UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

ESTUDIO DEL EFECTO ANTITUMORAL DE LA PLANTA *XYLOPIA AROMATICA*

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por la Bachiller Larisa Yackibel González Grande
como requisito parcial para optar al
título de Licenciado en Biología

Tutor (a) (es): Dr. Omar Estrada
Dra. Elizabeth Valdivieso

CARACAS, VENEZUELA
MAYO- 2014

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Larisa Gonzalez Grande, C.I. 19.370.217, titulado " Estudio del Efecto Antitumoral de la Planta *Xylopia aromática*", para optar al titulo de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 22 días del mes de Mayo de 2014, dejando constar que la Prof. Elizabeth Valdivieso actúo como coordinador del jurado examinador.

Dra. Elizabeth Valdivieso
Asesor Académico

Dr. Omar Estrada
Tutor

Dr. Francisco Arvelo
Jurado

Dr. Peter Taylor
Jurado

RESUMEN

El cáncer representa la segunda causa de muerte en Venezuela, por lo que recientemente se ha impulsado una búsqueda urgente de nuevos medicamentos. Una de las alternativas que se ha propuesto, es el desarrollo de fármacos a partir de productos naturales, diseñando para ello, estrategias de búsqueda a gran escala, como el *screening* de plantas, el cual emplea el fraccionamiento biodirigido, como modelo rápido de selección.

Mediante dicha metodología se analizó el extracto foliar de *Xylopia aromatica*, una planta de amplio uso etnofarmacológico en Venezuela, a fin de evaluar su posible efecto antinflamatorio y antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Determinándose, la capacidad citotóxica de la fracción E1 y sus respectivas sub-fracciones E1-I, E1-II y E1-III, siendo mayor el efecto de E1-II, de la cual se aislaron los compuestos E1-IIA (ácido (8)(17),12-labdadieno-19-oico) y E1-IIB (ácido 15,16-dihidroxi-8(17),13(E)-labdadieno-19-oico) ambos con capacidad citostática y anti-inflamatoria, ya que ambos compuestos, mayoritariamente el E1-IIA, inhibieron la producción de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7, con una baja tasa de toxicidad celular.

Asimismo, a través de un modelo murino, se determinó que la sub-fracción E1-I es una sustancia de precaución con una toxicidad aguda mayor a 2000 mg/Kg y menor de 5000 mg/Kg, que no genera efectos tóxicos en ratones de la cepa BALB/c. Conforme a todos los análisis realizados, la planta *X. aromatica* contiene metabolitos de interés farmacológico con posible aplicación anticancerígena y anti-inflamatoria, estimándose el diterpeno E1-IIA como una molécula de considerable interés que nos invita a continuar su estudio, ahondando a nivel celular y molecular sobre sus posibles dianas y puntos de acción.

PALABRAS CLAVES

Xylopia aromatica, metabolitos secundarios, fraccionamiento biodirigido, cáncer, inflamación.

A Dios, la Virgen

y mi Familia

por todos aquellos que han soñado junto a mi

AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS

Agradezco a Dios y a la Virgen, fuente de mi amor, fuerza y esparanza, quienes me han dado la bendición más grande del mundo: mi Familia.

No me alcanza la vida para demostrarle a mi Familia el gran amor que les tengo. Gracias a mi Madre y Padre quienes me dieron la vida y me educan con amor y valor, se preocupan por alentarme dia a dia pese a las dificultades, y a mis hermanos Oscar y Patricia, quienes son para mi un gran ejemplo a seguir, me guian en el camino, a pesar de lo fastidiosa y arisca que soy.

Debo mencionar la colaboración especial e invalorable de la Magister Patricia Gonzalez Grande, mi hermana, quien se involucró directamente en el desarrollo de la TESIS, me explicó la elaboraración del manuscrito y me guió durante todo el proceso, corrigiendo periódicamente los avances del mismo. Por ello la llamo: “MI SUPER TUTORA”.

Agradezco también a todos mis amigos, quienes me han enseñado a luchar, soñar, reir y lo bueno que es tener alguien al lado cunado se llora. En especial a mi gemela de alma Male, pues nos parecemos tanto que a veces me asusto, gracias por no haberme abandonado nunca y espero yo siempre poder corresponderte

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL vi

ÍNDICE DE TABLAS viii

ÍNDICE DE FIGURAS ix

LISTA DE ABREVIATURAS x

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1. El metabolismo secundario, fuente de productos naturales 1
1.2. Productos naturales de plantas como moléculas de interés farmacológico 2
1.3. El cáncer, una enfermedad compleja 5
1.3.1 El cáncer y su estrecha relación con la Inflamación 6
1.4. Desarrollo de fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer a partir de productos naturales de plantas 10
1.5. El *Screening* de plantas como estrategia de búsqueda de principios activos anti-cancerígenos 14
1.5.1 El Fraccionamiento Biodirigido, del extracto al metabolito activo 15
1.5.2 Bioensayos asociados al *Screening* de compuestos anti-cancerígenos 16
1.5.2.1 Modelo de evaluación *in vitro* de la actividad anti-cancerígena 17
1.5.2.2 Modelo de evaluación *in vitro* de la actividad anti-inflamatoria 19
1.5.2.3 Modelo de evaluación *in vivo* de la Toxicidad Aguda 19
1.6. *Xylopia aromatica* como planta de estudio y potencial fuente de compuestos anti-cancerígenos 21

2. OBJETIVOS 24

3. MATERIALES Y MÉTODOS 25

3.1. Obtención del material vegetal 25
3.2. Líneas celulares 25
3.3 Medios de cultivo 26
3.4 Cultivo celular 26
3.5 Modelo animal 27
3.6 Análisis Fitoquímicos 27
3.6.1 Obtención del extracto etanólico y fracciones de las hojas secas de *X. aromatica* 27
3.6.2 Fraccionamiento Biodirigido del extracto de *X. aromatica (Xyar)* 29
3.6.3 Elucidación de la estructura química de los compuestos E1-IIA y E1-IIB 29
3.7 Bioensayos 30
3.7.1 Ensayo de citotoxicidad y/o citostásis utilizando el colorante Sulforodamina B 30
3.7.2 Determinación de la inhibición de óxido nítrico (ON) mediante la reacción de Griess 32
3.7.3 Ensayo de viabilidad celular mediante el método colorimétrico de la sal de tetrazolio (MTT) 34
3.7.4 Evaluación del efecto antitumoral *in vivo* de la sub-fracción activa de las hojas de *X. aromatica* 35
3.7.4.1 Clasificación de la toxicidad aguda de la sub-fracción activa 35
3.7.4.2 Inducción del tumor primario 36

3.8 Análisis Estadístico 37

4. RESULTADOS 39
4.1 Obtención y fraccionamiento biodirigido del extracto etanólico de las hojas de *X. aromatica* 39
4.2 Evaluación del efecto citotóxico y/o citostático de los metabolitos secundarios presentes en la hoja de *X. aromatica* sobre las líneas tumorales 4T1, MDA-MB-231 y HT-29 41
4.3 Evaluación del efecto de la sub-fracción E1-II y los compuestos E1-IIA y E1-IIB sobre la producción de óxido nítrico (ON) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS 44
4.4 Evaluación del efecto antitumoral de la sub-fracción E1-II en el modelo de carcinoma mamario murino (4T1) 51
4.5 Estructura química de los compuestos E1-IIA y E1-IIB 54

5. DISCUSIÓN 56

5.1 Obtención y fraccionamiento biodirigido del extracto de las hojas de *X. aromatica* 56
5.2 Evaluación del efecto antitumoral *in vitro* de los componentes de las hojas de *X. aromatica* 58
5.3 Evaluación del efecto inhibitorio de los componentes de las hojas de *X. aromatica* en la producción *in vitro* de ON 68
5.4 Evaluación del efecto antitumoral *in vivo* de la sub-fracción E1-II del extracto de las hojas de *X. aromatica* 71

6. CONCLUSIONES 76

7. SUGERENCIAS 78

8. BIBLIOGRAFÍA 79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1. Fraccionamiento químico del extracto etanólico seco de las hojas de *X. aromatica*, mediante diferencia de solubilidad en solventes de decreciente polaridad (metanol/agua 1:1, acetona) y sub-fraccionamiento cromatográfico (exclusión molecular y capa fina) de las fracciones obtenidas del extracto; guiado por bioensayos 40

Tabla 4.2. Rendimiento porcentual del fraccionamiento químico y biodirigido de las hojas seca de *Xylopia aromatica* 41

Tabla 4.3. Concentración citotóxica y citostática del extracto seco, las fracciones, sub-fracciones y compuestos de las hojas secas de *X. aromatica* sobre las líneas tumorales 4T1, MDA-MB-231 y HT-29, expresados en µg/mL. Evaluado en un tiempo de 48 horas, mediante el método de tinción de Sulforodamina B 44

Tabla 4.4. Concentración inhibitoria media máxima (IC50) de la producción de óxido nítrico (ON) y de la viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7 expuestos durante 24 y 48 h a concentraciones crecientes (0-100µg/mL) de la sub-fracción E1 y los compuestos E1-IIA y E1-IIB. 51

Tabla 4.5. Signos clínicos de toxicidad aguda en ratones hembras (cepa BALB/c) debido a la administración de las dosis únicas intraperitoneales de la sub-fracción E1-II (2000mg/Kg) y DMSO (38mg/Kg). Tiempo de evaluación 15 días. Experimento realizado por duplicado y de manera independiente (n=6). 53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Esquema de fraccionamiento del extracto hidroalchohólico seco de las hojas de *X. aromatica*. 29

Figura 3.2. Patrón dosis-respuesta del efecto citotóxico de una droga problema sobre la viabilidad celular. 33

Figura 3.3. Curva de calibración de nitrito de sodio en medio Dulbecco suplementado. Cuantificación por el reactivo de Griess. n=3; r2=0,996. 35

Figura 3.4. Procedimiento de ensayo con una dosis inicial de 2000 mg/kg peso corporal. Guía 423 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) (2001). 39

Figura 4.1. Efecto citostático del extracto seco de las hojas de *X. aromatica* sobre la línea tumoral HT-29. Evaluado en un tiempo de 48 horas. Utilizando el método de tinción de Sulforodamina B. Los valores son la media ± S (n=3). 43

Figura 4.2. Efecto de la sub-fracción E1-II y los compuestos E1-IIA y E1-IIB extraídos de las hojas seca de *X. aromatica*, sobre la producción de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. Período de evaluación 24 h. Los valores son la media ± S (n=3). Las estrellas indican la concentración de E1-II, E1-IIA y E1-IIB a partir de la cual existen diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control (prueba T). 46

Figura 4.3. Efecto de la sub-fracción E1-II y los compuestos E1-IIA y E1-IIB extraídos de las hojas seca de *X. aromatica*, sobre la producción de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. Período de evaluación 48 h. Los valores son la media ± S (n=3). Las estrellas indican la concentración de E1-II, E1-IIA y E1-IIB a partir de la cual existen diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control (prueba T). 47

Figura 4.4. Viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7 expuestos a concentraciones crecientes de la sub-fracción E1-II y de los compuestos E1-IIA y E1-IIB en un período de 24 h. Los valores son la media ± S (n=3). La línea negra corresponde a la IC50. 49

Figura 4.5. Viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7 expuestos a concentraciones crecientes de la sub-fracción E1-II y los compuestos E1-IIA y E1-IIB en un período de 48 h. Los valores son la media ± S (n=3). La línea negra corresponde a la IC50. 50

Figura 4.6. Toxicidad aguda de la sub-fracción E1-II de las hojas seca de *X. aromática* en ratones de la cepa BALB/c. Dosis única: sub-fracción E1-II (2000mg/Kg) y DMSO (38mg/Kg). Experimento realizado por duplicado y de manera independiente. Los valores son la media ± S (n=6). 54

Figura 4.7. Estructura química de los diterpenos ácido (8)(17), 12-labdadieno-19-oico (E1-IIA) y ácido 15,16-dihidroxi-8(17), 13(E)-labdadieno-19-oico (E1-IIB). 56

LISTA DE ABREVIATURAS

100% de inhibición del crecimiento celular	TGI
2-Ciclooxigenasa	COX-2
50% de concentración letal	LC_{50}
50% de inhibición del crecimiento celular	GI_{50}
9-metaloproteinasa	MMP-9
Acetilcoenzima-A	acetil-CoA
Ácido desoxirribonucleico	ADN
Ácido nitroso	HNO_2
Ácido ribonucleico	ARN
Anhídrido nitroso	N_2O_3
Clasificación Toxicológica Aguda	ATC
Cromatografía líquida de alta resolución	HPLC
Dióxido de nitrógeno	NO_2
Dosis efectiva media	ED_{50}
Dosis letal mediana	DL_{50}
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	EPOC
Factor de crecimiento de fibroblastos	FGF
Factor de crecimiento del endotelio vascular	VEGF
Factor de necrosis tumoral	TNF-α
Factor estimulante de colonias-granulocito/macrófago	GM-CSF
Factor nuclear *kappa* B	NF-κB
Food and Drug Administration	FDA
Inhibidor de la Tirosina quinasa	TKI
Línea celular de adenocarcinoma de mama humano	MCF-7
Línea celular de adenocarcinoma de colon humano	HT-29
Línea celular de carcinoma de riñon humano	A-498
Línea celular de carcinoma de páncreas humano	PaCa-2
Línea celular de glioblastoma neuronal humano	U-251
Línea celular de adenocarcinoma de cuello uterino humano	Hela
Línea celular de carcinoma de estómago humano	HGC-27
Línea celular de carcinoma de mama humano	T47D
Línea celular de adenocarcinoma de ovario humano	Caov-3
Línea celular de ovario humano	NCI-ADR
Línea celular de adenocarcinoma de ovario humano	OVCAR
Línea celular de cáncer de próstata humano	PCO.3
Línea celular de leucemia humano	HL-60
Línea celular de cáncer de próstata humano	PC-3
Línea celular de cáncer de riñón humano	786-0
Línea celular de carcinoma mamario humano	MDA-MB-435
Línea celular epitelial de adenocarcinoma de pulmón humano	A-549
Lipopolisacárido	LPS
Organisación para la Cooperación y el Desarrollo Económico	OECD
Óxido nítrico	ON
Óxido nítrico sintasa endotelial	eNOS

Óxido nítrico sintasa inducible	iNOS
Óxido nítrico sintasa mitocondrial	mtNOS
Óxido nítrico sintasa neuronal	nNOS
Peroxinitrito	$ONOO^-$
Quinasas dependientes de ciclinas	CDK
Resonancia magnética nuclear de carbono	RMN C-13
Sal de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)- 2,5- difenil tetrazolio)	MTT
Síndrome de inmunodeficiencia adquirida	SIDA
Subfamilia de proteínas anti-apoptótica	Bcl-2
Subfamilia de proteínas anti-apoptótica	Bcl-XL
Subfamilia de proteínas pro-apoptótica	Bax
Sulforodamine B	SRB
Virus de la inmunodeficiencia humana	VIH
Virus de papiloma humano	VPH

1. INTRODUCCIÓN

Para que un organismo pueda vivir, crecer y reproducirse, necesita transformar una gran variedad de compuestos orgánicos, para ello, miles de reacciones simultáneas son llevadas a cabo a nivel celular y cada secuencia de reacciones está controlada, de tal manera que no se acumulen ni falten intermediarios o productos; estas reacciones pueden exhibir una gran complejidad. Todas estas reacciones conforman el metabolismo, el cual se define como la suma de las conversiones químicas de una célula (Mathews y col., 2002; Purves y col., 2003).

El metabolismo puede subdividirse en dos categorías principales, el catabolismo, aquellos procesos relacionados con la degradación de sustancias complejas y el anabolismo, los procesos fundamentales asociados a la síntesis de moléculas orgánicas complejas (Mathews y col., 2002).

Las moléculas esenciales para la vida son los aminoácidos (que permiten la formación de proteínas), los azúcares, los lípidos y los ácidos nucleicos (Mathews y col., 2002; Gutiérrez y Estévez, 2009). A pesar de las características extremadamente diferentes de los distintos seres vivos, las rutas generales para modificar y sintetizar estas sustancias son esencialmente las mismas para todos, con pequeñas modificaciones (Gutiérrez y Estévez, 2009). Estos procesos se conocen como metabolismo primario y los compuestos implicados en las diferentes rutas se conocen como metabolitos primarios (Gutiérrez y Estévez, 2009).

1.1. El metabolismo secundario, fuente de productos naturales

Se denomina metabolismo secundario al conjunto de procesos en el que participan compuestos con una distribución mucho más limitada y específica según el ser vivo (Gutiérrez y Estévez, 2009). Los compuestos que participan en este metabolismo se denominan metabolitos secundarios; su formación tiene lugar a partir de los metabolitos primarios y a diferencia de los mismos la ausencia de algún metabolito secundario no impide la supervivencia del organismo, si bien se verá afectado por ella, a veces gravemente (Ávalos y Pérez-Urria, 2009; Kennedy y Wightman, 2011).

Los metabolitos secundarios son específicos para cada especie aunque en ocasiones son comunes en grupos de especies relacionadas. Se les ha considerado producto de la adaptación de un organismo a un ecosistema particular, no obstante, en la mayoría de los casos no se ha logrado determinar el rol o función definitiva que desarrolla en el organismo cada metabolito secundario (Ávalos y Pérez-Urria, 2009; Kennedy y Wightman, 2011).

Dichos metabolitos se pueden aislar a partir de organismos terrestres, por ejemplo: plantas superiores, microorganismos, vertebrados e invertebrados; o de organismos marinos tales como: algas, esponjas, microorganismos como actinomicetos e invertebrados, entre otros (Gutiérrez y Estévez, 2009).

El estudio de estos compuestos secundarios fue iniciado por los químicos orgánicos del siglo XIX y principios del siglo XX, quienes se interesaron por estas sustancias y las llamaron **productos naturales** (término que desde entonces se ha utilizado indistintamente para referirse a los metabolitos secundarios) debido a su importancia como drogas medicinales, venenos, sabores, fragancias, pesticidas, resinas, gomas, colorantes, somníferos, alucinógenos, entre otros (Galbis, 2004). Constituyendo en definitiva, productos de gran interés industrial y comercial, de elevado valor económico pero bajo volumen productivo (Galbis, 2004).

1.2. Productos naturales de plantas como moléculas de interés farmacológico

Los botánicos del siglo XIX y principio del siglo XX se limitaron a la identificación, aislamiento y descripción de la distribución de varios compuestos químicos en el reino vegetal, por lo que durante muchos años se desconoció la función de los metabolitos secundarios derivados de éstas y el significado adaptativo de los mismos (Vilela y col., 2011). Se creía entonces, que estos compuestos eran sencillamente productos finales del metabolismo sin función alguna o simplemente metabolitos de desecho (Vilela y col., 2011).

No fue, sin embargo, hasta entrado el siglo XX que se logró desarrollar la química de los productos naturales y con ella alcanzar grandes descubrimientos asociados a la enorme cantidad y diversidad de

dichos compuestos, obteniéndose compuestos con una variedad enorme de estructuras químicas (Galbis, 2004; Vilela y col., 2011).

Como consecuencia de dicho desarrollo y aunado a ciertos avances en biología molecular, se demostró con claridad que los metabolitos secundarios cumplen un rol fundamental en la adaptación de las plantas al ambiente (Kennedy y Wightman, 2011), estando involucrados en la protección de las plantas frente al ataque de herbívoros (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011), la infección por patógenos microbianos y virales (Efferth y Koch, 2011), la atracción de polinizadores y dispersores de semilla (Kinghorn y col., 2010), actuando además como agentes alelopáticos en la competencia planta-planta y como sustancias protectoras frente a diversos tipos de estrés abiótico (Oh y col., 2009; Kennedy y Wightman, 2011).

En cuanto a la clasificación de los metabolitos secundarios se refiere, estos pueden catalogarse de acuerdo a sus estructuras, ubicación, biosíntesis, a la fuente de producción o a su acción biológica, siendo inevitable en cualquiera de los casos la superposición (Marcano y Hasegawa, 2002). Tomando en cuenta la biosíntesis de los metabolitos secundarios en plantas como denominador común se pueden dividir éstos en cuatro grupos principales: los terpenos, compuestos alifáticos, compuestos aromáticos y alcaloides (Marcano y Hasegawa, 2002).

Los productos naturales de plantas son fuente indiscutible de compuestos bioactivos, presentando una larga historia como agentes medicinales de relevancia farmacéutica. No obstante, es necesario considerar la diferencia entre compuestos bioactivos y fármacos, así pues, fármaco es toda sustancia química pura cualquiera que sea su origen (natural o sintético), utilizada en el tratamiento, curación o prevención de una enfermedad; es decir, que posea una actividad biológica apropiada para constituir un medicamento, por lo tanto un fármaco es el principio activo del medicamento (Galbis, 2004). Mientras que un compuesto bioactivo en plantas representa a un metabolito secundario con actividad biológica capaz de generar efectos farmacológicos o tóxicos en los animales, en particular en los humanos (Azmir y col., 2013).

Por tal razón, la investigación dedicada al desarrollo de fármacos es bastante amplia, pues son numerosos los métodos que se han utilizado para el descubrimiento y producción de los mismos,

incluyendo entre éstos métodos el aislamiento de productos naturales, la química sintética, la química combinatoria y el modelado molecular, entre otras (Balunas y Kinghorn, 2005).

A pesar del reciente interés en el modelado molecular, la química combinatoria y otras técnicas de química sintética de las compañías farmacéuticas y organizaciones de financiación, el estudio de productos naturales y en particular el de las plantas medicinales, sigue siendo una importante fuente no solo de nuevos fármacos en estado puro, sino también de nuevas pistas para el desarrollo de fármacos y entidades químicas nuevas (Balunas y Kinghorn, 2005). De hecho, en un estudio acerca del origen de los nuevos fármacos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) entre 1981 y 2008, se desprende que un 57.7% corresponden a productos naturales, entendiendo como tal a los propiamente llamados así, a sus derivados y a los fármacos que imitan las características moleculares de los mismos (Gutiérrez y Estévez, 2009).

El desarrollo de fármacos a partir de plantas aún en la actualidad proporciona importantes pistas de nuevas drogas, muchas de las cuales se aprueban o se someten a ensayos para usos clínicos principalmente contra objetivos de interés farmacológico cuyos tratamientos actuales no son suficientes, tales como el cáncer, la malaria, la enfermedad de Alzheimer, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) / síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedades pulmonares, cardiovasculares, microbianas, enfermedades inflamatorias crónicas, entre otros (Balunas y Kinghorn, 2005; Balunas y col., 2006; Schmidt y col., 2007; Aravindaram y Yang, 2010).

Se considera que el éxito de los productos naturales de plantas como posibles fármacos, radica en que son compuestos que ya han sido validados por la evolución: han sido biosintetizados, degradados y transformados por sistemas enzimáticos (Hong, 2011). Por tanto, a la hora de interactuar con las moléculas dianas lo realizarán de una manera privilegiada, es decir, muchos de estos productos aportan actividades biológicas altamente específicas, basadas muchas veces sobre nuevos mecanismos de acción (Gutiérrez y Estévez, 2009; Hong, 2011).

Por consiguiente, el estudio de productos naturales como posibles fármacos genera una utilidad extra y es que permite ahondar y dilucidar los blancos moleculares y las fisiopatologías celulares de diferentes

enfermedades, lo que deriva indiscutiblemente en un mayor entendimiento de dichos procesos (Galbis, 2004; Gómez y col., 2011).

Según establece la hipótesis anterior, la bioactividad de los productos naturales proviene de la capacidad de los mismos para unirse a algún receptor específico a nivel celular; lo que resta por hacer es, determinar a qué receptor es capaz de unirse un determinado producto natural (Galbis, 2004). O expresado de otra manera cualquier organismo viviente proporciona al científico una *biblioteca* de constituyentes bioactivos únicos, análogos a la *biblioteca* de productos químicos sintéticos que puede obtenerse por Química Combinatoria, la tarea es investigar y seleccionar entre la *biblioteca* "*combinatoria natural*", aquellos productos de interés farmacológico (Galbis, 2004).

Aunado a lo anterior, los productos naturales son una fuente de compuestos químicos de gran complejidad y diversidad estructural, que no sólo en esencia pueden ser nuevos fármacos, sino que también pueden proporcionar un punto de partida para el desarrollo de nuevos fármacos sintéticos, ya que muchas de las características estructurales comunes a los productos naturales (por ejemplo, centros quirales, anillos aromáticos, sistemas complejos de anillo, el número y proporción de heteroátomos) han demostrado ser altamente relevante para el descubrimiento de fármacos (Hemalswarya y Doble, 2006; Hong, 2011).

1.3. El cáncer, una enfermedad compleja

El cáncer es un término general utilizado para las enfermedades cuya característica común y principal es la multiplicación rápida de células anormales (malignas) (Jiménez, 2006), que proliferan en los órganos blanco y forman focos secundarios que frecuentemente son múltiples (Arvelo y Poupon, 2001). Así, mientras los eventos que conducen a la proliferación de células normales en sitios particulares, obedecen señales de control de la proliferación, vinculados la mayoría de las veces a la diferenciación o al fenómeno de la apoptosis, las células malignas escapan a estos controles (Arvelo y Poupon, 2001).

Cualquier parte del organismo se puede ver afectada por el cáncer, debido a que se producen canceres en la mayoría de los tipos celulares (Lodish y col. 2006). Comparando los casi 300 tipos celulares diferentes

del organismo humano, se pueden reconocer unos 200 tipos distintos de cáncer (Bamford y col., 2004; Lodish y col. 2006). Que se clasifican en carcinomas y sarcomas, siendo las leucemias una clase de sarcomas que proliferan como células aisladas en la sangre, mientras que la mayoría de los demás tumores son masas sólidas, denominados tumores malignos o neoplasias malignas (Lodish y col. 2006).

En la historia de un cáncer se pueden describir tres fases: la primera fase de crecimiento local, caracterizada por la transformación de una o varias células de un tejido a partir de la selección de un clon que origina el tumor primario; aclarando que aquí la noción de clon es relativa, ya que el tumor es heterogéneo por numerosos caracteres, sin descartar que sea posible encontrar elementos genéticos que prueben el origen común de las células (Arvelo y Poupon, 2001). Una segunda fase, constituida por la diseminación micrometastásica o migración de células tumorales aisladas o en pequeños grupos, originadas del tumor primario a través del sistema circulatorio y finalmente una tercera fase, caracterizada por la proliferación de células tumorales en órganos distantes del tumor primario, conocida como metástasis (Arvelo y Poupon, 2001).

Es importante mencionar que la transformación de una célula normal a una célula tumoral es un proceso muy dinámico, multifactorial y a largo plazo, conformado por múltiples etapas, durante las cuales las alteraciones genéticas (acumulación de mutaciones) ocurren principalmente en los genes que regulan la muerte, la diferenciación y la división celular, confiriendo esto determinadas ventajas de proliferación a las células tumorales (Polyak y Hahn, 2006; Aravindaram y Yang, 2010). Por su parte, las células malignas ya establecidas presentan un crecimiento atípico caracterizado por la autosuficiencia de las señales de proliferación, la insensibilidad a las señales inhibitorias de la división celular, el escape de la apoptosis, promoción de la angiogénesis y finalmente la metástasis (Lu y col., 2006).

Estas alteraciones son el resultado de una variedad de factores etiológicos, tales como la inestabilidad genómica y el estrés ambiental producido por agentes carcinógenos físicos, como las 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) (Klaunig y col., 2010); carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus como el VIH y el

virus de papiloma humano (VPH) y bacterias como *Helicobacter pylori*, entre otros (Lu y col., 2006). Además de los agentes infecciosos se ha asociado el desarrollo de células tumorales al microambiente de irritación e inflamación a nivel celular y de tejido (Lu y col., 2006).

1.3.1 El Cáncer y su estrecha relación con la Inflamación

La inflamación es descrita como enrojecimiento e hinchazón con calor y dolor, si bien, es un proceso complejo que involucra una serie de eventos inespecíficos que pueden ser provocados por numerosos estímulos o agresiones del medio, cada uno de los cuales provoca una respuesta característica que constituye una variante relativamente menor del mismo fenómeno (Gautam y Jachak, 2009).

La respuesta inflamatoria ocurre en tres fases distintas: una fase transitoria aguda, una fase sub-aguda tardía y una fase proliferativa crónica; cada una mediada aparentemente por diferentes mecanismos, algunos de los cuales son regulados por moléculas de señalización, otros en cambio involucran la activación de los factores del complemento (Gómez y col., 2011).

Ahora bien, en todo proceso inflamatorio los mediadores son secretados por las células inflamatorias que se encuentran de forma permanente en los tejidos (mastocitos y células endoteliales) o por células inflamatorias con la capacidad de migrar al foco inflamatorio (neutrófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos, basófilos y células dendríticas, entre otros tipos celulares), respondiendo a un estímulo específico (Gómez y col., 2011)

Respecto a la naturaleza de los mediadores inflamatorios, cabe destacar la existencia de mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios, siendo la respuesta inflamatoria normal (generalmente) auto-regulada, consistiendo en la eventual baja de la expresión de los mediadores pro-inflamatorios y el aumento de la expresión de mediadores anti-inflamatorios junto con la fagocitosis de las células dañadas (Lu y col., 2006). Sin embargo irregularidades en el proceso inflamatorio pueden desencadenar una inflamación crónica, generando morbilidad y mortalidad en enfermedades tales como, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, la peritonitis, entre otras (Gómez y col., 2011).

La inflamación crónica es una inflamación de duración prolongada (de semanas a meses y años) en la que la inflamación activa, la lesión tisular y la cicatrización suceden simultáneamente (Kratz y col., 1996); en la mayoría de las veces la inflamación es crónica desde el inicio, pero en ciertas ocasiones ésta puede progresar a partir de una inflamación aguda si el agente responsable (agresor) persiste, o por interferencia del proceso de cicatrización normal (Macarthur y col., 2004).

El microambiente inflamatorio crónico se caracteriza por la infiltración mayoritaria de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas (Macarthur y col., 2004). Los macrófagos producen una gran cantidad de mediadores pro-inflamatorios, especialmente metabolitos activos de oxígeno y nitrógeno (O_2^-, H_2O_2, OH^-, ON), los cuales al persistir en el medio celular de forma prolongada generan un daño sostenido en el tejido, el cual ha de ser reparado mediante la proliferación celular de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y la fibrosis, ambos acontecimientos en simultáneo, sin embargo, generan un microambiente propenso para la transformación neoplásica (Visser y col., 2005; Greene y col., 2011).

La relación entre inflamación crónica y cáncer, se determinó por vez primera hace ya 150 años, cuando en 1863 el médico R. Virchow notificó la presencia de leucocitos en los tejidos neoplásicos e indicó que los cánceres tendían a ocurrir en los sitios de inflamación crónica (Coussens y Werb, 2002).

Dicha asociación ha sido evidenciada también a través de estudios clínicos y epidemiológicos, en los que se observó un riesgo de cáncer colorrectal 10 veces mayor si éste se vincula con una enfermedad inflamatoria del intestino como la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn, al igual que el desarrollo de adenocarcinoma y linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa, cuya principal causa es la infección gástrica por *Helicobacter pylori* y finalmente se ha determinado que la infección por el VPH es la causa principal de cánceres de pene y ano-genital, entre muchos otros ejemplos (Coussens y Werb, 2002; Greene y col., 2011). De esta manera tanto la inflamación crónica causada por infección como por agentes físicos y/o químicos no infecciosos, puede contribuir a la carcinogénisis, en otras palabras la inflamación crónica es considerada un factor de riesgo para el desarrollo de ciertos tipos de cáncer (Shukla y col., 2012). No obstante, recientemente se observó que la inflamación aguda contribuye en cambio a la regresión tumoral (Lu y col., 2006).

La investigación sobre los mecanismos que subyacen en la transición de la inflamación crónica a los cánceres y el desarrollo de cánceres asociados a la misma, ha involucrado estudios sobre el papel que desempeñan las células y los mediadores inflamatorios característicos de la inflamación crónica (Lu y col., 2006). Identificando una variedad de mediadores inflamatorios que actúan en concierto para desempeñar un papel crítico en la predisposición e iniciación del cáncer, entre ellos se encuentran las citocinas (factor de necrosis tumoral (TNF-α), factor estimulante de colonias-granulocito/macrófago (GM-CSF) e interleucinas), las enzimas mediadoras (isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS), 2-ciclooxigenasa (COX-2), 9-metaloproteinasa (MMP-9)), los factores de crecimiento (del endotelio vascular (VEGF), de fibroblastos (FGF)), los catabolitos (óxido nítrico (ON) y prostaglandinas) y el factor nuclear *kappa* B (NF-κB) (Muntané y Mata, 2010; Aravindaram y Yang, 2010; Shukla y col., 2012).

En particular el óxido nítrico (ON) es un radical, de estado gaseoso, lipofílico de fácil difusión, con vida media de 10 a 20 segundos, sintetizado por una familia de óxido-reductasas conocidas como NOS, a partir del aminoácido L-arginina, NADPH y oxígeno, actualmente se conocen cuatro isoenzimas de la NOS (NOS neuronal, NOS endotelial, NOS inducible (iNOS) y más recientemente la NOS mitocondrial) (Federico y col., 2007).

Las primeras aproximaciones presentaban al ON como un potencial agente mutagénico capaz de dar lugar a la transformación neoplásica (Lu y col., 2006), pues en un microambiente de inflamación crónica, las células inflamatorias activadas liberan una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que pueden resultar citotóxicas y/o genotóxicas para las células epiteliales y del estroma cercano, ya sea de forma directa o indirecta reaccionando con otros componentes estructurales o químicos de las células (Ying y Hofseth, 2007).

En efecto, estudios posteriores presentaron evidencias contundentes de la capacidad del ON para reaccionar con las especies reactivas de oxígeno y producir intermediarios secundarios altamente tóxicos como son el peroxinitrito ($ONOO^-$), el anhídrido nitroso (N_2O_3), el dióxido de nitrógeno (NO_2) y el ácido nitroso (HNO_2), todos ellos potentes oxidantes, nitrantes y nitrosantes, capaces de actuar como agentes mutagénicos y nitrosaminas cancerígenas, al reaccionar con proteínas (especialmente con los residuos de

tirosina y cisteina), carbohidratos, lípidos, ADN y ARN (Grisham y col., 2000). El daño al ADN puntualmente, puede ser directo, al reaccionar el N_2O_3 con las purinas y pirimidinas o a través de la inhibición de las enzimas de reparación del ADN, lo que conduce a la generación de mutaciones y a la inestabilidad genómica (Grisham y col., 2000, Dhankhar y col., 2010).

Del mismo modo, la acción del ON sobre las proteínas conlleva modificaciones post-traduccionales, que se han relacionado no solo con la alteración de la función de las proteínas y la transcripción génica, sino también con lesiones genotóxicas, alteración de los puntos de control del ciclo celular, necrosis, apoptosis e incluso como se mencionó previamente la reparación del ADN (Muntané y Mata, 2010).

Tales indicios apuntan al ON y los demás mediadores inflamatorios, antes mencionados, como dianas en la búsqueda de nuevos fármacos en la prevención del cáncer. Inclusive se han registrado ya una gran variedad de fármacos anti-inflamatorios que actúan sobre la expresión de tales moléculas, aunado a ello, estudios clínicos han informado la reducción en la incidencia de cáncer en los pacientes tratados a largo plazo con medicamentos anti-inflamatorios, indicando que dichos agentes pueden ser utilizados en el tratamiento de prevención al cáncer (Visser y col., 2005).

Sin embargo, el papel de las células y los mediadores inflamatorios persiste una vez establecido el tumor, ya que las células inflamatorias infiltradas en los tumores están involucradas en la evasión de las células tumorales por parte del sistema inmunitario del individuo, incluso junto con los mediadores inflamatorios juegan un papel aún más directo facilitando la supresión de la apoptosis, la proliferación, la angiogénesis, la invasión y la metástasis tumoral (Lu y col., 2006). El ON ha sido asociado incluso a la progresión tumoral y la metástasis por inducción directa de la proliferación, angiogénesis, migración e invasión de las células tumorales (Fukumura y col., 2006), observándose también la sobreexpresión de la enzima NOS en diferentes tumores humanos (Hong y col., 2002).

Sin embargo, aún resulta difícil identificar la función específica del ON en el desarrollo del cáncer, pues en contraposición a lo antes expuesto, existen evidencias también de que este radical libre desarrolla diversas funciones como un mediador pleiotrópico, crítico para numerosos procesos biológicos (Xu y col.,

2002), luego el ON puede tanto promover como inhibir la progresión tumoral y la metástasis (Fukumura y col., 2006; Dhankhar y col., 2010).

1.4. Desarrollo de fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer a partir de productos naturales de plantas

La mayoría de los nuevos medicamentos derivados de metabolitos secundarios de las plantas han sido aplicados hacia el tratamiento y/o prevención del cáncer, ya que hay una urgente necesidad en la búsqueda de nuevos agentes antitumorales, debido a las alarmantes cifras de personas que padecen esta enfermedad.

Así pues, se atribuyen a esta enfermedad 7,6 millones de defunciones (aproximadamente el 13% del total) ocurridas en todo el mundo en el año 2008, más del 70% de las defunciones por cáncer se registraron en países de bajos y medianos ingresos. Se prevé que el número de defunciones por cáncer siga aumentando en todo el mundo y supere los 13,1 millones en el año 2030 (Organización Mundial de la Salud, 2013).

En la actualidad el cáncer representa la principal causa de muerte en Venezuela, precedido sólo por las enfermedades cardiovasculares (Capote, 2013); con una incidencia estimada en el año 2009 de 36.387 casos totales, de los cuales 17.609 corresponden a hombres y 18.778 a mujeres, con un número de defunciones de 10.334 y 9.954 respectivamente (estos datos contemplan únicamente los canceres más frecuentes y excluyen las neoplasias malignas de piel diferentes de melanoma) (Capote, 2013).

Si bien, las cifras anteriores son preocupantes, se han logrado progresos parciales en la prevención, el diagnóstico y/o tratamiento de la enfermedad, lo cual resulta notorio al comparar la alta tasa de incidencia de cáncer con la relativa baja tasa de mortalidad (Balunas y Kinghorn, 2005, Capote, 2013).

Inicialmente se concibió la quimioterapia antineoplásica como la administración al paciente de sustancias químicas (fármacos), que actuasen destruyendo las células tumorales o inhibiendo la división celular, en definitiva interfiriendo en el crecimiento tumoral (Jiménez, 2006). No obstante, se constató que los efectos de estos fármacos eran bastante amplios y no solo actuaban sobre las células tumorales, sino también, aunque en menor grado, sobre las células normales, especialmente las que se dividen

rápidamente bajo circunstancias normales (células de la medula ósea, tracto digestivo y folículo piloso), dando como resultado mielosupresión (disminución de la producción de células sanguíneas, por lo tanto inmunosupresión), mucositis (inflamación del revestimiento del tracto digestivo) y alopecia (pérdida de cabello), debido a que según el esquema establecido las drogas más efectivas eran justamente las que presentaban una mayor toxicidad (Jiménez, 2006).

La investigación quimioterapéutica fue centrada en la búsqueda y selección de compuestos con actividad citotóxica frente a líneas tumorales, causantes de la regresión tumoral en aloinjertos o xenoinjertos en modelos murinos y la ventaja de supervivencia de los animales tratados (Lu y Mahato, 2009). Entendiendo como compuestos citotóxicos, aquellas sustancias capaces de inducir la muerte de las células cancerígenas por diferentes vías tal como la apoptosis, la necrosis o la autofagia (Rixe y Fojo, 2013).

Entre el año 1940 y 2002, 40% de la totalidad de fármacos disponibles contra el cáncer eran productos naturales en sí mismos o derivados y otro 8% imitadores de productos naturales (Balunas y Kinghorn, 2005). Se considera incluso, que una buena parte de los progresos actuales en la quimioterapia contra el cáncer se debe al estudio de las plantas como fuente alternativa de agentes quimioterapéuticos (Balunas y col., 2006),de hecho existen evidencias clínicas de las propiedades antitumorales de un gran número de compuestos de origen vegetal, que presentan menor toxicidad que los tratamientos empleados actualmente, actuando la mayoría de ellos, sobre el ciclo celular, inhibiendo alguna fase específica del mismo (Jiménez, 2006; Aravindaram y Yang, 2010).

Ahora bien, actualmente el concepto de quimioterapia ha sido ampliado, surgiendo nuevas propuestas para atacar de forma efectiva un tumor sin que esto implique citotoxicidad; introduciendo el concepto de citostáticos, que se refiere a aquellas sustancias capaces de inhibir la división de las células cancerígenas sin causar la muerte celular directa, sin embargo, en la literatura aún se discute sí los compuestos citostáticos pueden terminar comportándose como citotóxicos después de un largo período de aplicación, conduciendo así a la muerte celular (Rixe y Fojo, 2013). Entre los nuevos agentes evaluados se encuentran compuestos con actividad inmuno-moduladora, anti-angiogénica, anti-proteasas, entre otros (Robert y Jarry, 2003; Wagner, 2006; Lu y Mahato, 2009).

En particular el uso potencial de los agentes inmuno-moduladores para el tratamiento o control de diversas enfermedades cancerosas ha tomado relevancia recientemente, debido a que muchas de las redes celulares y vías de señalización molecular que actúan en diferentes etapas de la carcinogénesis están asociadas a la regulación del sistema inmune y las actividades inflamatorias crónicas (apartado 1.3.1), lo que proporciona una justificación para el uso de inmuno-moduladores en el tratamiento contra el cáncer, destacando entre ellos los compuestos anti-inflamatorios (Aravindaram y Yang, 2010).

La mayoría de los agentes anti-inflamatorios que presentan propiedades antitumorales se distribuyen en dos clases: (a) los agentes de bloqueo, que inhiben el paso de la iniciación del tumor mediante la prevención de la activación de carcinógenos y (b) agentes supresores, que inhiben la proliferación de células tumorales durante los pasos de promoción de la carcinogénesis y metástasis (Aravindaram y Yang, 2010).

Por su parte los metabolitos secundarios de plantas han significado una fuente importante no solo de compuestos citotóxicos, sino también de compuestos anti-inflamatorios, capaces de bloquear la iniciación de la carcinogénesis a través de diferentes mecanismos: prevención de ataques al ADN por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, inhibición de la captación de materiales tóxicos en las células, mejora de la reparación del ADN, activación de enzimas protectoras (glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y hemo-oxigenasas), regulación del ciclo celular de las células tumorales en una fase temprana o en su fase terminal, mediante la inhibición de la angiogénesis o la prevención de la invasión y metástasis tumoral (Aravindaram y Yang, 2010).

Entre los productos naturales de plantas de comprobada actividad anti-inflamatoria capaces de prevenir la iniciación de la carcinogénesis utilizados en la actualidad, destacan: el flavonoide Quercetina, un eficaz antioxidante e inductor de la apoptosis en células de carcinoma de mama humano MDA-MB-435 en el modelo de xenoinjerto *in vivo*, que actúa inhibiendo la producción del ON (Hämäläinen y col., 2007) ya que interactúa con las enzimas iNOS, COX-2 y algunas caspasas (Dechsupa y col., 2007), la Apigenina y el carotinoide Zeaxantina, entre otros (Aravindaram y Yang, 2010). También están los compuestos capaces de inhibir la promoción de la carcinogénesis, la invasión, angiogénesis y metástasis tumoral, entre

ellos, los terpenoides Geraniol y Limoneno que inducen la apoptosis en la línea de cáncer humano de próstata (PC-3), la inhibición del ciclo celular y además presentan efecto anti-angiogénico, actuando sobre el TNF-α, Bcl-2, Bcl-XL, Bax, caspasas, ciclina D1, CDK, VEGF y la expresión de los genes p53, p21 y p27 (Aravindaram y Yang, 2010) y el polifenol Curcumina que presenta efecto antiproliferativo, antioxidante y antiangiogénico, actuando sobre las dianas moleculares NF-κB, Bcl-2, COX-2, VEGF, Bax, iNOS, p53, p21, entre otras (Aravindaram y Yang, 2010).

Finalmente, y a pesar de la gran variedad de fármacos ya existentes, resultan insuficientes para contrarrestar dicha enfermedad, debido a la elevada complejidad y variedad de cánceres y a la incapacidad de tales compuestos de combatir la creciente quimioresistencia presentada en varios tipos de tumores. Por ende, es necesaria la búsqueda de nuevos principios activos más efectivos y menos tóxicos, que permitan prevenir y tratar con mayor eficacia tal enfermedad (Herrin y Thigpen, 1999; Kaufmann y Earnshaw, 2000; Rixe y Fojo, 2007; Lu y Mahato, 2009).

1.5. El *Screening* de plantas como estrategia de búsqueda de principios activos anti-cancerígenos

El desarrollo de fármacos es un amplio y largo proceso, que incluye estudios pre-clínicos y clínicos de diferentes fases. Los ensayos pre-clínicos preceden a los ensayos clínicos (las pruebas en seres humanos) y son la etapa de investigación, donde se incluye la búsqueda de nuevos principios activos, estudios del mecanismo de acción del compuesto, de las relaciones estructura-actividad y de toxicología en modelos animales, entre otros estudios.

Particularmente la investigación en el descubrimiento de nuevos fármacos a partir de plantas incluye la participación de varias áreas de conocimiento y distintos métodos de análisis. El proceso suele comenzar con un botánico, etnobotánico, etnofarmacologista o ecólogo vegetal, que recoge e identifica la(s) planta(s) de interés (Balunas y Kinghorn, 2005). Seguidamente fitoquímicos se encargan de preparar los extractos vegetales y condicionar estos para los ensayos biológicos con relevancia farmacéutica (Balunas y Kinghorn, 2005). Iniciando así el proceso de aislamiento y caracterización del compuesto(s) activo(s) (Balunas y Kinghorn, 2005).

La colección de plantas, puede implicar especies con actividad biológica conocida, de las cuales el(los) compuesto(s) activo(s) no ha sido aislado(s), por ejemplo, plantas tradicionalmente utilizadas como remedios por alguna cultura en especial, o puede implicar taxones recolectados al azar para un programa de estudio a gran escala, conocido técnicamente como *screening*, respetando por supuesto los derechos de propiedad intelectual del país donde se recogen la(s) planta(s) de interés (Cos y col., 2006; Kinghorn y col., 2010).

La investigación a través del *screening,* pone énfasis en disponer de una buena y extensa colección de material de partida, fundamentalmente extractos, que cubran la mayor diversidad de géneros, especies y ecosistemas; de manera que pueda encontrarse una amplia expresión de todo tipo de metabolitos secundarios, asegurando de esta forma una gran variedad estructural (Bermejo y col., 2011).

Por tal motivo, el *screening* permite aumentar la probabilidad de descubrimiento de nuevos fármacos a partir de productos naturales de plantas, generando amplias bibliotecas de datos, cuyas muestras pueden ser mezclas, tales como extractos crudos, mezclas pre-fraccionadas o compuestos puros, donde cada uno de estos diseños de bibliotecas lleva consigo ventajas y desventajas (Koehn, 2008).

Para que el programa de búsqueda de nuevos fármacos basado en productos naturales de plantas cumpla con las expectativas de satisfacer los rápidos ciclos de tiempo característicos de otros enfoques como la química sintética o combinatoria, el modelado molecular, entre otros; y se lleve a cabo con eficacia y éxito, se han desarrollado y optimizado varias estrategias de estudio, entre ellas: la recolección y extracción de la biomasa, el fraccionamiento dirigido por la bioactividad de los componentes (fraccionamiento biodirigido), técnicas eficaces de ensayos de la actividad biológica (bioensayos), la eficiente elucidación estructural, estudios biológicos y clínicos, la preparación de muestras a gran escala y el estudio de las relaciones estructura-actividad (SAR) (Galbis, 2004; Pieters y Vlietinck,2005).

1.5.1 El Fraccionamiento Biodirigido, del extracto al metabolito activo

La fuente de inspiración para el desarrollo del fraccionamiento biodirigido, provino de la disciplina de Productos Naturales, enfrentándose ésta a la identificación y aislamiento de los principales constituyentes

químicos bioactivos (metabolitos secundarios) presentes en el extracto de una planta o animal (Phillipson y col, 2002).

Entendiendo como extracto todo tejido, órganos o exudado de origen vegetal o animal, fresco o seco, que bajo esta forma y condición primigenia, presenta alguna actividad biológica y ha sido tratado física, química o biológicamente, con fines de lograr una óptima conservación, es decir, el extracto es una mezcla compleja de compuestos, que necesita ser procesada para aislar los principios activos contenidos en dichos tejidos vegetales o animales (Albornoz, 1992).

Con el objetivo de determinar la actividad biológica de uno o más de los compuestos desconocidos, presentes en una mezcla compleja (extracto), se desarrolló la estrategia del fraccionamiento biodirigido (Pauli y col., 2005). Ésta consiste, en la reducción secuencial de la complejidad de la mezcla, mediante un proceso químico de fraccionamiento (Pauli y col., 2005). Una vez separadas las fracciones, se realizan los bioensayos que permiten determinar la o las fracciones activas, las cuales son nuevamente fraccionadas, guiándose por la evaluación biológica, tantas veces como sea necesario (Pauli y col., 2005).

Cuando la complejidad de la mezcla se reduce a unos cuantos compuestos individuales, las fracciones se someten a la identificación, cuantificación y análisis estructural, para poder finalmente asignar las estructuras químicas correspondientes a cada uno de los compuestos activos (Brack, 2003). El fraccionamiento se puede basar en las diferentes propiedades fisicoquímica y químicas de los analitos, incluyendo la polaridad, la hidrofobicidad, el tamaño molecular y la presencia de determinados grupos funcionales. Así, el propio fraccionamiento aporta información de las propiedades de los compuestos fraccionados, que puede ser útil para la identificación química (Brack, 2003).

Las técnicas químicas asociadas al fraccionamiento biodirigido, incluyen fundamentalmente técnicas de separación simples como cromatografías en capa fina, filtración en gel, de gases, o más avanzadas como la cromatografía en contracorriente (CCC) y líquida de alta presión (HPLC); seguido por técnicas espectroscópicas de identificación y elucidación de estructuras química, como espectroscopia ultravioleta, resonancia magnética nuclear de carbono (RMN C-13), entre otras (Wu y col., 2008; Weller, 2012).

El fraccionamiento biodirigido ha demostrado ser una herramienta exitosa, con aplicaciones actuales y potenciales tanto en el *screening* de compuestos naturales como en diversos campos, que incluyen la toxicología, el análisis ambiental, el análisis de dopaje, el análisis de alimentos, la toxicología forense y el estudio de feromonas (Weller, 2012). Reportando para el 2012 varios miles de referencias de trabajos donde se ha utilizado el fraccionamiento biodirigido como herramienta (Weller, 2012).

1.5.2 Bioensayos asociados al *Screening* de compuestos anti-cancerígenos

Los ensayos de la actividad biológica o bioensayos, son fundamentales en el proceso del fraccionamiento físico-químico del extracto, ya que no solo lo guían, sino que son en última instancia los que discriminan y determinan la presencia de compuestos de interés específico en la muestra evaluada (Weller, 2012).

Por consiguiente, la elección de qué tipos de bioensayos ha de realizarse durante el fraccionamiento biodirigido, conlleva un estudio concienzudo de los mismos y se considera parte esencial en el diseño experimental de los estudios a gran escala, en búsqueda de nuevos fármacos (Pauli y col., 2005; Weller, 2012).

Ciertos criterios rigen la adecuada elección de un bioensayo para fraccionamientos biodirigidos, entre ellos destacan: la capacidad del ensayo para seleccionar o indicar el compuesto que interactúa con la entidad biológica, es decir, el compuesto bioactivo relevante para la investigación llevada a cabo, la sencillez, reproducibilidad, automatización (se considera ideal bioensayos automatizados), de bajos costos, alto rendimiento de la muestra y finalmente, se considera que un bioensayo es adecuado para cierto fraccionamiento cuando es capaz de proporcionar información suficiente para correlacionar rápidamente la actividad biológica observada en una mezcla con los componentes individuales de la misma, a fin de hacer frente a un número variado de extractos y fracciones (Phillipson y col, 2002; Weller, 2012; Valgas y col, 2007).

Como se mencionó previamente, existe una amplia gama de ensayos biológicos que se pueden realizar para dirigir un fraccionamiento físico-químico según sea el interés de la investigación, así pues, se han

propuesto bioensayos para el *screening* de agentes anti-cancerígenos como los ensayos de citotoxicidad e inflamación *in vitro*, que permiten realizar de forma preliminar y rápidamente, distinciones a gran escala sobre la efectividad del compuesto. Por su parte los compuestos con efectos prometedores a continuación son sometidos a ensayos biológicos más precisos de mayor alcance como los de toxicidad, inflamación y antitumorales *in vivo*, y ensayos que permitan puntualizar los mecanismos y rutas por los que actúa, los cuales requieren mayor tiempo de realización y permiten estudiar a profundidad la actividad del compuesto (Balunas y Kinghorn, 2005).

1.5.2.1 Modelo de evaluación *in vitro* de la actividad anti-cancerígena

A finales de la década de 1980 en el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, fue desarrollada una colección de 60 líneas celulares de tumores humanos, como una herramienta *in vitro* para el desarrollo del *screening* de productos naturales, especialmente de plantas (Boyd y Paull, 1995). Se destinó esta colección para la suplantación de los ensayos del modelo *in vivo* de tumores trasplantables en ratones (Abbott y col., 1967), debido a la ausencia relativa de la actividad clínica de los compuestos que habían sido seleccionados a través de dicho modelo murino en tratamientos de tumores sólidos humanos, tomando en cuenta además que el modelo de xenoinjertos en ratones, no era precisamente un ensayo rápido que permitiera lograr los objetivos temporales del *screening* (Boyd y Paull, 1995).

Siendo la finalidad de dicha colección de líneas celulares, identificar compuestos con efecto inhibidor del crecimiento tumoral o de efecto tóxico para determinados tipos de tumores, se encontraron rápidamente los patrones de sensibilidad y resistencia relativa de las líneas celulares a medicamentos contra el cáncer ya establecidos (compuestos estándar), proporcionando información sobre los posibles mecanismos de inhibición del crecimiento y la muerte celular, ya que los compuestos conocidos que actúan de una manera similar produjeron patrones obviamente similares (Shoemaker, 2006).

Esta observación llevó a la elaboración de convenios formales para la presentación y análisis de los datos obtenidos a partir de los ensayos de citotoxicidad en el programa de *screening* (Shoemaker, 2006). Presentando el perfil de sensibilidad y resistencia relativa de todas las líneas celulares a un compuesto determinado, a tres niveles de efecto: 50% de inhibición del crecimiento celular (GI_{50}), 100% de

inhibición del crecimiento celular (*TGI*) y 50% de concentración letal (LC_{50}), se puede construir un gráfico dosis-respuesta que permite comparar los patrones de nuevos compuestos, cuyo mecanismo de acción es desconocido, con compuestos antitumorales ya establecidos cuyo mecanismo de acción se conoce, y de esta manera no solo obtener información acerca del potencial citotóxico si no también del posible mecanismo de acción del compuesto a estudiar (Shoemaker, 2006). Lo que proveyó una dimensión adicional e inesperada para el uso de tal colección de células tumorales.

Aunado a tal aplicación, el modelo de evaluación *in vitro* de la actividad anti-cancerígena no solo contribuyó en la búsqueda de agentes quimioterapéuticos, sino también en descubrimientos en diversos campos como: la inmunoterapia contra el cáncer, la terapia molecular dirigida en el descubrimiento de drogas anti-cancerígenas, la virología (descubrimiento de medicamentos para el VIH y una visión de la patogénesis viral) y la patogénesis de las toxinas bacterianas con potencial de bioterrorismo, entre otros (Shoemaker, 2006).

1.5.2.2 Modelo de evaluación *in vitro* de la actividad anti-inflamatoria

Los macrófagos son células tisulares pertenecientes al sistema inmunitario derivadas de los monocitos que tras penetrar en los tejidos se convierten en macrófagos y producen una gran cantidad de mediadores pro-inflamatorios: factores de crecimiento, citocinas, enzimas y metabolitos activos de oxígeno y nitrógeno (O_2^-, H_2O_2, OH^-, ON) responsables de la función citotóxica de los macrófagos, como respuesta a un estímulo específico (véase apartado 1.3.1) (Ortega y col., 2007).

Dichas células, juegan un papel crucial en la iniciación y perpetuación de la inflamación crónica, además ha sido estudiado el rol de los macrófagos como promotores de tumores en los cánceres asociados con la inflamación crónica, inclusive en ensayos clínicos, se encontró que un aumento en la densidad de macrófagos infiltrados en los tumores, está asociada con un mal pronóstico de la enfermedad, justamente debido a la secreción de mediadores pro-inflamatorios como el ON, interleucinas, entre muchos otros, los cuales enlazan la inflamación con el cáncer desempeñando un papel principal en ambos procesos (Lu y col., 2006).

Por ende, gracias a la propiedad que tienen las células fagocíticas como los macrófagos de responder a una variedad de estímulos de membrana por la producción y liberación extracelular de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, respuesta que se conoce como estallido oxidativo; se convierten en el tipo celular predilecto para el modelo de evaluación *in vitro* de la actividad anti-inflamatoria, ideal para observar tanto la inhibición de especies reactivas de oxigeno como de nitrógeno (Gómez y col., 2011).

Por esta razón, el modelo de estimulación *in vitro* de líneas celulares de macrófagos murinos, y la determinación de la inhibición de la producción de ON por compuestos aislados, permite proporcionar una estimación del efecto anti-inflamatorio de los mismos y a su vez permite proponer dichos compuestos como posibles anti-cancerígenos, tomando en cuenta que varios compuestos con ambas propiedades (anti-inflamatorios y anti-cancerígenos) ejercen su efecto a través de la inhibición de la producción de ON, como se mencionó anteriormente (Gómez y col., 2011).

1.5.2.3 Modelo de evaluación *in vivo* de la Toxicidad Aguda

Para la evaluación y desarrollo de productos farmacéuticos existe una ruta crítica establecida, conformada por una serie de fases de carácter obligatorio, que incluyen evaluaciones farmacológicas y toxicológicas experimentales (Pérez y col., 2008). La caracterización farmacológica de un producto a nivel pre-clínico no está completa si no se ha examinado exhaustivamente sus posibles reacciones tóxicas (Pérez y col., 2008).

Las pruebas pre-clínicas de toxicidad en dosis única y en dosis repetidas brindan una valiosa información sobre la seguridad del producto así como evaluaciones de las vías de administración y el régimen de dosificación (Infante y col., 2001).

Dentro de la batería de ensayos de primera barrera se encuentran los estudios de toxicidad a dosis única, imprescindibles en la estimación del potencial tóxico de una sustancia, referido como el estudio cuali-cuantitativo de los fenómenos tóxicos y de su aparición en función del tiempo tras la administración de

una dosis única de la sustancia o de varias dosis fraccionadas en el transcurso de 24 horas (Pérez y col., 2008).

Es importante que en el empleo de modelos animales, por razones éticas y económicas, se garantice el uso racional y humano de los animales de experimentación, contribuyendo a la adopción internacional de criterios regulatorios en la validación y análisis de métodos alternativos científicamente seguros, menos costosos, rápidos y extrapolables que favorezcan la implantación de las 3R propuestas por Rusell y Burch (1959) referidas a: reducir (disminución), refinar (perfeccionamiento) y reemplazar (sustitución) el uso animal, unido a una 4R de responsabilidad por parte de los investigadores (Pérez y col., 2008).

El método de Clasificación Toxicológica Aguda (*ATC*) o método de las Clases, fue adoptado originalmente en 1996 en la Guía N° 423 de la OECD e internacionalmente validado usando para ello 20 sustancias en un estudio colaborativo entre varios laboratorios y países. Con su introducción ha surgido una nueva variante para la estimación de la toxicidad de una sustancia por vía oral, que tiene como objetivo describir la clase de toxicidad sin precisar un valor exacto de la dosis letal media (DL_{50}) (Pérez y col., 2008).

Análogamente a la citotoxicidad *in vitro* que comúnmente se describe como LC_{50}, para describir la toxicidad *in vivo* de un nuevo compuesto se utiliza frecuentemente la DL_{50}, que se define como la dosis que mata a la mitad de la población analizada en un modelo animal (Zhang y col., 2007).

1.6. *Xylopia aromatica* como planta de estudio y potencial fuente de compuestos anti-cancerígenos

La planta *Xylopia aromatica*, conocida comúnmente como Fruta de Burro, y de amplia utilización en la medicina tradicional americana (como tónico estomacal, aperitivo, antiespasmódico, emenagogo y anti-veneno en caso de mordedura de serpiente), se reconoce como un árbol pequeño, de hojas lanceoladas, con envés sedoso, cuyas flores blancas son axilares, solitarias y de frutos cilíndricos, pedicelados (Albornoz, 1992).

Dicha planta, pertenece al género *Xylopia* (representado por 150 especies aproximadamente) y distribuido en regiones tropicales del mundo entero, siendo nativo del continente americano y común en muchas regiones de Venezuela como el estado Amazonas, (Colman-Saizarbitoria y col., 1994).

Tal género pertenece a su vez, a la familia de plantas Annonaceae, que comprende aproximadamente 130 géneros y 2.300 especies (Colman-Saizarbitoria y col., 1994), muchas de las cuales han sido investigadas fundamentalmente por constituir una fuente potencial de compuestos biológicamente activos conocidos como acetogeninas, los cuales han mostrado un amplio espectro de efectos biológicos, entre ellos, citotoxicidad contra células tumorales, efecto antitumoral *in vivo*, supresión de células T, inhibidores poderosos de la cadena respiratoria mitocondrial dependiente de glutamato tanto en mamíferos como en insectos, inhibición de la actividad del complejo I ubiquinona oxido reductasa NADH (blanco de acción de la mayoría de las acetogeninas), antimaláricos, pesticidas, antiparasitarios y antimicrobianos (Colman-Saizarbitoria y col., 1994).

Respecto a las acetogeninas provenientes de Anonáceas con efecto citostático, vale mencionar, que dichos compuestos han presentado efectos claros contra las líneas celulares de tumores sólidos humanos de pulmón (A-549), mama (MCF-7), colon (HT-29), riñón (A-498), próstata (PC-3) y páncreas (PaCa-2), entre las más estudiadas destacan la Trilobacina y la Trilobalicina, que presentaron una dosis efectiva capaz de inhibir el 50% de la proliferación celular (ED_{50}) menor a 2,5 µg/mL y la 4-hidroxitrilobina con un ED_{50} menor a 4,5 µg/mL (Schlie-Guzmán y col., 2009).

Además de las acetogeninas han sido aislados de la familia Annonaceae, compuestos de tipo alcaloide con comprobados efectos citostáticos, como el alcaloide Palmatina que exhibió un GI_{50} menor a 20 µM contra las líneas tumorales MCF-7 y U-251 (glioma) (Costa y col., 2013) o el Liriodenine que mostró un *TGI* de 37.67 µM contra la línea tumoral MCF-7 (Costa y col., 2013).

Igualmente, la estiril-lactona (R)-goniothalamin aislada del género *Goniothalamus,* presenta propiedades citotóxicas y anti-proliferativas sobre diversas líneas tumorales humanas incluyendo carcinoma cervical (Hela), gástrico (HGC-27), de mama (MCF-7, T47D y MDA-MB-231), de ovario (Caov-3, NCI-ADR, OVCAR), de próstata (PCO.3), de leucemia (HL-60), de colon (HT-29) y de riñón (786-0) e inhibe la

expresión de la nNOS y la eNOS, que conlleva a la disminución de la producción de ON (Fátima y col., 2008).

En relación con lo anterior, se ha estudiado además, la presencia de compuestos con efecto anti-inflamatorio en tal familia, Saha y col. (2008) evaluaron el efecto regulador del extracto etanólico de las hojas de *Polyalthia longifolia* sobre el ON, evidenciándose la capacidad del mismo para neutralizar la formación de ON, NO_2, N_2O_4, N_3O_4 y NO^{-3}, sugiriendo que tal efecto se debe a la presencia de taninos y flavonoides.

Destacándose el caso de los alcaloides Annomontine y metoxi-Annomontine de comprobada actividad anti-inflamatoria en ensayos *in vivo* (Barbosa-Filho y col., 2006). Asimismo, se ha determinado el efecto antinociceptivo y anti-inflamatorio del aceite esencial de los frutos de *Dennettia tripetala* en roedores (Oyemitan y col., 2008).

Puntualmente, el género *Xylopia* ha demostrado ser una fuente de diversos compuestos con actividad citotóxica frente a varios tipos de cánceres, por ejemplo el Xylodiol, un diterpeno aislado de *Xylopia langsdorfiana* posee un reconocido efecto citotóxico sobre las líneas celulares de leucemia humana HL60, U937, K562 con un IC_{50} de 90, 76, 40 µM respectivamente (Castello-Branco y col., 2011). Del mismo modo, Colman-Saizarbitoria y col. (1994), presentan evidencias del efecto antitumoral del extracto de *Xylopia aromatica*.

Por el contrario, aún se conoce poco del potencial anti-inflamatorio de las plantas del género *Xylopia*, encontrándose datos únicamente de la actividad antioxidante del extracto de *Xylopia aethiopica* (Odukoya y col., 2005) y de la inhibición de la producción de ON de los extractos acuoso, etanólico e hidroetanólico de *Xylopia parviflora*, resultando más efectivos los dos últimos (Kuate y col., 2011).

En referencia a *Xylopia aromática* nuestra planta de estudio, se mencionó previamente su amplia utilización en la medicina tradicional americana (Albornoz, 1992; Colman-Saizarbitoria y col. 1994), debido probablemente a la presencia no solo de compuestos ya conocidos como sesquiterpenos (Moraes y Roque, 1988), alcaloides (Martins y col., 1995), acetogeninas (Xylopianin, Xylopiacin, Xylomaticin,

Xylopien, Xylomatenin, Venezinone, Venezenin, Aromicin y Aromin) (Zafra-Polo y col., 1996), amidas y lignoides (Lago y col., 2003), sino también debido al efecto de muchos otros metabolitos secundarios que permanecen todavía desconocidos para la ciencia; y es que aún hoy el estudios del potencial de esta planta es incipiente, así pues no existen precedentes bibliográficos relevantes del posible efecto anti-inflamatorio y aún más del efecto sobre la regulación del ON que podría ejercer en ensayos *in vitro* esta planta, ni la relación de esto con los demostrados efectos antitumorales de la misma (Colman-Saizarbitoria y col. 1994).

Razón por la cual, el propósito fundamental de este trabajo es realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto de las hojas de *Xylopia aromatica*, a fin de determinar qué tipo de compuestos presentes en esta planta (diterpenos, alcaloides y acetogeninas, entre otros) ejercen un efecto antitumoral y anti-inflamatorio *in vitro* con una baja toxicidad *in vivo*; partiendo de la premisa que no solo las tan estudiadas acetogeninas de las anonaceas poseen un efecto antitumoral, sino que también alcaloides y diterpenos podrían tener tales efectos, aportando con ello información única y pionera en el estudio del género *Xylopia* a nivel fitoquímico, sin olvidar además los aportes que se abonarían en la búsqueda de nuevos compuestos anti-cancerígenos y anti-inflamatorios.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar el efecto antitumoral y la toxicidad a partir del aislamiento de los metabolitos secundarios de las hojas de *Xylopia aromatica*, con la finalidad de conocer si existe la presencia de algún metabolito secundario con actividad antitumoral, de baja toxicidad en dicha planta.

Objetivos específicos

- Obtener el extracto etanólico seco de las hojas de *Xylopia aromatica*, por maceración en etanol, llevando a sequedad mediante presión reducida.
- Obtener a partir del extracto seco las fracciones mediante extracciones sucesivas con solventes de diferente polaridad y separar por métodos cromatográficos las sub-fracciones y compuestos, mediante ensayos biodirigidos.
- Evaluar el efecto citotóxico y/o citostático del extracto, fracciones, sub-fracciones y compuestos obtenidos, sobre las líneas tumorales 4T1, MDA-MB-231 y HT-29, utilizando el colorante Sulforodamina B.
- Determinar la inhibición en la producción de óxido nítrico de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS, de los compuestos obtenidos, mediante la reacción de Griess.
- Evaluar el efecto antitumoral *in vivo* de la sub-fracción activa de *Xylopia aromatica*, en ratones de la cepa BALB/c.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención del material vegetal

Las hojas de la planta *Xylopia aromatica*, fueron colectadas por el Ing. Ángel Fernández del laboratorio de Fisiología Gastrointestinal del Centro de Biofísica y Bioquímica del Instituto Venezolano de Investigación Científica (IVIC), en la región de Yutaje en el norte del Estado Amazonas. Una muestra de dichas hojas, se guardó en el herbario del Centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC bajo el número de voucher: 14612AF.

3.2. Líneas celulares

- Línea 4T1: Adenocarcinoma mamario murino de la cepa BALB/c. Al inyectarse células 4T1 en tejido mamario de ratones de la cepa BALB/c, puede generarse de forma espontánea metástasis del tumor primario a múltiples sitios distantes tales como hígado, pulmón, ganglios linfáticos, cerebro y hueso, mientras el tumor primario crece *in situ*. Por estas características las células 4T1 son consideradas similares al cáncer de mama humano, por lo que se suele utilizar como un modelo experimental adecuado. Está línea celular fue establecida por B.A Pulaski (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 2000; American Type Culture Collection, 2013). Por su parte, las células utilizadas en el presente trabajo se adquirieron originalmente de la ATCC catálogo No. CRL-2539.

- Línea HT-29: Adenocarcinoma colorrectal humano. Aislado del tumor primario de una mujer con 44 años de edad, establecida por J. Fogh (Lesuffleur y col. 1991; Fabre y García de Herreros, 1993). Se adquirieron originalmente de la ATCC catálogo No. HTB-38.

- Línea MDA-MB-231: Adenocarcinoma de mama humano. Aislado del derrame pleural sitio metastásico, en una mujer de 55 años de edad. Establecida por R. Cailleau (American Type Culture Collection, 2013). Se adquirieron originalmente de la ATCC, catálogo No. HTB-26.

- RAW 264.7: Macrófagos murinos de la cepa BALB/c. Esta línea fue creada a partir de un tumor inducido por el virus de la leucemia murina de Abelson, que expresa propiedades de los

macrófagos. Establecida por W.C. Raschke (American Type Culture Collection, 2013). Se adquirieron originalmente de la ATCC catálogo No. TIB-71.

3.3 Medios de cultivo

- Medio DMEM/F12 HAM (SIGMA) suplementado con: 5% suero fetal bovino (SFB), 1% L-glutamina, 1% penicilina/estreptomicina y 1% HEPES. Utilizado para el cultivo de las tres líneas tumorales (4T1, HT-29 y MDA-MB-231).

- Medio Dulbecco suplementado con: 10% de SFB inactivado por calor, una mezcla de antibiótico antimicóticos (100 unidades/mL de penicilina y 100 μg/mL de sulfato de estreptomicina) y 2 mM de glutamina. Utilizado para el cultivo de los macrófagos RAW 264.7.

3.4 Cultivo celular

Se cultivaron las líneas tumorales HT-29, 4T1 y MDA-MB-231 para la estimación de la citotoxicidad y/o citostásis, con la finalidad de estudiar el efecto antitumoral de componentes de las hojas de *X. aromatica*. También se cultivó la línea de macrófagos RAW 264.7 para la evaluación de la inhibición en la producción de óxido nítrico.

Para ello, se descongelaron las células a temperatura ambiente (25 ^{0}C), diluyendo rápidamente la solución de congelamiento (500 μL de SFB con 10% DMSO) en medio de cultivo específico para cada tipo de célula (F12 HAM para las líneas tumorales y Dulbecco para los macrófagos). La suspensión celular fue centrifugada a 1000 *g* durante 10 minutos a 4 ^{0}C, descartándose el sobrenadante y resuspendiendo el *pellet* celular en 10 mL de medio específico. Este volumen se colocó en el frasco de cultivo de 75 cm^2 agregando 10 mL de medio, correspondiente a la línea celular. Se incubó en una estufa (Thermo Electron corporation napco. CO_2 5400 incubator) a una temperatura de 37 ^{0}C en una atmósfera de 5% CO_2 y 100% de humedad relativa.

En todos los experimentos realizados, las células se crecieron a una confluencia de 70-80% y se despegaron mediante un método enzimático. Para ello, se descartó el medio de cultivo de los frascos de 75 cm^2, seguidamente se lavaron con buffer fosfato PBS 1X (NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; KH_2PO_4 1.76

mM, Na_2HPO_4 10 mM) y se añadió aproximadamente 2 mL de solución 0.25 % (p/v) tripsina-0.53 mM de EDTA en PBS, permaneciendo durante 10 minutos en la estufa.

Las células en solución, se colocaron en un tubo Falcon con PBS, y se centrifugaron a 1000 *g* (Centrifuga Thermo scientific. Sorvall ST16R centrifuge) durante 10 min, luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* celular en 2 mL de medio específico (véase apartado 3.3). Se cuantificaron las células y se verificó la viabilidad de las mismas, mediante la técnica de exclusión con azul de tripano al 0.4%, por medio de una cámara de Neubauer. Finalmente se ajustó la concentración celular, según el protocolo experimental deseado.

3.5 Modelo animal

Se utilizaron 38 ratones hembras de la cepa BALB/c de 20-30 g, con edad comprendida entre 9 a 11 semanas, nulíparas y en ausencia de gestación. Al inicio del experimento se identificaron convenientemente mediante un sistema de marcaje con ácido pícrico.

Los animales se mantuvieron en el Bioterio del Centro de Medicina Experimental del IVIC a una temperatura de 22 ± 3 °C, con una humedad relativa entre 70 y 80% y ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas. La alimentación consistió en el sólido comercial certificado (Ratarina Protinal®) y agua apta para consumo humano a voluntad. Al finalizar el experimento los animales fueron sacrificados en una cámara de Éter.

3.6 Análisis Fitoquímicos

3.6.1 Obtención del extracto etanólico y fracciones de las hojas secas de *X. aromatica*

El protocolo descrito a continuación, fue realizado por el Dr. Omar Estrada del Centro de Medicina Experimental-IVIC, con la finalidad de obtener el extracto, fracciones y compuestos purificados de las hojas de *X. aromatica*.

Se colocaron 100 g de hoja seca de *X. aromatica* en un recipiente con 2 L de etanol al 80% a una temperatura de 25 ^{0}C. Después de una semana, el extracto etanólico se llevó a sequedad a presión

reducida, utilizando un rotavapor (Heidolph. Basis Hei-VAP ML). Obteniéndose el extracto etanólico seco de las hojas de *X. aromatica*, identificándose con las siglas *Xyar* (Estrada y col. 2009).

El extracto etanólico seco (*Xyar*) se trató con una mezcla de solventes (metanol- agua proporción 1:1), tras lo cual se obtuvo un precipitado verde que se identificó como la fracción E1 y una solución de color rojo, la cual a su vez se llevó a sequedad y se trató con acetona grado P.A. De lo anterior, se obtuvo un precipitado marrón que se identificó como la fracción E3 y una solución amarilla que se llevó a sequedad. Obteniendo así un nuevo precipitado que se identificó como la fracción E2 (Estrada y col. 2009) (Figura 3.1).

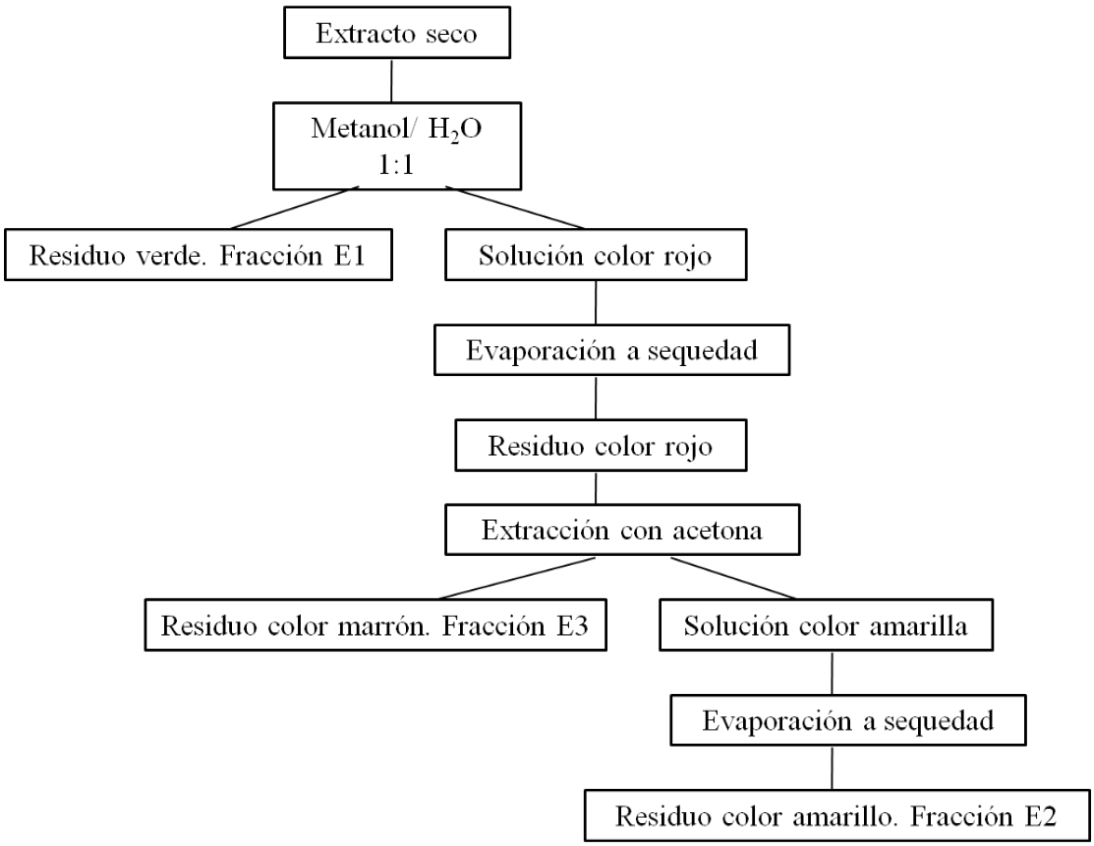

Figura 3.1. Esquema de fraccionamiento del extracto hidroalchohólico seco de las hojas de *X. aromatica.*

Una vez recibidos los datos obtenidos en dicho procedimiento por el Dr. Estrada, se procedió al cálculo del rendimiento del extracto seco, las fracciones, sub-fracciones y compuestos obtenidos a partir de las hojas de *X. aromatica.* Según la fórmula descrita a continuación.

$$\text{Rendimiento (\%)} = (P)*(100)/(m)$$

Donde (P) es el peso del extracto seco (g) y m es el peso de muestra (g)

3.6.2 Fraccionamiento Biodirigido del extracto de *X. aromatica* (*Xyar)*

Se realizó la evaluación del efecto citotóxico y/o citostático del extracto *Xyar*, junto con las fracciones E1, E2 y E3 sobre las tres líneas tumorales.

La fracción con mayor actividad sobre las tres líneas tumorales, se analizó en cromatografía de capa fina en fase reversa de *RP18* utilizando como eluyente una mezcla de solventes etanol-tetrahidrofurano-agua, en una proporción (75:5:20).

A continuación, dicha fracción se separó mediante cromatografía de columna con fase estacionaria *Sephadex.LH20* y con fase móvil metanol grado P.A, se obtuvo varios eluatos, que a su vez se estudiaron por cromatografía en capa fina (condiciones antes mencionadas), a partir de lo cual se agruparon en tres sub-fracciones, denominadas con el nombre de la fracción de la que provienen seguida de números romanos según el orden en que fueron separados (Estrada y col. 2009).

Se continuó con la evaluación del efecto citotóxico y/o citostático de las tres sub-fracciones sobre las tres líneas tumorales (apartado 3.2). La sub-fracción que presentó el mayor efecto citotóxico, se analizó en cromatografía de capa fina (condiciones antes mencionadas), prosiguiendo con la separación por cromatografía en columna (condiciones antes mencionadas). Los eluatos obtenidos de ésta última se analizaron por cromatografía en capa fina (condiciones antes mencionadas), consiguiendo separar los compuestos presentes en las mismas, los cuales se denominaron con el nombre de la sub-fracción de la que provienen, seguido de las letras del abecedario según el orden en que fueron obtenidos (Estrada y col. 2009).

Por último se realizó la evaluación del efecto citotóxico y/o citostático de los compuestos obtenidos, sobre las tres líneas tumorales. Se analizó además el efecto de dichos compuestos sobre la inhibición de la producción de óxido nítrico de macrófagos murinos.

3.6.3 Elucidación de la estructura química de los compuestos E1-IIA y E1-IIB

La elucidación de la estructura química de los compuestos obtenidos del ensayo de fraccionamiento biodirigido (apartado 3.6.2) fue realizada por el Dr. Omar Estrada. Los espectros de RMN H-1, C-13, DEPT135, HMQC y HMBC, se realizaron en el Laboratorio de RMN del Centro de Química IVIC, en un espectrómetro BRUKER modelo Advance 500, con un campo de aplicación de 300 MHz para RMN H-1 y 125MHz C-13. Los datos obtenidos fueron comparados con los reportados en la literatura (Moraes y Roque, 1988; Martins y col., 1999).

3.7 Bioensayos

3.7.1 Ensayo de citotoxicidad y/o citostásis utilizando el colorante Sulforodamina B

El ensayo colorimétrico de sulforodamina B (SRB) permite determinar la biomasa total de células adherentes y en suspensión en placas de 96 pozos. Basado en la medición del contenido celular, específicamente en la tinción de proteínas celulares (Skehan y col. 1990).

La SRB es un colorante de aminoxantano, rosado brillante; posee dos grupos sulfónicos $-SO_3^-$ cargados negativamente, capaces de unirse electrostáticamente a cationes. En condiciones ácidas aumenta la afinidad por los residuos de aminoácidos básicos que conforman las proteínas celulares, uniéndose electrostáticamente. Mientras que en condiciones básicas, se logra separar de las proteínas celulares y solubilizar para la medición de la densidad óptica (D.O) (Escobar y col. 2009).

De acuerdo con el protocolo descrito por Vichai y Kirtikara (2006) con algunas modificaciones, se preparó el extracto *Xyar*, elaborando una solución madre en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 100 mg/mL, a partir de la cual se prepararon diluciones seriadas en DMSO cuyas concentraciones finales en el ensayo fueron de: 0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100 µg/mL, siendo la concentración final del disolvente (DMSO) en el medio de cultivo menor a 1%. Se realizó el mismo protocolo con las fracciones y compuestos.

Dicho intervalo de concentraciones se probó sobre las líneas tumorales HT-29, 4T1 y MDA-MB-231, las cuales previamente se despegaron de la superficie de cultivo y se cuantificaron en la cámara de

Neubauer (apartado 3.4), ajustando la concentración celular con medio de cultivo DMEM/F12 HAM a $8x10^4$ células/mL para HT-29 y MDA-MB-231 mientras que 4T1 se ajustó a una concentración de $7x10^4$ células/mL.

Una vez cuantificadas y estabilizadas las células en medio de cultivo, se procedió a sembrar en placas de 96 pozos colocando 100 µL por pozo, es decir 8.000 células por pozo en el caso de MDA-MB-231, HT-29 y 7.000 células por pozo en el caso de 4T1. Se utilizaron dos placas, una denominada T=0 siendo el control de tiempo cero, donde se sembró una sola fila de 12 pozos y otra placa denominada T=48, donde se sembró la totalidad de los pozos. Incubándose ambas placas en la estufa a 37 ^{0}C en una atmósfera de 5% CO_2 y un ambiente saturado de humedad (Thermo Electron corporation napco. CO_2 5400 incubator).

Transcurridas 24 horas se procedió a colocar por triplicado las diferentes concentraciones del componente a evaluar en la placa T=48, ésta se incubó en la estufa por 48 horas. En paralelo se fijaron las células de la placa T=0 colocando 25 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 50% p/v por 1 hora a 4^{0}C, pasado dicho tiempo se retiró el TCA y se lavó la placa con 200 µL de agua destilada cinco veces, dejando secar a temperatura ambiente (25 ^{0}C). Una vez completadas las 48 horas de incubación, se fijaron las células de la placa T=48 de igual manera como se hizo con la placa T=0.

Finalmente, en ambas placas se procedió a teñir los componentes celulares (proteínas); para ello se agregó 50 µL de SRB (0,4% p/v en ácido acético al 1%) por pozo, seguidamente se incubó las placas por 20 minutos a temperatura ambiente (25 ^{0}C). El colorante no adherido se retiró lavando cinco veces con 200 µL por pozo de ácido acético al 1%. Por último, la SRB establemente unida a las células, se solubilizó con una solución amortiguadora trizma base (10 mM) colocando 100 µL por pozo.

Para la determinación de la densidad óptica, se utilizó un espectofotómetro lector de placas de ELISA (Tecan GENios. Spectra FLUOR plus), evaluando la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 515 nm.

A partir de los datos obtenidos en las lecturas espectofotométricas se calcularon los siguientes parámetros:

***GI_{50}*:** Concentración de la droga que inhibe el crecimiento de las células en un 50%

$$GI_{50} = 100 \times (C_1 - T0)/(C_0 - T0) = 50$$

***TGI*:** Concentración de la droga que inhibe el crecimiento de las células en un 100%

$$TGI = 100 \times (C_2 - T0)/(C_0 - T0) = 0$$

***LC_{50}*:** Concentración de la droga que induce 50 % de citotoxicidad

$$LC_{50} = 100 \times (C_3 - T0)/T0 = -50$$

Posteriormente los resultados se graficaron en una curva dosis-respuesta tal como se muestra en la Figura 3.2.

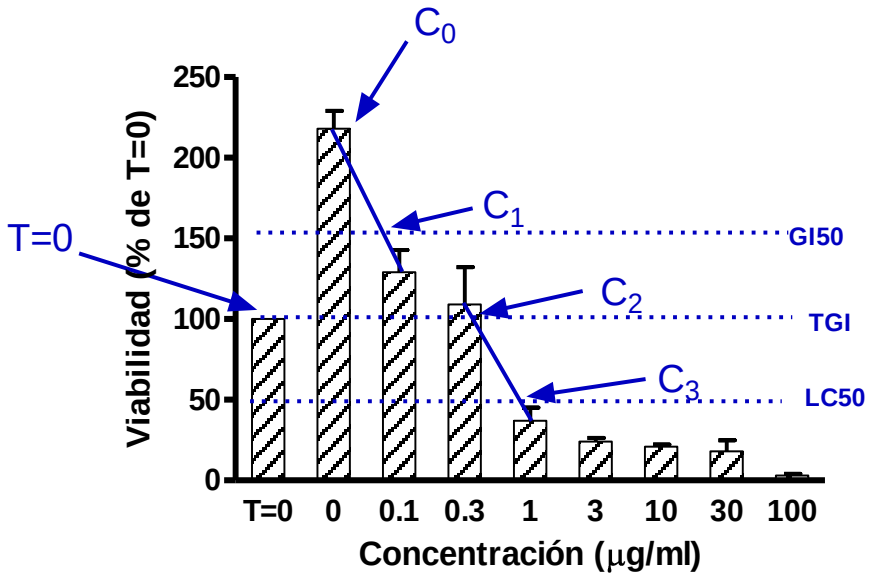

Figura 3.2. Patrón dosis-respuesta del efecto citotóxico de una droga problema sobre la viabilidad celular. T=0 es valor de la biomasa total del cultivo al momento de añadir la droga. C_0 corresponde al crecimiento máximo de las células luego de 48 h (concentración de la droga=0). Las diferentes C (C_1, C_2 y C_3), representan la lectura que corresponde a GI_{50}, *TGI* y LC_{50} respectivamente.

3.7.2 Determinación de la inhibición de óxido nítrico (ON) mediante la reacción de Griess

Para determinar el efecto de los compuestos obtenidos del fraccionamiento biodirigido sobre la inhibición de la producción de óxido nítrico de macrófagos RAW 264.7 (apartado 3.2), se elaboró en principio una solución madre con cada uno de ellos en DMSO a una concentración final de 100 mg/mL, a

partir de éstas soluciones se prepararon diluciones seriadas en medio de cultivo Dulbecco (apartado 3.3), cuyas concentraciones finales en el ensayo fueron de: 0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100 μg/mL; siendo la concentración final del disolvente (DMSO) en el medio de cultivo menor a 0,1%.

El cultivo de los macrófagos RAW 264.7, se realizó según lo descrito en el apartado 3.4. La concentración celular se ajustó con medio de cultivo (apartado 3.3), se procedió seguidamente a sembrar en placas de 96 pozos 50.000 células por pozo, las cuales fueron tratadas con las diluciones de concentraciones crecientes del compuesto respectivo e incubadas en la estufa a 37 ^{0}C en una atmósfera de 5% CO_2 y un ambiente saturado de humedad (Thermo Electron corporation napco. CO_2 5400 incubator).

Sesenta minutos después del tratamiento, las células fueron estimuladas con LPS (Lipopolisacárido de *E.coli*. Sigma, EE.UU) a una concentración final en el pozo de 1μg/mL, e incubadas a 37 ºC por 24 y 48 horas. Al cabo de estos tiempos, la acumulación de nitrito (NO_2^-) (como indicador de síntesis de óxido nítrico (ON)) fue cuantificada en el medio de cultivo por la reacción de Griess. Siendo el nitrito (NO_2^-) el principal producto final estable de la autoxidación del ON en solución acuosa (libre de oxihemoglobina), con poca o ninguna formación de nitrato (NO_3^-) (Green y col. 1982; Ignarro y col., 1993; Dirsch y col. 1998, Miranda y col., 2001).

Colocando 120 μL de los sobrenadantes del cultivo celular en placas de 96 pozos, agregando 50 μL de sulfanilamida 1% en ácido fosfórico al 2,5% e incubados a 4 ºC por 10 minutos, dando paso a la formación de la sal de diazonio, tras dicho tiempo, se agregó a cada pozo 50 μL de N-(1-naftil) etilendiamina diclorhidrato (NED) al 0,1% m/v, mezclados e incubados a 4 ºC por 10 minutos adicionales para completar la reacción de diazotación. La placa se colocó 5 minutos en agitación constante, en una plancha de agitación. Finalmente se determinó la absorbancia de cada pozo de la placa en un lector de ELISA (Tecan GENios. Spectra FLUOR plus) a una longitud de onda de 540 nm.

El medio Dulbecco sin células incubado por 24 y 48 horas fue utilizado como blanco en cada caso. La cantidad de nitritos en los sobrenadantes, fue determinada a través de una curva de calibración estándar de

nitrito, preparada en medio de cultivo. Los pozos con células no estimuladas con LPS representan la activación basal de los macrófagos. Finalmente los valores de absorbancia de los blancos fueron restados.

Para cuantificar la cantidad de ON, fue preparada una curva de calibración estándar, usando el nitrito de sodio ($NaNO_2$) disuelto en medio de cultivo Dulbecco, en un intervalo de concentración de 0 a 75 μM, partiendo de una solución stock de $NaNO_2$, realizando las diluciones pertinentes. El aumento de la concentración del nitrito de sodio, generó una respuesta lineal cuando fue graficado versus la absorbancia leída a 540 nm, como se muestra en la Figura 3.3.

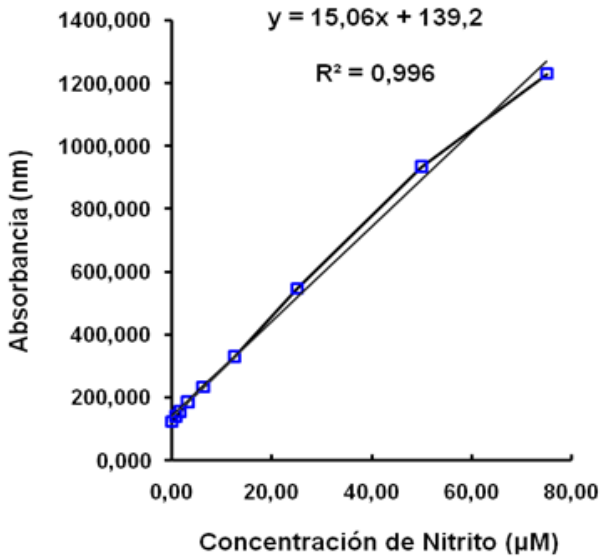

Figura 3.3. Curva de calibración de nitrito de sodio en medio Dulbecco suplementado. Cuantificación por el reactivo de Griess. n=3; r^2=0,996.

3.7.3 Ensayo de viabilidad celular mediante el método colorimétrico de la sal de tetrazolio (MTT)

Conjuntamente con la cuantificación de nitrito, se realizó la evaluación de la viabilidad de las células RAW 264.7, siendo pertinente reportar los posibles efectos citotóxicos de las diferentes drogas a estudiar, pues resulta necesario garantizar que el efecto inhibitorio en la producción de ON no sea consecuencia de un efecto citotóxico.

Diversos métodos han sido utilizados para ensayar la viabilidad celular, entre ellos se encuentra el ensayo colorimétrico del MTT. La sal de tetrazolio, MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)- 2,5-

difenil tetrazolio), es un compuesto de color amarillo soluble en agua, cuyo anillo de tetrazolio es clivado principalmente por enzimas deshidrogenadas presentes en mitocondrias activas (de células viables) produciendo cristales de formazán azul oscuro, insolubles en medio acuoso (Mosmann y col. 1983).

Al finalizar los tiempos de incubación de las células RAW 264.7 (apartado 3.7.2), las placas se centrifugaron (Centrifuga Thermo scientific. Sorvall ST16R centrifuge) y se retiró los sobrenadantes cuidadosamente, los cuales se utilizaron para determinar la acumulación de nitrito (apartado 3.7.2).

Los pozos fueron lavados con 250 μL de PBS a temperatura ambiente (a fin de eliminar el suero presente en los mismos), luego se adicionó 50 μL de una disolución de MTT (0,4 mg/mL en PBS) a cada pozo y se incubaron en la estufa a 37 ºC (Thermo Electron corporation napco. CO_2 5400 incubator) por 4 horas. Al finalizar las 4 h de incubación con la sal MTT, las placas fueron centrifugadas a 1600 rpm por 10 minutos (Centrifuga Thermo scientific. Sorvall ST16R centrifuge), se retiró cuidadosamente el sobrenadante y los cristales de formazán fueron disueltos con 100 μL de DMSO, agitando la placa a velocidad constante, por 10 minutos en una plancha de agitación. Por último la extensión de la reducción del MTT fue cuantificada por la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm, en el lector de ELISA (Tecan GENios. Spectra FLUOR plus). Los resultados de viabilidad celular fueron reportados en porcentaje, donde las células sin tratar (control) representan el 100% de viabilidad.

3.7.4 Evaluación del efecto antitumoral *in vivo* de la sub-fracción activa de las hojas de *X. aromatica*

Con la finalidad de evaluar el efecto antitumoral *in vivo* de la sub-fracción activa, obtenida mediante el fraccionamiento biodirigido del extracto de las hojas de *X. aromatica* (apartado 3.6.2), se llevó a cabo el modelo de inducción de carcinoma mamario murino. Para ello, se evaluó previamente el efecto de toxicidad aguda de la sub-fracción activa, con el fin de estimar la concentración adecuada de dicha sustancia, es decir, aquella que no causa efectos tóxicos sobre los ratones evaluados, para utilizarse posteriormente en el experimento antitumoral *in vivo*, y de esta forma asegurar que los posibles fallecimientos sean causa del cáncer desarrollado y no de un efecto tóxico por parte de la sub-fracción a estudiar.

3.7.4.1 Clasificación de la toxicidad aguda de la sub-fracción activa

La evaluación de la toxicidad aguda de la sub-fracción activa obtenida de las hojas de *X. aromatica* se realizó mediante el método de clases de toxicidad aguda, de acuerdo con la guía 423 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) (2001), con modificaciones.

Según lo descrito en la Figura 3.5, la sustancia de ensayo fue administrada por vía intraperitoneal a una dosis única límite de 2000 mg/kg de masa corporal. Dicha dosis fue aplicada a tres ratones de la cepa BALB/c sexo femenino (apartado 3.5), grupo problema, con un volumen de inyección de 100 μL de la sustancia de ensayo disuelta en DMSO, otros tres ratones recibieron un volumen de inyección de 100 μL de solución DMSO y finalmente el grupo control constituido por tres ratones de la misma cepa y el mismo sexo que no recibieron ninguna sustancia.

Los animales fueron observados individualmente durante las primeras dos horas y diariamente durante los 15 días del experimento. En dicho periodo se evaluaron los siguientes parámetros: muerte y tiempo de ocurrencia de la misma, signos de toxicidad incluyendo su comienzo y duración, cambios en el sistema respiratorio y en la conducta. Se prestó especial atención a la potencial aparición de temblor, convulsiones, letargo, somnolencia y coma. Se registró además el peso de los animales vivos en intervalos de un día durante el periodo de experimentación, como uno de los parámetros cuantitativos de la toxicidad.

Los resultados obtenidos determinan la segunda etapa del procedimiento, es decir: 1) Si el siguiente paso corresponde a la réplica del experimento bajo las mismas condiciones, 2) si se realiza en el nivel de dosis inmediatamente inferior, 3) o si no es necesario otra prueba más, como se explica en la Figura 3.5.

3.7.4.2 Inducción del tumor primario

Con la finalidad de inducir el tumor primario de carcinoma mamario murino, se emplearon 20 ratones de la cepa BALB/c sexo femenino, conservados bajo las condiciones indicadas en el apartado 3.5, seleccionando de manera aleatoria 10 animales para tratar con la sub-fracción activa y otros 10 como

grupo control. Siendo ambos grupos, inoculados por vía subcutánea con una concentración de $3x10^5$ células tumorales 4T1 en un volumen final de 100 µL PBS, en la glándula mamaria abdominal.

Una vez inducido el tumor primario en los animales, estos fueron tratados 5 veces por semana durante dos semanas, desde el día 0 hasta el día 15, por vía intraperitoneal, con 5 mg/kg de la sub-fracción activa diluida en 100 µl de DMSO, mientras el grupo control fue dosificado únicamente con 100 µl DMSO.

Finalmente la actividad antitumoral se evaluó a través de la medición diaria del tamaño del tumor primario, en dos dimensiones, utilizando un Vernier. También se registro la supervivencia de los animales.

3. 8 Análisis Estadístico

Todos los resultados fueron expresados como la media ± la desviación estándar (S). El procesamiento de los datos provenientes del ensayos 3.7.2, implicó la realización de una Prueba T para datos no pareados, fijándose un nivel de aceptación del 95% ($\alpha = 0,05$), para la determinación de la dosis mínima significativamente diferente, no obstante, se realizó además un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para el mismo conjunto de datos, tomándose como factores fijos, el tiempo y el compuesto y como factor aleatorio las diferentes concentraciones evaluadas.

Por su parte, los datos generados del ensayo 3.7.4.1 se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, fijándose como factores fijos el tiempo y el tratamiento, siendo el factor aleatorio las concentraciones evaluadas y la variable medible, el peso de los ratones. Dicha prueba, permite además de establecer la existencia de diferencias significativas entre los grupos evaluados, la significancia de la interacción entre algunos de los factores, para ello se estableció un nivel de aceptación del 95% ($\alpha = 0,05$).

Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa estadístico GraphPad Prism (6,01).

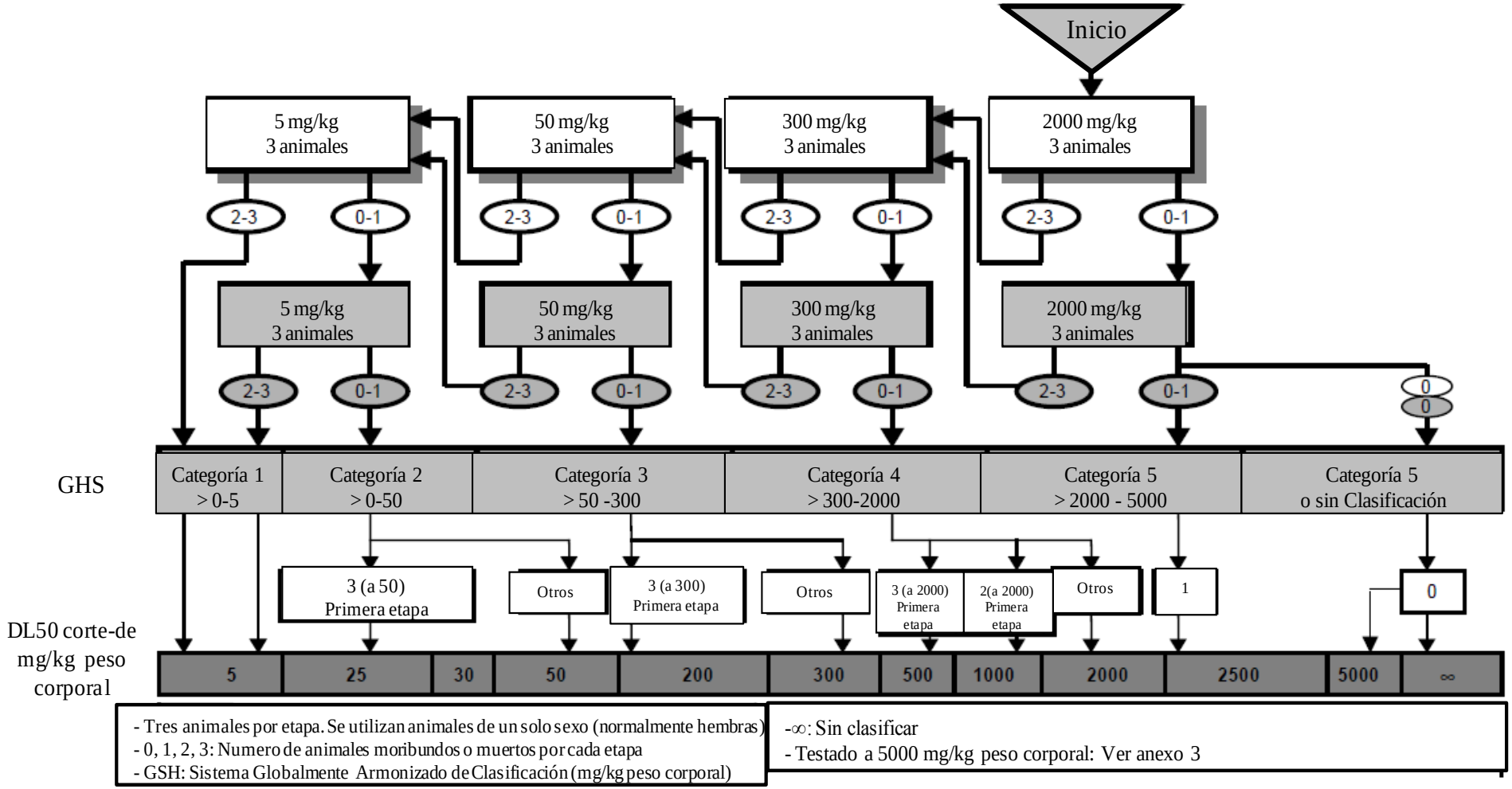

Figura 3.4. Procedimiento de ensayo con una dosis inicial de 2000 mg/kg peso corporal. Guía 423 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) (2001).

4. RESULTADOS

4.1 Obtención y fraccionamiento biodirigido del extracto etanólico de las hojas de *X. aromatica*

Partiendo de la extracción en etanol (EtOH) de los metabolitos secundarios presentes en 100 g de hoja seca de *X. aromatica* y llevando tal extracto a sequedad, se obtuvieron 15 g de extracto etanólico seco, denominado *Xyar*. Una vez obtenido dicho extracto, y considerando las diferencias de polaridad que influyen a su vez sobre las características de solubilidad asociadas a cada grupo de metabolitos secundarios, se procedió a la separación de éstos, mediante las diferencias de solubilidad de los mismos en dos solventes orgánicos empleados en orden decreciente respecto a su polaridad (una mezcla de Metanol/H_2O en proporción 1:1 y acetona), como se expone en el protocolo de Estrada y col. (2009).

Tomando en cuenta que las moléculas polares son fácilmente solubles en otros compuestos polares y prácticamente insolubles en compuestos apolares, se obtuvo tres fracciones denominadas E1, E2 y E3. Tal como se muestra en la Tabla 4.1, los compuestos de menor polaridad como terpenos, acetogeninas y clorofilas permanecieron en la fracción E1; en la fracción E2, en cambio, de polaridad intermedia se pueden encontrar flavonoides y alcaloides, los cuales fueron disueltos en acetona, mientras que la fracción E3 contiene únicamente los compuestos de mayor polaridad como azúcares libres y taninos, que fueron disueltos en la mezcla de Metanol/H_2O.

Tabla 4.1. Fraccionamiento químico del extracto etanólico seco de las hojas de *X. aromatica*, mediante diferencia de solubilidad en solventes de decreciente polaridad (metanol/agua 1:1, acetona) y sub-fraccionamiento cromatográfico (exclusión molecular y capa fina) de las fracciones obtenidas del extracto; guiado por bioensayos.

Fracción	Polaridad	Metabolitos secundarios
Fracción E1	Baja	Terpenos, acetogeninas y clorofilas
Fracción E2	Intermedia	Flavonoides y alcaloides
Fracción E3	Alta	Azúcares libres y taninos
Sub-fracción E1-I	Alta	Acetogeninas
Sub-fracción E1-II	Intermedia	Terpenos
Sub-fracción E1-III	Baja	Clorofilas

Una vez realizada la primera fase del fraccionamiento químico, se procedió a evaluar la actividad biológica de dichas fracciones; determinándose la fracción E1 como la de mayor actividad citotóxica sobres las tres líneas tumorales evaluadas (Tabla 4.3). Por ende y siguiendo el protocolo del fraccionamiento biodirigido, se sub-fraccionó E1 mediante cromatografía de exclusión molecular y de capa fina, obteniéndose tres sub-fracciones denominadas E1-I, E1-II y E1-III (Tabla 4.1).

Cada una de estas sub-fracciones, contenía un grupo más reducido de metabolitos secundarios, los cuales se eluyeron en forma decreciente respecto a su polaridad. Dichos metabolitos se constataron mediante espectroscopia de RMN H-1, C-13, DEPT135, HMQC y HMBC (resultados no mostrados en este trabajo), obteniéndose en las muestrastres grupos de metabolitos, tal como sigue a continuación: acetogeninas en la sub-fracción E1-I, terpenos en la sub-fracción E1-II y las clorofilas en la sub-fracción E1-III (Tabla 4.1); disminuyendo con ello el espectro de metabolitos de interés y afinándose la búsqueda del compuesto con actividad biológica.

Tabla 4.2. Rendimiento porcentual del fraccionamiento químico y biodirigido de las hojas seca de *Xylopia aromatica.*

Etapas de Fraccionamiento	Cantidad obtenida (g)	Rendimiento (%)
Extracto seco de *X. aromatica* (proveniente de 100 g de hoja seca)	15	15
Fracción E1 (proveniente de 2 g de extracto seco)	0,6	30
Fracción E2 (proveniente de 2 g de extracto seco)	0,4	20
Fracción E3 (proveniente de 2 g de extracto seco)	0,8	40
Sub-fracción E1- I (proveniente de 2 g de la Fracción E1)	0,4	20
Sub-fracción E1- II (proveniente de 2 g de la Fracción E1)	1,3	65
Sub-fracción E1- III (proveniente de 2 g de la Fracción E1)	0,15	7,5
Compuesto E1- IIA (proveniente de 500 mg de la Sub-fracción E1-II)	400 **	0,002
Compuesto E1- IIB (proveniente de 500 mg de la Sub-fracción E1-II)	50 **	0,00025

(**) Unidad de medida mg.

Para alcanzar dicho objetivo, sin embargo, se procedió nuevamente a evaluar la actividad biológica de cada sub-fracción. Observándose la mayor actividad en la sub-fracción E1-II, dado el drástico efecto citotóxico de ésta sobre las tres líneas tumorales evaluadas (Tabla 4.3). Razón por la cual, se procedió mediante cromatografía de capa fina y de exclusión molecular a separar los compuestos presentes en la misma, obteniéndose dos compuestos denominados E1-IIA y E1-IIB resultando ambos terpenos (Tabla 4.1).

Finalmente, en la Tabla 4.2 se presenta el rendimiento en porcentaje del proceso de obtención y fraccionamiento del extracto *Xyar*. Los valores globales del proceso son moderados (7.5-65%).

Cabe destacar, que si bien la fracción E1 fue la única que presentó actividad biológica, no resulto ser la más abundante en el extracto seco, ya que constituía únicamente el 30 % de la muestra, siendo la fracción E3 la mayoritaria (40%), lo que indica por tanto un alto contenido de carbohidratos y taninos en las hojas secas de *X. aromatica*, que posee sin embargo, una menor proporción de flavonoides y alcaloides (20%), según los datos expuestos en la Tabla 4.2.

Por su parte, al fraccionar E1, se evidenció que la sub-fracción E1-II es la más abundante (65%) de la mezcla, además de contener los compuestos con actividad biológica (Tabla 4.3). Se tiene por consiguiente y según los datos compilados en las Tablas 4.1 y 4.2 que existe una mayor concentración de terpenos que de acetogeninas en el extracto *Xyar*, según el método de fraccionamiento aquí utilizado.

Referente a los compuestos E1-IIA y E1-IIB, se observó una mayor abundancia del compuesto E1-IIA que del compuesto E1-IIB en la sub-fracción E1-II, siendo el rendimiento de obtención de ambos compuestos moderado.

4.2 Evaluación del efecto citotóxico y/o citostático de los metabolitos secundarios presentes en la hoja de *X. aromatica* sobre las líneas tumorales 4T1, MDA-MB-231 y HT-29

El efecto citotóxico y/o citostático del extracto seco, fracciones, sub-fracciones y compuestos obtenidos de las hojas seca de *X. aromatica* sobre las líneas tumorales 4T1, MDA-MB-231 y HT-29 se evaluó mediante el método colorimétrico de Sulforodamina B.

La Figura 4.1 representa el gráfico característico de los ensayos de citotoxicidad; en éste, se graficó la viabilidad celular expresada en porcentaje respecto al T=0, el cual constituye el valor de la biomasa total al momento de añadir la droga, versus las concentraciones expresadas en µg/mL de la droga a estudiar (extracto seco, fracciones, sub-fracciones y compuestos), en un intervalo de 0 a 100 µg/mL, donde la concentración de la droga igual a 0 corresponde al crecimiento máximo de las células luego de 48 horas.

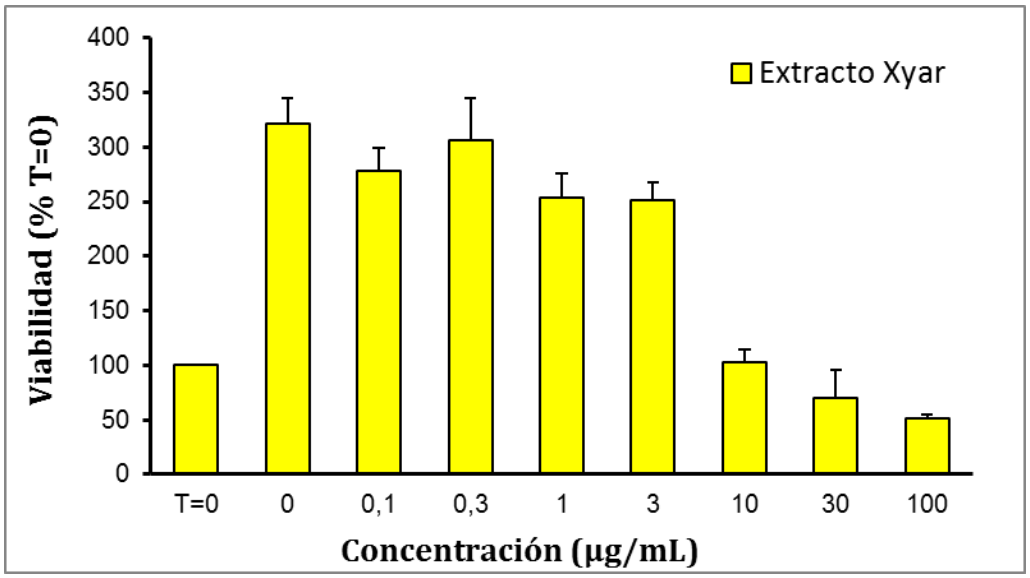

Figura 4.1. Efecto citostático del extracto seco de las hojas de *X. aromatica* sobre la línea tumoral HT-29. Evaluado en un tiempo de 48 horas. Utilizando el método de tinción de Sulforodamina B. Los valores son la media ± S (n=3).

El crecimiento celular de la línea HT-29, durante 48 horas, en respuesta a la aplicación del extracto *Xyar* (Figura 4.1), evidencia una tendencia decreciente, lo que se traduce en una disminución de la viabilidad celular en respuesta a incrementos de la concentración del extracto.

Se presenta únicamente el grafico correspondiente al extracto seco a modo de ejemplificar el método de análisis de los resultados presentados en la Tabla 4.3.

Con la finalidad de evaluar el grado de citotoxicidad de la droga, se determinaron tres parámetros de interés, como son: GI_{50} (concentración de la droga a la cual se inhibe el crecimiento de las células en un 50%), *TGI* (concentración de la droga a la cual se inhibe el crecimiento de las células en un 100% igualándose al valor de T=0) y la LC_{50} (concentración de la droga que induce el 50% de citotoxicidad).

Los valores obtenidos para cada uno de los parámetros antes mencionados sobre las tres líneas tumorales se presentan en la Tabla 4.3.

Cuando un compuesto es capaz de detener el crecimiento celular, se dice que ejerce un efecto citostático (GI_{50} y *TGI*). Si además de detener el crecimiento, causa la muerte celular, se dice que ejerce un efecto citotóxico. Cuando la citotoxicidad alcanza el 50 % se emplea el término LC_{50}.

Tabla 4.3. Concentración citotóxica y citostática del extracto seco, las fracciones, sub-fracciones y compuestos de las hojas secas de *X. aromatica* sobre las líneas tumorales 4T1, MDA-MB-231 y HT-29, expresados en µg/mL. Evaluado en un tiempo de 48 horas, mediante el método de tinción de Sulforodamina B.

	MDA-MB-231			**HT-29**			**4T1**		
Xylopia aromatica	GI_{50}	*TGI*	LC_{50}	GI_{50}	*TGI*	LC_{50}	GI_{50}	*TGI*	LC_{50}
Extracto seco	3	9	>100	5	11	>100	6	26	>100
Fracción E1	2	5	>100	**1**	**4**	**10**	**5**	**8**	**17**
Fracción E2	>100	>100	>100	39	87	>100	>100	>100	>100
Fracción E3	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Sub-fracción E1-I	17	25	>100	**9**	**28**	**91**	**26**	**58**	**92**
Sub-fracción E1-II	**5**	**7**	**24**	**0,1**	**3**	**9**	**1**	**2**	**5**
Sub-fracción E1-III	45	>100	>100	**0,3**	**12**	**27**	**2**	**5**	**15**
Compuesto E1-IIA	70	>100	>100	9	30	>100	26	>100	>100
Compuesto E1-IIB	23	28	>100	**8**	**19**	**30**	24	>100	>100

En la Tabla 4.3 se evidencia el efecto citostático del extracto sobre las tres líneas tumorales, siendo este efecto más drástico para la línea celular MDA-MB-231, a la cual correspondieron los menores valores de GI_{50} y *TGI* (3 µg/mL y 9 µg/mL, respectivamente).

Por su parte, la fracción E1 presentó un efecto citotóxico, sobre las líneas tumorales HT-29 y 4T1 con un LC_{50} de 10 µg/mL y 17 µg/mL respectivamente y un efecto citostático sobre la línea tumoral MDA-MB-231 alcanzando el GI_{50} a 2 µg/mL y el *TGI* a 5 µg/mL. La fracción E2 no exhibió algún tipo de efecto en el intervalo de concentraciones estudiadas sobre las líneas tumorales MDA-MB-231

y 4T1, si bien se determinó un efecto citostático sobre la línea tumoral HT-29 con un GI_{50} de 39 µg/mL y un *TGI* de 87 µg/mL. Finalmente, la fracción E3 en el intervalo de concentraciones estudiadas no presentó efecto sobre ninguna de las tres líneas tumorales.

Respecto a las sub-fracciones, E1-I presentó efecto citostático sobre la línea celular MDA-MB-231 (GI_{50} de 17 µg/mL y un *TGI* de 25 µg/mL) y un efecto citotóxico sobre las líneas celulares HT-29 y 4T1 (LC_{50} de 91 y 92 µg/mL, respectivamente). E1-II por su parte, demostró ser un agente citotóxico para las tres líneas tumorales MDA-MB-231, HT-29 y 4T1 con un LC_{50} correspondiente de 24, 9 y 5 µg/mL, respectivamente. A diferencia de la anterior, la sub-fracción E1-III desencadenó un efecto citostático sobre la línea celular MDA-MB-231 (GI_{50} de 45 µg/mL) y un efecto citotóxico sobre las líneas HT-29 y 4T1 (LC_{50} de 27 y 15 µg/mL respectivamente).

Finalmente, el compuesto E1-IIA generó un efecto citostático sobre las tres líneas tumorales con un GI_{50} de 70 y 26 µg/mL correspondiente a las líneas MDA-MB-231 y 4T1, sobre HT-29 se obtuvo un GI_{50} de 9 µg/mL y un *TGI* de 30 µg/mL. E1II-B presentó efecto citotóxico sobre HT-29 con un LC_{50} de 30 µg/mL y un efecto citostático sobre 4T1 (GI_{50} de 24 µg/mL) y MDA-MB-231 (GI_{50} de 23 µg/mL y *TGI* de 28 µg/mL).

4.3 Evaluación del efecto de la sub-fracción E1-II y los compuestos E1-IIA y E1-IIB sobre la producción de óxido nítrico (ON) en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS

Los ensayos de cuantificación de producción de ON *in vitro* en macrófagos, comparan la concentración de ON producido por macrófagos estimulados con LPS y la concentración basal de ON (concentración de ON producido por macrófagos sin haber sido previamente estimulados con LPS), con la concentración de ON producido por macrófagos previamente estimulados con LPS, en respuesta a concentraciones crecientes de la droga a estudiar (0-100 µg/mL), en este caso: la sub-fracción E1-II y los compuestos E1-IIA y E1-IIB. Todo ello mediante la reacción de Griess, que permite experimentalmente cuantificar la acumulación de nitrito en el medio, la cual se transforma ulteriormente (mediante análisis matemáticos) en concentración de ON. Tales mediciones se realizaron en períodos de tiempo definidos, 24 y 48 horas.

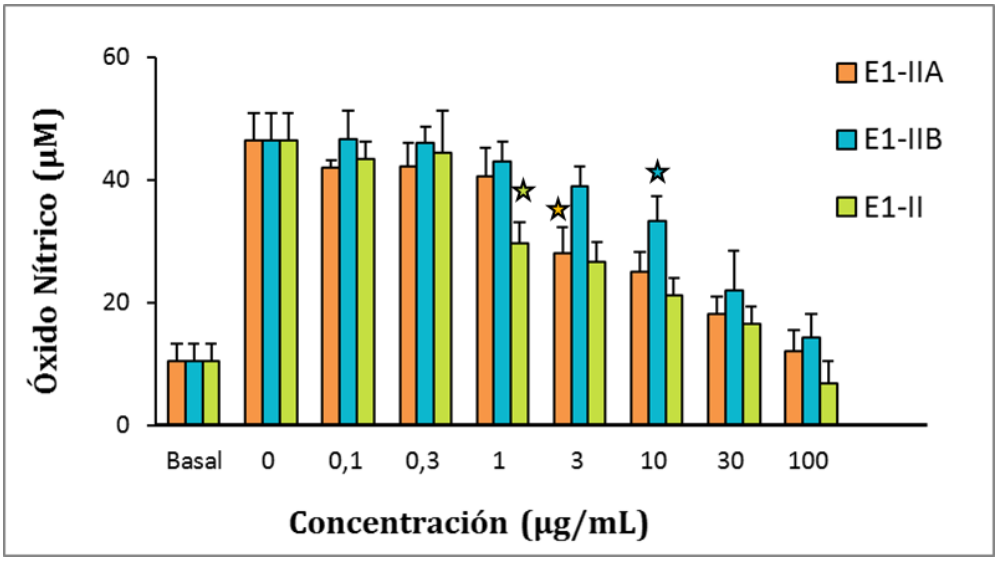

Figura 4.2. Efecto de la sub-fracción E1-II y los compuestos E1-IIA y E1-IIB extraídos de las hojas seca de *X. aromatica*, sobre la producción de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. Período de evaluación 24 h. Los valores son la media ± S (n=3). Las estrellas indican la concentración mínima de E1-II, E1-IIA y E1-IIB a partir de la cual existen diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control (prueba T).

La estimulación con LPS durante 24 horas, tal como se observa en la Figura 4.2, genera un incremento en la producción de ON en las células de los macrófagos RAW 264.7, respecto a su producción basal, alcanzando ésta su mayor valor en ausencia de la droga a evaluar, es decir, a concentración cero. Al evaluarse el efecto de la sub-fracción E1-II y los compuestos E1-IIA y E1-IIB, se determinó una concentración basal de ON de 11 µM, mientras la concentración de ON al cabo de 24 h en células estimuladas fue de 46 µM, lo que implicó un incremento del 24%, respecto a la producción basal.

Ahora bien, aun cuando las células han sido previamente estimuladas con LPS, la aplicación creciente de la sub-fracción E1-II y los compuestos E1-IIA y E1-IIB generó una disminución constante en la concentración de ON, en especial se observa un mayor efecto inhibitorio por parte de la sub-fracción E1-II generando a partir de 1 µg/mL diferencias estadísticamente significativas respecto al control, con una disminución del 30% de la concentración de ON, mientras que a 3, 10, 30 y 100 µg/mL disminuyó un 35, 45, 54 y 71% respectivamente; seguido por el compuesto E1-IIA, el cual generó a partir de 3 µg/mL un significativo efecto inhibitorio, disminuyendo un 33% la [ON], mientras que a 10, 30 y 100 µg/mL redujo un 39, 51 y 62% respectivamente, y con un menor efecto el

compuesto E1-IIB que a partir de 10 µg/mL, mostró un efecto significativo respecto al control, disminuyendo un 23% la [ON], mientras que a 30 y 100 µg/mL, redujo un 44 y 58% respectivamente. Por consiguiente, dichas sustancias, inhiben la producción de ON en las células evaluadas en un período de 24 h.

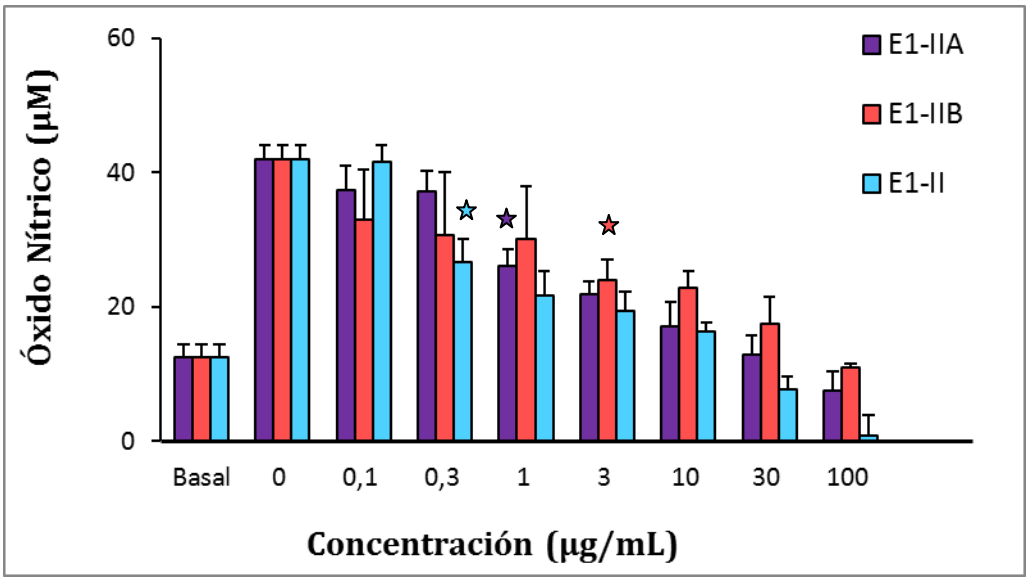

Figura 4.3. Efecto de la sub-fracción E1-II y los compuestos E1-IIA y E1-IIB extraídos de las hojas seca de *X. aromatica*, sobre la producción de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. Período de evaluación 48 h. Los valores son la media ± S (n=3). Las estrellas indican la concentración mínima de E1-II, E1-IIA y E1-IIB a partir de la cual existen diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control (prueba T).

Por su parte, en la Figura 4.3 se presenta el efecto de la sub-fracción E1-II y los compuestos E1-IIA y E1-IIB a las 48 horas, determinándose una concentración basal de ON de 13 µM, mientras la concentración de ON al cabo de 48 h en células estimuladas fue de 42 µM, lo que implicó un incremento del 31%, respecto a la producción basal.

Ahora bien, aun cuando las células han sido previamente estimuladas con LPS, la aplicación creciente de la sub-fracción E1-II y los compuestos E1-IIA y E1-IIB generó una disminución constante en la concentración de ON, observándose un mayor efecto inhibitorio por parte de la sub-fracción E-II, generando a partir de 0,3 µg/mL un efecto estadísticamente significativo respecto al control, reduciendo un 30% la concentración de ON, mientras que a 1, 3, 10, 30 y 100 µg/mL redujo

un 40, 44, 50, 67 y 80% respectivamente, seguido por el compuesto E1-IIA que causo un efecto inhibitorio significativo a partir de 1 μg/mL, disminuyendo un 31% la [ON], aumentando tal efecto a medida que incrementa la concentración de dicho compuesto, pues a 3, 10, 30 y 100 μg/mL, redujo un 39, 49, 57 y 67% respectivamente, y por último el compuesto E1-IIB que causo un efecto inhibitorio estadísticamente significativo a partir de 3 μg/mL, disminuyendo un 35% la [ON], mientras que a 10, 30 y 100 redujo un 37, 48 y 61% respectivamente. Por consiguiente, dichas sustancias inhiben la producción de ON en las células evaluadas en un período de 48 h.

Se tiene por tanto, que el efecto de tales sustancias sobre la producción de ON, sigue la misma tendencia de inhibición en los dos períodos de tiempo evaluados (24 y 48 h), observándose incluso diferencias similares entre cada una de las sustancias evaluadas en cada período individual, no obstante, resulto notorio la intensificación del efecto al pasar del tiempo, corroborándose la significancia estadística de esta observación mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías.

Dicho análisis, permitió a su vez corroborar que las diferencias antes mencionadas, entre las concentraciones mínimas a partir de las cuales cada compuesto inhibía significativamente la producción de ON respecto al control, son en efecto diferentemente significativas entre sí, es decir, mediante la prueba T, se determinaron las diferencias significativas entre cada concentración evaluada y el control para cada compuesto, con la finalidad de determinar la concentración mínima de compuesto que generé inhibición de ON; luego sin embargo, es necesario un análisis de varianza que permita establecer la existencia de diferencias significativa entre los compuestos evaluados, tomando en cuenta todo el rango de concentraciones evaluadas y determinar además las posibles diferencias entre los períodos de tiempo evaluados.

Ahora bien, al evaluarse la producción *in vitro* de ON en macrófagos en respuesta al incremento de concentraciones de una droga determinada, es aconsejable realizar además el ensayo de viabilidad celular, para verificar el estado fisiológico de las células evaluadas, con lo cual se descartan falsos resultados, pues al yuxtaponer ambos ensayos, se puede por ejemplo, determinar si la producción de ON responde a la droga suministrada o a procesos de muerte celular. Igualmente los ensayos de viabilidad, permiten determinar el potencial efecto citotóxico de la droga evaluada.

Por tal motivo, y con la finalidad de evaluar la viabilidad celular de los macrófagos RAW 264.7, se utilizó el método colorimétrico MTT; éste permite determinar los porcentajes de biomasa celular, respecto a la biomasa celular inicial (crecimiento máximo) correspondiente a una concentración cero de droga, en respuesta a concentraciones crecientes (0-100 µg/mL) de la droga a evaluar en este caso, la sub-fracción E1-II y los compuestos E1-IIA y E1-IIB.

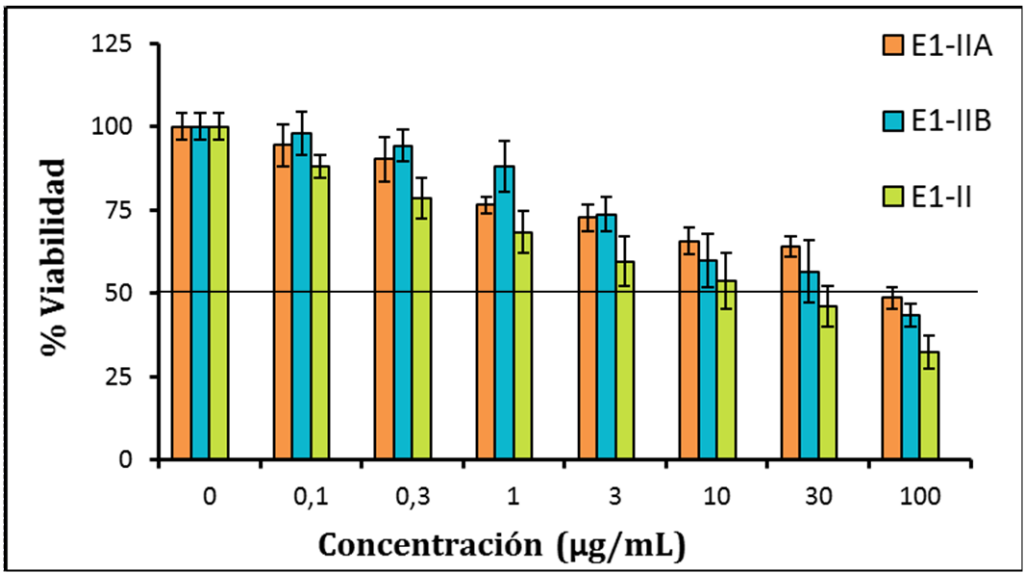

Figura 4.4. Viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7 expuestos a concentraciones crecientes de la sub-fracción E1-II y de los compuestos E1-IIA y E1-IIB en un período de 24 h. Los valores son la media ± S (n=3). La línea negra corresponde a la IC_{50}.

Dicho ensayo, evidenció la disminución de la viabilidad de las células RAW 264.7 en respuesta a las tres drogas evaluadas, tal como se presenta en la Figura 4.4. En ésta se observa que es la sub-fracción E1-II la que genera la mayor disminución en la viabilidad celular, seguida por el compuesto E1-IIB y con menor efecto el compuesto E1-IIA. Así pues la sub-fracción E1-II desencadenó un efecto tóxico desde la concentración 0-100 µg/mL en las células RAW 264.7, disminuyendo un 56% la viabilidad celular, mientras el compuesto E1-IIB generó una disminución del 47% y por último el compuesto E1-IIA que desencadenó una disminución en la viabilidad celular del 43%, por lo cual se considera al compuesto E1-IIA, la sustancia con menor toxicidad sobre las células RAW 264.7, de las tres evaluadas, en un período de 24 horas.

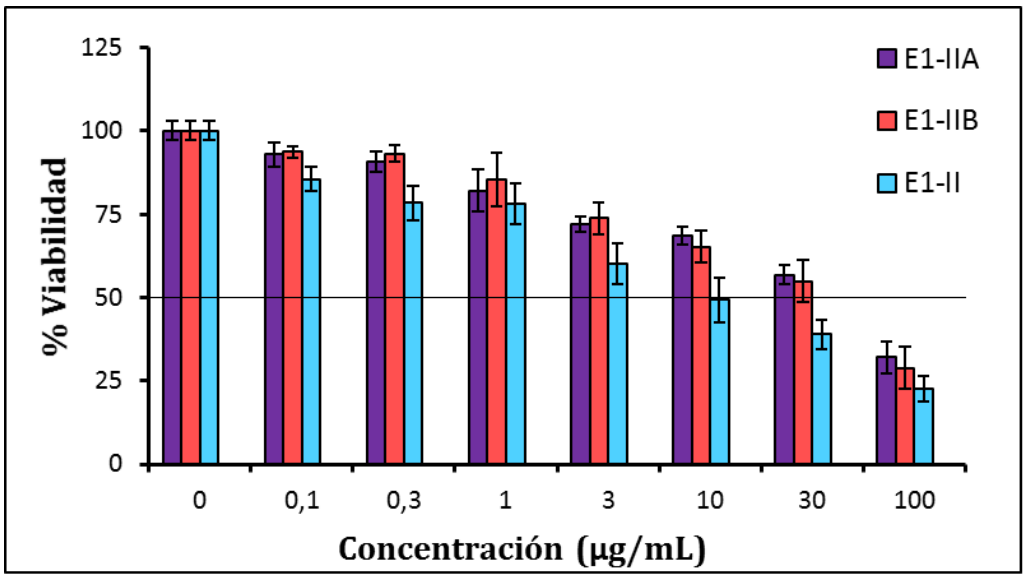

Figura 4.5. Viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7 expuestos a concentraciones crecientes de la sub-fracción E1-II y los compuestos E1-IIA y E1-IIB en un período de 48 h. Los valores son la media ± S (n=3). La línea negra corresponde a la *IC_{50}*.

Dicho comportamiento varía por demás en el tiempo, pues como se presenta en la Figura 4.5, al aumentar el tiempo de exposición (48 h) de las células a las sustancias extraídas de *X. aromatica* se mantiene el patrón de toxicidad antes comentado, donde la mayor toxicidad se asocia a la sub-fracción E1-II, seguidamente del compuesto E1-IIB y del compuesto E1-IIA, que permanece como el menos tóxico del conjunto. No obstante, todos los valores se incrementaron según lo siguiente, 65% de disminución de la viabilidad celular en respuesta a la sub-fracción E1-II, 60% en respuesta al compuesto E1-IIB y un 57% en respuesta al compuesto E1-IIA.

A modo de comparar e integrar los resultados antes analizados, se estimó la concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}) de la producción de ON y de la viabilidad celular de los macrófagos RAW 264.7, en respuesta a cada una de las sustancias evaluadas. Dicho parámetro, permite estimar el grado de inhibición de la producción de ON y la citotoxicidad que inducen las sustancias provenientes de *X. aromatica* en los macrófagos RAW 264.7, en un período de 24 y 48 h, datos éstos que se presentan en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}) de la producción de óxido nítrico (ON) y de la viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7 expuestos durante 24 y 48 h a concentraciones crecientes (0-100µg/mL) de la sub-fracción E1 y los compuestos E1-IIA y E1-IIB.

	IC_{50} (µg/mL)			
	Tiempo de exposición (horas)			
	24 h		48 h	
Xylopia aromatica	**ON**	**Viabilidad**	**ON**	**Viabilidad**
Sub-fracción E1-II	21,1	19,8	9,6	9,5
Compuesto E1-IIA	28,6	93,7	13,3	49,1
Compuesto E1-IIB	60,7	64,9	41,8	43,2

En concordancia con lo observado en los ensayos de ON (Figuras 4.2 y 4.3) y los ensayos de viabilidad celular (Figuras 4.4 y 4.5), los datos expuestos en la Tabla 4.4 confirman el efecto inhibitorio de la sub-fracción E1-II sobre la producción de ON, a las 24 y 48 h de exposición, con un IC_{50} igual a 21,1 y 9,6 µg/mL respectivamente, siendo mayor el efecto inhibitorio a las 48 h. No obstante, al compararse estos datos con el IC_{50} de la viabilidad celular, se evidencia también un efecto citotóxico de dicha sub-fracción sobre los macrófagos, tanto a las 24 (19,8 µg/mL) como a las 48 (9,5 µg/mL) horas de exposición, resultando mayor el efecto a las 48 h de exposición.

Por su parte, el compuesto E1-IIA generó inhibición de la producción de ON de los macrófagos durante las 24 y 48 h de exposición, con un IC_{50} igual a 28,6 y 13,3 µg/mL respectivamente, observándose al igual que en la sub-fracción que el efecto se potencia en el tiempo. Respecto a la viabilidad celular, se observó que el compuesto E1-IIA, presenta un leve efecto citotóxico sobre las células RAW 264.7, tanto a las 24 como a las 48 h de exposición, con un IC_{50} igual a 93,7 y 49,1 µg/mL, respectivamente.

Finalmente, el compuesto E1-IIB presentó el menor efecto inhibitorio sobre la producción de ON en las células RAW 264.7, en el período de 24 y 48 h de exposición, con un IC_{50} de 46,4 y 28,7 µg/mL, respectivamente. Sin embargo, en ese mismo período de tiempo, dicho compuesto exhibió un efecto citotóxico con un IC_{50} igual 49,8 y 29,6 µg/mL respectivamente, resultando inclusive más tóxico que el compuesto E1-IIA.

Por consiguiente, la sub-fracción E1-II genera el mayor efecto inhibitorio de la producción de ON, si bien, dicho efecto es dependiente de la toxicidad celular, pues se alcanza la inhibición media máxima de la producción de ON y de la viabilidad celular (IC_{50}) a concentraciones muy similares. Seguidamente, el compuesto E1-IIA presentó un efecto inhibitorio de la producción de ON independiente de la toxicidad celular, ya que el IC_{50} de la producción de ON es tres veces mayor que el IC_{50} de la viabilidad celular. A diferencia del compuesto E1-IIB, que si bien presenta el menor efecto inhibitorio de la producción de ON, el IC_{50} de viabilidad celular es muy próximo al de la producción de ON, luego no se descarta que dicho efecto sea independiente a procesos de citotoxicidad.

4.4 Evaluación del efecto antitumoral de la sub-fracción E1-II en el modelo de carcinoma mamario murino (4T1)

Con la finalidad de evaluar el efecto antitumoral *in vivo* de la sub-fracción E1-II obtenida a partir del extracto de las hojas seca de *X. aromatica*, se determinó la toxicidad de la misma en un modelo murino.

Para ello, se utilizaron ratones hembras de la cepa BABL/c y se siguió el método secuencial descrito en la Guía 423 de la OECD, el cual permite clasificar la sustancia problema en un intervalo de toxicidad. Se han descrito específicamente cinco categorías: altamente tóxico, muy tóxico, tóxico, nocivo y no clasificado, sin precisar un valor exacto de la dosis letal media (LD_{50}).

Por tanto y siguiendo el protocolo antes mencionado, se administró vía intraperitoneal (i.p.) 2000 mg/kg (dosis única) de la sub-fracción E1-II disuelta en 100 μL de DMSO, a tres ratones hembra de la cepa BALB/c, como grupo problema; conjuntamente con tres ratones más de la misma cepa y sexo, tratados únicamente con el vehículo (38 mg/kg de DMSO, dosis única) y tres ratones sin administración, como grupo control. Al no exhibirse signos tóxicos de gravedad, ni fallecimientos en el grupo de ratones tratados con la sub-fracción E1-II, se procedió a replicar dicho experimento bajo las mismas condiciones, obteniéndose nuevamente los mismos resultados.

Las observaciones de los signos clínicos presentados por los animales en experimentación se presentan en la Tabla 4.5. En ésta se exponen las alteraciones de las actividades físicas típicas de los ratones evidenciadas en el transcurso de las dos primeras horas posteriores a la aplicación de la dosis

única de la sub-fracción E1-IIA, las cuales disminuyen poco a poco, observándose una recuperación paulatina del comportamiento típico de los ratones, sin presentarse jamás algún fallecimiento, ni mostrarse tampoco signos de toxicidad durante el periodo experimental.

Del mismo modo, se observaron alteraciones en las actividades físicas típicas de los ratones tratados con DMSO, durante la primera hora post-inyección (Tabla 4.5), retomando, sin embargo, su comportamiento y actividades habituales una hora antes que el grupo tratado con la sub-fracción E1-II. No se presentaron tampoco para este grupo, fallecimientos ni signos de toxicidad durante la experimentación.

Tabla 4.5. Signos clínicos de toxicidad aguda en ratones hembras (cepa BALB/c) debido a la administración de las dosis únicas intraperitoneales de la sub-fracción E1-II (2000mg/Kg) y DMSO (38mg/Kg). Tiempo de evaluación 15 días. Experimento realizado por duplicado y de manera independiente (n=6).

Grupo	Decesos	Periodo de observación pos inyección	Signos clínicos
E1-II	0	0-2 h	Parálisis parcial de los miembros traseros, postura abdominal, piloerección, párpados cerrados, hiperventilación, apatía, actividades locomotoras reducidas, pérdida del apetito.
		2-24 h	Signos de recuperación, postura normal (erguida), actividades de aseo, alimenticias y consumo de agua normales.
		48- 360 h	No se apreciaron signos de toxicidad, los animales se mostraron normales en su comportamiento y hábito de vida.
(DMSO)	0	0-15 min	Excitación motora, postura encorvada, piloerección, hiperventilación, párpados abiertos.
		15 min-1 h	Postura encorvada, actividades locomotoras reducidas, cierre incompleto de párpados, apatía, pérdida del apetito.
		1-24 h	Signos de recuperación, postura normal (erguida), actividades de aseo, alimenticias y consumo de agua normales.
		48-360 h	No se apreciaron signos de toxicidad, los animales se mostraron normales en su comportamiento y hábito de vida.
Control	0	0-360 h	Los animales se mostraron normales en su comportamiento y hábito de vida

Complementariamente, se evaluó la perdida de peso corporal de los animales durante la experimentación, como parámetro cuantitativo e indicativo de toxicidad (Figura 4.6). Evidenciándose para los tres grupos una tendencia constante en el tiempo, con altibajos no significativos estadísticamente, pues al realizarse un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con un coeficiente de confianza del 95% no se obtuvieron diferencias significativas entre los ratones control, los ratones a los que se administró exclusivamente vehículo y aquellos a los que se les administró la sub-fracción E1-II en el vehículo, tanto en relación al tiempo como entre los tratamientos.

Por consiguiente, en el intervalo de tiempo evaluado tanto los ratones del grupo control como los grupos tratados (vehículo y sub-fracción E1-II) no presentaron variaciones estadísticamente significativas de peso, ni entre sí, ni entre tratamientos. El análisis estadístico realizado, permite además determinar la interacción entre los factores evaluados (en este caso, tiempo y tratamiento), obteniéndose para ambos una interacción no significativa, luego, según los datos aportados por la muestra evaluada, la tendencia de la variación observada en el peso de los ratones en respuesta a las dosis únicas administradas, es independiente del tiempo.

Finalmente, no se reportó ningún fallecimiento, los animales sobrevivieron de manera exitosa los 15 días de periodo experimental, tanto en el primer experimento como en la réplica.

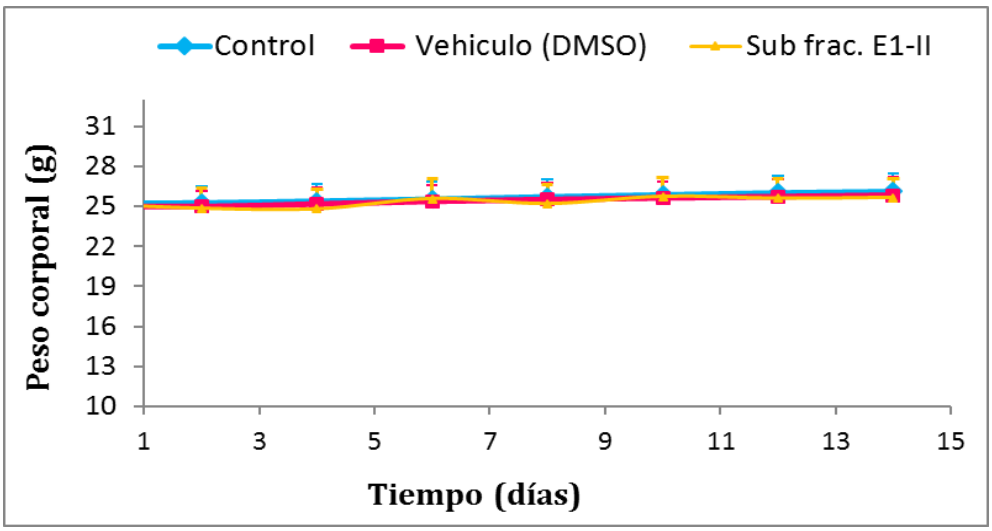

Figura 4.6. Toxicidad aguda de la sub-fracción E1-II de las hojas seca de *X. aromatica* en ratones de la cepa BALB/c. Dosis única: sub-fracción E1-II (2000mg/Kg) y DMSO (38mg/Kg). Experimento realizado por duplicado y de manera independiente. Los valores son la media ± S (n=6).

Tomando en consideración, los datos presentados en la Tabla 4.5 y en la Figura 4.4, y en concordancia con la Guía 423 de la OECD, se clasifica la sub-fracción E1-II en la categoría de sustancias no clasificadas, cuyo intervalo de dosis letal (LD_{50}) se ubica en dosis mayores a 2000 mg/kg y menores de 5000 mg/Kg.

Una vez establecida la dosis letal (LD_{50}) para la sub-fracción E1-II, se procedió a la evaluación del efecto antitumoral en un modelo de carcinoma mamario murino (4T1), para ello se estableció la dosis subaguda de la sub-fracción en 5 mg/Kg.

Seguidamente y empleando los protocolos descritos en las sección correspondiente, se inoculó $3x10^5$ células tumorales de la línea 4T1 en ratones hembra de la cepa BALB/c (n= 20), sin embargo, no se logró inducir al menos durante el período de evaluación (15 días), el tumor mamario primario en ninguno de los animales, observándose únicamente y sólo durante los primeros 7 días de evaluación, una pequeña inflamación en el área de inyección, la cual ceso al pasar del tiempo, por consiguiente, no se pudo determinar el efecto antitumoral *in vivo* de la sub-fracción E1-II, debido a la imposibilidad de generar el tumor primario con células de la línea 4T1 en ratones hembras de la cepa BALB/c.

4.5 Estructura química de los compuestos E1-IIA y E1-IIB

Una vez obtenidos los compuestos E1-IIA y E1-IIB, mediante el fraccionamiento cromatográfico de la sub-fracción E1-II y evaluada su actividad biológica sobre las líneas tumorales 4T1, MDA-MB-231 y HT-29 (Tabla 4.3), la producción de óxido nítrico y la viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7 (Tabla 4.4), se procedió a la elucidación de la estructura química de los mismos por espectroscopia de RMN H-1, C-13, DEPT135, HMQC y HMBC. Identificando el compuesto E1-IIA como ácido (8)(17),12-labdadieno-19-oico y el compuesto E1-IIB como ácido 15,16-dihidroxi-8(17),13(E)-labdadieno-19-oico; cuyas estructuras químicas se presentan en la Figura 4.7.

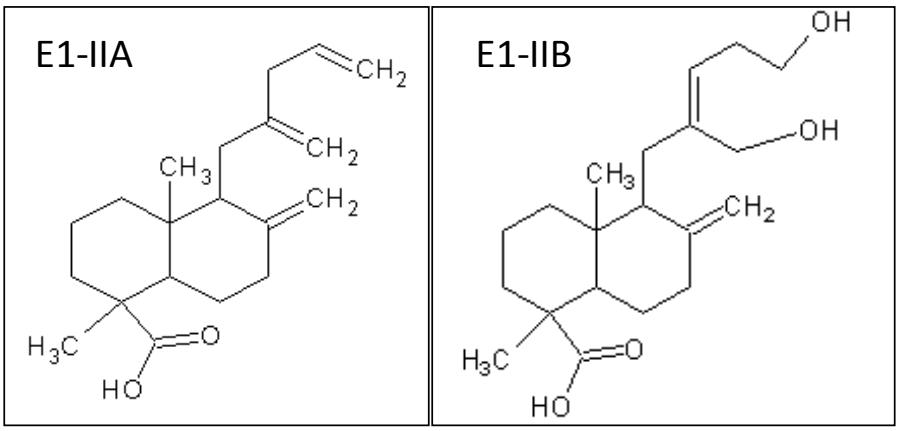

Figura 4.7. Estructura química de los diterpenos ácido (8)(17), 12-labdadieno-19-oico (E1-IIA) y ácido 15,16-dihidroxi-8(17), 13(E)-labdadieno-19-oico (E1-IIB).

5. DISCUSIÓN

5.1 Obtención y fraccionamiento biodirigido del extracto de las hojas de *X. aromatica*

Venezuela es un país megadiverso, con más de 20.000 especies de plantas descritas hasta ahora, de éstas, las comunidades indígenas y locales utilizan más de 1.500 especies con fines medicinales; pero sólo una proporción relativamente pequeña de estas han sido evaluadas en términos de su potencial como agentes antitumorales (Taylor y col., 2013).

Con el fin de explorar la gran variedad de productos naturales presentes en la biodiversidad de nuestro país y ampliar así los conocimientos reportados hasta ahora, se realizan programas de *screening* de extractos de plantas venezolanas como fuentes de potenciales agentes antitumorales. Uno de los principales objetivos de estos programas, es discernir los posibles mecanismos de acción antitumoral de dichos extractos, pues se tienen evidencias de que los medicamentos anticancerígenos derivados de plantas, pueden actuar tanto a nivel de inmunomoduladores, como agentes anti-angiogénicos o desencadenando un efecto citotóxico directo sobre las células tumorales (Gasparini y col., 2005; Wagner y Ulrich-Merzenich, 2009).

Sin embargo, una de las grandes limitantes del estudio y producción a gran escala de los productos naturales de plantas es la obtención adecuada de biomasa, tanto en relación a la cantidad como a la legalidad de la misma (Galbis, 2004). En el caso particular de Venezuela, tanto en la Constitución Nacional de 1999 como en la Ley de Diversidad Biológica (Gaceta, 2000), se reafirma la soberanía del país sobre los recursos biológicos y genéticos y se ratifica la responsabilidad del Estado en la conservación y protección de la diversidad biológica y cultural (Bermúdez y col., 2005).

Tomando en cuanto la cantidad de biomasa requerida para la producción a gran escala de dichos productos resulta inasequible su producción desde el punto de vista de la protección del medio ambiente (Li y Vederas, 2009), sin embargo, han surgido varias alternativas al respecto, como la posterior síntesis orgánica del compuesto o en caso de que existan limitaciones en ésta, se puede considerar también la semisíntesis, o incluso gracias a los avances de la biotecnología, se puede en ciertos casos producir los metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro* de las mismas (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Xylopia aromatica, en particular es una planta leñosa, común en las sabanas abiertas de Centro y Sur América, estando descrita también en la selva Amazónica (Lago y col., 2003; Stashenko y col., 2004). La selección de ésta como planta de estudio, se fundamentó en el amplio uso etnofarmacológico que tiene en la cultura venezolana (Colman-Saizarbitoria y col., 1994; Colman-Saizarbitoria y col., 1995; Alfonso y col., 1996; Colman-Saizarbitoria y col., 1996; Zafra-Polo y col., 1998) y americana, siendo utilizada también como planta medicinal en Colombia y Brasil (Alves y col., 2000; Garavito y col., 2006; Osorio y col., 2007; Suffredini y col., 2007; Mesquita y col., 2009; Tiuman y col., 2011; Oliveira y col., 2012).

El estudio químico y biológico de los metabolitos secundarios presentes en las plantas medicinales, se puede realizar en uno o varios órganos de la planta, en respuesta no solo a la complejidad y diversidad del metabolismo vegetal, sino también a los objetivos específicos del estudio, así pues la búsqueda dirigida de metabolitos secundarios para un determinado fin, implica en sí un refinamiento del material vegetal a analizar (Balunas y col., 2006; Kinghorn y col., 2010).

Al comparase por ejemplo, la actividad *in vitro* de extractos de hojas jóvenes y corteza (interna y externa) de *X. aromatica* sobre una variedad de líneas tumorales, se asoció el mayor efecto citotóxico y/o citostático al extracto foliar (Taylor y col., 2006; Taylor y col., 2013). Del mismo modo, Villasmil y col. (2006) evaluaron el efecto antitumoral *in vivo* del extracto foliar de *X. aromatica* en ratón, obteniendo resultados prometedores.

Por consiguiente, resulta de interés ampliar los estudios químicos del extracto foliar de *X. aromatica* hasta identificar los compuestos activos responsables de los efectos anticancerígenos reportados por las investigaciones anteriores, además de discernir los posibles mecanismos de acción de los mismos.

La obtención de los extractos vegetales, constituye en sí misma una fuente de variabilidad considerable en los estudios fitoquímicos, ya que según la metodología utilizada se pueden extraer unos u otros metabolitos y en proporciones diferentes, conociéndose que la presencia de un metabolito está íntimamente ligada al disolvente con el cual se extraiga, e incluso su posible actividad, dado que ciertos solventes pueden modificar la estructura de los metabolitos potenciando o no su actividad biológica (Ling y col., 2010), se debe por tanto considerar la metodología de extracción y fraccionamiento incluso en análisis comparativos entre estudios de una misma especie (Lapornik y

col., 2005; Kukula-Koch y col., 2013). Algunas de las metodologías de extracción de productos naturales más utilizadas son, la extracción continua, la destilación por arrastre de vapor y la maceración, entre otros, la escogencia de uno u otro método, depende fundamentalmente de los objetivos del estudio (Marcano y Hasegawa, 2002).

En el presente trabajo, se utilizó la maceración como metodología de extracción, a fin de obtener el extracto crudo de las hojas secas de *X. aromatica*, debido a la sencillez del mismo, pues no requiere de equipos complejos, lo cual disminuye además los costes del proceso (Marcano y Hasegawa, 2002; Azmir y col., 2013). Se realizó la maceración a temperatura ambiente, ya que muchos principios activos son termolábiles y pueden ser destruidos total a parcialmente a elevadas temperaturas (Ncube y col., 2008).

Como solvente de extracción se eligió el alcohol etílico debido a que es más eficaz para recuperar la mayor cantidad de metabolitos secundarios (alcaloides, flavonoides, acetogeninas y terpenos) de bajo punto de ebullición y baja reactividad, siendo este solvente uno de los más utilizados, indicado especialmente en estudios donde los constituyentes activos de la planta son desconocidos y el extracto obtenido es un crudo bastante complejo de difícil fraccionamiento (Marcano y Hasegawa, 2002).

En efecto, en situaciones como la mencionada previamente, donde el extracto es una mezcla compleja, tal como lo es el extracto *Xyar*, obtenido de las hojas de *X. aromatica*, el tiempo y la efectividad de los métodos de aislamiento y detección, se convierten en una de las limitantes más importantes en la búsqueda de productos naturales con relevancia farmacéutica, siendo en este caso moderado el rendimiento de tal proceso (Tabla 4.2, Resultados). Sin embargo, cada vez aumenta más el número de metodologías desarrolladas o modificaciones de las ya existentes, lo que deriva en una mayor eficiencia en los procesos de fraccionamiento y obtención de extractos naturales (Li y Vederas, 2009).

5.2 Evaluación del efecto antitumoral *in vitro* de los componentes de las hojas de *X. aromatica*

En la quimioterapia actual, uno de los enfoques centrales ha sido la búsqueda y selección de compuestos con actividad no solo citotóxica, sino también citostática frente a diversas líneas tumorales (Lu y Mahato, 2009). Entendiendo como compuestos citotóxicos aquellas sustancias capaces de

inducir la muerte de las células cancerígenas y citostáticos aquellas sustancias capaces de inhibir la división de las células cancerígenas sin causar la muerte celular directa, sin embargo, existen aún discrepancias respecto a si los compuestos citostáticos tienen la capacidad de comportarse o no como compuestos citotóxicos después de un largo periodo de aplicación, conduciendo así a la muerte celular (Rixe y Fojo, 2013). Dicha estrategia de búsqueda, ha logrado un éxito significativo en el tratamiento farmacológico del cáncer, pues la mayoría de los fármacos actuales son el resultado de ésta (Lu y Mahato, 2009), es por ello, que uno de los primeros análisis que se realizan a los compuestos de recién aislamiento es la evaluación de su capacidad citótoxica y/o citostática frente a las líneas tumorales de estudio, todo ello en condiciones *in vitro*.

Con tal finalidad, se han adaptado y desarrollado varios protocolos, entre ellos se encuentra la prueba de incorporación de timidina tritiada, el método colorimétrico de la sal de tetrazolio (MTT) (Carmichael y col. 1987) y el método de la sulforodamina B (SRB) (Skehan y col. 1990).

En el presente trabajo, se decidió utilizar el método colorimétrico de sulforodamina B (SRB), debido a que posee ciertas ventajas en estudios tipo *screening* sobre los otros métodos, por ejemplo, la prueba de incorporación de timidina tritiada resulta prohibitivamente costosa en ensayos a gran escala (Rubinstein y col., 1990). Por otra parte, el método colorimétrico MTT es menos costoso y resulta bastante sencillo, sin embargo, es dependiente del tiempo, no así el método colorimétrico de la Sulforodamina B, pues éste emplea un paso de fijación química al final del tratamiento con los compuestos analizados, que facilita el procesamiento posterior de muestras a gran escala de una manera independiente del tiempo (Rubinstein y col., 1990; Keepers y col., 1991), lo cual constituye una gran ventaja técnica respecto al método colorimétrico MTT, además posee una menor susceptibilidad a la interferencia directa de las sustancias de ensayo, es capaz de distinguir entre los efectos citostáticos y citotóxicos de los compuestos (Shoemaker, 2006) y finalmente se ha demostrado que esta metodología es bastante constante y varía poco entre diversas líneas celulares, lo que permite evaluar y comparar el efecto de un compuesto entre diversas líneas (Keepers y col. 1991). Razón por la cual, el método de la SRB ha sido la prueba de elección en el Programa Nacional de *screening* de plantas, por más de 20 años en el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos (Shoemaker, 2006) y fue por consiguiente el método de análisis aplicado en el presente estudio.

La aplicación del método SRB, involucra previamente la dilución de los compuestos vegetales en un solvente o vehículo, el cual debe evaluarse y considerarse en los resultados finales del ensayo, con el objetivo de evitar falsos positivos o resultados ficticios que enmascaren el efecto real de los compuestos a evaluar (Vichai y Kirtikara, 2006).

En el presente estudio, tanto el extracto, como las fracciones, sub-fracciones y compuestos derivados de las hojas secas de *X. aromatica*, se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO); éste es considerado un compuesto potencialmente tóxico para las células, no obstante, diversas investigaciones sugieren que en concentraciones finales de hasta 1% p/v, el DMSO no constituye un agente tóxico o de interferencia en la actividad biológica normal de las células, o al menos no interfiere sustancialmente en las actividades biológicas evaluadas en el ensayo de viabilidad de líneas tumorales, por lo que se suele utilizar como vehículo para disolver los compuestos de origen vegetal en ensayos de *screening* que utilizan el método de SRB (Vichai y Kirtikara, 2006; Houghton y col., 2007). En consecuencia, al utilizarse el DMSO a una concentración final de 1% p/v como vehículo, tal como se realizó en el presente trabajo, se tiene la certeza de que el efecto observado en los ensayos de SRB, se debe a los compuestos evaluados y no a un efecto no-específico del solvente.

Los resultados obtenidos para los ensayos de citotoxcidad fueron presentados en la Tabla 4.3, donde se observa el efecto citostático del extracto etanólico de las hojas secas de *X. aromatica* sobre todas las líneas tumorales evaluadas (MDA-MB-231, HT-29 y 4T1), siendo este efecto más drástico para la línea celular MDA-MB-231, a la cual correspondieron los menores valores de GI_{50} y *TGI*. Con base en este resultado, y siguiendo los preceptos de los ensayos bio-dirigidos (Phillipson y col, 2002; Brack, 2003; Weller, 2012), se decide continuar el fraccionamiento, observándose en efecto, la presencia de compuestos no sólo citostáticos sino también citotóxicos, enmascarados en las pruebas iniciales por la presencia de múltiples compuestos en la mezcla compleja o extracto crudo.

Así pues los ensayos de SRB con las fracciones, demostraron que cada una de ellas desencadena un efecto diferente sobre cada una de las líneas tumorales evaluadas; la fracción E3, compuesta primordialmente de azúcares libres y tanninos (Tabla 4.1), no desencadenó ningún efecto al menos en las líneas celulares aquí evaluadas (Tabla 4.3), a diferencia sí de las fracciones E1 y E2, las cuales sin

embargo, se diferencian entre sí debido a los efectos generados sobre cada una de las células evaluadas.

Mientras la fracción E2 (compuesta de flavonoides y alcaloides, Tabla 4.1) no exhibió algún tipo de efecto en el intervalo de concentraciones estudiadas sobre las líneas tumorales MDA-MB-231 y 4T1, si presentó un efecto citostático sobre la línea tumoral HT-29, lo cual es indicativo de la diferencia de diana en cada una de éstas, luego un metabolito puede ser activo en ciertas condiciones o en ciertas células y no necesariamente en otras (Oberlies y Kroll, 2004), lo que redunda en el abanico de posibilidades que brindan los metabolitos secundarios y también, por supuesto, en la complejidad del estudio de los mismos (Oberlies y Kroll, 2004) y de la imperiosa necesidad de delimitar efectivamente los objetivos de los ensayos y no descartar compuestos inactivos bajo ciertas condiciones o en ciertas líneas celulares, en relación a todas las posibilidades de acción que éstos pueden tener.

La ausencia de efecto citotóxico de la fracción E2 sobre las líneas celulares MDA-MB-231 y 4T1, resulta igualmente llamativa, ya que diversos estudios con otras plantas relacionadas y no relacionadas a *X. aromatica*, presentan evidencias de los efectos citotóxicos de alcaloides (Wu y col., 1993; Itoigawa y col., 2000; Vijayan y col., 2004; Martínez-Vázquez y col., 2005; Jansen y col., 2006) y flavonoides (Agullo y col., 1996; Ren y col., 2003; Carini y col., 2014) sobre éstas y otras líneas celulares. Respecto al efecto citostático de la fracción E2 sobre la línea celular HT-29, Kuntz y col. (1999) evidenciaron el efecto anti-proliferativo más no citotóxico de más de 30 flavonoides sobre esta línea celular, pues se ha establecido un grado positivo de correlación entre la estructura química de los flavonoides y su actividad biológica citostásica o citotóxica (Agullo y col., 1996). Luego el efecto de la sub-fracción E2 sobre las tres líneas evaluadas, se puede deber tanto a la naturaleza de los compuestos presentes en la misma (tipos y estructuras químicas) como a la interacción entre ellos (Gertsch, 2011; Efferth y Koch, 2011).

A diferencia de las fracciones 3 y 2, la fracción E1 compuesta por acetogeninas, terpenos y clorofila (Tabla 4.1), desencadenó un notorio efecto citotóxico sobre las líneas tumorales HT-29 y 4T1, además de un efecto citostático sobre la línea tumoral MDA-MB-231 (Tabla 4.3); motivo por el cual se decidió continuar su fraccionamiento. Obteniéndose que la sub-fracción E1-II conformada por terpenos (Tabla 4.1), generó un efecto citotóxico más drástico sobre las tres líneas tumorales MDA-

MB-231, HT-29 y 4T1, que la sub-fracción E1-III compuesta por clorofila (Tabla 4.1) y la fracción E1-I compuesta por acetogeninas (Tabla 4.1), que presentó un efecto citostático sobre la línea celular MDA-MB-231 y un efecto citotóxico menor sobre las líneas celulares HT-29 y 4T1 (Tabla 4.3). Luego los datos presentados en la Tabla 4.3, sugieren que si bien las acetogeninas foliares de *X. aromatica*, tienen actividad citostásica y citotóxica; son los terpenos presentes en la sub-fracción E1-II, los que desencadenan el mayor efecto citotóxico sobre todas las líneas tumorales evaluadas, lo cual difiere de la observación realizada por Colman-Saizarbitoria y col. (1994), quienes presentan evidencias de la actividad citotóxica antitumoral de las acetogeninas presentes en la corteza de *X. aromatica*.

Ahora bien, la diferencia antes mencionada puede deberse a diversos factores, entre ellos: (a) la distribución de metabolitos según el tejido vegetal, ya que los datos aquí presentados corresponden a un extracto foliar y no así los presentados por Colman- Saizarbitoria y col. (1994), quienes evalúan la corteza, por tanto ha de considerarse la posibilidad de que las acetogeninas presentes en dicho órgano vegetal no se correspondan con las acetogeninas presentes en el tejido foliar, puesto que la cantidad y concentración de los metabolitos secundarios varía según el órgano vegetal y el estadio de desarrollo de la planta (Palo, 1984; Liu y col., 1988; Yazaki, 2006; Murillo y col., 2007); (b) las condiciones de colecta del material vegetal, pues si bien no queda explícito en el trabajo de Colman- Saizarbitoria y col. (1994) las condiciones ambientales a las cuales estaba expuesta la planta al momento de la colecta, es indiscutible que éstas fueron diferentes a las de las plantas utilizadas en el presente estudio, luego se puede sugerir que tales diferencias en la distribución y actividad biológica de los metabolitos secundarios de *X. aromatica*, pueda deberse también a la influencia que ejerce el ambiente, tanto los factores bióticos (depredación por herbívoros, infecciones, entre otros) como abióticos (la temporada, factores climáticos, disponibilidad de agua, luz, CO_2, entre otros) sobre la biosíntesis y acumulación de metabolitos secundarios (Spitaler y col., 2006; Pavarini y col., 2012; Björkman y col., 2011; Ghasemzadeh y Jaafar, 2011), inclusive Balunas y col. (2006) han evidenciado mediante datos recopilados durante 15 años de estudios, la existencia de tendencias significativas en la actividad citotóxica de extractos y compuestos obtenidos de plantas, frente a diferentes líneas tumorales en relación con la ubicación de recogida, el órgano de la planta de donde proviene, el extracto y la clase

de compuestos aislados, por lo que recomiendan la profundización de estudios que permitan correlacionar datos edafológicos, altitudinales y climáticos con la actividad biológica de los compuestos de interés, lo cual sigue aun siendo una tarea pendiente en la mayoría de los estudios de *screenning* a gran escala; (c) finalmente, resulta necesario considerar las líneas tumorales sobre las cuales fueron evaluados el extracto, las fracciones y los compuestos, debido a que, como se mencionó anteriormente un metabolito puede resultar activo en ciertas células y no necesariamente en otras, pues influye la diana molecular con la que interactúa, la captación celular (tasa de adsorción y eflujo de salida del compuesto), el metabolismo celular y el tiempo de incubación con el compuesto (Finlay y col., 1986; Ouellet y Percival, 1995; Finlay y Baguley, 2000; Mertins y col., 2001).

Por otra parte, y aunque las acetogeninas han sido ampliamente estudiadas en la familia Annonaceae por su efecto citotóxico sobre diferentes líneas tumorales tanto *in vitro* como *in vivo* (Li y col., 2009; Abdel-lateff y col., 2009; Chen y col., 2012; Ragasa y col., 2012; Shi y col., 2014), también es conocido el efecto antitumoral de los terpenos (Gould, 1997; Khosla y Keasling, 2003; Gordaliza, 2010; Elsharkawy y Alshathly, 2013). En efecto, uno de los fármacos anticancerígenos más eficaces para tratar diversos tipos de cánceres desde su introducción en 1993, el reconocido Taxol, es un diterpeno aislado de la corteza del *Taxus brevifolia* (Rowinsky y Donehower, 1995; Lee y col., 2001; Guo y col., 2006).

Para la familia Annonaceae, específicamente se ha descrito mayoritariamente la actividad citotóxica del ácido kaurenoico, un diterpeno aislado, entre otras, de *Annona bullata* (Hui y col. 1990), y de otros diterpenos del tipo kaurenoicos aislados de *Annona senegalensis* (Fatope y Audu, 1996) y *Annona squamosa* (Joy y Remani, 2008; Zhoua y col., 2013) entre otras. Análisis posteriores, determinaron la actividad de éstos compuestos, sobre el punto G2 de control de daños del ADN, lo que genera un detenimiento de la mitosis celular, y por ende, un retroceso en la multiplicación de células cancerígenas (Dal Piaz y col., 2007).

Ferraz y col. (2013), observaron un efecto citotóxico y antitumoral de los aceites esenciales presentes en las hojas de *Xylopia frutescens*, provocado en su mayoría por sesquiterpernos. No obstante, no es únicamente la presencia de terpenos, bien sean, diterpenos o sesquiterpernos en las hojas de las plantas del género *Xylopia* (Moraes y Roque, 1988) lo que cautiva la atención de los

investigadores, sino también la formación casi exclusiva para este género, de dímeros de terpenos, el primer caso descrito corresponde al ácido acutiflorico, aislado de *Xylopia acutipora*, formado mediante la condensación de Diels-Alder de monómeros de kaureno y labdaneo (Hasan y col. 1985).

Posteriormente se describió el ácido frutoico, un dímero de derivados de kaureno aislado de los frutos verdes de *Xylopia frutescens* (Takahashi y col., 1995); seguidamente se describieron dímeros de sesquiterpenos en *X. aromatica*, mediante una ciclación aditiva, reacción que tampoco se había descrito antes para esta familia de plantas (Martins y col., 1998) y dímeros de labdano también en *X. aromatica* (Martins y col., 1999). Estudios fitoquímicos posteriores proporcionaron información de un número aún mayor de dímeros en diversas especies de este género, por lo que Moreira y col. (2007), surgieren la utilización de esta característica como un carácter diagnóstico dentro de la quimio-taxonomía de la familia Annonaceae.

De hecho, los compuestos aislados en el presente trabajo, E1-IIA y E1-IIB, son ambos diterpenos (Figura 4.7), específicamente ácido (8)(17), 12-labdadieno-19-oico y ácido 15,16-dihidroxi-8(17), 13(E)-labdadieno-19-oico, respectivamente. Este tipo de compuestos, se han aislado únicamente de plantas y algunos organismos marinos, por lo que en principio, solo se tienen evidencias de que estos organismos los puedan biosintetizar (Singh y col., 1998).

Tal como se observa en la Tabla 4.3, ambos labdanos desencadenaron un efecto citostático sobre las tres líneas tumorales evaluadas, con excepción de la línea tumoral HT-29, en la que el compuesto E1-IIB exhibió un leve efecto citotóxico.

Dichos resultados, guardan similitud con los datos obtenidos en las investigaciones de Roengsumran y col. (2001) y Suresh y col. (2010), quienes tras evaluar la actividad citotóxica de varios labdadienos, reportan diferencias en el grado de citotoxcicidad de los mismos, variando desde actividades importantes a moderadas o incluso muy leves, por lo que el último de ellos sugiere que la actividad anti-cancerígena de los labdadienos viene determinada en gran medida por la estructura química de los mismos.

Cabe destacar, que los labdadienos no sólo presentan un efecto citotóxico sobre diversas líneas cancerígenas (Karioti y col., 2007; Chimnoi y col., 2009; Reddy y col., 2009), ya que existen además

evidencias de labdadienos con actividad antibacterial (Singh y col., 1998; Singh y col., 2010), anti-fúngica (Singh y col., 1998; Sielinou y col., 2012), anti-lesmaniasis (Singh y col., 1998), cardiotónica (Singh y col., 1998; Pereira de Oliveira y col., 2006), anti-inflamatoria (Chang y col., 2014), como inhibidores de la β-galacturonasa (Singh y col., 1998) y de la COX-1 y 2 (Hegazy y col., 2008), entre otros. De allí, la importancia de estos compuestos y por ende, el interés cada vez mayor de sintetizar nuevas moléculas análogas a los labdadienos naturales (Singh y col., 2010; Pawar y col., 2014).

Ahora bien, si las diferencias en el nivel de citotoxicidad entre los compuestos E1-IIA y E1-IIB, aislados de *X. aromatica*, concuerda con lo reportado en investigaciones similares, dicho resultado no se corresponde con los valores esperados según el ensayo bio-dirigido, pues en el análisis de citotoxidad de la sub-fracción E1- II (Tabla 4.3), se observa un fuerte efecto citotóxico de la misma. Luego, se esperaba que al purificar los compuestos presentes en tal sub-fracción, éstos mostrasen un efecto citotóxico aún más drástico que la sub-fracción, pues estarían aún más concentrados, lo cual no se evidenció (Tabla 4.3).

Tal fenómeno, puede deberse a problemas en el fraccionamiento fitoquímico, ya que frecuentemente el (los) principio (s) activo (s) resulta ser un componente minoritario de la mezcla (extracto), lo cual constituye un verdadero obstáculo para su aislamiento y purificación, de esta manera no se puede asegurar que el compuesto activo haya sido realmente aislado (Ortholand y Ganesan, 2004; Koehn, 2008). Existiendo la posibilidad de que el compuesto activo no eluyera correctamente de la columna cromatográfica, presentando pérdidas por adsorción u otras eventualidades (Phillipson y col., 2002).

Igualmente, existe la posibilidad de que los componentes responsables de la actividad sean compuestos inestables y en consecuencia hayan sido degradados, durante el tiempo que la muestra pasó a temperatura ambiente en presencia del disolvente (DMSO) (Phillipson y col., 2002). Incluso, podría suceder que el componente activo sea volátil y ante la exposición de la muestra al aire sea eliminado (Phillipson y col., 2002). De esta manera es posible que el(los) compuesto(s) activo(s) se haya perdido en la etapa de fraccionamiento (Wildman, 2003; Weller, 2012). También habría de considerarse la posibilidad de que existiesen contaminantes en lo que se determinó como “los compuestos activos”, es decir, dichos compuestos podrían realmente no estar puros, por lo cual su actividad podría estar siendo enmascarada (Brack, 2003).

Asimismo, cabe señalar que no solo problemas en el fraccionamiento, pueden generar estos resultados, si no también problemas de solubilidad en medio acuoso; estando ampliamente reportado en la literatura, los problemas de solubilidad en medio acuoso que presentan los productos naturales, reconociéndose incluso como una de las limitaciones más importantes en el desarrollo de fármacos a partir de los mismos (Cragg y Newman, 2005; Simmons y col., 2005; Koehn, 2008). Tal es el caso del Taxol, cuya estructura química ha sido ampliamente estudiada desde el punto de vista estructura-actividad, síntesis y solubilidad, desencadenando incontables esfuerzos dedicados a la búsqueda de la síntesis más eficiente y una forma más soluble (Kim y col., 2001; Oberlies y Kroll, 2004).

Aunado a las posibilidades anteriormente descritas, Williamson (2001) evalúa bajo una perspectiva crítica el método de fraccionamiento biodirigido, especialmente con extractos de plantas, puesto que si bien el objetivo de los mismos es encontrar la entidad química única del efecto biológico observado, los resultados obtenidos mediante esta metodología pueden ser no concluyentes. Así pues, si el efecto biológico observado es el resultado de la combinación entre dos o más sustancias, el método de fraccionamiento biodirigido, es decir, la reducción de la actividad a una fracción y eventualmente a un compuesto, estaría condenado al fracaso, incluso podría generar la conclusión errada de que la planta analizada estuviese desprovista de actividad biológica. Por tanto, el efecto biológico determinado en el fraccionamiento biodirigido debería corresponderse con el esperado y cuando la actividad biológica, como se piensa, se pierde durante la purificación, cabría preguntarse si existe la presencia de sinergia (Williamson, 2001).

Conceptualizar la sinergia resulta en ocasiones difícil, ya que ésta tiene una definición matemática exacta de acuerdo con el método utilizado para determinarla, sin embargo, de forma general la sinergia se puede definir, como un efecto observado mayor de lo que habría de esperarse, debido a la combinación de sustancias; a partir de la consideración de las contribuciones individuales de dichas sustancias, aplicado al aumento de un efecto terapéutico, la reducción en el perfil de efectos secundarios y/o preferiblemente ambos (Williamson, 2001).

El efecto de sinergia, se ha descrito a través de varios mecanismos, principalmente la acción conjunta de constituyentes de una mezcla (extracto) en diferentes puntos de una misma cascada de señalización celular (acción sobre diferentes dianas moleculares, que conllevan a un mismo objetivo),

la mejora de la biodisponibilidad de los constituyentes, interactuando entre sí con el fin de optimizar la solubilidad o interfiriendo con los procesos de transporte celular (expulsión del compuesto activo del interior al exterior de la célula blanco) y la evasión de los procesos de descomposición del(los) compuesto(s) activo(s) si es este inestable, debido a la interacción con compuestos antioxidantes presentes en los extractos; entre otros mecanismos sinérgicos (Williamson, 2001; Wagner y Ulrich-Merzenich, 2009; Efferth y Koch; 2011).

Entorno al estudio de la sinergia, existen ya, varios casos de sinergia entre compuestos tanto fitoquímicos como sintéticos y ambos, bien documentados en la literatura, en su mayoría evaluados en el tratamiento de enfermedades complejas de causa multifactoriales como el cáncer, SIDA, enfermedades cardiovasculares, entre otras (Ulrich-Merzenich y col., 2009; Efferth y Koch, 2011; Gertsch, 2011).

En particular, el tratamiento quimioterapéutico del cáncer ha empleado comúnmente la combinación de fármacos en uso clínico, lo que se conoce como polifarmacología o poliquimioterapia (Reynolds y Maurer, 2005). Aplicación basada en la concepción de combatir el cáncer a través de un tratamiento dirigido a múltiples dianas, como por ejemplo: la inhibición de la angiogénesis, la inducción de la diferenciación celular, la apoptosis o la lucha contra los procesos inflamatorios (Danilenko y Studzinski, 2004; Wang y col., 2008; Wagner y Ulrich-Merzenich, 2009; Gertsch, 2011). Siendo cada vez más los estudios realizados en este campo, debido a la presente quimioresistencia a múltiples drogas de diferentes cánceres, que se conoce como fenotipo MDR (*multidrug resistance*), donde la administración conjunta de agentes citotóxicos con inhibidores de transportadores celulares específicos como la glicoproteína-P, asociados a la expulsión de diferentes sustancias entre ellas drogas del interior al exterior celular, resulta un enfoque prometedor para solucionar dichos procesos de resistencia (Bansal y col., 2009; Eid y col., 2012).

Por lo que finalmente no debe descartarse la posibilidad de que sea la sinergia entre ambos compuestos E1-IIA y E1-IIB, por ejemplo, mediante la formación de dímeros, que tal como se comentó previamente es un carácter diagnóstico del género *Xylopia*; o incluso entre dichos compuestos con algunos otros no identificados, lo que generó los altos valores de citotoxicidad en la

sub-fracción E1-II (Tabla 4.3) y que se pierden al purificar y evaluar los compuestos de forma individual.

5.3 Evaluación del efecto inhibitorio de los componentes de las hojas de *X. aromatica* en la producción *in vitro* de ON

La investigación de la estrecha relación que existe entre el cáncer y los procesos de inflamación crónica, han conllevado al señalamiento de mediadores inflamatorios, entre ellos el óxido nítrico, como dianas moleculares de interés en la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer (Calixto y col., 2004). Afirmación tras la cual se ha ahondado en el estudio del papel que desempeña el óxido nítrico en la promoción y desarrollo del cáncer. Al respecto, Dhankhar y col. (2010) señalan que el ON como mediador pleiotrópico puede tanto promover como inhibir la progresión tumoral y la metástasis, ya que existen evidencias del rol crítico de este mediador en numerosos procesos biológicos, como son la vasodilatación y la inmunidad mediada por macrófagos (Xu y col., 2002), luego el efecto de promoción o inhibición del ON sobre la progresión tumoral y la metástasis, parece depender del tipo y la actividad de las isoformas de NOS que lo sintetizan, la concentración y la duración de la exposición del tejido al ON, la interacción con otros radicales libres, iones metálicos y proteínas, además de la sensibilidad celular al ON (Fukumura y col., 2006; Dhankhar y col., 2010).

Por tal motivo, tanto el aumento como la disminución de la señalización del ON se ha propuesto como una estrategia potencial para el tratamiento de tumores (Fukumura y col., 2006). No obstante, para determinar cuál de las dos estrategias ha de utilizarse, se debe tomar en cuenta el tipo y estadio del tumor, así como la expresión, actividad y distribución espacial y temporal de las isoformas de NOS presentes en el tejido, entre otros (Fukumura y col., 2006).

Por consiguiente, ciertos sectores consideran la inhibición de la señalización de ON como una posible estrategia terapéutica anti-angiogénica, lo que sugiere que las drogas anti-inflamatorias no solamente podrían ser utilizadas en el tratamiento preventivo del cáncer, como se menciono en la introducción (apartado 1.3.1), sino también en el tratamiento contra el cáncer (Fukumura y col., 2006).

Con el objetivo de estudiar el efecto de nuevos compuestos sobre la producción de ON, se ha implementado el ensayo de estimulación *in vitro* de líneas macrofágicas con LPS, puesto que los

macrófagos, juegan un papel clave en la promoción y desarrollo de la inflamación crónica (Gómez y col., 2011). Dicho tipo celular responde ante una variedad de estímulos de membrana con la producción y liberación extracelular de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, pues poseen una gran variedad de receptores como por ejemplo el receptor para lipopolisacáridos (CD14) y numerosos receptores para citocinas como INF-γ, TNF-α, entre otras (Taylor y col., 2005). De esta manera los macrófagos pueden ser activados por el lipopolisacárido (LPS) que es un polímero presente en la pared celular de bacterias Gram-negativas, capaz de desencadenar el estallido oxidativo, respuesta en la cual se producen grandes cantidades de ON (Gómez y col., 2011).

Para medir de forma directa e indirecta la concentración *in vitro* del ON liberado por los macrófagos, se han adaptado diversos métodos. Siendo la cuantificación de los metabolitos estables nitrato (NO_3^-) y nitrito (NO_2^-) a través de la reacción de Griess, uno de los métodos más utilizados, pues se evitan las dificultades atribuibles a la corta vida media del ON, resultando así un método sencillo, poco costoso e idóneo para el análisis de muestras a gran escala (Miranda y col., 2001; Sun y col., 2003).

La reacción de Griess permite únicamente medir la formación de nitrito, pues para considerar la formación de nitrato es necesario reducir el mismo mediante el uso de metales pesados (Cd, V, Zn) o enzimas especializadas (nitrato reductasa) a nitrito (Sun y col., 2003). Sin embargo, ya que el nitrito es el único producto final estable de la oxidación del ON en medio acuoso, pues el nitrato se forma por la reacción del ON con el superóxido o la oxihemoglobina (Miranda y col., 2001), Chang y col. (1998) señalan que más del 95% del ON total liberado por los macrófagos activados, se convierte en nitrito en el medio de cultivo, por lo cual la cuantificación únicamente del nitrito resulta una medida confiable de la concentración de ON producido.

Ahora bien, el análisis de la inhibición en la producción de ON por acción de los compuestos a evaluar, además de la cuantificación de la concentración de dicho radical libre, incluye la evaluación de la viabilidad de los macrófagos, ya que resulta obligatorio analizar el estado fisiológico de las células evaluadas, con el objetivo de evitar falsos positivos (Gómez y col., 2011). Para ello se empleó el ensayo colorimétrico MTT, ya que es un método sencillo, reproducible, de corto tiempo, ideal para el análisis de un gran número de muestras (Twentyman y Luscombe, 1987; Edmondson y col., 1988).

Asimismo los compuestos vegetales a estudiar, requieren de la previa dilución en un solvente, el cual depende principalmente de la naturaleza del extracto vegetal (etanólico, acuoso, entre otros). En este trabajo la sub-fracción E1-II y los compuestos E1-IIA y E1-IIB obtenidos a partir del extracto etanólico de las hojas de *X. aromatica* se diluyeron en el solvente DMSO, sin embargo como se mencionó en el apartado 5.2, dicho solvente resulta tóxico para las células, no obstante Kim y col. (2013) indica que la concentración final de DMSO en el medio de cultivo celular debe ser menor a 0,1%, concentración a la cual no presenta interferencia en el sistema de ensayo, es decir, no exhibe efecto tóxico sobre los macrófagos RAW 264.7; siendo este nuestro caso.

Actualmente se conoce el potente efecto inhibitorio en la producción de ON, por parte de una variedad de terpenos, aislados de diferentes especies vegetales (Gautam y Jachak, 2009; Gomez y col., 2011; Zhang y col., 2013). Estando, la sub-fracción E1-II compuesta por terpenos (Tabla 4.1) y siendo los compuestos E1-IIA y E1-IIB, ambos diterpenos de tipo labdadienos (Figura 4.7).

Los datos del efecto inhibitorio por parte de la sub-fracción E1-II y los compuestos E1-IIA y E1-IIB en la producción de ON y en la viabilidad de los macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, evaluados en un periodo de 24 y 48 horas, se presentaron en la Tabla 4.4. Donde se evidenció que la sub-fracción E1-II compuesta por terpenos (Tabla 4.1) generó el mayor efecto inhibitorio, en la producción de ON, si bien, dicho efecto es dependiente de la toxicidad celular; pues se alcanza la inhibición media máxima de la producción de ON y de la viabilidad celular (IC_{50}) a concentraciones muy similares. Seguidamente, el compuesto E1-IIA presentó un efecto inhibitorio de la producción de ON, independiente de la toxicidad celular, ya que el IC_{50} de la producción de ON es tres veces mayor que el IC_{50} de la viabilidad celular. Mientras, el compuesto E1-IIB, si bien presentó el menor efecto inhibitorio de la producción de ON, el IC_{50} de viabilidad celular es muy próximo al de la producción de ON, luego no se descarta que dicho efecto sea independiente de procesos de citotoxicidad.

En presencia de estos resultados llama la atención la acción del compuesto E1-IIA, pues muestra un significativo efecto inhibitorio en la producción de ON tanto a las 24 como a las 48 h, con valores de IC_{50} = 94.7 y 44 μM, respectivamente, sin presentar mayor toxicidad celular. Resultando interesante el aumento del efecto inhibitorio en el tiempo, pues se conoce la acción dependiente del tiempo de diferentes compuestos anti-inflamatorios, entre otros. Relacionando tal condición, con el mecanismo

de acción del compuesto. Al respecto se ha descrito en la literatura, la acción de un compuesto en el tiempo, en función del tipo de unión, ya sea reversible o irreversible, del mismo con la diana molecular, aclarando que los compuestos dependientes del tiempo se unen de forma irreversible, lo que implica una mayor duración temporal para la formación del complejo compuesto-diana (Ouellet y Percival, 1995; Guo y col., 1996). Siendo de interés, por tal razón ahondar sobre las propiedades anti-inflamatorias del compuesto E1-IIA sobre su mecanismo de acción y cinética del mismo, en posibles dianas moleculares como la iNOS, TNF-α, COX-2, NF-κB, entre otras.

Ahora bien, al comparar el efecto inhibitorio del compuesto E1-IIA sobre la producción de ON, con otros labdanos aislados también de plantas, se tiene por ejemplo que el ácido 15-nor-14-oxolabda-8(17),13(16)-dien-19-oico, proveniente de las hojas de *Thuja orientalis*, genera un efecto inhibitorio asociado a un IC_{50} de 3,6 μM (Kim y col., 2013), al igual que otros cinco labdadienos derivados de semillas de *Vitex negundo*, de los cuales se destacan dos compuestos debido a sus potentes efectos, con valores de IC_{50} de 0.12 y 0.23 μM, respectivamente (Zheng y col., 2010), por consiguiente se sugiere que el compuesto E1-IIA presenta una actividad inhibitoria del ON de nivel moderado, respecto a estos otros labdanos vegetales, para los cuales se demostró además que uno de los mecanismos que inducían la inhibición de la producción de ON, era la inhibición de la actividad enzimática de la iNOS y la COX-2 (Zheng y col., 2010; Kim y col., 2013), lo que nos invita a profundizar en el estudio molecular de los compuestos asilados de las hojas de *X. aromatica*.

5.4 Evaluación del efecto antitumoral *in vivo* de la sub-fracción E1-II del extracto de las hojas de *X. aromatica*

El estudio de las propiedades antitumorales de compuestos recién aislados, involucra un amplio abanico de posibilidades entorno a la diversa disponibilidad de ensayos existentes, debido a la relación de cada uno de ellos con la inmensa variedad de mecanismos de acción e interacción con moléculas dianas, que se pueden evaluar. Así, lo demuestra por ejemplo, el aislamiento y uso de compuestos de comprobada actividad citotóxica y/o citostática. Sin embargo, sea cual sea el ensayo *in vitro* escogido, todos los compuestos de recién aislamiento deben ser evaluados en modelos *in vivo*, dado que solo un pequeño porcentaje de compuestos que presentan actividad *in vitro*, han exhibido también actividad *in vivo* (Kinghorn y col., 2010). Por tal razón resulta precisa la evaluación del efecto

antitumoral de la sub-fracción E1-II sobre el carcinoma mamario murino, ya que dicha sub-fracción reveló el mayor efecto citotóxico sobra la línea celular 4T1 (apartado 4.2, Resultados), a partir de la cual se induce el carcinoma mamario en ratones de la cepa BALB/c. Sin embargo, también resulta interesante la evaluación del efecto antitumoral *in vivo* de los compuestos aislados E1-IIA y E1-IIB pues pese a no presentar un efecto citotóxico, exhibieron un efecto citostático (apartado 4.2, Resultados), sugiriendo en investigaciones futuras, ahondar sobre dicho resultado, ya que es igualmente interesante en la búsqueda de nuevos compuestos activos.

Existe, no obstante, un paso previo a la evaluación del efecto antitumoral *in vivo*, y es la evaluación de la toxicidad aguda de la sustancia a evaluar, pues en principio dicha sustancia, debe ser suministrada en dosis tolerables, es decir, que no cause efectos tóxicos, ya que la respuesta tumoral a la sustancia evaluada requiere un periodo de observación considerable, donde el animal recibe continuamente y por un largo periodo dicha sustancia, además, el no determinar el posible efecto toxico de la sustancia, genera resultados cuestionables y poco robustos en los ensayos antitumorales *in vivo*, pues se podría enmascarar resultados posteriores de regresión tumoral, por ejemplo.

Razón por la cual, se han establecido una gran variedad de métodos para determinar cuantitativamente la toxicidad aguda de sustancias en modelos animales, como una herramienta para evaluar el peligro tóxico que pueden presentar dichas sustancias con potencial interés farmacológico, alimenticio, entre otros, destinadas al uso humano. Considerándose la estimación de la dosis letal media (LD_{50}) el procedimiento más antiguo, a partir del cual se han desarrollado varias alternativas, como el método de dosis fijas (*FDP*), método de clase tóxica aguda (*ATC*) y el método arriba y abajo (*Up-and-Down*), los cuales ya han sido aceptados por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) (Whitehead y Curnow, 1992; Schlede y col., 1995; Botham y col., 2002; Rispin y col., 2002).

Para la realización de esta investigación se decidió utilizar el método de clases de toxicidad aguda, debido a que posee la ventaja de emplear menos animales experimentales, de esta manera son menos los animales sujetos a dolor y angustia, en comparación con el procedimiento clásico de estimación de la LD_{50}, obteniendo sin embargo la misma información sobre los signos tóxicos de los animales tratados (Schlede y col., 1995). Inclusive, aunque el método *ATC* no permite estimar un valor exacto

de la LD_{50}, Schlede y col. (1992) sugiere que la probabilidad de la clasificación precisa para la evaluación del peligro intrínseco de una sustancia, es igual o incluso mejor con dicho método, que con el procedimiento clásico de la LD_{50}. Señalándose además que dicho método alternativo presenta una excelente reproducibilidad en comparación con la prueba clásica, siendo finalmente una alternativa fiable para los estudios toxicológicos (Schlede y col., 1992).

Inicialmente el método de clase tóxica aguda fue concebido para el estudio de sustancias administradas por vía oral, sin embargo, también es aplicable en estudios de sustancias por vía inhalatoria, dérmica (Schlede y col., 1992; Holzhutter y col., 2003) y por vía parenteral, específicamente subcutánea (Dadarkar y col., 2007).

Debido a la ausencia de literatura acerca de estudios toxicológicos *in vivo* de los terpenos presentes en *Xylopia aromatica*, se decidió iniciar el protocolo por la dosis límite de 2000 mg/kg, considerándose la guía 423 de la OCDE (2001), donde señalan que la dosis inicial debe ser aquella con mayor probabilidad de causar la muerte en algunos de los animales tratados (Pérez y col., 2008; Zayed y Philippe, 2009). Para ello, se empleó ratones de la cepa BALB/c de sexo femenino, puesto que no han sido reportadas diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas toxicológicas de ambos sexos y en los pocos casos donde esto ha ocurrido, el sexo femenino ha sido el más sensible, por eso es el comúnmente utilizado para dichos experimentos (Schlede y col., 2005; Lahlou y col., 2008). Además se consideró pertinente la utilización de ratones hembras, debido a la posterior evaluación del efecto antitumoral de la sub-fracción E1-II en el modelo de carcinoma mamario murino (4T1) el cual contemplaba obligatoriamente la utilización de hembras (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 2000).

La administración de la sub-fracción E1-II, se realizó utilizando como vehículo el DMSO, ya que dicha sub-fracción resultó insoluble en medio acuoso. Farrant (1964) reportó como valor de la toxicidad aguda del DMSO administrado por vía intraperitoneal en ratones, una LD_{50} de 14,7 g/Kg, mientras Caujolle y col. (1965) obtuvo un valor de 17,7 g/kg; siendo el valor máximo de dosis DMSO utilizada en este trabajo (28 mg/kg), mucho más baja que las concentraciones mencionadas, por lo cual el DMSO no debería presentar actividad tóxica en los ratones tratados. Tal como se observó en los resultados reportados en la Tabla 4.5, donde los ratones tratados únicamente con DMSO no

presentaron signos de toxicidad ni aconteció la muerte de algún animal durante el periodo de experimentación, en comparación con el grupo control. En consecuencia, el efecto exhibido por la sub-fracción E1-II, se debe estrictamente a los componentes presentes en ella y no a un efecto del vehículo.

La Sub-fracción E1-II, como se muestra en la Tabla 4.5, no desencadeno efectos tóxicos graves ni persistentes, como tampoco ocasionó la muerte de los animales tratados durante el periodo experimental, en referencia al grupo control. Tales signos clínicos concordaron con el comportamiento del peso corporal de los animales tratados con dicha sub-fracción, los cuales no presentaron diferencias significativas en el peso, respecto al grupo control, tal como se observa en la Figura 4.6. Por ende, se consideró que la dosis letal media se encuentra a una concentración mayor de 2000 mg/Kg y menor a 5000 mg/Kg, clasificando a la sub-fracción E1-II según las directrices de la OECD, en la categoría 5 (sin clasificación), sugiriendo tal sub-fracción como sustancia de precaución.

Una vez establecido el grado de toxicidad aguda de la sub-fracción E1-II, se procedió a la evaluación de su efecto sobre tumores mamarios primarios generados a partir de la línea celular 4T1, en ratones hembras de la cepa BALB/c, con el impedimento de que no se logró establecer en el periodo experimental (2 semanas) tumores sólidos estables, debido probablemente a la cantidad de células inoculas, pues en la literatura se reporta el uso de $1x10^6$ o $1x10^7$ células en un volumen de inyección de 100 μL (Pulaski y Ostrand-Rosenberg, 2000), mientras que en el presente estudio se emplearon $3x10^5$ células en un volumen de inyección de 100 μL, y al ser menor la cantidad de células disminuye la probabilidad de inducción del tumor, ya que como plantea la hipótesis de las células madres del cáncer, los tumores se componen de poblaciones heterogéneas de células y solo una determinada y poco numerosa sub-población denominadas células madres del cáncer (*CSC*) exhiben propiedades iniciadoras del tumor, así pues se disminuye la frecuencia de células promotoras del tumor (Matilainen y col., 2012).

Constituye por tanto, una tarea pendiente la evaluación de la toxicidad aguda de los compuestos aislados de la sub-fracción E1-II, al igual que la evaluación del efecto antitumoral *in vivo* tanto de la sub-fracción E1-II como de los compuestos E1-IIA y E1-IIB, rescatándose, sin embargo, el carácter pionero del presente estudio, que aporta información valiosa en relación a los orígenes químicos de la

utilización y efectividad etno-farmacológica de la planta *X. aromatica* en la cultura americana, determinándose en relación a ello la posible importancia de los diterpenos del tipo labdano como agentes anticancerígenos, dada su probada actividad citotóxica y citostática (apartado 5.2), además de constituirse como posibles agentes anti-inflamatorios de baja toxicidad celular, tal como es el caso del ácido (8)(17), 12-labdadieno-19-oico (compuesto E1-IIA) que inhibió la producción de ON, a concentraciones no tóxicas a nivel celular (apartado 5.3). Considerándose también, un resultado alentador la baja toxicidad aguda de la sub-fracción E1-II en los ensayos *in vivo*, ya que al resultar ésta la más tóxica en los ensayos *in vitro*, cabría esperar una toxicidad menor de los compuestos, especialmente del compuesto E1-IIA, que conforme a todos los análisis realizados y expuestos en esta investigación, constituye una molécula de elevado interés, que nos invita como científicos a continuar su estudio, ahondando a nivel celular y molecular sobre sus posibles dianas y puntos de acción.

6. CONCLUSIONES

- Se obtuvo el extracto etanólico de las hojas secas de *Xylopia aromatica* (*Xyar*), con un rendimiento del 15%. Siendo éste, un crudo bastante complejo.
- El fraccionamiento biodirigido del extracto *Xyar*, derivó en la obtención de las fracciones E1 (Terpenos, acetogeninas y clorofilas), E2 (Flavonoides y alcaloides) y E3 (Azúcares libres y taninos); las sub-fracciones E1-I (Acetogeninas), E1-II (Terpenos) y E1-III (Clorofilas) con un rendimiento respectivo de 30, 20, 40, 20, 65, 7.5%, y finalmente se aislaron los compuestos E1-IIA y E1-IIB con un rendimiento de 0.002 y 0.00025%.
- Se identificaron los compuestos aislados (E1-IIA y E1-IIB) como diterpenos, específicamente: ácido (8)(17),12-labdadieno-19-oico y ácido 15,16-dihidroxi-8(17),13(E)-labdadieno-19-oico.
- El extracto *Xyar* presentó un efecto citostático sobre las tres líneas tumorales evaluadas. Si bien la fracción E1 generó un efecto citotóxico sobre las líneas HT-29 y 4T1 (LC_{50}= 10 y 17 μg/mL), mientras la sub-fracción E1-II exhibió un efecto citotóxico sobre las líneas MDA-MB-231, HT-29 y 4T1 (LC_{50}= 24.0, 9.0 y 5.0 μg/mL).
- El aislamiento de los compuestos de la sub-fracción E1-II, implicó la disipación del efecto citotóxico de la misma, pues el compuesto E1-IIA, presentó únicamente un efecto citostático sobre las tres líneas tumorales evaluadas, al igual que el compuesto E1-IIB con excepción de la línea HT-29 sobre la que mostró un efecto citotóxico (LC_{50}= 30 μg/mL).
- La sensibilidad relativa de las células evaluadas a los constituyentes del extracto *Xyar* fue diferente, resultando mayor la de la línea de cáncer de colon humano HT-29, seguido por la línea de cáncer de mama murino 4T1, y por último la línea de cáncer de mama humano MDA-MB-231.
- El efecto inhibitorio de la sub-fracción E1-II y los compuestos E1-IIA y E1-IIB sobre la producción de ON en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, resultó dependiente del tiempo, pues tal efecto incrementa significativamente con el paso de éste, desde las 24 h hasta las 48 h.

- La sub-fracción E1-II evaluada en un periodo de tiempo de 24 y 48 horas, mostró un significativo efecto inhibitorio de la producción de ON en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS (IC_{50}= 21.1 y 9.6 μg/mL), dependiente de la toxicidad celular (IC_{50}= 19.8 y 9.5 μg/mL).

- El compuesto E1-IIA exhibió también un significativo efecto inhibitorio de la concentración de ON (IC_{50}= 28.6 y 13.3 μg/mL), pero independiente de la toxicidad celular (IC_{50}= 93.7 y 49.1 μg/mL). El compuesto E1-IIB por su parte mostró, que si bien presenta el menor efecto inhibitorio de la producción de ON (IC_{50}= 60.7 y 41.8 μg/mL), la concentración inhibitoria media de la viabilidad celular es muy próxima (IC_{50}= 64.9 y 43.12 μg/mL), luego no se descarta que dicho efecto sea independiente a procesos de citotoxicidad.

- El compuesto ácido (8)(17),12-labdadieno-19-oico (E1-IIA) constituye entonces una molécula de interés como posible agente anti-inflamatorio de baja toxicidad celular.

- La evaluación de la toxicidad aguda de la sub-fracción E1-II, no reveló efectos tóxicos, pues los animales no presentaron signos clínicos de toxicidad y tampoco implicó variaciones significativas del peso corporal durante el tiempo de experimentación.

- La sub-fracción E1-II se clasificó según su toxicidad en la categoría nº 5 (sustancias no clasificadas), en un intervalo de 2000-5000 mg/Kg, como una sustancia de precaución, según la guía 423 de la OCDE. Sin embargo, no se logró evaluar el efecto antitumoral de E1-II sobre el carcinoma mamario murino (4T1), debido a la imposibilidad de generar el tumor primario, a partir del protocolo empleado.

7. SUGERENCIAS

Se sugiere evaluar la toxicidad aguda y el efecto antitumoral *in vivo* de los compuestos aislados (E1-IIA y E1-IIB). Siendo necesario para ello, reconsiderar las condiciones de inoculación del tumor, descritras en el protocolo de este trabajo. Igualmente resulta propicio ahondar en el mecanismo de acción del compuesto E1-IIA, evaluando el efecto sobre posibles dianas moleculares, relacionadas con la inhibicón de la concentración de ON, tal como la enzima iNOS, el factor de trancripción NF-κB, entre otras.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, B., Hartwell, J., Letter, J., Spetzman, L., Schepartz, S. 1967. Screening data from the cancer chemotherapy national service center screening laboratories. XLI. plant extracts. *CANCER RES.* **27:** 365.536
- Abdel-lateff, A., El-Menshawi, B., Haggag, M., Nawwar, M. 2009. Cytotoxic acetogenins from *Annona glabra* cultivated in Egypt. *PHARMACOGN MAG.* **1:** 130-135
- Agarwal, S., Singh, V. 1999. Inmunomodulators: A Review of Studies on Indian Medicinal Plants and Synthetic Peptides. *PINSA*. **65:** 377-392.
- Agullo, G; Garnet-Payrastre, L; Femandez, Y; Anciauxa, N; Dernigné, C; Rémésy, C. 1996. Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells). *CANCER LETT*. **105:** 61-70
- Albornoz, A. 2001. Medicina tradicional herbaria. Instituto Farmacoterápico Latino S.A. Cuarta Edición. Venezuela. Caracas
- Alfonso, D., Colman-Saizarbitoria, T., Zhao, G.-X., Shi, G., Ye, Q., Schwedler, J. T., y McLaughlin, J. L. 1996. Aromin and aromicin, two new bioactive annonaceous acetogenins, possessing an unusual bis-THF ring structure, from *Xylopia aromatica* (Annonaceae). *Tetrahedron*. **52**(12), 4215–4224.
- Alves, T. M. de A., Silva, A. F., Brandão, M., Grandi, T. S. M., Smânia, E. de F. A., Smânia Júnior, A., y Zani, C. L. 2000. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **95:** 367–373.
- Aravindaram, K., Yang, N. 2010. Anti-Inflammatory Plant Natural Products for Cancer Therapy. *PLANTA MED.* **76:** 1103-1117.
- Arvelo, F., y Poupon, M. 2001. Aspectos moleculares y celulares de la metastasis cancerosa. Acta Científica Venezolana, **52:** 304-312
- Ávalos, A., Pérez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). SERIE FISIOLOGÍA VEGETAL*. **2:** 119-145.
- Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M., y colaboradores. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J FOOD ENG.* **117:** 426-436
- Balunas, M., Jones, w., Chin, Y., Mi, Q., Farnsworth, N., Soejarto, D., Cordell, G., Swanson, S., Pezzuto, J., Chai, H., Kinghorn, D. 2006. Relationships between Inhibitory Activity against a Cancer Cell Line Panel, Profiles of Plants Collected, and Compound Classes Isolated in an Anticancer Drug Discovery Project. *CHEM BIODIVERS.* **3:** 897-915.

- Balunas. M., Kinghorn, D. 2005. Drug discovery from medicinal plants. *LIFE SCI.* **78:** 431-441.
- Bamford, S., Dawson, E., Forbes, S., Clements, J., Pettett, R., Dogan, A., Flanagan, A., y colaboradores. 2004. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *BRIT J CANCER.* **91:** 355-358
- Bansal, T., Akhtar, N., Jaggi, M., Khar, R. K., y Talegaonkar, S. 2009. Novel formulation approaches for optimising delivery of anticancer drugs based on P-glycoprotein modulation. *DRUG DISCOV TODAY*. **14**(21-22): 1067-1074
- Barbosa-Filho, J., Piuvezam, M., Moura, M., Silva, M., Lima, K., da-Cunha, E., Fechine, I. M., y colaboradores. 2006. Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review. *REV BRAS FARMACOGN*. **16:** 109-139.
- Bermejo, J., Léon, F., Brouard, I., Hernández, J., Triana, J., López, M., Eiroa, J., Pérez, F. 2011. Identificación y síntesis de metabolitos secundarios aislados de plantas y hongos de Canarias, norte de África y Sudamérica. *BIOCÁNCER.* **5:** 197-214
- Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M., Velázquez, D. 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *INTERCIENCIA.* **30:** 453-459.
- Björkman, M.; Klingen, I.; Birch, A.; Bones, A.; Bruce T.; Johansen, T. J.; Meadow, R.; Mølmann, J.; Seljåsen, R.; Smart, L. E.; Stewart, D. 2011. Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health-Influences of climate, environment and agronomic practice. *Phytochemistry*, **72:** 538-556
- Botham, P. 2002. Acute Systemic Toxicity. *ILAR J.* **43:** 27-30
- Boyd, M., y Paull, K. 1995. Some Practical Considerations and Applications of the National Cancer Institute In Vitro Anticancer Drug Discovery Screen. *DRUG DEVELOPMENT RESEARCH.* **34:** 91-109
- Brack, W. 2003. Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures?. *ANAL BIOANAL CHEM.* **377:** 397-407
- Calixto, j., Campos, M., Otuki, M., Santos, A. 2004. Anti-Inflammatory Compounds of Plant Origin. Part II. Modulation of Pro-Inflammatory Cytokines, Chemokines and Adhesion Molecules. *PLANTA MED*. **70:** 93-103.
- Capote, L. 2013. Perfil epidemiológico y control del cáncer en Venezuela. *GAC MÉD CARACAS.* **121:** 43-52.
- Carini, J; Klamtbc, F; Linck, V. 2014. Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: promising biomolecules for anticancer therapy. *Royal Society Chemestry Advances.* **4:** 3131-3144.

- Carmichael J, De Graff, WG, Gazdar, AF, Minna, JD, Mitchell, JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**(4):936–942.
- Castello-Branco, M., Tavares, J., Silva, M., Barbosa-Filho, J., Anazetti, M., Frungillo, L., Haun, M., y colaboradores. 2011. Xylodiol from Xylopia langsdorfiana induces apoptosis in HL60 cells. *REV BRAS FARMACOGN*. **21:** 1035-1042.
- Caujolle, F., Caujolle, D., Cros, S., Calvet, M. Limits of toxic and teratogenic tolerance of dimethyl sulfoxide. *Centre de Recherches sur les Toxicités.* **141:** 110-125
- Chen, H., Wang, H., Yang, B., Jin, D., Yang, S., Wang, M., Xu, J. 2014. Diterpenes inhibiting NO production from *Euphorbia helioscopia*. *Fitoterapia*.
- Chen, Y; Chen, J; Wang, Y; Xu, S; Li, X. 2012. Six cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* seeds. *FOOD CHEM*. **135:** 960-966
- Chimnoi, N; Sarasuk, C; Khunnawutmanotham, N; Intachote, P; Seangsai, S; Saimanee, B; Pisutjaroenpong, S; Mahidol, C; Techasakul, S. 2009. Phytochemical reinvestigation of labdane-type diterpenes and their cytotoxicity from the rhizomes of *Hedychium coronarium*. *PHYTOCHEM LETT*. **2:** 184-187
- Colman-Saizarbitoria, T., Alfonso, D., McLaughlin, J.L. 1996. 2,4-cis- and trans-Venezinones: New Bioactive Ketolactone Annonaceous Acetogenins, Lacking Tetrahydrofuran Rings, from *Xylopia aromatica*. *PHYTOCHEM ANALYSIS.* **7:** 313-317
- Colman-Saizarbitoria, T., Gu, Z.-M., McLaughlin, J.L. 1994. Two new bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the bark of *Xylopia aromatica. J NAT PROD.* **57:** 1661-1669.
- Colman-Saizarbitoria, T., Gu, Z.-M., Zhao, G.-X., Zeng, L., Kozlowski, J.F., McLaughlin, J.L. 1995. Venezenin: a new bioactive annonaceous acetogenin from the bark of *Xylopia aromatica*. *J NAT PROD.* **58:** 532-539.
- Colman-Saizarbitoria, T., Zambrano, J., Ferrigni, N.R. 1994. bioactive annonaceous acetogenins from the bark of *Xylopia aromatica. J NAT PROD.* **57:** 486-493.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., y Maes, L. 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J ETHNOPHARMACOL*. **106**(3), 290-302.
- Costa, E., Cruz, P., Pinheiro, M., Marques, F., Ruiz, A., Marchetti, G., Carvalho, J., Barison, A., y colaboradores. 2013. Aporphine and Tetrahydroprotoberberine Alkaloids from the Leaves of Guatteria friesiana (Annonaceae) and their Cytotoxic Activities. *J BRAZ CHEM SOC*. **24:** 788-796

- Costa, E., Dutra, L., Salvador, M., Ribeiro, L., Gadelha, F., Carvalho, J. 2013. Chemical composition of the essential oils of Annona pickelii and Annona salzmannii (Annonaceae), and their antitumour and trypanocidal activities. *NAT PROD RES.* **27:** 997-1001
- Coussens, L., y Werb, Z. 2002. Inflammation and cáncer. *NATURE*. **420:** 860-867
- Cragg, G. M., y Newman, D. J. 2005. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *PURE APPL CHEM*. **100:** 72-79
- Dadarkar, S., Deore, M., Gatne, M. 2007. Comparative evaluation of acute toxicity of ivermectin by two methods after single subcutaneous administration in rats. *REGUL TOXICOL PHARM.* 47: 257–260
- Dal Piaz, F; Nigro, P; Braca, A; De Tommasi, N; Belisario, M. 2007. 13-Hydroxy-15-oxo-zoapatlin, an ent-kaurane diterpene, induces apoptosis in human leukemia cells, affecting thiol-mediated redox regulation. *FREE RADICAL BIO MED*. **43:** 1409-1422
- Danilenko, M., Studzinski, G. 2004. Enhancement by other compounds of the anti-cancer activity of vitamin D3 and its analogs. *EXP CELL RES.* **298:** 339– 358
- Dechsupa, S., Kothan, S., Vergote, J., Leger, G., Martineau, A., Berangeo, S., Kosanlavit, R., Moretti, J.L., Mankhetkorn, S., 2007. Quercetin, Siamois 1 and Siamois 2 induce apoptosis in human breast cancer MDA-mB-435 cells xenograft in vivo. *CANCER BIOL THER*. **6:** 56–61.
- Dhankhar, R., Dahiya, K., Singh, V., Sangwan, L., Kaushal, V. 2010. Nitric Oxide and Cancer. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* **4:** 2550-2559
- Dirsch, V. M.; Stuppner, H.; Vollmar, A. M. 1998. The griess assay: Suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts?. *Planta Med*. **64:** 423–426.
- Dusse, L., Vieira, L., Carvalho, M. 2003. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de patologia e medicina laboratorial.* **39:** 343-350.
- Edmondson, J. M., Armstrong, L. S., y Martinez, A. O. 1988. A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures. *Journal of tissue culture methods*. **11:** 15–17.
- Efferth, T., y Koch, E. 2011. Complex Interactions between Phytochemicals. The Multi-Target Therapeutic Concept of Phytotherapy. *CURR DRUG TARGETS.* **12:** 122-132
- Eid, S. Y., El-Readi, M. Z., y Wink, M. 2012. Carotenoids reverse multidrug resistance in cancer cells by interfering with ABC-transporters. *Phytomedicine*. **19**(11), 977-987.
- Elsharkawy, E., y Alshathly, M. (2013). Anticancer activity of lactuca steriolla growing under dry desert conditionof Northern Region in Saudi Arabia. *Journal of Natural Sciences Research*, **3**(2), 5–18

- Escobar, L., Alfonso, P., Aristizábal, F. 2009. Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. *REV. COLOMB. BIOTECNOL*. **11:** 49-56.
- Estrada, O., Alvarado-Castillo, C., Fernández, A., López, M., Romero-Vecchione, E., Vásquez, J., Méndez, J., Conde, D., Cardozo, A. 2009. Pomolic acid isolated from the leaves of Licania pittieri inhibits ADP- and epinephrine-induced platelet aggregation and has hypotensive effect on rats. *CURRENT BIOACTIVE COMPOUNDS*. **5:** 219-225.
- Fabre, M., García de Herreros, A. 1993. Phorbol ester-induced scattering of HT-29 human intestinal cancer cells is associated with down-modulation of E-cadherin. *J CELL SCI.* **106:** 513-522.
- Farrant J. 1964. Pharmacological actions and toxicity of dimethyl sulphoxide and other compounds which protect smooth muscle during freezing and thawing. *J Pharm Pharmacol.* **16:** 472–483.
- Fátima, A., Zambuzzi, I., Modolo, L., Tarsitano, C., Gadelha, F., Hyslop, S., Carvalho, J., y colaboradores. 2008. Cytotoxicity of goniothalamin enantiomers in renal cancer cells: Involvement of nitric oxide, apoptosis and autophagy. *CHEM-BIOL INTERACT.* **176:** 143-150
- Fatope, MO, Audu OT, Takeda Y, Zeng L, Shi G, Shimada H, McLaughlin JL. 1996. Bioactive ent-kaurene diterpenoids from Annona senegalensis. *J Nat Prod.* **59**(3): 301-303
- Federico, A., Morgillo, F., Tuccillo, C., Ciardiello, F., Loguercio, C. 2007. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogénesis. *INT J CANCER.* **121:** 2381-2386
- Ferraz, R; Cardoso, G; Silva, T; Fontes, J; Prata, A; Carvalho, A; Moraes, M; Pessoa, C; Costa, E; Bezerra, D. 2013. Antitumour properties of the leaf essential oil of *Xylopia frutescens* Aubl. (Annonaceae). *FOOD CHEM.* **141:** 196-200
- Finlay, G. J., Baguley, B. C. (2000). Effects of protein binding on the *in vitro* activity of antitumour acridine derivatives and related anticancer drugs. *Cancer Chemother. Pharmacol*. **45**, 417–422.
- Finlay, G.J., Wilson, W.R., Baguley, B.C. (1986). Comparison of *in vitro* activity of cytotoxic drugs towards human carcinoma and leukaemia cell lines. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol*., **22**: 655
- Fukumura, D., Kashiwagi, S., Jain, R. 2006. The role of nitric oxide in tumour progression. *NAT REV CANCER*. **6:** 521–534
- Gaceta (2000) Ley de Diversidad Biológica. Gaceta Oficial Nº 5468E (Extraordinaria). República Bolivariana de Venezuela. Caracas, Venezuela. 41 pp.

- Galbis, J. 2004. Panorama actual de la química farmacéutica. Universidad de Sevilla. secretariado de publicaciones. Segunda edición. Madrid. España.
- Garavito, G., Rincón, J., Arteaga, L., Hata, Y., Bourdy, G., Gimenez, A., Pinzón, R., y colaboradores. 2006. Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **107:** 460-462
- Gasparini, G., Longo, R., Fanelli, M., Teicher, B. 2005. Combination of Antiangiogenic TherapyWith Other Anticancer Therapies: Results, Challenges, and Open Questions. *JPN J CLIN ONCOL*. **23:** 1295-1311
- Gautam, R., y Jachak, S. 2009. Recent Developments in Anti-Inflammatory Natural Products. *MED RES REV*. **29:** 767-820
- Gertsch, J. 2011. Botanical Drugs, Synergy, and Network Pharmacology: Forth and Back to Intelligent Mixtures. *PLANTA MED*. **77:** 1086-1098
- Ghasemzadeh, A., y Jaafar, H. 2011. Antioxidant potential and anticancer activity of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) grown under different CO_2 concentration. *J MED PLANTS RES.***14:** 3247-3255
- Goméz, H., González, K., Medina, J. 2011. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* **10:** 182-217.
- González, A., Castro, M. 2008. Papel ecológico de los metabolitos secundarios. *Lacandonia*. **2:** 123-130.
- Gordaliza, M. 2010. Cytotoxic Terpene Quinones from Marine Sponges. *MAR DRUGS*. **8:** 2849-2870
- Gould, M. 1997. Cancer Chemoprevention and Therapy by Monoterpenes. *ENVIRON HEALTH PERSP*. **105:** 977-979
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L, Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**: 131–138.
- Greene, E., Huang, S., Serhan, C., Panigrahy, D. 2011. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *PROSTAG OTH LIPID M*. **96:** 27-36
- Grisham, M., Heuil., D., Wink, D. 2000. Review article: chronic inflammation and reactive oxygen and nitrogen metabolism – implications in DNA damage and mutagenesis. *ALIMENT PHARMACOL THER*. **14:** 3-9
- Guo, B. H., Kai, G. Y., Jin, H. B., y Tang, K. X. (2006). Taxol synthesis. *African Journal of Biotechnology*. **5:** 015-020

- Guo, Q., Wang, L., Ruan, K., Kulmacz, R. 1996. Role of Val^{509} in Time-dependent Inhibition of Human Prostaglandin H Synthase-2 Cyclooxygenase Activity by Isoform-selective Agents. *J BIOL CHEM*. **271:** 19134–19139
- Gutiérrez, A., Estévez, A. 2009. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat*. **103:** 409-419.
- Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., Moilanen, E. 2007. Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF-Kb Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF-κB Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression and NO Production in Activated Macrophages. *MEDIAT INFLAMM.* 1-10
- Hasan, C; Healey, T; Waterman, P. 1985. Acutifloric acid: A diterpene dimer from the stem bark of *Xylopia acutiflora*. *PHYTOCHEMISTRY*. **24:** 192-194.
- Hegazy, M; Ohta, S; Abdel-latif, F; Albadry, H; Ohta, E; Paré, P; Hirata, T. 2008. Cyclooxygenase (COX)-1 and -2 Inhibitory Labdane Diterpenes from *Crassocephalum mannii*. *J NAT PROD.* **71:** 1070-1073
- Hemalswarya, S., y Doble, M. 2006. Potential Synergism of Natural Products in the Treatment of Cancer. *PHYTOTHER RES*. **4:** 239-249.
- Hengge, U., Benninghoff, B., Ruzicka, T., Goos, M. 2001. Topical immunomodulators-progress towards treating inflammation, infection, and cáncer. *THE LANCET*. **1:** 189-198.
- Herrin, V., y Thigpen, J. 1999. Chemotherapy for Ovarian Cancer: Current Concepts. *SEMIN SURG ONCOL*. **17:** 181-188
- Holzhutter, H., Genschow, E., Diener, E., Schlede, E. 2003. Dermal and inhalation acute toxic class methods: test procedures and biometric evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *ARCH TOXICOL*. **77:** 243–254
- Hong, C., Hur, S., Oh, O., Kim, S., Nam, K., Lee, S. 2002. Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells. *J ETHNOPHARMACOL*. **83:** 153-159
- Hong, J. 2011. Role of natural product diversity in chemical biology. *CURR OPIN CHEM BIOL*. **15:** 350-354.
- Houghton, P., Fang, R., Techatanawat, I., Steventon, G., Hylands, P. J., y Lee, C. C. 2007. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*. **42**(4), 377-387
- Hui, YH, Chang CJ, Smith DL, McLaughlin JL. 1990. 16 alpha-hydroxy-(-)-kauranoic acid: a selectively cytotoxic diterpene from *Annona bullata*. *Pharm Res.* **7**(4): 376-378.

- Ignarro, L. J., Fukuto, J. M., Griscavage, J. M., Rogers, N. E., Byrns, R. E. 1993. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not to nitrate: Comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **90:** 8103–8107.
- Infante, J., Sifontes, S., Murioz, E., Gonzalez, M., Perez, V., Baldor, C., Faririas, M. 2001. Prueba toxicologica en ratones de una sola dosis inicial y segura de la vacuna cubana antileptospirosica Vax-SPIRAL. *Biotecnología Aplicada.* **8:** 20-23
- Itoigawa, M; Kashiwada; Y; Ito, C; Furukawa, H; Tachibana, Y; Bastow, K; Lee, K. 2000. Antitumor Agents. 203. Carbazole Alkaloid Murrayaquinone A and Related Synthetic Carbazolequinones as Cytotoxic Agents. *J NAT PROD*. **63:** 893-897
- Jansen, O; Akhmedjanova, V; Angenot, L; Balansard, G; Chariot, A; Ollivier, E; Titsa, M; Frédérich, M. 2006. Screening of 14 alkaloids isolated from *Haplophyllum* A. Juss. for their cytotoxic properties. *J ETHNOPHARMACOL*. **105:** 241-245.
- Jiménez, E. 2006. Estudio de las actividades antitumorales de un extracto de Caléndula: Propiedades inmunomoduladoras y citotóxicas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada. España.
- Joy, B y Remani, P. 2008. Antitumor constituents from *Annona squamosa* fruit pericarp. *MED CHEM RES*. **17:** 345-355
- Karioti, A; Skopeliti, M; Tsitsilonis, O; Heilmann, J; Skaltsa, H. 2007. Cytotoxicity and immunomodulating characteristics of labdane diterpenes from *Marrubium cylleneum* and *Marrubium velutinum*. *PHYTOCHEMISTRY*. **68:** 1587-1594
- Kaufmann, S., y Earnshaw, W. 2000. Induction of Apoptosis by Cancer Chemotherapy. *EXP CELL RES.* **256:** 42-49
- Keeper, Y; Piazo, P; Peters, G, van Ark-Otte, J; Winograd, B; Pinedo, H. 1991. Comparison of the Sulforhodamine B Protein and Tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *EUR J CANCER*. **27:** 897-900
- Kennedy, D., y Wightman, E. 2011. Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function. *American Society for Nutrition.* **2:** 32-50
- Khosla, C., Keasling, J. D. 2003. Metabolic engineering for drug discovery and development. *Nature Rev. Drug Discov.* **2:** 1019–1025
- Kim, S. C., Kim, D. W., Shim, Y. H., Bang, J. S., Oh, H. S., Kim, S. W., y Seo, M. H. (2001). In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. *Journal of Controlled Release*, **72**(1), 191–202
- Kim, T., Li, H., Wu, Q., Lee, H., Ryu, J. 2013. A new labdane diterpenoid with anti-inflammatory activity from *Thuja orientalis. J ETHNOPHARMACOL*. **146:** 760-767

- Kinghorn, A., Carcache de Blanco, E., Chai, H., Orjala, J., Farnsworth, N., Soejarto, D., Oberlies, N., y colaboradores. 2010. Discovery of anticancer agents of diverse natural origin. *Pure Appl Chem.* **6:** 1051-1063
- Klaunig, J., Kamendulis, L., Hocevar, B. 2010. Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *TOXICOL PATHOL.* **38:** 96-109
- Koehn, F, y Carter, G. 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *NAT REV DRUG DISCOV.* **5:** 206-220
- Koehn, F. 2008. High impact technologies for natural products screening. *PROGRESS IN DRUG RESEARCH.* **65:** 177-210
- Kratz, A., Campos-Neto, A., Hanson, M., Ruddle, N. 1996. *J EXP MED.* **183:** 1461-1472
- Kuate, D., Etoundi, B., Soukantaua, Y., Ngondi, G., Oben, J., 2011. Comparative study of the antioxidant, free radical scavenging activity and human LDL oxidation inhibition of three extracts from seeds of a Cameroonian spice, *Xylopia parviflora* (A. Rich.) Benth (Annonaceae). *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. **5**(1): 18-32
- Kukula-Koch, W., Aligiannis, N., Halabalaki, M., Skaltsounis, A.-L., Glowniak, K., y Kalpoutzakis, E. (2013). Influence of extraction procedures on phenolic content and antioxidant activity of Cretan barberry herb. *Food Chemistry*, **138**(1), 406-413
- Kuntz, S; Wenzel, U; Daniel, H. 1999. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *EUR J NUTR.* **38:** 133-142.
- Lago, J. H. G., Ávila, P. de, Moreno, P. R. H., Limberger, R. P., Apel, M. A., y Henriques, A. T. 2003. Analysis, comparison and variation on the chemical composition from the leaf volatile oil of *Xylopia aromatica* (Annonaceae). *BIOCHEM SYST ECOL.* **31:** 669-672
- Lahlou, S., Israili, Z., Lyoussi, B. 2008. Acute and chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Tanacetum vulgare* leaves in rodents. *J ETHNOPHARMACOL.* **117:** 221–227
- Lapornik, B., Prosek, M., Golc Wandra, A. 2005. Comparison of extracs prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J FOOD ENG.* **71:** 214-222
- Lee, F., Borzilleri, R., Fairchild, C., Kim, S., Long, B., Reventos-Suarez, C., Vite, G., y colaboradores. 2001. BMS-247550: A Novel Epothilone Analog with a Mode of Action Similar to Paclitaxel but Possessing Superior Antitumor Efficacy. *CLIN CANCER RES.* **7:** 1429–1437
- Lesuffleur, T., Barbat, A., Luccioni, C., Beaumatin, J., Clair, M., Kornowski, A., Dussaulx, E., y colaboradores. 1991. Dihydrofolate Reductase Gene Amplification-associated Shift of Differentiation in Methotrexate-adapted HT29 Cells. *J CELL BIOL.* **115:** 1409-1418.

- Li, L., Vederas, J. 2009. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?. *SCIENCE*. **325:** 161-165
- Ling, L; Radhakrishnan, A; Subramaniam, T; Cheng, H; Palanisamy, U. 2010. Assessment of Antioxidant Capacity and Cytotoxicity of Selected Malaysian Plants. *MOLECULES.* **15:** 2139-2151
- Liu, Z., Carpenter, S. B., Bourgeois, W. J., Yu, Y., Constantin, R. J., Falcon, M. J., y Adams, J. C. (1998). Variations in the secondary metabolite camptothecin in relation to tissue age and season in Camptotheca acuminata. *Tree Physiology*, **18**(4), 265–270
- Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell. 2006. Biología Celular y Molecular. Médica Panamericana. Quinta Edición. Madrid. España.
- Lu, H., Ouyang, W., Huang, C. 2006. Inflammation, a Key Event in Cancer Development. *Mol Cancer Res.* **4:** 221-233.
- Lu, Y., Mahato, R. 2009. Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics. Springer. Primera Edición. New York. Estados Unidos.
- Macarthur, M., Hold, G., El-Omar, E. 2004. Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *Gastrointest Liver Physiol.* **286:** 515-520
- Marcano, D., Hasegawa, M. 2002. Fitoquímica Orgánica. U.C.V.: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Segunda Edición. Caracas. Venezuela.
- Márquez, C., Grases, D., Guzmán, W., Hevia, E., Ibáñez, G., Bracho, C., Taylor, P. 2011. Síntesis y evaluación biológica de agentes antitubulínicos relacionados con colchicina y combretastatina. *Revista Facultad de Farmacia.* **74:** 9-16.
- Martínez-Vázquez, De la Cueva Lozano, D; Estrada-Reyes, R; González-Lugo, D; Ramírez, T; Heinze, G. 2005. Bio-guided isolation of the cytotoxic corytenchine and isocoreximine from roots of *Annona cherimolia*. *FITOTERAPIA*. **76:** 733-736
- Martins, D; Hamerski, L; Alvarenga, S; Roque, N. 1999. Labdane dimers from *Xylopia aromatica*. *PHYTOCHEMISTRY.* **51:** 813-817
- Martins, D; Osshiro, E; Roque, N; Marks, V; Gottlieb, H. 1998. A sesquiterpene dimer from *Xylopia aromatica*. *PHYTOCHEMISTRY.* **48:** 677-680
- Mathews, C., Van Holde, K., Ahern, K. 2002. Bioquímica. Pearson Educación, S.A. Tercera Edición. Madrid. España.
- Matilainen, H., Yu, X.-W., Tang, C.-W., Berridge, M. V., y McConnell, M. J. 2012. Sphere formation reverses the metastatic and cancer stem cell phenotype of the murine mammary

tumour 4T1, independently of the putative cancer stem cell marker Sca-1. *CANCER LETT*. **323**(1): 20-28

- Mertins, S., Myers, T., Hollingshead, M., y colaboradores. 2001. Screening for and Identification of Novel Agents Directed at Renal Cell Carcinoma. **7:** 620-633
- Mesquita, M; Paulab, J; Pessoac, C; Moraes, M; Costa-Lotufoc, L; Grougnet, R; Michel, S; Tillequin, F; Espindola, L. 2009. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *J ETHNOPHARMACOL*. **123:** 439-445.
- Miranda, K., Espey, M., Wink, D. 2001. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *NITRIC OXIDE-BIOL CH*. **5:** 62-71.
- Moraes, M y Roque, N. 1988. Diterpenes from the fruits of *Xylopia aromatica*. *PHYTOCHEMISTRY.* **27:** 3205-3208
- Moreira, I. C., Roque, N. F., Contini, K., y Lago, J. H. G. 2007. Sesquiterpenes and hydrocarbons from *Xylopia emarginata* (Annonaceae) fruits. *REV BRAS FARMACOGN*, **17**(1), 55–58.
- Moreira, I., Lago, H., Roque, N. 2005. Sesquiterpenes, diterpenes, steroids and alkaloid from branches of *Xylopia brasiliensis* Spreng (Annonaceae). *BIOCHEM SYST ECOL.* **33:** 948-951
- Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of lmmunological Methods.* **65:** 55-63.
- Mukherjee, A., Basu, S., Sarkar, N., Ghosh, A. 2001. Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products. *CURR MED CHEM*. **8:** 1467-1486
- Muntané, J., y Mata, M. 2010. Nitric oxide and cáncer. *WORLD J HEPATOL*. **9:** 337-344
- Murillo, E., Lombo, O., Tique, M., Méndez, J. 2007. Potencial Antioxidante de Bauhinia *Kalbreyeri* Harms (FABACEAE). *Información Tecnológica.* **18:** 65-74
- Ncube, N., Afolayan, A., Okoh, A. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*. **7**(12):1797-1806.
- Newman, D., Cragg, G. 2007. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.* **70**: 461-477.
- Oberlies, N. H., y Kroll, D. J. (2004). Camptothecin and Taxol: Historic Achievements in Natural Products Research. *Journal of Natural Products*, **67**(2), 129-135.
- Odukoya, O., Ilori, O., Sofidiya, M., Aniunoh, O., Lawal, B., Tade, I. 2005. Antioxidant activity of Nigerian dietary spices. *Electr. J. Environ. Agric Food Chem*. **4:** 1086-1093.

- Oh, M., Trick, H., Rajashekar, C. 2009. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *Journal of Plant Physiology*. **166:** 180-191
- Oliveira, V., Yamada, L., Fagg, C., Brandão, M. 2012. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. *Food Research International.* **48:** 170–179
- Ortega, B., Aldana, E., Pompa, J., Aldana, E. 2007. Determinación de la actividad de macrófagos peritoneales mediante la producción de óxido nítrico en ratones expuestos crónicamente al plaguicida metamidofos. *Bol Med UAS*. **2:** 7-11.
- Ortholand, J., Ganesan, A. 2004. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *CURR OPIN CHEM BIOL*. **8:** 271–280
- Osorio, E., Arango, G. J., Jiménez, N., Alzate, F., Ruiz, G., Gutiérrez, D., Paco, M. A., y colaboradores. 2007. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. *Journal of Ethnopharmacology*. **111:** 630-635
- Ouellet, M., y Percival, M. D. 1995. Effect of inhibitor time-dependency on selectivity towards cyclooxygenase isoforms. *Biochem. J.* **306:** 247–251.
- Oyemitan, I., Iwalewa, E., Akanmu, M., y Olugbade, T. 2008. Antinociceptive and antiinflammatory effects of essential oil of Dennettia tripetala G. Baker (Annonaceae) in rodents. *Afr J Trad CAM*. ***5*:** 355-362.
- Palo, R. T. (1984). Distribution of birch (*Betula* spp.), willow (*Salix* spp.), and poplar (*Populus* spp.) secondary metabolites and their potential role as chemical defense against herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, **10**(3), 499–520
- Pauli, G., Case, R., Inui, T., Wang, Y., Cho, S., Fischer, N., Franzblau, S. 2005. New perspectives on natural products in TB drug research. *LIFE SCI.* **78:** 485-494
- Pavarini, D. P., Pavarini, S. P., Niehues, M., y Lopes, N. P. (2012). Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology*, **176**(1-4), 5-16.
- Pawar, R; Das, T; Mishra, S; Nutan; Pancholi, B; Gupta, S; Bhat, S. 2014. Synthesis, anti-HIV activity, integrase enzyme inhibition and molecular modeling of catechol, hydroquinone and quinol labdane analogs. *BIOORG MED CHEM LETT*. **24:** 302-307
- Pereira de Oliveira, A; Fialho, F; Sobral, M; Tavares, J; Amaral, R; Machado, D; Santos, J; Medeiros, I. 2006. Calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by the 8 (17), 12E, 14-labdatrien-18-oic acid (labdane-302). *VASC PHARMACOL*. **44:** 338-344
- Pérez, M., Jimenez, E., Boffill, M., González, D., Verdecía, B., Blanco, F. 2008. Evaluación de la Toxicidad Aguda de un Extracto de *Boldoa purpurascens* Cav. por el Método de las Clases. *LAT AM J PHARM.* **27:** 250-254

- Pérez-Alonso, N., Jiménez, E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal.* **11:** 195-211.
- Phillipson, D., Milgram, K., Yanovsky, A., Rusnak, L., Haggerty, D., Farrell, W., Greig, J., y colaboradores. 2002. High-Throughput Bioassay-Guided Fractionation: A Technique for Rapidly Assigning Observed Activity to Individual Components of Combinatorial Libraries, Screened in HTS Bioassays. *J COMB CHEM*. **4:** 591-599
- Pieters, L., y Vlietinck, A. 2005. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds?. *J Ethnopharmacol*. **100** (1-2):57-60.
- Polyak, K., y Hahn, W. 2006. Roots and stems: stem cells in cáncer. *NAT MED*. **11:** 296-300
- Pulaski, B., Ostrand-Rosenberg, S. 2000. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Current Protocols in Immunology*.
- Purves, W., Sadava, D., Orians, G., Heller, H. 2003. Vida La Ciencia de la Biología. Médica Panamericana, S.A. Sexta Edición. Madrid. España.
- Ragasa, C; Soriano, G; Torres, O; Don, M; Shen, C. 2012. Acetogenins from *Annona muricata*. *PHCOG J*. **4:** 32-37.
- Reddy, P; Rao, R; Shashidhar, J; Sastry, B; Rao, M; Babu, S. 2009. Phytochemical investigation of labdane diterpenes from the rhizomes of *Hedychium spicatum* and their cytotoxic activity. *BIOORG MED CHEM LETT*. **19:** 6078-6081
- Ren, W; Qiao, Z; Wang, H; Zhu, L; Zhang, L. 2003. Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *MED RES REV*. **23:** 519-534
- Reynolds, C., Maurer, B. 2005. Evaluating Response to Antineoplastic Drug Combinations in Tissue Culture Models. *Methods in Molecular Medicine.* **110:** 173-183
- Rispin, A., Farrar, D., Margosches, E., Gupta, K., Stitzel, K., Carr, G., Greene, M., y colaboradores. 2002. Alternative Methods for the Median Lethal Dose (LD_{50}) Test: The Up-and-Down Procedure for Acute Oral Toxicity. *ILAR J.* **43:** 233-243
- Rixe, O., y Fojo, T. 2007. Is Cell Death a Critical End Point for Anticancer Therapies or Is Cytostasis Sufficient?. *CLIN CANCER RES.* **13:** 7280-7287
- Robert, J., Jarry, C. 2003. Multidrug Resistance Reversal Agents. *Journal of Medicinal Chemistry.* **46:** 4805-4817.
- Roengsumran, S; Petsom, A; Kuptiyanuwat, N; Vilaivan, T; Ngamrojnavanich, N; Chaichantipyuth, C; Phuthong, S. 2001. Cytotoxic labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. *PHYTOCHEMISTRY*. **56:** 103-107

- Rowinsky, E. K., y Donehower, R. C. (1995). Paclitaxel (taxol). *New England Journal of Medicine*, **332**(15), 1004–1014.
- Rubinstein, L. V., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Simon, R. M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D. A., et al. (1990). Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, **82**(13): 1113–1117.
- Saha, M., Jahangir, R., Vhuiyan, M., Biva, I. 2008. In vitro nitric oxide scavenging activity of ethanol leaf extracts of four Bangladeshi medicinal plants. *S J PHARM SCI*. **1:** 57-62.
- Schlede, E., Genschow, E., Spielmann, H., Stropp, G., Kayser, D. 2005. Oral acute toxic class method: A successful alternative to the oral LD_{50} test. *REGUL TOXICOL PHARM.* **42:** 15–23
- Schlede, E., Mischke, U., Diener, W., Kayser, D. 1995. The international validation study of the acute toxic class method (oral). *ARCH TOXICOL.* **69:** 659-670
- Schlede, E., Mischke, U., Roll, R., Kayser, D. 1992. A national validation study of the acute-toxic-class method-an alternative to the LD_{50} test. *ARCH TOXICOL*. **66:** 455-470
- Schlie-Guzmán, M., González-Esquinca, A., Luna-Cazáres, L. 2009. Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *BOL LATINOAM CARIBE*. **8:** 246-257
- Schmidt, B., Ribnicky, D., Lipsky, P., Raskin, I. 2007. Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics. *NAT CHEM BIOL*. **3:** 360-366
- Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H., Rocha-Sosa, M. 2004. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. **21:** 355-363.
- Shi, J.-F., Wu, P., Jiang, Z.-H., y Wei, X.-Y. 2014. Synthesis and tumor cell growth inhibitory activity of biotinylated annonaceous acetogenins. *EUR J MED CHEM*. **71:** 219-228
- Shoemaker, R. 2006. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *NAT REV CANCER.* **6:** 813-823
- Shukla, P., Sharma, P., Garg, V., Singh, A., Mondal, S. 2012. Chronic Inflammation and Cancer. *European Journal of Clinical & Medical Oncology*. **000:** 1-6
- Sielinou, V; Vardamides, J; Nkengfack, A; Laatsch, H. 2012. Phenolic derivatives and an antifungal and cytototoxic labdane diterpenoid from the root bark of *Turraeanthus mannii*. *PHYTOCHEM LETT*. **5:** 409-413
- Simmons, T. L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P., y Gerwick, W. H. (2005). Marine natural products as anticancer drugs. *MOL CANCER THER*, **4**(2), 333–342.

- Singh, M; Pal, M; Sharma, R. 1998. Biological activity of the labdane diterpenes. *PLANTA MED*. **65:** 2-8
- Singh, S; Kumar, K; Saikia, D; Shanker, K; Thakur, J; Negi, A; Banerjee, S. 2010. A bioactive labdane diterpenoid from *Curcuma amada* and its semisynthetic analogues as antitubercular agents. *EUR J MED CHEM*. **45:** 4379-4382
- Skehan, P, Storeng, R, Scudiero, D, Monks, A, McMahon, J, Vistica, D, Warren, JT, Bokesch, H, Kenney, S, Boyd, MR. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*. **82:** 1107-1112.
- Souza-Fagundesa, E; Gazzinelli, G; Gambogi, G; Martins-Filho, O; Amarante-Mendesf, G; Corrêa-Oliveirab, R; Zani, V. 2003. In vitro activity of labdane diterpene from *Alomia myriadenia* (Asteraceae): immunosuppression via induction of apoptosis in monocytes. *INT IMMUNOPHARMACOL*. **3:** 383-392
- Spitaler, R., Schlorhaufer, P., Ellmerer, E., Merfort, I., Bortenschlager, S., Stuppner, H., Zidorn, C. 2006. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO. *Phytochemistry*. **67:** 409–417
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., y Martínez, J. R. (2004). Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. *J CHROMATOGR A*, **1025**(1), 105-113
- Suffredini, I., Paciencia, M., Varella, A., Younes, R. 2007. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. *Fitoterapia*. **78:** 223–226
- Sun, J., Zhang, X., Broderick, M., y Fein, H. 2003. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *SENSORS*. **3**: 276-284
- Suresh, G; Reddy, P; Suresh, K; Basha, T; Kalivendi, S. 2010. Two new cytotoxic labdane diterpenes from the rhizomes of *Hedychium coronarium*. *BIOORG MED CHEM LETT*. **20:** 7544-7548
- Taiz, L., Zeiger, E. 2006. Fisiología Vegetal. Universitat Jaume I. Tercera Edición. Castellón de la Plana. España.
- Takahashi, J; Boaventura, M; De Carvalho, J; Oliveira, A. 1995. Frutoic acid, a dimeric kaurane diterpene from *Xylopia frutescens*. *PHYTOCHEMISTRY*. **40:** 607-609
- Taylor, P., Arsenak, M., Abad, M. J., Fernández, Á., Milano, B., Gonto, R., Ruiz, M.-C., y colaboradores. 2013. Screening of Venezuelan Medicinal Plant Extracts for Cytostatic and Cytotoxic Activity Against Tumor Cell Lines: cytotoxic activity of venezuelan plants. *PHYTOTHER RES*. **27**(4), 530-539

- Taylor, P., Cesari, I., Arsenak, M., Ballen, D., Abad, M., Fernandez, A., Milano, B. 2006. Evaluation of Venezuelan Medicinal Plant Extracts for Antitumor and Antiprotease Activities. *PHARM BIOL*. **44:** 349–362
- Taylor, P., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H., Brown, G., Gordon, S. 2005. Macrophage receptors and immune recognition. *ANNU REV IMMUNOL.* **23:** 901-944
- Tiuman, T., Santos, A., Ueda-Nakamura, T., Filho, B., Nakamura, C. 2011. Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases.* **15:** 525–532
- Twentyman, P., Luscombe, M. 1987. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *BR J CANCER*. **56:** 279-285
- Valgas, C., Machado de Souza, S., Smânia, E., Smânia, A. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *BRAZ J MICROBIOL*. **38**: 369-380.
- Vichai, V., Kirtikara, k. 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* **1:** 1112-1116.
- Vijayan, P; Vijayaraj, P; Setty, P; Hariharpura, R; Godavarthi, A; Badami, S; Arumugam, D: Bhojraj, S. 2004. The Cytotoxic Activity of the Total Alkaloids Isolated from Different Parts of S*olanum pseudocapsicum. BIOL PHARM BULL*. **27:** 528-530
- Vilela, A., González-Paleo, L., Ravetta, D. 2011. Metabolismo secundario de plantas leñosas de zonas áridas: mecanismos de producción, funciones y posibilidades de aprovechamiento. *Ecología Austral.* **21:**317-327.
- Villasmil, J., Abad, M., Arsenak, M., Fernández, A., Ruiz, Williams, B., Michelangeli, F., y colaboradores. 2006. Cytotoxic and antitumor activities of venezuelan plant extracts *in vitro* and *in vivo*. *Pharmacologyonline*. **3:** 808-816
- Visser, K., Korets, L., Coussens, L. 2005. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *CANCER CELL*. **7:** 411-423
- Vrignaud, P., Sémiond, D., Lejeune, P., Bouchard, H., Calvet, L., Combeau, C., Riou, J. y colaboradores. 2013. Preclinical Antitumor Activity of Cabazitaxel, a Semisynthetic Taxane Active in Taxane-Resistant Tumors. *Clin Cancer Res.* **19:** 2973-2983.
- Wagner, H. 2006. Multitarget therapy - The future of treatment for more than just functional dispepsia. *Phytomedicine*. **13:** 122-129
- Wagner, H., y Ulrich-Merzenich, G. 2009. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *PHYTOMEDICINE*. **16:** 97-110

- Wang, X.-N., Han, X., Xu, L.-N., Yin, L.-H., Xu, Y.-W., Qi, Y., y Peng, J.-Y. (2008). Enhancement of apoptosis of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells through synergy of berberine and evodiamine. *Phytomedicine*, **15**(12), 1062-1068
- Weller, M. 2012. A Unifying Review of Bioassay-Guided Fractionation, Effect-Directed Analysis and Related Techniques. *SENSORS.* **12:** 9181-9209
- Whitehead, A., Curnow, R. 1992. Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *FD CHEM TOXIC.* **30:** 313-324
- Wildman, H. G. 2003. The fall and rise of natural products screening for drug discovery. *FUNGAL DIVERS*. **13:** 221–231.
- Williamson, E. 2001. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine.* **8:** 401–409
- Wink, M. 2010. Annual Plant Reviews, Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. Blackwell Publishing Ltd. Segunda Edición. Estados Unidos.
- Wu, S., Yang, L., Gao, Y., Liu, X., y Liu, F. 2008. Multi-channel counter-current chromatography for high-throughput fractionation of natural products for drug discovery. *J. Chromatogr. A*. **1180:** 99–107
- Wu, Y; Gwo, C; Changih, D; Shang, W. 1993. Cytotoxic alkaloids of *Annona montana*. *PHYTOCHEMISTRY.* **33:** 497-500
- Xu, W., Liu, L., Loizidou, M., Ahmed, M., Charle, I. 2002. The role of nitric oxide in cáncer. *CELL RESEARCH.* **12:** 311-320
- Yazaki, K. (2006). ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Letters*, **580:** 1183-1191
- Ying, L., y Hofseth, L. 2007. An Emerging Role for Endothelial Nitric Oxide Synthase in Chronic Inflammation and Cancer. *CANCER RES.* **67:** 1407-1410
- Zafra-Polo, M. C., González, M. C., Estornell, E., Sahpaz, S., y Cortes, D. 1996. Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. *Phytochemistry*. **42:** 253–271.
- Zafra-Polo, M., Figadere B., Gallardo T., Tormo J. R., Cortes, D. 1998. Natural acetogenins from annonaceae, synthesis and mechanisms of action. *Phytochemistry*. **48:** 1087-1117.
- Zayed, J., y Philippe, S. 2009. Acute Oral and Inhalation Toxicities in Rats With Cadmium Telluride. *INT J TOXICOL*. **28**(4): 259-265
- Zhang, L., Dong, L., Huang, J., Liu, M., Li, G., Zhang, C., Zhang, K., y colaboradores. 2013. 3, 4-seco-Labdane diterpenoids from the leaves of *Callicarpa nudiflora* and their inhibitory effects on nitric oxide production. *FITOTERAPIA*. **89:** 218-223

- Zhang, M., Aguilera, D., Das, C., Vasquez, H., Zage, P., Gopalakrishnan, V., Wolff, J. 2007. Measuring Cytotoxicity: A New Perspective on LC_{50}. *ANTICANCER RES.* **27:** 35-38
- Zhang, S., Won, Y.-K., Ong, C.-N., y Shen, H.-M. 2005. Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*. **5:** 239-249
- Zheng, C., Huang, B., Wang, Y., Ye, Q., Han, T., Zhang, Q., Zhang, H. 2010. Anti-inflammatory diterpenes from the seeds of *Vitex negundo*. *BIOORGAN MED CHEM.* **18:** 175-181
- Zhoua, C; Sun, L; Feng, F; Mo, J; Zhu, H; Yang, B; He, Q; Gan, L. 2013. Cytotoxic Diterpenoids from the Stem Bark of *Annona squamosa* L. *HELV CHIM ACTA*. **96:** 656-662

Páginas Web

- ATCC. http://www.atcc.org/. [Consulta: 03 de enero de 2013].
- OECD. http://es.scribd.com/doc/37006995/Guia-Oecd-Toxicidad-Aguda. [Consulta: 03 de enero de 2013].
- OMS. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/. [Consulta: 19 de mayo de 2013].