,M1,LL,N	Ácido pomónico	
471	442;427;403;254.9	A,B,C,C60,CR,S,G,I,M1,M2,LL	Ácido maslínico o alfitólico	Guo y col., 2011
485.5	494;441;423;409;256	C,C60,CR,S,F,G,I,M1,LL	Ácido ceanótico	
579	561;548;521;469;418	B,C,CR,S,G,I,M1	Quercetina-3- <i>O</i> -β-D-xilosil-(1→2)-α-L-ramnósido	Guo y col., 2011
609	423;341;267	A,C,C60,CR,S,F,G,I,M1,M2	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinósido	Guo y col., 2011
ESI [M-H]⁺				
593	447,285	B,C,C60,CR,S,F,G,I,M1,M2,LL,N	Kaempferol 3- <i>O</i> -rutinósido or Kaempferol 3- <i>O</i> -robinobiosido	Pawlowska y col., 2009
447	301	A,B,C,C60,CR,S,F,G,H,I,M2,LL,N	Quercetina-3-ramnósido	Zhou y col., 2014
ESI [M-H]⁻				
596	577		6,8-Diglucopiranosil-4',5,7-trihidroxi flavonona	Yang y col., 2013

Extracto hidroalcohólico de: Arizpe, B: BÁCUM, C: Caborca, C60: Campo 60, CR: Carbó-Rayón, S: Santa Ana, F: Fruto, H: Hermosillo, G: Guaymas, I: Imuris, M1: Magdalena 1, M2: Magdalena 2, LL: Llano, N: Navojoa

DISCUSIÓN

En la determinación de la capacidad antioxidante de *Z. obtusifolia* por el método de FRAP, el extracto con mayor actividad fue el de la región de Caborca 0.18 ± 0.03 , seguido por Navjoa 0.71 ± 0.13 y Hermosillo 0.74 ± 0.06 $\mu\text{mol ET/g}$, siendo el primero el que tuvo diferencia significativa con respecto al control. En otra investigación realizada por Koley y col. (2016), analizaron la actividad antioxidante de 13 genotipos de una planta del mismo género, *Z. mauritiana* Lamk, por el método de FRAP y encontraron actividades antioxidantes que fueron desde 7.45 – 11.95 $\mu\text{mol ET/g}$, siendo menores que las encontradas en las plantas con mayor actividad antioxidante del presente estudio. En la determinación del perfil químico de los extractos hidroalcohólicos de *Z. obtusifolia* se encontraron fenoles y flavonoides. Estos compuestos son reconocidos como los mejores antioxidantes, al realizar la eliminación de radicales libres a través de su reactividad como agentes donadores de hidrógeno o de electrones y propiedades quelantes de iones metálicos (Olajuyigbe y Afolayan, 2011). En este estudio, los extractos de *Z. obtusifolia* mostraron poseer una fuente potencial antioxidante que se debe muy probablemente a la presencia de compuestos flavonoides como Quercetin-3-rutinoside o su isómero Quercetin-3-rhamnoside que han sido identificados previamente en frutas de especies del género *Ziziphus* como *jujube* y *espinosa* (Guo y col., 2011), así como de Kaempferol 3-*O*-robinobioside y Kaempferol 3-*O*-rutinoside, que en otro estudio llevado a cabo por Pawlowska y col. (2009) presentaron actividad antioxidante.

La actividad antiinflamatoria se determinó en los extractos etanólicos utilizando la medida de la reducción del porcentaje de producción de óxido nítrico (NO) en células RAW 264.7, resultando con mayor actividad los extractos de Imuris 121.1 ± 8.0 , Carbó-Rayón 122.3 ± 5.0 y Magdalena 130.6 ± 9.0 $\mu\text{g/mL}$. En otro estudio realizado por Ghonime y col. (2015), se midió la inhibición de la producción de NO por los extractos de 11 plantas medicinales en células RAW 264.7 y encontraron que 7 de los extractos disminuyeron la producción de NO, y sus IC_{50} no presentaron diferencias significativas entre ellos teniendo una prueba de ANOVA con $p > 0.05$. En el presente estudio la mayoría de los extractos

redujo la producción de NO con IC_{50} entre 118 – 277 $\mu\text{g/mL}$ y no presentaron una diferencia significativa entre los valores de IC_{50} , concordando con los resultados de la otra investigación mencionada.

La actividad antiinflamatoria y antioxidante del extracto hidroalcohólico Carbó-Rayón, puede atribuirse a la presencia flavonoides. Mu y col. (2001) encontraron que Quercetina era responsable de la actividad antiinflamatoria en un estudio similar realizado en células RAW 264.7, donde se observó la disminución de la producción de NO por efecto del flavonoide.

La actividad antiinflamatoria observada en el extracto hidroalcohólico de Hermosillo, puede deberse muy probablemente a la presencia de Quercetina-3-*O*-malonilglucósido, siendo un resultado similar al encontrado en otro estudio (Mu y col., 2001). La actividad antiinflamatoria de los compuestos presentes en los extractos hidroalcohólicos de las plantas de este estudio se encontraron también presentes en extractos analizados en otra investigación, donde determinaron la actividad antiinflamatoria, inmunomoduladora e inhibitoria de la oxigenasa-1 en un modelo de rata con asma. La formulación herbal probada contenía extracto hidroalcohólico de fruto seco de *Z. jujube* (Abdureyim y col., 2011). Los compuestos de naturaleza fenólica presentes en los extractos hidroalcohólicos, le confieren a *Ziziphus obtusifolia* propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

El extracto de Caborca, presentó la mayor capacidad antioxidante, esta propiedad puede atribuirse al estrés hídrico y/o presencia de depredadores. El estrés hídrico induce cambios en el metabolismo fotosintético e induce cambios en el transcriptoma, el metabolismo y en la planta entera, dando como resultado la composición química particular de la planta. Cuando las plantas están estresadas producen más isoprenoides y compuestos fenólicos, compuestos que contienen más átomos de carbono que los compuestos del metabolismo primario. Esto se asocia aparentemente con la severidad de la sequía u otro factor ambiental (Niinemets, 2016). Estos metabolitos secundarios tienen propiedades pesticidas y son para la defensa contra los depredadores de las plantas (Devi y Bora, 2017).

La actividad antiproliferativa se evaluó primeramente en un extracto metanólico y su fracción de *n*-hexano, resultando que la actividad del extracto metanólico fue mayor en la línea celular RAW con IC₅₀ 187.8±4.0 µg/mL y sin efectos en la línea control L-929. La fracción de *n*-hexano del extracto metanólico tuvo una actividad de IC₅₀ 165.5±2.7 µg/mL. Subsecuentemente se subfraccionó la fracción de *n*-hexano del extracto metanólico en columna de sílica gel, utilizando solventes y mezcla de ellos en polaridad ascendente para posteriormente probar la actividad antiproliferativa de las fracciones, encontrándose que la actividad mejoraba. Varios informes en la literatura ejemplifican la susceptibilidad de varias líneas celulares tumorales a agentes citotóxicos encontrados en otras especies de *Ziziphus*.

En *Z. mauritiana* las fracciones activas ilustran una actividad antiproliferativa mejorada contra las células A549 (Asgarpanah y col., 2012) *Z. spina-cristi* mostró una potencia citotóxica eficiente hacia la línea celular HeLa (Jafarian y col., 2014). En otro estudio, en líneas celulares de cáncer humano: HeLa, Jurkat (leucemia de células T) y HEP-2 (carcinoma de laringe), se utilizó extracto acuoso de frutos de azufaifa secos en una concentración de 0 a 1 mg / ml. Encontraron inducción de apoptosis en estas líneas celulares de cáncer, y que HEP-2 fue el más sensible a este tratamiento con IC₅₀ de 0.1 µg / mL (Vahedi y col., 2008).

En la determinación del perfil químico de *Z. obtusifolia*, se encontraron triterpenos como: ácido ceanótico, ácido ceanoténico, ácido betulínico, ácido oleanólico, ácido ursólico. Se tienen reportes de estudios de estos compuestos encontrados en extractos de frutos de *Z. jujube* y han estudiado sus efectos en algunas líneas de células cancerosas, así como el mecanismo mediante el cual compuestos como el ácido ursólico y el ácido betulínico inducen la muerte celular (Guo y col., 2011; Yadav y col., 2010; Pawlowska y col., 2009).

La evasión de la apoptosis es una característica de las células tumorales y ayuda con la quimiorresistencia. Durante la apoptosis, las células muestran encogimiento y formación de membranas. Además, el cambio de PS a la cara externa de la membrana celular y este

evento se utiliza como marcador en la apoptosis (Delbridge y col., 2015). En nuestro estudio, se utilizaron el yoduro de anexina V-propidio y la tinción de JC-1 para detectar la apoptosis. El extracto de metanol y la fracción de *n*-hexano indujeron la externalización de PS, y los resultados muestran que las células HeLa tratadas con el extracto de metanol y la fracción de *n*-hexano murieron por apoptosis 7 veces con respecto al control.

Durante el estadio temprano de la apoptosis ocurre la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Rascon Valenzuela y col., 2015), evento que se evidenció en este estudio con la tinción JC-1, cuando la intensidad de fluorescencia roja / verde se redujo en comparación con los controles sin tratamiento. En el presente estudio, los extractos metanólico y su fracción de *n*-hexano fueron capaces de despolarizar la membrana mitocondrial. El mecanismo por el cual los compuestos presentes en los extractos de naturaleza triterpénica inducen la muerte celular por apoptosis es muy posible que sea por la vía intrínseca ya que en las primeras etapas de la apoptosis al despolarizar la membrana mitocondrial se provoca la salida del citocromo c y se activa la caspasa -9 y esta a su vez a las caspasas efectoras.

El extracto de la región de Estación Llano, tuvo poca actividad biológica. Este extracto no presentó los compuestos: brassicasterol, ácido cianoténico, Quercetin-3-*O*-rutinosido o Quercetin-3-*O*- β -D-xilosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnósido (Tabla XI). Mientras que el extracto de la región de Arizpe que no redujo la producción de NO en el cultivo, no presentó los compuestos: campesterol, β -sitosterol, Quercetin-3-*O*-malonil-glucósido, ácido ceanoténico, ácido betulínico, ácido pomónico, ácido ceanótico, Quercetin-3-*O*- β -D-xilosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-ramnósido y Kaempferol rutinósido. Por otro lado, el extracto de la región de Guaymas no redujo la producción de NO y como se puede observar en la Tabla XI en este extracto no se detectó a campesterol.

En este estudio se identificaron en los extractos compuestos triterpenos, glicósidos y compuestos fenólicos con datos de iones *m/z* que fueron consistentes con lo reportado en la literatura (Figura 8).

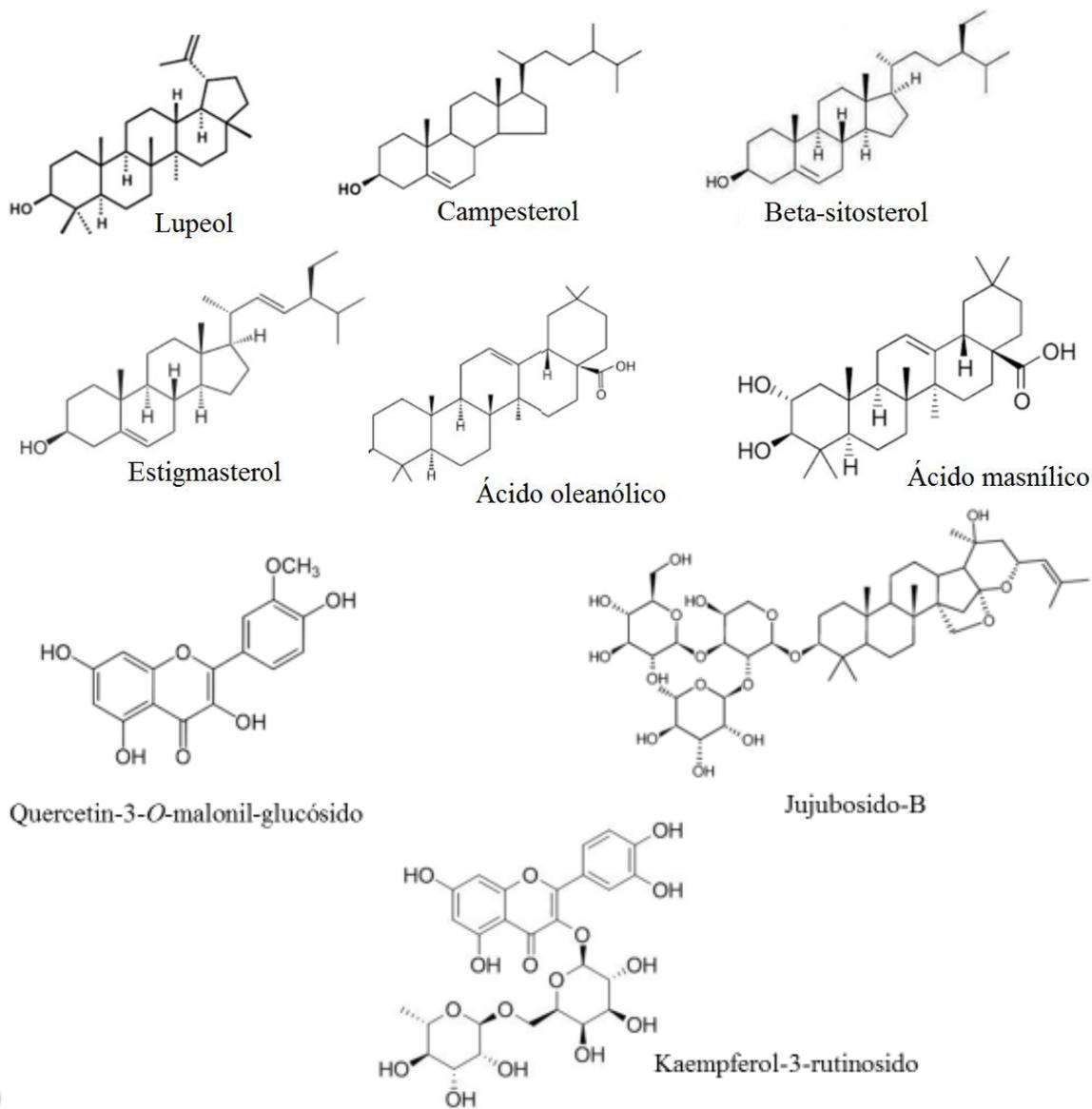


Figura 8. Compuestos encontrados en extractos de *Ziziphus obtusifolia*.

Existen reportes acerca de las propiedades farmacológicas de los compuestos encontrados, así como de sus actividades antiproliferativa, antiinflamatoria y antioxidante (Yang y col., 2013).

Entre los compuestos triterpenos identificados en la presente investigación, se encuentran: brassicasterol, estigmasterol, β -sitosterol, que fueron encontrados con anterioridad en plantas de otras especies del género *Ziziphus*. Mientras que los compuestos ácido ursólico y oleanólico se estudiaron e identificaron por HPLC-MS con peso molecular de 456 g/mol, encontrando sus iones principales por ESI en modo positivo m/z los cuales fueron: 439, 411 y 393, siendo los mismos que encontramos en esta investigación para *Ziziphus obtusifolia* (Chen y col., 2011).

El compuesto con m/z 609 se encontró en el estudio de Bai y col. (2016) y corresponde a Quercetina-3-*O*-rutinosido un flavonoide con propiedades antimutagénicas e inmunomoduladoras (Valentová y col., 2016). Otro de los compuestos identificado fue lupeol, un triterpeno que tiene propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, anti protozoarios, antiproliferativas y antiangiogénicas, así como la de disminuir e colesterol en la sangre (Valentová y col., 2016).

Algunos fitosteroles fueron analizados (Mo y col., 2013), coincidiendo para algunos de los compuestos encontrados en *Ziziphus obtusifolia* en el presente estudio: brassicasterol, campesterol, estigmasterol y β -sitosterol. Estos compuestos pueden existir en las plantas, así como tal, o formando ésteres con ácidos grasos o como glicósidos cuando se unen a carbohidratos. Se ha reportado que tienen actividades: antiinflamatoria, antibacterial, antifúngica y antitumoral (Othman y Moghadasian, 2011; Siddique y Saleem, 2011).

En el proceso de carcinogénesis, los compuestos antioxidantes y antiinflamatorios presentes en los extractos, actúan en las primeras etapas, como son la iniciación y la promoción (Figura 9). Durante estas etapas es posible que las reacciones sean reversibles, de tal forma que, si los compuestos actúan a este nivel, el consumo de tratamientos funcione previniendo que continúe el curso de la enfermedad. En etapas más avanzadas,

los tratamientos bien dirigidos pretender la reprogramación de la muerte celular de las células cancerosas, ya que estas evaden los estímulos de la apoptosis.

Las células estimuladas con LPS en la prueba de actividad antiinflamatoria, desencadenan la activación del NF- κ B y estas producen por la activación de genes de transcripción la producción de NO que fue cuantificado en el sobrenadante del cultivo celular, es por lo tanto una forma indirecta de saber que se ha activado esta vía de señalización. Se sabe por estudios previos como los reportados por Yadav y col. (2014), que los compuestos triterpenos pueden inactivar al NF- κ B, mediante la inhibición de la fosforilación de la proteína que lo mantiene en reposo en el citoplasma de las células, evitando la liberación del NF- κ B y su traslocación al núcleo para encender genes que promueven la proliferación celular y la evasión de la apoptosis. Los compuestos de esta naturaleza presentes en los extractos, durante el tiempo que estimularon a los macrófagos en esta prueba, muy probablemente inhibieron esta vía de señalización (Figura 9).

En esta investigación, la apoptosis temprana y la actividad antiproliferativa detectada son resultados consistentes. Encontramos por primera vez ante la evidencia, actividad antiproliferativa y apoptótica de *Z. obtusifolia* que informan los eventos moleculares de la apoptosis inducida por los extractos de esta planta. La actividad antioxidante y antiinflamatoria de la planta se deben a la presencia de compuestos con estas propiedades farmacológicas y con esta investigación se evidencian las razones del uso tradicional de la *Z. obtusifolia* con fines medicinales.

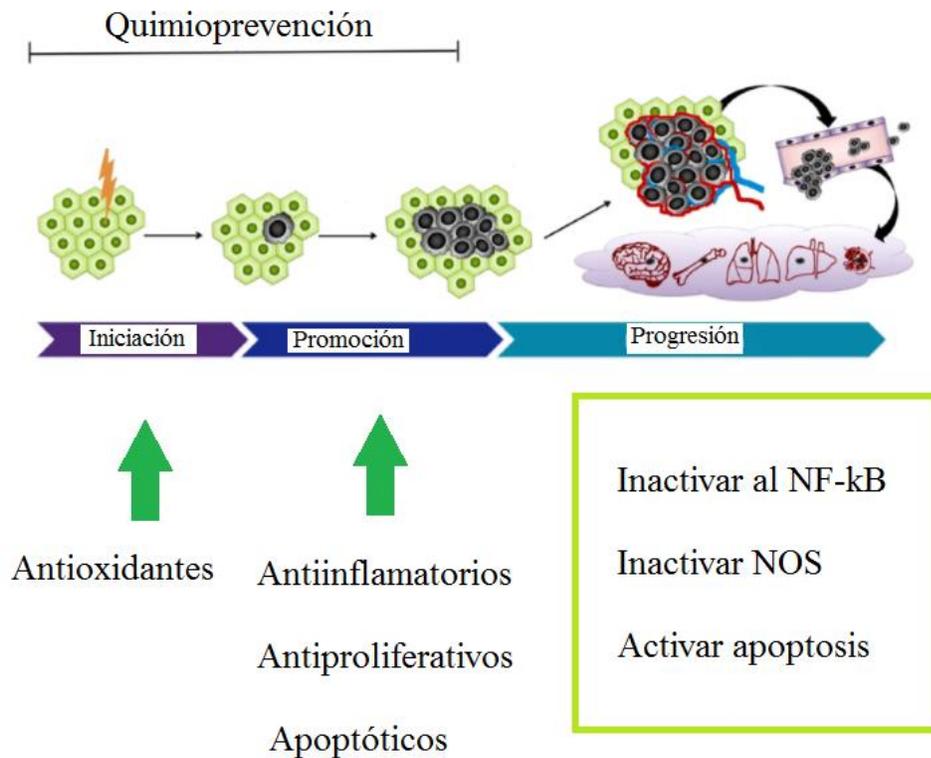


Figura 9. Actividad de los compuestos en el proceso de carcinogénesis (Liu y col., 2015).

NF-κB: Factor nuclear κB; NOS: Especies reactivas de oxígeno.

CONCLUSIONES

- a) Este estudio es el primero en comprobar las propiedades biológicas de *Ziziphus obtusifolia* relacionadas con la actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa; asimismo, el efecto que presentan las condiciones ambientales sobre las propiedades biológicas de los especímenes y su composición química.
- b) El perfil químico de *Ziziphus obtusifolia* está comprendido por compuestos del tipo polifenoles y triterpenos, se encuentran también presentes en otras plantas del mismo género.
- c) La presencia de compuestos tales como polifenoles, puede estar involucrada en la actividad antiproliferativa y antioxidante de esta planta.
- d) Estos resultados permiten identificar a *Ziziphus obtusifolia* como una fuente de compuestos bioactivos con interés farmacológico.

REFERENCIAS

- Abdureyim, S., Amat, N., Umar, A., Upur, H., Berke, B., y Moore, N. 2011. Anti-inflammatory, immunomodulatory, and heme oxygenase-1 inhibitory activities of ravan napas, a formulation of uighur traditional medicine, in a rat model of allergic asthma. *Evid Based Complement Alternat Med*.
- Al-Reza, S.M., Yoon, J.I., Kim, H.J., Kim, J.S., y Kang, S. C. 2010. Anti-inflammatory activity of seed essential oil from *Zizyphus jujuba*. *Food Chem Toxicol*, 48(2), 639-643.
- Arroyo A.J., Prashad G.M., Vásquez B.Y., Li P.E., y Tomás C.G. 2005. Actividad citotóxica in vitro de la mezcla de *Annona muricata* y *Krameria lappacea* sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, Vol 22 (4).
- Asgarpanah, J. 2012. Phytochemistry and pharmacologic properties of *Zizyphus spina christi* L. Willd. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(31).
- Ávalos G.A, y Pérez-Urria C.E. 2009. Metabolismo Secundario de Plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119-145. ISSN: 1989-3620.
- Bai, L., Zhang, H., Liu, Q., Zhao, Y., Cui, X., Guo, S., y Bai, N. 2016. Chemical characterization of the main bioactive constituents from fruits of *Zizyphus jujuba*. *Food Funct*, 7(6), 2870-2877.
- Belkhadir, Y., y Jaillais, Y. 2015. The molecular circuitry of brassinosteroid signaling. *New Phytol*, 206(2), 522-540. doi: 10.1111/nph.13269.
- Boletín de la secretaría de salud
http://www.dgis.salud.gob.mx/descargas/pdf/Boletxn_InformacixnEstadxstica_14_15.pdf (Accessed 21/11/2017, 2017).
- Brower, V. 2008. Back to Nature: Extinction of Medicinal Plants Threatens Drug Discovery. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 100(12), 838-839.
- Buchanan, B., Gruissem, W., y Jones, R. 2015. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Vol Second edition: Wiley-Blackwell.

- Bunel, V., Ouedraogo, M., Nguyen, A.T., Stevigny, C., y Duez, P. 2014. Methods applied to the in vitro primary toxicology testing of natural products: state of the art, strengths, and limits. *Planta Med*, 80(14), 1210-1226.
- Cannell, R.J.P. 1998. Natural Products Isolation. New Jersey: Human Press Inc. pp. 165–208.
- Coussens, L.M., y Werb, Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860-867.
- Czapski, G.A., Szypuła, W., Kudlik, M., Wileńska, B., Kania, M., Danikiewicz, W., y Adamczyk, A. 2014. Assessment of antioxidative activity of alkaloids from *Huperzia selago* and *Diphasiastrum complanatum* using in vitro systems. *Folia Neuropathologica*, 52(4), 394-406.
- Cheel, J., Antwerpen, P.V., Tůmová, L., Onofre, G., Vokurková, D., Zouaoui-Boudjeltia, K., y Nève, J. 2010. Free radical-scavenging, antioxidant and immunostimulating effects of a licorice infusion (*Glycyrrhiza glabra* L.). *Food Chemistry*, 122(3), 508-517.
- Chen, Q., Zhang, Y., Zhang, W., y Chen, Z. 2011. Identification and quantification of oleanolic acid and ursolic acid in Chinese herbs by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*, 25(12), 1381-1388.
- Choi, S.H., Ahn, J.B., Kozukue, N., Levin, C.E., y Friedman, M. 2011. Distribution of free amino acids, flavonoids, total phenolics, and antioxidative activities of Jujube (*Ziziphus jujuba*) fruits and seeds harvested from plants grown in Korea. *J Agric Food Chem*, 59(12), 6594-6604.
- Degtarev, A., y Yuan, J. 2008. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(5), 378-390.
- Delbridge, A.R., y Strasser, A. 2015. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ*, 22(7), 1071-1080.
- Devi, U., y Bora, D. 2017. Growth inhibitory effect of phenolic extracts of *Ziziphus jujuba* Mill. in dengue vector *Aedes aegypti* (L) in parent and F1 generation. *Asian Pac J Trop Med*, 10(8), 787-791.

- Dewanjee, S., Dua, T.K., y Sahu, R. 2013. Potential anti-inflammatory effect of *Leea macrophylla* Roxb. leaves: a wild edible plant. *Food Chem Toxicol*, 59, 514-520.
- Dureja, A., y Dhiman, K. 2012. Free radical scavenging potential and total phenolic and flavonoid content of *Ziziphus mauritiana* and *Ziziphus nummularia* fruit extracts. *International Journal of Green Pharmacy*, 6, 187.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516.
- Fawole, O.A., Ndhkala, A.R., Amoo, S.O., Finnie, J.F., y Van Staden, J. 2009. Anti-inflammatory and phytochemical properties of twelve medicinal plants used for treating gastro-intestinal ailments in South Africa. *J Ethnopharmacol*, 123(2), 237-243.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., y Parkin, D.M. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127(12), 2893-2917.
- Fox, J.B. 1979. Kinetics and mechanisms of the Griess reaction. *Analytical Chemistry*, 51(9), 1493-1502.
- Ghonime, M., Emara, M., Shawky, R., Soliman, H., El-Domany, R., y Abdelaziz, A. 2015. Immunomodulation of RAW 264.7 murine macrophage functions and antioxidant activities of 11 plant extracts. *Immunol Invest*, 44(3), 237-252.
- Guo, S., Duan, J.A., Tang, Y., Qian, Y., Zhao, J., Qian, D., y Shang, E. 2011. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of triterpenic acids, saponins and flavonoids in the leaves of two *Ziziphus* species by HPLC-PDA-MS/ELSD. *J Pharm Biomed Anal*, 56(2), 264-270.
- Guo, S., Duan, J.A., Tang, Y., Su, S., Shang, E., Ni, S., y Qian, D. 2009. High-performance liquid chromatography--two wavelength detection of triterpenoid acids from the fruits of *Ziziphus jujuba* containing various cultivars in different regions and classification using chemometric analysis. *J Pharm Biomed Anal*, 49(5), 1296-1302.

- Halliwell, B., y Cross, C.E. 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*, 102 Suppl 10, 5-12.
- Harborne, J.B., Williams, C.A., Greenham, J., y Moyna, P. 1974. Distribution of charged flavones and caffeylshikimic acid in Palmae. *Phytochemistry*, 13(8), 1557-1559.
- Hartmann, T. 2007. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2831-2846.
- Hernandez, J., Goycoolea, F.M., Quintero, J., Acosta, A., Castañeda, M., Dominguez, Z., Robles, R., Vazquez-Moreno, L., Velazquez, E.F., Astiazaran, H., Lugo, E., y Velazquez, C. 2007. Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Med.* 73:1469–1474.
- Hoshyar, R., Jamali, S., Fereidouni, M., y Abedini, M.R. 2015. The cytotoxic activity of *Ziziphus jujube* on cervical cancer cells: In Vitro study. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 61(8), 128-130.
- Instituto Nacional de Estadística y Geográfica (INEGI). 2016. "Estadísticas a Propósito del Día Mundial Contra el Cáncer (4 de Febrero) ".
- Irshad, M., Zafaryab, M., Singh, M., y Rizvi, M.M. 2012. Comparative Analysis of the Antioxidant Activity of *Cassia fistula* Extracts. *Int J Med Chem*, 2012, 157125.
- Jafarian, A., Zolfaghari, B., y Shirani, K. 2014. Cytotoxicity of different extracts of arial parts of *Ziziphus spina-christi* on Hela and MDA-MB-468 tumor cells. *Adv Biomed Res*, 3, 38.
- Jiang, X., Wang, X. 2004. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 73, 87-106.
- Jiménez-Estrada, M., Velázquez-Contreras, C., Garibay-Escobar, A., Sierras-Canchola, D., Lapizco-Vázquez, R., Ortiz-Sandoval, C., y Robles-Zepeda, R.E. 2013. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of plants of the ethnopharmacopeia from northwest of Mexico. *BMC Complement Altern Med*, 13(1), 12.

- Johnson, G.D., Moreno, S.S.F., y López, E.R. 1996. *Compendio fitoquímico de la medicina tradicional herbolaria de Sonora*. Hermosillo, Sonora, México: Universidad de Sonora.
- Khanna, H., Kairi, K., Pande, D., Negi, R., y Khamma R.S. 2014. Inflammation, Free Radical Damage, Oxidative Stress and Cancer. *Interdisciplinary Journal of Microinflammation*, 01(01).
- Kanwar, J.R., Kanwar, R.K., Burrow, H., y Baratchi, S. 2009. Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders. *Curr Med Chem*, 16(19), 2373-2394.
- Kanwar, J.R., Palmano, K.P., Sun, X., Kanwar, R.K., Gupta, R., Haggarty, N., y Krissansen, G.W. 2008. 'Iron-saturated' lactoferrin is a potent natural adjuvant for augmenting cancer chemotherapy. *Immunol Cell Biol*, 86(3), 277-288.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., y Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4), 239-257.
- Koley, T.K., Kaur, C., Nagal, S., Walia, S., Jaggi, S., y Sarika. 2016. Antioxidant activity and phenolic content in genotypes of Indian jujube (*Zizyphus mauritiana* Lamk.). *Arabian Journal of Chemistry*, 9 (Supplement 2), S1044-S1052.
- Li, F.S., y Weng, J.K. 2017. Demystifying traditional herbal medicine with modern approach. *Nat Plants*, 3, 17109.
- Li, J., y Yuan, J. 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48), 6194-6206.
- Li, J.W., y Vederas, J.C. 2009. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science*, 325(5937), 161-165.
- Li, T.-Z., Zhang, W.-D., Yang, G.-J., Liu, W.-Y., Chen, H.-S., y Shen, Y.-H. 2006. Saponins from *Polygala japonica* and Their Effects on a Forced Swimming Test in Mice. *Journal of Natural Products*, 69(4), 591-594.
- Liu, Y., Yin, T., Feng, Y., Cona, M.M., Huang, G., Liu, J., Ni, Y. 2015. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 5(5), 708-729.

- Lozano-Duran, R., y Zipfel, C. 2015. Trade-off between growth and immunity: role of brassinosteroids. *Trends Plant Sci*, 20(1), 12-19.
- Lung, S.C., Liao, P., Yeung, E.C., Hsiao, A.S., Xue, Y., y Chye, M.L. 2017. Acyl-CoA-Binding Protein ACBP1 Modulates Sterol Synthesis during Embryogenesis. *Plant Physiol*, 174(3), 1420-1435.
- Martin P.S., Yetman D., Fishbein P.J., Van Devender T.R., y Wilson R.K. 1998. Plantas de Río Mayo de Gentry: el bosque tropical caducifolio y los alrededores del noroeste de México. Tucson, EE. UU . University of Arizona Press.
- McKeown, N. 1999. Antioxidants and breast cancer. *Nutr Rev*, 57(10), 321-324.
- Miettinen, K., Inigo, S., Kreft, L., Pollier, J., De Bo, C., Botzki, A., y Goossens, A. 2017. The TriForC database: a comprehensive up-to-date resource of plant triterpene biosynthesis. *Nucleic Acids Res*.
- Min, Z., Wang, L., Jin, J., Wang, X., Zhu, B., Chen, H., y Cheng, Y. 2014. Pyrroloquinoline Quinone Induces Cancer Cell Apoptosis via Mitochondrial-Dependent Pathway and Down-Regulating Cellular Bcl-2 Protein Expression. *J Cancer*, 5(7), 609-624.
- Mishra, T., Khullar, M., y Bhatia, A. 2011. Anticancer Potential of Aqueous Ethanol Seed Extract of *Ziziphus mauritiana* against Cancer Cell Lines and Ehrlich Ascites Carcinoma. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 11.
- Mo, S., Dong, L., Hurst, W. J., y van Breemen, R.B. 2013. Quantitative analysis of phytosterols in edible oils using APCI liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Lipids*, 48(9), 949-956.
- Moran-Palacio, E.F., Tortoledo-Ortiz, O., Yañez-Farias, G.A., Zamora-Álvarez, L.A., Stephens-Camacho, N.A., Soñanez-Organis, J.G., y Rosas-Rodríguez, J.A. 2014. Determination of Amino Acids in Medicinal Plants from Southern Sonora, Mexico. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(4), 601.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1), 55-63.

- Mou, H., Li, Z., Yao, P., Zhuo, S., Luan, W., Deng, B., y Le, Y. 2013. Knockdown of FAM3B triggers cell apoptosis through p53-dependent pathway. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(3), 684-691.
- Mu, M.M., Chakravorty, D., Sugiyama, T., Koide, N., Takahashi, K., Mori, I., Yokochi, T. 2001. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J Endotoxin Res*, 7(6), 431-438.
- Naumoska, K., y Vovk, I. 2015. Analysis of triterpenoids and phytosterols in vegetables by thin-layer chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1381, 229-238.
- Niinemets, U. 2016. Uncovering the hidden facets of drought stress: secondary metabolites make the difference. *Tree Physiol*, 36(2), 129-132.
- Ola, M.S., Nawaz, M., y Ahsan, H. 2011. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*, 351(1-2), 41-58.
- Olajuyigbe, O.O., y Afolayan, A.J. 2011. Phenolic content and antioxidant property of the bark extracts of *Ziziphus mucronata* Willd. subsp. *mucronata* Willd. *BMC Complement Altern Med*, 11, 130.
- Onal, M., Ovet, G., y Onal, O. 2016. Review of Apoptosis. *MOJ Immunol* 3 (1):00073.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (s. f.). 10 datos sobre el cáncer. Recuperado el 2 de enero de 2017, de: <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/facts/es/>. Accessed 21/11/2017, 2017
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. 2015, 30 de enero. La mayoría de los tipos de cáncer se puede prevenir. Recuperado el 2 de enero de 2017, de: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10394&Itemid=40591&lang=es. Accessed 21/11/2017, 2017
- Othman, R.A., y Moghadasian, M.H. 2011. Beyond cholesterol-lowering effects of plant sterols: clinical and experimental evidence of anti-inflammatory properties. *Nutr Rev*, 69(7), 371-382.

- Otto, T., y Sicinski, P. 2017. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 17(2), 93-115.
- Panche, A.N., Diwan, A.D., y Chandra, S.R. 2016. Flavonoids: an overview. *journal of nutritional science*, 5, e47-e47.
- Paulino, N., Abreu, S.R., Uto, Y., Koyama, D., Nagasawa, H., Hori, H., y Bretz, W.A. 2008. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. *Eur J Pharmacol*, 587(1-3), 296-301.
- Pawlowska, A.M., Camangi, F., Bader, A., y Braca, A. 2009. Flavonoids of *Ziziphus jujuba* L. and *Zizyphus spina-christi* (L.) Willd (Rhamnaceae) fruits. *Food Chemistry*, 112(4), 858-862.
- Peng, W.H., Hsieh, M.T., Lee, Y.S., Lin, Y.C., y Liao, J. 2000. Anxiolytic effect of seed of *Ziziphus jujuba* in mouse models of anxiety. *J Ethnopharmacol*, 72(3), 435-441.
- Pettit, G.R., Mukku, V.J.R.V., Cragg, G., Herald, D.L., Knight, J.C., Herald, C.L., y Chapuis, J.-C. 2008. Antineoplastic Agents. 558. Ampelocissus sp. Cancer Cell Growth Inhibitory Constituents. *Journal of Natural Products*, 71(1), 130-133.
- Pradelli, L.A., Beneteau, M., y Ricci, J.E. 2010. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci*, 67(10), 1589-1597.
- Rascón Valenzuela, L.A., Jiménez Estrada, M., Velázquez Contreras, C.A., Garibay Escobar, A., Medina Juárez, L.A., Gámez Meza, N., y Robles Zepeda, R.E. 2015. Antiproliferative and apoptotic activities of extracts of *Asclepias subulata*. *Pharmaceutical Biology*, 53(12), 1741-1751.
- Rastogi, R.P., y Dhawan, B.N. 1982. Research on medicinal plants at the Central Drug Research Institute, Lucknow (India). *Indian J Med Res*, 76 Suppl, 27-45.
- Ray, S.D., Ray, S., Zia-Ul-Haq, M., De Feo, V., y Dewanjee, S. 2015. Pharmacological basis of the use of the root bark of *Zizyphus nummularia* Aubrev. (Rhamnaceae) as anti-inflammatory agent. *BMC Complement Altern Med*, 15, 416.
- Ferreira Rodrigues, R.A., de Carvalho, J.E, de Oliveira Sousa, I.M., Antônio, M.A., Pizão, P.E., Konecny Kohn, L., Estanislau do Amaral, M.C., Bittrich V., y Foglio, M.A.

2011. Antiproliferative activity, isolation and identification of active compound from *Gaylussacia brasiliensis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21, 622-626.
- Rousseaux, C.G., y Schachter, H. 2003. Regulatory issues concerning the safety, efficacy and quality of herbal remedies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 68(6), 505-510.
- Secretaría de Salud [SSA]. 2016, 30 de junio. Se conmemora el día del superviviente de cáncer. Recuperado el 5 de enero de 2017. http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf. (Accessed 21/11/2017, 2017).
- Sengar, N., Joshi, A., Prasad, S.K., y Hemalatha, S. 2015. Anti-inflammatory, analgesic and anti-pyretic activities of standardized root extract of *Jasminum sambac*. *J Ethnopharmacol*, 160(Supplement C), 140-148.
- Siddique, H.R., y Saleem, M. 2011. Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. *Life Sci*, 88(7-8), 285-293.
- Siddiqui, S., y Patil, M. 2015. Assessment of Antioxidant and Cytotoxic Activities of Extracts of Some *Ziziphus* Species with Identification of Bioactive Components. *European Journal of Medicinal Plants*, 8(4), 202-213.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., y Jemal, A. 2017. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*, 67(1), 7-30.
- Souto, A.L., Tavares, J.F., da Silva, M.S., Diniz, M.d.F., de Athayde-Filho, P.F., y Barbosa Filho, J.M. 2011. Anti-Inflammatory Activity of Alkaloids: An Update from 2000 to 2010. *Molecules*, 16(10).
- Sun, Y.F., Song, C.K., Viernstein, H., Unger, F., y Liang, Z.S. 2013. Apoptosis of human breast cancer cells induced by microencapsulated betulonic acid from sour jujube fruits through the mitochondria transduction pathway. *Food Chem*, 138(2-3), 1998-2007.
- Takada, Y., y Aggarwal, B.B. 2003. Betulinic acid suppresses carcinogen-induced NF-kappa B activation through inhibition of I kappa B alpha kinase and p65

- phosphorylation: abrogation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloprotease-9. *J Immunol*, 171(6), 3278-3286.
- Torres-Moreno, H. 2015. Antiproliferative and apoptosis induction of cucurbitacin-type triterpenes from *Ibervillea sonorae*. *Industrial Crops and Products*, v. 77, pp. 895-900-2015 v.2077.
- Trejo-Solis, C., Pedraza-Chaverri, J., Torres-Ramos, M., Jimenez-Farfan, D., Cruz Salgado, A., Serrano-Garcia, N., y Sotelo, J. 2013. Multiple molecular and cellular mechanisms of action of lycopene in cancer inhibition. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 705121. doi: 10.1155/2013/705121
- Umthong, S., Phuwapraisirisan, P., Puthong, S., y Chanchao, C. 2011. In vitro antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. *BMC Complement Altern Med*, 11, 37-37.
- Vahedi, F., Fathi Najafi, M., y Bozari, K. 2008. Evaluation of inhibitory effect and apoptosis induction of *Zyzyphus jujube* on tumor cell lines, an in vitro preliminary study. *Cytotechnology*, 56(2), 105-111.
- Valencia, D., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Galvez-Ruiz, J.C., Salas-Reyes, M., y Velazquez, C. 2012. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, 131(2), 645-651.
- Valentová, K., Šíma, P., Rybková, Z., Křížan, J., Malachová, K., y Křen, V. 2016. Anti mutagenic and immunomodulatory properties of quercetin glycosides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(5), 1492-1499.
- Veeresh, S., y Veeresh, K. 2010. Anthelmintic activity of *Zyzyphus jujuba* Mill and Lamk. *Pharmacognosy Journal*, 2(17), 63-65.
- Wink, D.A., Ridnour, L.A., Hussain, S.P., y Harris, C.C. 2008. The reemergence of nitric oxide and cancer. *Nitric Oxide*, 19(2), 65-67.
- Yadav, V.R., Prasad, S., Sung, B., Kannappan, R., y Aggarwal, B.B. 2010. Targeting Inflammatory Pathways by Triterpenoids for Prevention and Treatment of Cancer. *Toxins*, 2(10), 2428-2466.

- Yang, B., Yang, H., Chen, F., Hua, Y., y Jiang, Y. 2013. Phytochemical analyses of *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* seed by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst*, 138(22), 6881-6888.
- Yang, V.W. 2012. The Cell Cycle. 451-471.
- Yetman, D., y Van Devender, T.R. 2002. Etnobotánica de Mayo: Tierra, historia y conocimiento tradicional en el noroeste de México. Estados Unidos: University of California Press.
- Yu, D., Sakurai, Y., Chen, C.-H., Chang, F.-R., Huang, L., Kashiwada, Y., y Lee, K.-H. 2006. Anti-AIDS Agents 69.1 Moronic Acid and Other Triterpene Derivatives as Novel Potent Anti-HIV Agents. *Journal of medicinal chemistry*, 49(18), 5462-5469.
- Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., y Han, J. 2017. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Research*.
- Zhou, H., Tang, W., Zeng, J., y Tang, C. 2014. Screening of Terpene Lactones and Flavonoid Glycosides in ginkgo biloba Capsule by UPLC- Orbitrap High Resolution MS, with Emphasis on Isomer Differentiation. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(7), 369-376.
- Zimmermann, K.C., Bonzon, C., y Green, D.R. 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*, 92(1), 57-70.