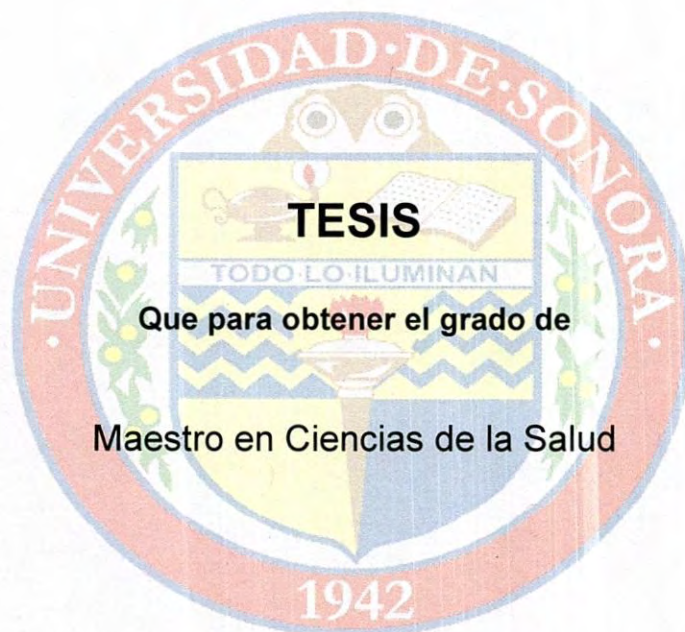


UNIVERSIDAD DE SONORA

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

Identificación de los Compuestos Responsables de la Actividad
Antiproliferativa de la planta *Argemone pleiacantha*



Presenta

Lilian Arely Carrasco Cota

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

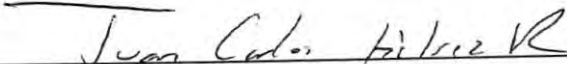


Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Esta tesis se realizó en los laboratorios de Investigación en Química y de Productos Naturales del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora, bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz y en una estancia en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Productos Naturales, con el Dr. Manuel Jiménez Estrada y con financiamiento del proyecto 83462 apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

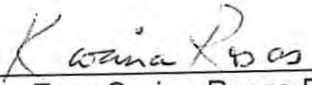
FORMA DE APROBACIÓN

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


Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz
Director Académico


Dr. Ramón Enrique Rojas Zepeda
Secretario


Dr. Fernando Rocha Alonzo
Vocal


Dra. Ema Carina Rosas Burgos
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Por su apoyo económico para la realización de mis estudios de maestría.

A la Universidad de Sonora

Por ser mi segundo hogar por tantos años y por otorgarme las herramientas para poder culminar con mi trabajo de tesis de maestría.

A mi director de tesis

Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz.

Gracias por haberme apoyado todo este tiempo, por su gran paciencia y darme nuevamente la oportunidad de seguir trabajando a su lado.

A mis sinodales

Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda,

Dr. Fernando Rocha Alonzo y

Dra. Ema Carina Rosas Burgos.

Gracias por su asesoría, tiempo brindado y apoyo en la revisión de esta tesis.

Dr. Manuel Jiménez Estrada (UNAM)

Por haberme aceptado en su laboratorio y apoyarme en la realización de esta tesis, permitiéndome gran conocimiento y experiencia en el área de aislamiento de compuestos.

Ingeniero Jesús Sánchez Escalante

Por su apoyo en la determinación de la especie vegetal.

Dra. Dora Edith Valencia

Por su asesoría en la realización de distintas técnicas hechas en esta tesis y por brindarme su amistad.

M. C. Milagros Aguilar (DIPM)

Por todas las facilidades y apoyo en las técnicas espectroscópicas.

M. C. Judith Valdez

Por apoyarme en todo el transcurso de la realización de esta tesis.

Cuerpo de trabajo CAAB

Por apoyarme con todo lo necesario para realizar esta tesis.

A mis amigos y amigas

Por estar a mi lado y apoyarme en cada momento.

M. C. Enrique Wenceslao Aceves

Por su gran apoyo y compañía en distintos momentos en la realización de esta tesis.

M. C. Sergio Daniel Morales Chávez

Por estar siempre dispuesto a escucharme, por brindarme su amistad y su apoyo.

QBC. Mario Leyva Peralta

Por su gran apoyo y amistad en esta tesis.

A todos ustedes Muchas Gracias

DEDICATORIA

Dedico esta tesis:

A mi madre

Que con su gran amor fue mi pilar para seguir adelante.

A mis sobrinos

Que con cada risa me daban la fortaleza para no caer nunca.

A mis hermanos

Por estar siempre a mi lado aunque estemos lejos.

A mi sobrina y la nueva llegada de mi nuevo (a) sobrino (a)

Que me den más ánimos de seguir adelante.

A Ramses del sol

Por estar a mi lado y por apoyarme siempre, te quiero ∞ .

A Dios

Por que donde termina mi fuerza comienza actuar la de mi señor.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
OBJETIVOS	xiv
General.....	xiv
Particulares.....	xiv
RESUMEN	xv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Cáncer.....	4
Epidemiología del Cáncer.....	4
Características Generales de las Células Cancerosas.....	6
Apoptosis.....	8
Vías Principales de Apoptosis.....	10
Vía extrínseca.....	10
Vía intrínseca.....	10
Mecanismos de Resistencia del Cáncer.....	10
Tratamientos.....	12
Fitoterapia.....	15
Género Argemone.....	16
<i>Argemone pleiacantha</i>	17
Usos Reportados para el Género Argemone.....	17
Compuestos Reportados en el Género Argemone.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Colecta y Clasificación Botánica.....	23
Fraccionamiento Químico.....	23

Obtención del Extracto Metanólico.....	23
Obtención de las Fracciones del Extracto Metanólico.....	23
Fraccionamiento y Purificación de los Compuestos Activos.....	24
Fraccionamiento por Cromatografía en Columna.....	24
Cromatografía en Capa Fina.....	24
Cromatografía en Placa Preparativa.....	25
Caracterización Estructural.....	26
Análisis por Espectroscopia en Infrarrojo.....	26
Resonancia Magnética Nuclear.....	26
Análisis por Espectrometría de Masas.....	27
Evaluación de la Actividad Biológica.....	27
Líneas Celulares.....	27
Preparación de los Extractos y Fracciones.....	27
Evaluación de la Actividad Antiproliferativa.....	28
Análisis del Mecanismo de Acción de los Compuestos Activos.....	28
Marcaje con Anexina V/Yoduro de Propidio.....	29
Reducción del Potencial de Membrana Mitocondrial (Ψ_m).....	30
Evaluación de la Actividad de las Caspasas.....	30
Análisis Estadístico.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
Fraccionamiento del Extracto Metanólico.....	32
Actividad Antiproliferativa de Extractos y Fracciones.....	32
Fraccionamiento y Selección de Subfracciones Activas.....	37
Fracción Hexánica.....	37
Fracción Etanólica.....	41
Efecto de las Subfracciones Activas en Líneas Tumorales.....	45
Subfracción S22.....	45
Subfracción SE27.....	45

Cromatografía en Placa Preparativa de las Subfracciones Activas S22 y SE27 de <i>A. pleiakantha</i>	48
Subfracción S22.....	48
Subfracción SE27.....	50
Evaluación de la Actividad Biológica de las Subfracciones S22R1, SE27A1 y SE27A3 Obtenidas en Cromatografía en Placa Preparativa...	52
Identificación de Compuestos Químicos de la Subfracción S22R1	54
Análisis por Infrarrojo.....	54
Análisis por IE-MS.....	56
Análisis de RMN.....	56
Identificación de Compuestos Químicos de la Subfracción SE27A1.....	61
Análisis de RMN.....	61
Análisis del Mecanismo de Acción.....	69
Análisis del Mecanismo de Acción de <i>A. pleiakantha</i> sobre la Línea Celular M12.C3F6 Mediante Marcaje con Anexina V/Yoduro de Propidio.....	71
Efecto de <i>A. pleiakantha</i> sobre el Potencial de Membrana Mitocondrial (Ψ_m).....	76
Análisis de la Inducción de Apoptosis por Activación de Caspasas....	78
CONCLUSIONES	81
PERSPECTIVAS	82
BIBLIOGRAFÍA	83
ANEXOS	91

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Distribución porcentual de morbilidad hospitalaria por tumores malignos para cada sexo 2009.....	5
II	Cambios morfológicos y bioquímicos en células apoptóticas.....	9
III	Mecanismos de resistencia de drogas anticáncer.....	13
IV	Propiedades encontradas en el género Argemone.....	19
V	Compuestos aislados en el género Argemone.....	20
VI	Porcentaje de rendimiento de extractos y fracciones de <i>A. pleiakantha</i>	33
VII	Resultados de IC ₅₀ (µg/mL) para los extractos y fracciones de <i>A. pleiakantha</i> contra las diferentes líneas analizadas.....	35
VIII	Efecto antiproliferativo de las subfracciones activas S22 y SE27 en diferentes líneas tumorales.....	46
IX	Resultados de IC ₅₀ (µg/mL) para las subfracciones extraídas de cromatografía en placa preparativa de <i>A. pleiakantha</i> contra las líneas M12.C3F6 y L-929.....	53
X	Evaluación de apoptosis inducida en células tumorales M12.C3F6 por las subfracciones de hexano de <i>A. pleiakantha</i>	75
XI	Sistema de solventes utilizados para el fraccionamiento en cromatografía en columna y capa fina para la fracción de hexano de <i>A. pleiakantha</i>	91
XII	Sistema de solventes utilizados para el fraccionamiento en cromatografía en columna y capa fina para la fracción de etanol de <i>A. pleiakantha</i>	93

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Capacidades adquiridas en las células cancerosas.....	7
2	Vías de apoptosis.....	11
3	<i>Argemone pleiakantha</i>	18
4	Procedimiento de fraccionamiento de la fracción de hexano de <i>Argemone pleiakantha</i>	38
5	Actividad antiproliferativa de las 34 subfracciones a una concentración de 50 µg/mL, separadas mediante cromatografía en columna de la fracción de hexano de <i>Argemone pleiakantha</i> frente a la línea celular cancerosa M12.C3F6	39
6	Actividad antiproliferativa de las subfracciones activas a una concentración de 25 µg/mL, separadas mediante cromatografía en columna de la fracción de hexano de <i>Argemone pleiakantha</i> frente a la línea celular cancerosa M12.C3F6	40
7	Procedimiento de fraccionamiento de la fracción de etanol de <i>Argemone pleiakantha</i>	42
8	Actividad antiproliferativa de las subfracciones a una concentración de 50 µg/mL, separadas mediante cromatografía en columna de la fracción de etanol de <i>Argemone pleiakantha</i> frente a la línea celular cancerosa M12.C3F6	43
9	Actividad antiproliferativa de las subfracciones activas a una concentración de 25 µg/mL, separadas mediante cromatografía en columna de la fracción de etanol de <i>A. pleiakantha</i> frente a la línea celular cancerosa M12.C3F6.....	44
10	Cromatografía en placa preparativa de la subfracción S22 en un sistema de solventes hexano/acetato de etilo 9:1.....	49

11	Cromatografía en placa preparativa de la subfracción SE27 en un sistema de solventes metanol/agua destilada 1:1.....	51
12	Espectro de infrarrojo de la subfracción S22R1 (hexano/acetato de etilo 9:1) obtenida de la fracción hexánica de <i>A. pleiakantha</i>	55
13	Espectro de EI-MS de la subfracción S22 obtenida de la fracción hexánica de <i>A. pleiakantha</i>	57
14	Espectro de RMN ¹³ C de la subfracción S22R1 (hexano/acetato de etilo 9:1) en CDCl ₃ , extraída de la fracción de hexano de <i>A. pleiakantha</i>	58
15	Espectro de RMN ¹³ C de la subfracción S22R1 (hexano/acetato de etilo 9:1) en CDCl ₃ , extraída de la fracción de hexano de <i>A. pleiakantha</i> comparado con los desplazamientos de 11-triacontanol.....	60
16	Espectro de RMN ¹ H de la fracción cromatográfica SE27A1 en MeOD, extraída de la subfracción SE27 de <i>Argemone pleiakantha</i>	63
17	Espectro COSY de SE27A1 extraída de la subfracción SE27 obtenida de la fracción etanólica de <i>Argemone pleiakantha</i>	64
18	Espectro NOESY de SE27A1 extraída de la subfracción SE27 obtenida de la fracción etanólica de <i>Argemone pleiakantha</i>	66
19	Acoplamiento COSY y NOESY de los protones presentes en berberina identificada en la subfracción SE27A1 obtenida de la fracción etanólica de <i>A. pleiakantha</i>	67
20	Espectro DEPT 135, DEPT 90 y RMN ¹³ C de SE27 en CD ₃ OD, obtenida de la fracción etanólica de <i>A. pleiakantha</i>	68
21	Espectro de correlación heteronuclear de la subfracción SE27 en CD ₃ OD, obtenida de la fracción etanólica de <i>A.</i>	

	<i>pleiakantha</i>	70
22	Cambios morfológicos inducidos por las subfracciones extraídas de la fracción de hexano sobre la línea celular M12.C3F6.....	72
23	Citograma de las células cancerosas M12.C3F6 con anexina V/yoduro de propidio después de 12h de incubación con el disolvente DMSO (25 µg/mL) izquierda y CAPE 3.75 (µM) derecha.....	74
24	Efecto del extracto metanólico, de la fracción de hexano y de la subfracción 22 (S22) sobre el potencial de la membrana mitocondrial (Ψ_m) en células M12.C3F6.....	77
25	Efecto de los extractos y fracciones de <i>A. pleiakantha</i> en la activación de las caspasas 3, 8 y 9 en la línea M12.C3F6.....	79

OBJETIVOS

General

Identificar los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa de las fracciones del extracto metanólico de la planta *Argemone pleiacantha*.

Particulares

1. Probar la actividad antiproliferativa de las fracciones de hexano, acetato de etilo y etanol del extracto metanólico frente a las líneas celulares M12.C3F6, RAW, HeLa, LS-180, A-549 y L-929.
2. Separar los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa de las fracciones activas mediante un estudio biodirigido.
3. Determinar la estructura de los compuestos activos por medio de espectroscopia de infrarrojo y resonancia magnética nuclear.
4. Evaluar el efecto apoptótico de las fracciones activas aisladas de *Argemone pleiacantha* en la línea celular M12.C3F6

RESUMEN

Los productos naturales han sido una fuente importante para el desarrollo de fármacos con acción anticancerígena. En el presente estudio se evaluó la actividad antiproliferativa de extractos y fracciones provenientes de la planta *Argemone pleiacantha* mediante el ensayo colorimétrico del MTT (bromo -3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazol), contra las líneas celulares cancerosas M12.C3F6 (linfoma de células B), RAW (macrófago de murino transformado por el virus de la leucemia de Abelson), HeLa (carcinoma de cérvix humano), A-549 (carcinoma de pulmón humano) y LS-180 (adenocarcinoma de colon humano). Se determinó la concentración mínima inhibitoria del 50% del crecimiento celular (IC_{50}) para la línea celular M12.C3F6, encontrando que las fracciones de hexano y etanol presentaron un IC_{50} de 3.2 ± 1.3 y 5.5 ± 1.3 , respectivamente. La fracción de hexano también mostró la mayor actividad sobre las líneas RAW, HeLa y LS-180 ($IC_{50} = 1.7 \pm 0.5$, 4.3 ± 0.3 y 35.7 ± 2.3 , respectivamente), mientras que para la fracción etanólica solo presentó actividad alta en RAW ($IC_{50} = 28.3 \pm 4.9$). Las fracciones de hexano y de etanol, mostraron baja actividad contra la línea celular normal de tejido subcutáneo (L-929) ($IC_{50} = 90.5 \pm 3.7$ e $IC_{50} = > 200 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). A partir de estas fracciones se separaron por cromatografía en columna dos subfracciones con actividad antiproliferativa, S22 y SE27, correspondientes a las fracciones de hexano y etanol, respectivamente. Las subfracciones activas se analizaron por medio de técnicas como infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H) y carbono (RMN ^{13}C) y EI-MS. Dentro de los compuestos presentes en la subfracción S22 se pudo detectar al 11-triacontanol y otros compuestos de cadena larga. Por otra parte, en la subfracción SE27 se identificó el alcaloide berberina, como compuesto mayoritario. Adicionalmente se inició con el estudio del mecanismo de acción implicado en la actividad antiproliferativa de *A. pleiacantha*. La inducción de la apoptosis se examinó en la línea M12.C3F6 por

citometría de flujo usando las tinciones del colorante JC-1, anexina V/yoduro de propidio, e inhibidores de caspasas 3, 8 y 9. Los resultados indican que la apoptosis ejercida por S22 esta mediada por la vía dependiente de caspasas.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las plantas continúan representando el recurso natural más explotado en la búsqueda de compuestos anticancerígenos y se encuentran en estudio una amplia variedad de familias de plantas tales como Umbelliferae, Euphorbaceae, Papaveraceae y Annonaceae (Pérez y col., 2005).

Dentro de la familia Papaveraceae se encuentra el género *Argemone* que contiene aproximadamente 30 especies, todas con tallos espinosos, hojas, cápsulas, similar desarrollo foliar y las hojas terminan en segmentos con espinas. *A. ochroleuca* Sweet y *A. mexicana* L., son especies originarias de la región central de América y el suroeste de Norte América, pero hoy en día se han generalizado en todas las zonas más cálidas del mundo (Karlsson y col., 2003).

Argemone mexicana L., es una planta usada en la medicina tradicional mexicana. Las propiedades curativas de *A. mexicana* fueron bien conocidas por la cultura mesoamericana, antes de la llegada de los europeos (Graz y col., 2010; Guízar y col., 2012). Esta planta es tradicionalmente usada como analgésico, antiplasmódico, antitusivo, demulcente, emético, expectorante, alucinogénico, purgativo, sedativo, tratamiento de las verrugas, herpes labial, infecciones cutáneas, enfermedades de la piel, tumores, disentería, hidropesía e ictericia (Kumar y col., 2009; Sharma y col., 2010; Perumal y col., 2010).

Estudios realizado en la India por Kumar y col., 2009, evaluaron la actividad bactericida del extracto de semillas de *A. mexicana* L., encontrando que el extracto de cloroformo de las semillas fue más activo que otros extractos analizados, reportando una mínima concentración inhibitoria (MIC) de 2.0 y 3.0 mg/mL, para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, respectivamente. Mientras que Sharma y col., 2010, investigaron el efecto de diferentes dosis del extracto etanólico de *A. mexicana* en cuanto a su actividad

analgésica y encontró que el extracto etanólico a dosis de 200 mg/Kg presentó actividad significativa en comparación con la aspirina.

En Perú, Vidal y col., 2009, evaluaron el efecto tóxico de los extractos etanólicos foliares de *A. subfusiformis* "cardo santo" sobre larvas IV y pupas de *Aedes aegypti*. Además, encontraron que los extractos crudos de *A. mexicana* poseen efecto en *Plasmodium berghei*, en tanto que los extractos etanólicos y metanólicos de *A. subfusiformis* muestran propiedades abortivas.

Pérez y col., 2005, realizaron la extracción de una mezcla de polisacáridos a partir de hojas de la planta *A. mexicana*, para determinar su actividad antitumoral en células de leucemia linfocítica P-388 y sarcoma 37. La mezcla de polisacáridos provocó rechazo a la implantación del tumor de Ehrlich y su administración conjunta con 5 fluoracilo produjo un incremento moderado de la actividad antitumoral en los ratones portadores del tumor sarcoma 37.

En México las semillas de *A. mexicana* han sido usadas como un antídoto al veneno de víbora (Kumar y col., 2009). Ésta es usada como un antimalárico en varios países africanos, incluyendo Benin, Mali y Sudan (Graz y col., 2010). *A. ochroleuca* se utiliza en la medicina tradicional por los habitantes de Tepozotlán, Estado de México para aliviar infecciones de los ojos, manchas y verrugas (Reyes y col., 2011).

En Sonora se han realizado estudios evaluando la actividad antiproliferativa de las especies *A. ochroleuca* y *A. pleiacantha*, centrándose dicha actividad en las fracciones de etanol para *A. ochroleuca*, donde se identificó al alcaloide berberina como responsable de dicha actividad (Becerra , 2011) y en las fracciones de hexano y acetato de etilo en *A. pleiacantha* (Leyva, 2010). Sin embargo, no se realizaron estudios de la composición de las fracciones activas de *A. pleiacantha*. El propósito de este estudio fue la evaluación de la actividad antiproliferativa de las fracciones de hexano, etanol y del extracto metanólico de las partes aéreas de *A. pleiacantha*, así como la identificación de los

compuestos responsables de dicha actividad y el mecanismo por el cual llevan a cabo esta acción.

ANTECEDENTES

Cáncer

El cáncer, neoplasia o tumor maligno, hace referencia a más de 200 tipos de enfermedades (Flores, 2009). Esta enfermedad resulta de dos procesos sucesivos: el aumento descontrolado de la proliferación celular y la posterior adquisición de la capacidad invasiva de estas células (Abril-Montes, 2006). Esta enfermedad es conocida desde hace mucho tiempo, pero ha alcanzado mayor importancia a lo largo del siglo XX por la magnitud de las cifras de mortalidad que ocasiona. La importancia del problema del cáncer se define con dos parámetros: 1) las cifras de incidencia del cáncer o nuevos casos que aparecen cada año y 2) las cifras de mortalidad anual por cáncer (Senra, 2002). Factores genéticos y medioambientales contribuyen al incremento en la morbilidad y mortalidad de distintos tipos de cáncer (Cavia y col., 2007).

Epidemiología del Cáncer

A nivel mundial, el cáncer es una de las primeras causas de mortalidad. De acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se prevé que entre 2007 y 2030, la mortalidad por cáncer a nivel mundial aumentará 45%, pues se estima que pasará de 7.9 a 11.5 millones de defunciones por año, resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población, y que el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 a 15.5 millones (INEGI, 2011).

En México, al igual que en el plano internacional, existe un incremento en los casos de cáncer (INEGI, 2010). Durante 2009 las principales causas de morbilidad hospitalaria en la población mexicana (Tabla I) fueron por tumores malignos en los órganos hematopoyéticos (leucemias en su mayoría) con 17.9%; órganos digestivos con 14.8%; y mama con 12.5% de los casos;

Tabla I. Distribución porcentual de morbilidad hospitalaria por tumores malignos para cada sexo 2009.

Tumores malignos	Total	Hombres	Mujeres
Órganos respiratorios e intratorácicos	5	7.8	2.9
Labio, de cavidad bucal y de la faringe	1.6	2.2	1.2
Células germinales (ovario y testículos)	6.6	5.6	7.3
Encéfalo y otras partes del sistema nervioso central	2.7	3.3	2.1
Órganos digestivos	14.8	17.5	12.6
Glándula tiroidea y otras glándulas endocrinas	2.6	1.6	3.5
Ojo y sus anexos	0.5	0.6	0.5
Melanoma y otros tumores malignos de la piel	3.3	3.6	3
Tumores malignos (primarios) de sitios múltiples independientes	0.1	0.1	0.1
Vías urinarias	3.9	5.4	2.6
Órganos hematopoyéticos	17.9	22.8	14.1
Tejido linfático y afines (incluye sarcoma de Kaposi y linfoma de células T, periférico y cutáneo)	7.6	9.8	5.9
Mama	12.5	0.4	22
Órganos genitales femeninos	7.5	NA	13.5
Órganos genitales masculinos	3.9	8.9	NA
Otros tumores malignos	7.4	7.9	6.9

Fuente:(INEGI 2012).

en contraste, los tumores del labio, de la cavidad bucal y de la faringe (1.6%); ojo y sus anexos (0.5%) y los tumores malignos (primarios) de sitios múltiples independientes (0.1%), presentan los porcentajes más bajos (INEGI, 2012).

Entre los hombres, las principales causas de morbilidad hospitalaria se presentaron en órganos hematopoyéticos (22.8%); órganos digestivos (17.5%); y del tejido linfático y afines que incluye sarcoma de Kaposi y linfoma de células T, periférico y cutáneo (9.8%). Mientras los que reportaron menos casos fueron en tumores de ojo y sus anexos (0.6%); mama (0.4%); y los tumores malignos (primarios) de sitios múltiples independientes (0.1%) (INEGI, 2012).

En las mujeres, el cáncer de mama constituye la principal causa de morbilidad hospitalaria (22.0%); seguida de los tumores de los órganos hematopoyéticos (14.1%) y de los órganos genitales femeninos (13.5%). En contraste, las tasas más baja se observan para el cáncer de labio, de la cavidad bucal y de la faringe (1.2%), ojo y sus anexos (0.5%) y los tumores malignos (primarios) de sitios múltiples independientes (0.1%) (INEGI, 2012).

Características Generales de las Células Cancerosas

Los diferentes genotipos de células de cáncer manifiestan seis alteraciones esenciales en la fisiología celular, que en conjunto determinan el crecimiento maligno (Figura 1): (i) autosuficiencia en señales de crecimiento, (ii) insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, (iii) evasión de la muerte celular programada (apoptosis), (iv) potencial replicativo ilimitado, (v) angiogénesis sostenida, e (vi) invasión de tejidos y metástasis. Estas seis capacidades están comúnmente compartidas en la mayoría de los tumores humanos (Hanahan y Weinberg, 2000). El progreso en las últimas décadas ha añadido dos características emergentes: la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la destrucción inmunológica. Dichos conceptos cada vez afectan más el desarrollo de nuevos medios para tratar

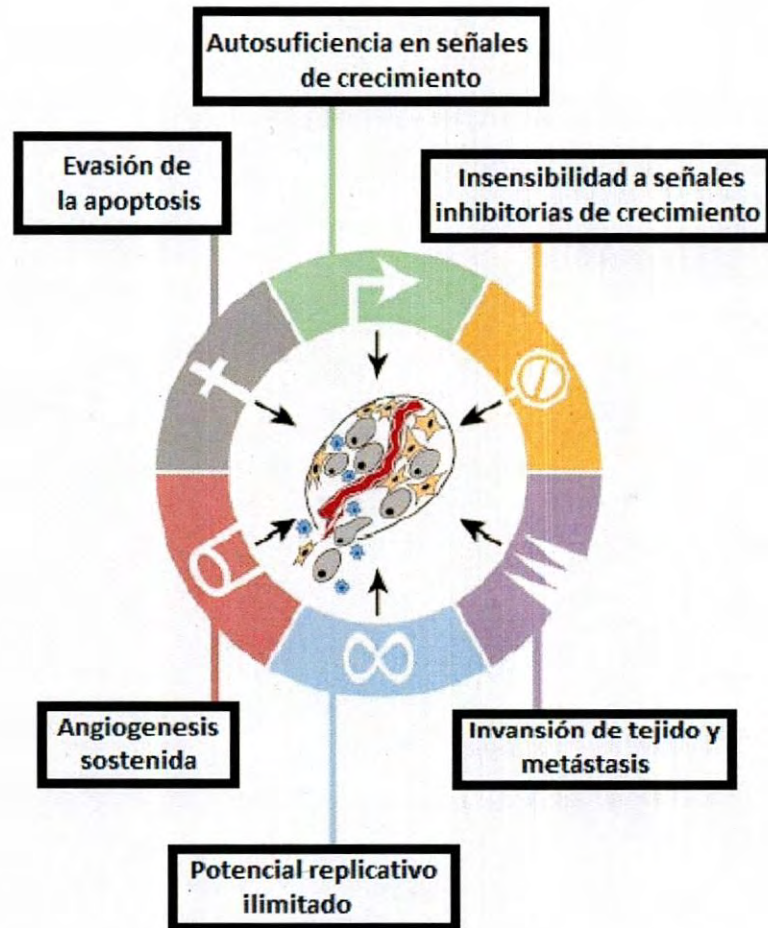


Figura 1. Capacidades adquiridas en las células cancerosas. La mayoría de los cánceres han adquirido el mismo conjunto de capacidades funcionales durante su desarrollo, aunque a través de diversos mecanismos estratégicos.

Fuente: Hanahan y Weinberg, 2000.

el cáncer humano. La mayoría de los cánceres han adquirido el mismo conjunto de capacidades funcionales durante su desarrollo aunque a través de diversos mecanismos estratégicos (Hanahan y Weinberg, 2011). Para entender las bases moleculares del cáncer, el mecanismo de acción de los agentes quimioterápicos y los mecanismos de la quimiorresistencia es necesario conocer los procesos biológicos que regulan el ciclo celular y la apoptosis (Burgués y col., 2005).

Apoptosis

La apoptosis se puede definir como “un proceso coordinado, dependiente de energía, que involucra la activación de un grupo de cisteína proteasas denominadas caspasas y una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la desaparición definitiva de la célula” (Martínez, 2009). Este proceso es una forma de muerte celular programada que es regulada fisiológica y genéticamente y juega un papel central en el desarrollo, morfogénesis, renovación celular normal y función del sistema inmune (Lagunas y col., 2010).

La apoptosis contribuye a la eliminación del daño por quimioterapia, por radiación o células infectadas por virus. La apoptosis anormal está involucrada en varias enfermedades como las autoinmunes y el cáncer (Lagunas y col., 2010). La apoptosis es la manera más conveniente de eliminación de células tumorales, ya que es un estado final en donde la célula tumoral no representa ningún peligro futuro posible y no provoca inflamación (Hernández y col., 2011). La apoptosis es activada por la aparición/desaparición de señales de otras células y por estímulos externos. Se caracteriza por una secuencia de cambios morfológicos y por modificaciones bioquímicas. Las características más importantes de las células apoptóticas se resumen en la Tabla II. Al final del proceso, la célula apoptótica o sus fragmentos son fagocitados por células vecinas o macrófagos sin inducir la inflamación (Frago y col., 2001).

Tabla II. Cambios morfológicos y bioquímicos en células apoptóticas.

Principales cambios fenotípicos que tienen lugar durante el proceso de apoptosis

Exposición de fosfatidilserina
Encogimiento de la célula
Aparición de burbujas en la membrana
Aislamiento de la cromatina
Condensación de la cromatina
Digestión de la cromatina y de regiones internucleosomales
Alteraciones en el potencial de la membrana mitocondrial
Formación de cuerpos apoptóticos

Fuente: Frago y col., 2001.

Vías Principales de Apoptosis

Vía extrínseca (receptor). El receptor es activado específicamente por un ligante, por ejemplo, TRAIL, TNF y FasL. Se ha demostrado la cascada de caspasas mediante unión y activación de sus receptores de membrana, DR4/TRAIL-R1 y DR5/TRAIL-R2, receptor TNF-1 (TNFR1), y Fas (CD95), respectivamente. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores TNF, la cual se relaciona con otros receptores, tales como el receptor de factor de crecimiento de nervios P75 y CD40 (Lagunas y col., 2010).

Vía intrínseca (mitocondria). Es usada en respuesta a muchos estímulos no específicos como daño al DNA, radiación, estrés osmótico, resultando en la liberación de citocromo c, del espacio intermembranal de la mitocondria, al citosol. En el citosol, un complejo conocido como apoptosoma formado por el factor de activación-1 de la proteasa apoptótica (Apaf-1), procaspasa 9 y citocromo c. Apaf-1 tienen un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) que le permite unirse a caspasa 9, un motivo central que une ATP y en el extremo COOH repeticiones WD40 que se unen al citocromo c. La oligomerización de Apaf-1 conduce a la autoactivación de procaspasa 9 que a su vez escinde y activa caspasa 3, evento que provoca la escisión de otros sustratos de muerte (Figura 2) (Lagunas y col., 2010).

Mecanismos de Resistencia del Cáncer

Clasificar las múltiples causas que pueden originar resistencia a la quimioterapia es difícil. El objetivo principal del tratamiento quimioterapéutico es conseguir la muerte de la célula tumoral. Para ello es necesario lograr que la mayor cantidad de fármaco activo posible llegue a nivel de su molécula diana

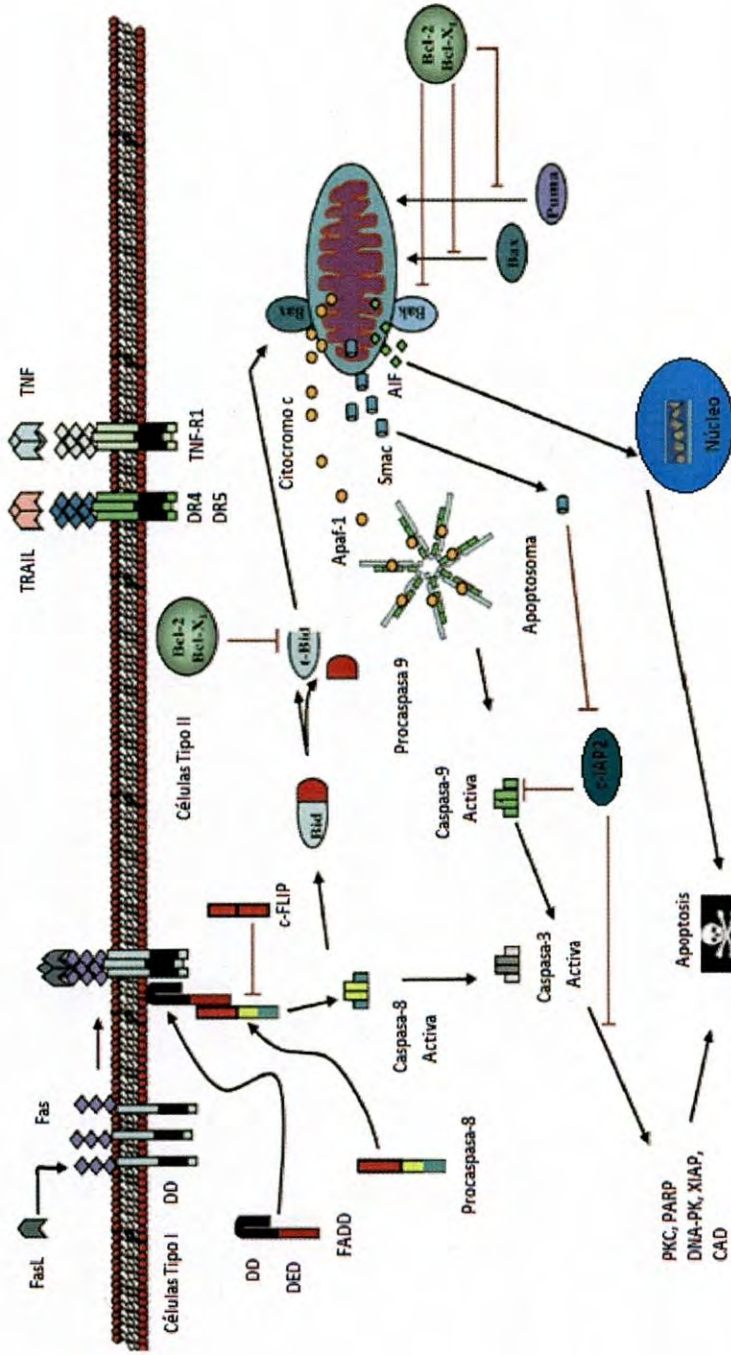


Figura 2. Vías de Apoptosis. En la vía extrínseca, FasL se une a Fas e induce su trimerización, que recluta a FADD con los dominios de muerte (DD). El complejo Fas-FADD se une a procaspasa 8 formando un complejo llamado DISC. Caspasa 8 activa, induce apoptosis por la activación de caspasa 3. En la vía intrínseca mitocondrial, Bax y PUMA se translocan del citosol a la membrana mitocondrial. AIF es el principal mediador de la apoptosis, contribuyendo en la fragmentación nuclear del ADN. Fuente: Lagunas y col., 2010.

en el interior de la célula. Cualquier circunstancia que se interponga o dificulte este objetivo puede ser causa de resistencia (Sánchez y Benítez, 2006).

En términos generales, la resistencia se puede dividir por dos diferencias principales: 1) la resistencia causada por una falla del agente anticancerígeno para llegar a una concentración adecuada a su molécula blanco (ADN, ARN, sitio activo de la enzima, etc.) que puede denominarse resistencia farmacocinética (O'Connor, 2009) y 2) la resistencia evidente donde se tiene una apropiada concentración de la droga en el sitio de acción, pero el agente no puede generar una respuesta farmacodinámica completa (especialmente en respuesta apoptótica), llamándose resistencia farmacodinámica (O'Connor, 2009).

Además, las contribuciones de un mecanismo de resistencia específica pueden ocurrir a diferentes niveles de organización pertenecientes al tumor, por ejemplo, el entorno del tumor, dinámica bioquímica y transcriptómica individual de la célula tumoral (O'Connor, 2009). La Tabla III resume algunos de los mecanismos de resistencia caracterizados que se consideran importantes en el cáncer.

Tratamientos

Los tratamientos de las neoplasias se dividen en cuatro grupos principales: cirugía, radioterapia, quimioterapia, e inmunoterapia. Estas modalidades a menudo se utilizan en combinación y los agentes que pertenecen a una categoría actúan por diversos mecanismos (Abril-Montes, 2006).

El tratamiento con fármacos, radiación y cirugía ha permitido alcanzar tasas elevadas de curación de unas cuantas formas de cáncer (por ejemplo, una forma de cáncer de piel), mientras que en otras (cáncer pulmonar), la tasa de curación sigue siendo muy baja (Hill, 2009). Los cánceres metastásicos

Tabla III. Mecanismos de resistencia de drogas anticáncer.

Resistencia farmacocinética Descripción del mecanismo de resistencia	Resistencia farmacodinámica Descripción del mecanismo de resistencia
<u><i>Resistencia debido a factores que afectan al tumor en general</i></u>	
Alteración de perfusión sanguínea-reducción del medicamento. Encapsulación del tumor. Reducción de la permeabilidad del tumor. Alteraciones en el tumor y pH celular. Alteraciones en el metabolismo, distribución y/o eliminación.	Alteraciones en la tensión de oxígeno. Alteración en el potencial redox.
<u><i>Resistencia evidente a factores de la célula tumoral</i></u>	
Consumo celular reducido de la droga (mecanismo pasivo o activo). Incremento en la expresión / actividad de las bombas de flujo de drogas. Localización vesicular de drogas - secuestro. Incremento en la expresión de enzimas metabólicas. Decremento en la expresión de enzimas metabólicas.	Disminución de la expresión de la enzima diana - receptor. Incremento en la expresión de molécula diana. Mutación del blanco. Alteraciones en la cascada de apoptosis. Alteraciones en la tasa de crecimiento celular. Alteraciones en el mecanismo de reparación. Factores estromales autocrinos - paracrinos secretados por la célula tumoral como protección contra el tratamiento.

Fuente: (O'Connor 2009).

son generalmente tratados por administración de uno o más agentes quimioterapéuticos, y, a veces, acoplados con otras formas de terapia, incluyendo radiación (O'Connor, 2009). La finalidad de tales tratamientos es eliminar la carga de células tumorales en el cuerpo y, hasta hace poco, los agentes que directamente destruyen las células, llamados citostáticos, eran la base del tratamiento para la mayoría de los tumores malignos (O'Connor, 2009).

En los últimos diez años, la llegada de más agentes dirigidos molecularmente ha proporcionado un nuevo repertorio para los oncólogos. Desafortunadamente, la biología básica de los tumores combinada con la inducción de sistemas redundantes de supervivencia de las células cancerosas permite su supervivencia y proliferación, lo que significa que muchos tumores avanzados pueden ser resistentes a la terapia o se hacen resistentes a la exposición posterior a cualquier agente molecularmente dirigido (O'Connor, 2009).

La quimioterapia también afecta a las células del cuerpo que se reemplazan con frecuencia, como las que recubren internamente el aparato digestivo y las que producen el pelo. Los efectos colaterales de la terapia incluyen náuseas y pérdida del cabello. Finalmente, las células normales resultan afectadas a tal grado que es preciso discontinuar el tratamiento (Hill, 1999).

En términos de tratamiento del cáncer, existen serias limitaciones debido a la falta de selectividad de los agentes quimioterapéuticos y a la resistencia desarrollada por algunas células cancerosas a dichos productos, por ello, los compuestos obtenidos mediante la extracción fitoquímica, cobran relevancia como nuevos recursos para tratamientos alternativos (Monroy y col., 2009).

Fitoterapia

La OMS define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Se estima que el 80% de las personas en regiones menos desarrolladas emplean la medicina tradicional con plantas para el cuidado de la salud (Schlaepfer y Mendoza, 2010).

México es un país de una gran riqueza biológica, diversidad de ecosistemas y variabilidad genética, debido a su topografía y variaciones climáticas. Ocupa el cuarto lugar entre los países considerados con gran diversidad biológica y posee cerca del 10 por ciento del total de las especies conocidas, con un gran número de endemismos. En el ámbito mundial, con respecto al número de especies de plantas, ocupa el quinto lugar y se estiman en alrededor de 7,000 las especies con algún tipo de uso (Schlaepfer y Mendoza, 2010).

Se han identificado y registrado 4,000 especies con atributos medicinales (15% de la flora total mundial) (Schlaepfer y Mendoza, 2010), sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo sólo en el 5% de estas especies (Ocegueda y Moreno, 2005).

Los productos vegetales naturales han proporcionado importantes beneficios económicos y de salud (Donalson y Cates, 2004). Las plantas han desarrollado complejas vías para la biosíntesis de metabolitos secundarios que proveen protección contra condiciones adversas, irradiaciones UV, tolerancia a bajas temperaturas, etc. (Palacios y Leech, 2004). En las últimas décadas, numerosas teorías se han propuesto para explicar la diversidad y distribución de metabolitos secundarios en plantas (Donalson y Cates, 2004).

Con el fin de combatir las diversas enfermedades del hombre, la medicina

ha estado vinculada al uso de compuestos provenientes de plantas, animales o microorganismos y en las últimas décadas, los avances en los métodos de aislamiento y purificación, así como los análisis espectrométricos, han permitido la caracterización de los principios activos para su uso farmacéutico, ya sea como productos naturales o como moléculas derivadas de ellos. En el área oncológica esto no ha sido una excepción y hoy se cuenta con medicamentos antineoplásicos provenientes de compuestos naturales, entre los que destacan los alcaloides de la *Vinca* (*Catharantus roseus*) como la vincristina y la vinblastina, el taxol de *Taxus brevifolia*, y los antibióticos doxorubicina (adriamicina) de *streptomyces peucetius* y la bleomicina de *Streptomyces verticillus*, entre otros (Schlie y col., 2009).

Dentro del grupo de plantas que se sabe tienen uso medicinal en Sonora, existen algunas referidas por sus propiedades anticancerígenas, entre éstas se encuentran algunas especies del género *Argemone* (López e Hinojosa, 1988).

Género Argemone

Dentro del género *Argemone* incluyen plantas herbáceas, anuales o perennes (rara vez arbustivas) con látex acuoso blanquecino o amarillento hasta anaranjado o rojizo, erectas o ascendentes, por lo común espinosas y más o menos glaucas; tallos con frecuencia muy ramificados; hojas a menudo dispuestas tanto en roseta basal (especialmente en sus estadios jóvenes) como alternas sobre el tallo. Se tienen más de 20 especies en regiones templadas y tropicales, son casi exclusivamente de América, aunque una de ellas, *A. mexicana* L., ha sido introducida a muchas otras partes del mundo. En México, con frecuencia se les denomina "chicalote". A algunas se les atribuyen propiedades curativas, especialmente contra afecciones de los ojos y de la piel. Son plantas de ambientes abiertos, soleados y muchas han resultado favorecidas por las actividades del hombre, comportándose como malezas; su

hábitat preferencial son las parcelas en descanso y los bordes de los caminos (De Rzedowski, 1991).

Argemone pleiacantha

A. pleiacantha es una Argemone típica, produce savia y posee hojas de color verde pálido. La planta (Figura 3) tiene múltiples ramificaciones y puede llegar a crecer más de 1 m de altura. Las hojas son anchas y lobuladas, con un tallo muy alto. Las flores son de hasta 7 cm de ancho y la planta está cubierta con delgadas espinas amarillas. Esta planta es anual o bianual, se encuentra comúnmente en gran parte del norte de México, se produce en el suelo de arena o de grava, tanto en llanuras como en laderas (Steve, 2000).

Usos Reportados para el Género Argemone

En la Tabla IV se enlista algunas de las propiedades encontradas en el género. Estas plantas son objeto de numerosos usos: se le atribuye propiedades contra la tos, la rabia, enfermedades nerviosas, de los ojos, de la piel. El aceite de las semillas se utiliza como insecticida o para hacer jabones y como secante en la fabricación de pinturas (De Rzedowski, 1991).

En los estudios realizados al género de Argemone se ha encontrado que *A. mexicana* y *A. ochroleuca* poseen una gran gamma de propiedades medicinales, entre las que destacan propiedades como antibióticos, antiinflamatorios y antitumorales (Indranil y col., 2006).

Compuestos Reportados en el Género Argemone

En la Tabla V se enlistan algunos compuestos aislados en el género Argemone así como sus actividades biológicas. En éste género se ha reportado la presencia del alcaloide sanguinarina (Devi y Sastry, 2002), un compuesto al



Figura 3. *Argemone pleiacantha*. Fuente: Leyva, 2010.

Tabla IV. Propiedades encontradas en el género Argemone.

Especie	Propiedad	Extracto, Fracción o Compuesto	Colecta	Referencia
<i>A. Mexicana</i> L	Actividad nematocida	Eter de petróleo	Egipto	(Saleh y col., 1987)
	Antitumoral	Polisacáridos	Municipio Plaza de la Revolución, Cuba.	(Pérez y col., 2005)
	Vasoconstrictor y vasorelajante	Metanólico	San Gregorio Atlapulco, Xochimilco y Ciudad de México	(Páez y col., 2006)
	Fungicida	Alcaloides cuaternarios	Distrito de Varanasi, India	(Singh y col., 2010)
	Antioxidante	Etanólico	Coimbatore, Tamil Nadu, India	(Perumal y col., 2010)
<i>A. subfusiformis</i>	Efecto tóxico sobre larvas IV y pupas de <i>Aedes aegypti</i>	Etanólico	Anexo la Merced, Distrito de Laredo, provincia de Trujillo, Perú.	(Vidal y col., 2009)
	Bactericida y Antioxidante	Acetona, metanol y acuoso.	Sur de África	(Jimoh y col., 2010)
<i>A. ochroleuca</i>	Actividad antimicrobiana	Berberina	Tepoztlán, México	(Reyes y col., 2011)

Tabla V. Compuestos aislados en el género Argemone.

Especie	Familia	Compuesto Aislado	Actividad	Referencia
<i>A. ochroleuca</i>	Alcaloides	Berberina	Antimicrobiana	(Reyes, 2011)
<i>A. pleiakantha</i>	Alcaloides	Protopina, criptopina, laudanosina, bisnorargemonina	-	(Stermitz y Coomes, 1969)
<i>A. platyceras</i>	Alcaloides	Isoquercitina, rutina, reticulina, munitagina, argemonina, metilargemonina, norargemonina, platycerina, ometilplatycerina y n-metosal de platycerina	Antiasmáticos	(Fernández, 2005; Fernández y col., 2005)
<i>A. mexicana</i>	Triglicérido	Glicerol-1-eicosa-9,12-dienoato-2-palmitoleato-3-inoleato	Actividad nematocida	(Saleh y col., 1987)
	Alcohol graso	Triacontanol-11	-	(Ballini y col., 2005; Lu, 2009)
	Flavona, flavonona	Luteolina, eriodictiol	-	(Harborne y Williams, 1983)
	alcaloides	N-Demetiloxisanguinarina, pancorina, (+)argenaxina, (+) higenamina, (+) reticulina, queleritrina, angolina, o-metilzantoxilina, norqueleritrina, sanguinarina, 6-acetonildihidroqueleritrina, 6-acetonildihidrosanguinarina, arontianamida, berberina, dihidroquelantifolina, protopina, alocriptopina	Algunos son citotóxico	(Chang y col., 2003; Capasso y col., 2006)

cual se le atribuye un fuerte efecto sobre el proceso de inducción de apoptosis (Yong-Hong, 2006).

En *Argemone mexicana* se ha aislado un alcohol graso llamado triacontanol-11 (Ballini y col., 2005). Estudios preliminares indican que el 1-triacontanol (TRIA), posee propiedades anti-inflamatorias (McBride y col., 1987) y es activo frente a la infección del virus de herpes simplex (Katz y col., 1991) y como estimulante del crecimiento en plantas (Knowles y Ries 1981; Khan y col., 2006).

En estudios realizados en Sonora (Leyva, 2010), se evaluó la actividad antiproliferativa en la especie *A. pleiakantha* y se encontró que las fracciones de hexano y acetato de etilo provenientes del extracto metanólico de dicha planta, poseen actividad antiproliferativa frente a la línea celular tumoral M12.C3F6. Estas fracciones inhibieron cerca del 100% a la concentración de 50 µg/mL, mismas que se analizaron frente a una línea celular normal L-929, mostrando una inhibición nula para la fracción hexánica, mientras que la fracción de acetato de etilo mostró más del 65% de inhibición en esta línea. Este descubrimiento coincide con la información disponible para el género *Argemone*, al cual se le atribuyen propiedades anticancerígenas.

Sin embargo, en esta especie no se ha avaluado específicamente la caracterización de los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa. Es por ello que en el presente estudio se enfocó en la identificación de los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa de la planta *Argemone pleiakantha*, empleando como paso inicial distintas técnicas de caracterización espectroscópica, así como también un modelo experimental *in vitro* para analizar el efecto antiproliferativo de las fracciones. Por último se llevaron a cabo ensayos para el análisis del mecanismo de acción ejercido por las fracciones. Todo esto con el fin de encontrar compuestos naturales que en determinado momento puedan ser usados contra el cáncer y en un futuro

puedan ser modificados químicamente para mejorar sus efectos y ampliar su uso a distintos tipos de cáncer.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y Clasificación Botánica

El material vegetal fue recolectado en la carretera Hermosillo-Santa Ana Km 150 y en la carretera Nogales-Cibuta Km 17. La clasificación taxonómica fue realizada por el Ingeniero Jesús Sánchez Escalante, encargado del Herbario de la Universidad de Sonora.

Fraccionamiento Químico

Obtención del Extracto Metanólico

El material vegetal colectado (847.71 g) fue secado a la sombra y homogeneizado en molino tipo Wiley con un tamaño de malla de 2-3 mm. Para la extracción se colocó la planta *Argemone pleiacantha* molida en metanol en una proporción (1:10 p/v). La mezcla se mantuvo en agitación periódica por 10 días a temperatura ambiente y protegida de la luz. Después, se llevó a cabo una filtración con papel Whatman No. 1. Posteriormente, el disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio Yamato a una temperatura de 40°C, 130 rpm/min y bajo presión reducida (Velázquez y col., 2007).

Obtención de las Fracciones del Extracto Metanólico

El extracto metanólico fue sometido a fraccionamiento con los disolventes: hexano, acetato de etilo y etanol. Para ello, se realizaron cuatro lavados con 400 mL de cada uno de los disolventes, con agitación constante por 24 horas, el volumen de disolvente obtenido (1,600 mL), fue posteriormente evaporado en un rotavapor Yamato RE300 para su concentración a una temperatura de 40°C. Al final se obtuvieron cuatro fracciones de distinta polaridad: hexano, acetato de etilo, etanol y residual. Todas las fracciones obtenidas fueron concentradas bajo

presión reducida y colocadas en frascos cerrados para su posterior uso.

Fraccionamiento y Purificación de los Compuestos Activos

Fraccionamiento por Cromatografía en Columna

Para separar los compuestos de las fracciones de hexano y etanol obtenidas del extracto metanólico de *Argemone pleiacantha* (92.4 g), se realizó una columna cromatográfica. Para ello se colocaron 3.8 g de la fracción hexánica y 6 g de la fracción de etanol, cada una por separado. Como fase estacionaria se utilizó sílica gel 60 (70-230 mesh) tamaño de partícula 0.63-0.200 mm, empleando una proporción de 1 gramo de muestra por 30 gramos de sílica (1:30), en una columna de 40 cm de largo por 10.8 cm de diámetro, la cual fue empacutada con hexano. Para la elución en la columna se usaron solventes en orden de polaridad creciente, iniciando con la fase móvil hexano (100 %), posteriormente con mezclas de hexano:acetato de etilo de polaridad creciente (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1) y por último mezclas de acetato de etilo:metanol de polaridad creciente (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1). El volumen de cada fracción colectada fue de 200 mL., a cada fracción se le realizó cromatografía en capa fina (Becerra, 2011; Carrasco, 2010).

Cromatografía en Capa Fina

Esta técnica se llevó a cabo para conocer cuáles fracciones cromatográficas eran diferentes y juntar las que fueran iguales. Se emplearon cromatofolios de sílica gel 60 (0.20 mm) F254 (Sigma) y como fase móvil mezclas de hexano, hexano/acetato de etilo, acetato de etilo/metanol, metanol, metanol/agua en proporciones y agua (10:0,9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1 y 0:1), en orden de polaridad creciente, según el disolvente usado en la columna para cada fracción. Se revelaron mediante una lámpara de UV (Spectroline CM-10) a λ de 254 y 365 nm. Se juntaron las subfracciones obtenidas de la cromatografía en columna

que resultaron con bandas iguales para obtener los distintos conjuntos, los cuales se concentraron en el rotavapor Yamato a temperatura de 40°C, 130 rpm/min y bajo presión reducida y cada uno de los conjuntos se colectó en frascos ámbar por separado y se procedió a la evaporación del disolvente restante. Posteriormente se evaluó la actividad antiproliferativa.

Cromatografía en Placa Preparativa

Esta técnica solo se aplicó a las subfracciones de hexano y de etanol que presentaron actividad antiproliferativa frente a la línea celular cancerosa M12.C3F6 a 25 µg/mL y que mostraron el menor número de bandas en capa fina. De la fracción de hexano se analizó la subfracción S22 y de la fracción de etanol la SE27.

Se aplicaron 36 mg para la subfracción S22 en una cromatoplaqueta de sílica gel de 2 mm de espesor de 20 x 20 cm, utilizando como eluyente el sistema I (hexano/acetato de etilo, 9:1) y en otra cromatoplaqueta de sílica gel (2 mm, 20 x 20 cm) se aplicó una porción de 30 mg de SE27 utilizando el sistema II (metanol/agua destilada, 1:1). Las bandas se revelaron mediante una lámpara de UV (Spectroline CM-10) a λ de 254 y 365 nm. Así como también con yodo, reactivo de Dragendorff y sulfato sérico.

Las bandas resultantes del fraccionamiento por cromatografía en placa preparativa de ambas subfracciones activas (S22 y SE27) fueron raspadas y extraídas con diferentes solventes. Para las bandas de S22 se utilizó acetato de etilo, mientras que las bandas de SE27 fueron extraídas con metanol. Posteriormente todas las bandas extraídas con los diferentes solventes fueron concentradas bajo presión reducida.

Por último, una vez concentradas las fracciones tanto de S22 como de SE27, se seleccionaron aquellas que resultaron con una cantidad mayor a 15 mg para el análisis de actividad biológica y posteriores análisis de caracterización.

Caracterización Estructural

La caracterización de los compuestos se realizó solo en las subfracciones obtenidas por cromatografía en placa preparativa que resultaron con actividad antiproliferativa (S22R1 y SE27A1) frente a las diferentes líneas celulares cancerosas. Para el análisis de los constituyentes químicos de dichas subfracciones se utilizó espectroscopia de infrarrojo y resonancia magnética nuclear. Parte de la purificación y caracterización química de las muestras analizadas se realizó en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el Dr. Manuel Jiménez Estrada.

Análisis por Espectroscopia en Infrarrojo

El análisis por infrarrojo se realizó en un espectrofotómetro FT-IR Perkin Elmer Modelo FTIR Spectrum GX, formando pastillas con bromuro de potasio (KBr).

Resonancia Magnética Nuclear

El análisis por RMN de ^1H y ^{13}C se realizó en un espectrómetro Bruker modelo Avance 400, que opera a 400 MHz, usando tetrametilsilano como referencia interna. Los compuestos se disolvieron en metanol deuterado (CD_3OD). Se realizaron los experimentos de HETCOR (Correlación Heteronuclear), COSY (Correlación Homonuclear) y NOESY (Espectroscopia del Efecto Nuclear Overhauser) estos dos últimos para la muestra SE27A1. Los experimentos se efectuaron utilizando las secuencias de pulso convencionales descritas en la literatura (Siverstein, 2007).

Análisis por Espectrometría de Masas

Se utilizó la técnica de impacto electrónico (EI⁺) a 70 eV, con una cantidad de muestra de 3 mg. Estos estudios se llevaron a cabo en el Instituto de Química en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Evaluación de la Actividad Biológica

Líneas Celulares

Se utilizaron las líneas cancerosas M12.C3.F6 (linfoma de células B murino), RAW (macrófago de murino transformado por el virus de la leucemia de Abelson), las cuales fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Emil R. Unanue (Departamento de Patología e Inmunología, Universidad de Washington en St. Luis, MO, USA). Las líneas celulares HeLa (carcinoma de cérvix humano), A-549 (carcinoma de pulmón humano), LS-180 (adenocarcinoma de colón humano), así como la línea celular utilizada como control normal L-929 (tejido conectivo subcutáneo), fueron adquiridas de American Type Culture Collection (ATCC, EUA). Los cultivos se mantuvieron en el medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado al 5% con suero fetal bovino (SFB) a una temperatura de 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y una humedad relativa de 80-90% en una incubadora Isotherm (Fisher Scientific, USA).

Preparación de los Extractos y Fracciones

Para determinar la actividad antiproliferativa se prepararon soluciones de cada uno de los extractos, fracciones y subfracciones obtenidos. Los sólidos se solubilizaron en dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.2%, concentración inocua para las células (Valencia, 2012) y se realizaron los ensayos de los extractos y fracciones a las concentraciones de 200, 100, 50 y 25 µg/mL y las

subfracciones a 50, 25, 12.5 y 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Para la preparación de las diluciones de los extractos, fracciones y subfracciones se partió de una solución patrón de 40 $\mu\text{g/mL}$ DMSO y posteriormente fueron disueltos con medio de cultivo. Se tomó como control negativo DMSO al 0.2% en DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino.

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa

Se utilizó el método de sales de tetrazolio (MTT) (Mosmann, 1983) con modificaciones (Hernández y col., 2007). Se prepararon suspensiones celulares a una concentración de 200,000 células/mL, y fueron incubadas en placas de 96 pozos de fondo plano (Costar, Corning, N.Y. USA) a 10,000 células/50 μL por pozo. Los cultivos celulares se incubaron por un periodo de 24 horas para la formación de la monocapa de células. Posteriormente se colocaron 50 μL de cada una de las soluciones de extractos, fracciones y subfracciones en presencia de diferentes concentraciones (0.0, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$) y se incubaron por 48 horas, para que las células pudieran incorporar los compuestos. Para cada concentración de las muestras a analizar se realizaron tres ensayos por triplicado.

Una vez transcurrido dicho tiempo de incubación, se añadieron 10 μL de la sal de MTT, se incubó por 4 horas y se adicionaron 100 μL de isopropanol ácido para disolver los cristales de formazán producidos y la absorbancia de la solución se leyó a 570 nm y 655 nm en un lector de ELISA (Multiskan EX, ThermoLabSystem) (Velázquez y col., 2007). El efecto antiproliferativo se expresó como IC_{50} (es decir, la concentración que induce la inhibición del 50% de la población celular).

Análisis del Mecanismo de Acción de los Compuestos Activos

Con el fin de establecer el mecanismo de acción mediante el cual el extracto

metanólico, la fracción hexánica y las subfracciones activas de hexano de *Argemone pleiacantha* ejercen su efecto antiproliferativo sobre la línea celular M12.C3F6, se realizaron distintas tinciones y la evaluación de la activación de las caspasas 3, 8 y 9 con Kits comerciales, que fueron analizadas por citometría de flujo, utilizando un equipo BD FACS Canto II.

Marcaje con Anexina V/Yoduro de Propidio

Suspensiones celulares de 100,000 células/mL fueron incubadas en placas de 6 pozos de fondo plano (Costar, Corning, N.Y. USA) (3×10^5 células por pozo, 3 mL) con la fracción S22 y R1S22 a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ por 12 h. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C, en una atmósfera de 5% de CO_2 y una humedad relativa de 80-90% en una incubadora Isotherm (Fisher Scientific, USA). Como control positivo de inducción de apoptosis se utilizó CAPE a una concentración de 3.75 μM . Una vez transcurrido el tiempo de inducción de apoptosis, las células fueron cosechadas con ayuda de un gendarme, posteriormente se lavaron dos veces con PBS frío (1700 rpm, 7 min, 4°C). El botón celular fue resuspendido en 50 μL de solución reguladora (binding buffer) que contenía anexina V a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ y altas concentraciones de calcio, lo que favorece la unión de la anexina V a la fosfatidilserina. Las células se incubaron 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 2.5 μL de yoduro de propidio con una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, obteniéndose una concentración final de tinción de 0.5 $\mu\text{g/mL}$. Las células fueron incubadas 10 minutos en la oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas 2 veces con solución reguladora (1700 rpm, 7 min, 4°C) y resuspendidas en 300 μL de ésta y analizadas por citometría de flujo de manera inmediata (Valencia, 2012).

Reducción del Potencial de Membrana Mitocondrial (Ψ_m)

Para evaluar la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, se utilizó el colorante lipofílico JC-1 (yoduro de 5,5',6, 6'-tetracloro-1,1',3, 3'-tetraetilbencimidazolcarbocianina), el cual es un molécula con autofluorescencia dual. Cuando se encuentra en forma de agregados (JC-agregados) fluoresce rojo (acumulado dentro de la mitocondria) y cuando se encuentra en forma de monómero (disuelto en el citosol) presenta un desplazamiento de su fluorescencia hacia al verde. Este desplazamiento en su fluorescencia está directamente asociado a la reducción del potencial de la membrana mitocondrial (Zamzami, 1995).

Se realizó una suspensión de 150,000 células por mL, de dicha suspensión se colocaron 3 mL por pozo (4.5×10^5 células/3mL), los cuales fueron colocados en placas de 6 pozos de fondo plano (Costar, Corning, N.Y. USA) e incubadas con extracto, fracciones y subfracciones a las concentraciones de (12.5, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$). Como control positivo se utilizó CAPE (7.5 μM). Las células fueron cosechadas y lavadas dos veces con PBS frío (1700 rpm, 7 minutos, 4°C). El botón celular se resuspendió en una solución de tinción (JC-1 10 $\mu\text{g/mL}$ en medio de cultivo), se mantuvo en incubación por 15 minutos a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO_2 y una humedad relativa de 80-90% en una incubadora Isotherm (Fisher Scientific, USA) (Valencia, 2012). Finalmente, se realizaron 2 lavados con medio de cultivo utilizando las mismas condiciones de centrifugación y las células fueron resuspendidas en 400 μL de D5F (DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino) para su análisis inmediato por citometría de flujo (Valencia, 2012).

Evaluación de la Actividad de las Caspasas

La evaluación de la activación de las caspasas 3, 8 y 9 se llevó a cabo utilizando Kits comerciales adquiridos en la compañía Abcam. Fluorescein

Active Caspase 3 Staining Kit, Fluorescein Active Caspase 8 Staining Kit y Fluorescein Active Caspase 9 Staining Kit fueron utilizados para la detección de la activación de cada una de estas proteínas respectivamente, siguiéndose las indicaciones del fabricante (Abcam®) con ligeras modificaciones (Valencia, 2012).

Las células fueron cultivadas en placas de 6 pozos con una densidad celular de 4.5×10^5 células por pozo en 3 mL medio, en presencia de los extractos, fracción, subfracción (50, 50 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente) por 48 h, utilizando CAPE (7.5 μM) como control positivo de inducción de activación. Posteriormente, las células fueron cosechadas y lavadas con D5F frío (dos veces), el botón celular se resuspendió en 300 μL de medio de cultivo y se adicionó 1 μL del inhibidor de caspasa (el cual se encuentra marcado con FITC, utilizando una dilución 1:20 del reactivo proporcionado en el kit comercial, FITC-DEVD-FMK, FITC-IETD-FMK, FITC-LEHD-FMK para caspasa 3, 8 y 9 respectivamente). Se incubaron 1 h a una temperatura de 37°C, 5% de CO_2 y una humedad relativa de 80-90% en una incubadora Isotherm (Fisher Scientific, USA). Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con 300 μL de buffer de lavado (proporcionado por la casa comercial). Para finalmente ser resuspendidas en 300 μL de este mismo para ser analizadas por citometría de flujo. Las células se mantuvieron en hielo hasta su análisis.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se hizo mediante análisis de varianza (ANOVA), se llevó a cabo una prueba de comparación de medias utilizando la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fraccionamiento del Extracto Metanólico

La planta seca de *Argemone pleiacantha* (847.7 g) fue molida y puesta en metanol obteniéndose una cantidad de 92.4 g de extracto metanólico crudo. Se apartó una cantidad de 17 g y el restante (75.4 g, 100%) fue sometido a lavados con los diferentes solventes y posteriormente se obtuvieron las fracciones primarias. En la Tabla VI se observan los rendimientos obtenidos para las distintas fracciones primarias.

Actividad Antiproliferativa de Extractos y Fracciones

Se realizaron ensayos antiproliferativos *in vitro* frente la línea celular M12.C3F6 y, posteriormente, las fracciones que resultaron con actividad fueron evaluadas con las líneas tumorales HeLa, RAW, A-549 y LS-180, así como la línea usada como control normal L-929. Esto debido a que desde 1999, el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos realiza y recomienda a otros laboratorios iniciar el tamizaje de un reducido panel de líneas celulares altamente sensibles y sólo evaluar con el panel amplio, los productos que muestren actividad a este nivel (León y col., 2006).

Para el análisis de los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antiproliferativa, se consideraron activos los extractos que presentaron una concentración mínima inhibitoria del 50% del crecimiento celular (IC_{50}) por debajo de la concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ frente alguna línea celular. Esto debido a los criterios del Instituto Nacional del Cáncer de los EUA, en cual considera que un extracto tiene actividad alta si la IC_{50} es $\leq 30 \mu\text{g/mL}$, media si es de 31-60 $\mu\text{g/mL}$ y baja si es de 61-99 $\mu\text{g/mL}$ (Moo-Puc, 2009).

Para evaluar la actividad antiproliferativa se usaron: el extracto metanólico y

Tabla VI. Porcentaje de rendimiento de extractos y fracciones de *A. pleiacantha*.

Extracto/Fracciones	Cantidad (g)	% Rendimiento
Metanol crudo	75.4	100
Hexano	6	8
Acetato de etilo	0.8	1
Etanol	40	53
Residual	28	37

las fracciones de hexano, acetato de etilo y etanol de *A. pleiakantha* sobre las distintas líneas celulares cancerosas de murino y de humano, así como frente a la línea celular normal (L-929). Cabe mencionar que la fracción residual no mostró actividad antiproliferativa sobre esta línea celular, por lo que no se muestran los datos de dicha fracción y fue descartada para continuar con los posteriores análisis. Los resultados obtenidos para la actividad antiproliferativa con los distintos tratamientos se muestran en la Tabla VII.

Los resultados obtenidos para la línea celular M12.C3F6 indican que la fracción más activa frente a esta línea es la de hexano, seguida de etanol, acetato de etilo, y por último el extracto crudo de metanol (Tabla VII). Todos ellos considerados con actividad alta. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la actividad antiproliferativa de los tratamientos con hexano y etanol. En cambio, el extracto metanólico mostró diferencias estadísticamente significativas tanto con la fracciones de hexano como con la de etanol.

Por otro lado, la actividad presentada por los diferentes tratamientos frente a la línea de cáncer de macrófago (RAW), tienen una tendencia muy similar a los datos mostrados por la línea M12.C3F6. El orden de la actividad fue hexano>acetato de etilo>etanol>metanol. Siendo todos los anteriores considerados altamente activos frente a esta línea. Mientras que el análisis estadístico nos indica que no existe diferencias estadísticamente significativas entre la actividad producida por metanol y etanol.

Por otra parte, observamos que el efecto mostrado por los distintos tratamientos frente a las líneas celulares de humano requiere una mayor concentración para causar la inhibición del 50% de la proliferación con respecto a las líneas celulares de murino. La fracción de acetato de etilo mostró la mayor actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares HeLa y LS-180, seguido

Tabla VII. Resultados de IC₅₀ (µg/mL) para los extractos y fracciones de *A. pleiakantha* contra las diferente líneas analizadas.

	IC ₅₀ (µg/mL)						
	Líneas celulares murinas			Líneas celulares humanas			
	M12.C3F6	L-929	RAW	HeLa	LS-180	A-549	
Metanol	28.0 ± 5.7 ^A	53.9 ± 0.6 ^B	30.2 ± 5.6 ^A	36.5 ± 4.7 ^B	44.7 ± 5.3 ^B	117.8 ± 5.4 ^B	
Hexano	3.2 ± 1.3 ^B	90.5 ± 3.7 ^A	1.7 ± 0.5 ^B	4.3 ± 0.3 ^C	35.7 ± 2.3 ^B	141.3 ± 8.2 ^A	
Acetato de etilo	< 6.2 ^{**}	33.2 ± 3.3 ^C	< 6.2 [*]	3.5 ± 0.4 ^C	22.6 ± 0.2 ^{BC}	34.8 ± 0.3 ^C	
Etanol	5.5 ± 1.3 ^B	> 200 ^{**}	28.3 ± 4.9 ^A	169.5 ± 4.3 ^A	70.5 ± 8.1 ^A	> 200 ^{***}	

La tabla representa los valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. Valores con letra distinta dentro de una misma columna son estadísticamente diferentes con una $p \leq 0.05$. ^{**}Concentración mínima analizada para la fracción de acetato de etilo en M12.C3F6 y RAW. ^{***}Concentración máxima analizada para la fracción de etanol en A-549.

de la fracción de hexano y metanol. Sin embargo, el análisis estadístico no refleja diferencias significativas entre las fracciones de acetato de etilo y hexano frente a las líneas celulares HeLa y LS-180.

Por otro lado, se puede observar que no hubo efecto sobre la proliferación de las líneas celulares humanas con la fracción etanólica. De manera general, el orden de la actividad antiproliferativa presentada por los distintos tratamientos frente a las líneas celulares analizadas fue: acetato de etilo>hexano>metanol>etanol. Es importante mencionar que la línea celular de adenocarcinoma de pulmón (A-549) mostró una resistencia a los diferentes tratamientos, con excepción de la fracción de acetato de etilo.

Estudios realizados en la región de Uttar, Pradesh, India, se ha reportado el uso del extracto etanólico de *Argemone mexicana* con efecto citotóxico a la concentración de 100 µg/mL frente a las líneas celulares humanas A-549 y 502713 HT-29 (cáncer de colón) mostrando un 83% y 100% de inhibición del crecimiento, respectivamente (Satish y col., 2010). Haciendo un análisis comparativo de los resultados anteriores con los obtenidos de *A. pleiacantha* podemos observar que la actividad de estas especies es distinta para A-549, ya que la fracción de etanol presentó un IC₅₀ mayor a 200 µg/mL y sólo la fracción de acetato presentó actividad sobre esta línea, por lo que posiblemente los compuestos responsables de la actividad sean distintos entre estas especies del género *Argemone*.

Con base en los resultados presentados por las fracciones se decidió analizar las fracciones de hexano y etanol para posteriores análisis de aislamiento y caracterización de compuestos, ya que éstas presentaron una actividad más selectiva sobre las líneas tumorales y no así sobre la línea usada como control normal.

Fraccionamiento y Selección de Subfracciones Activas

Fracción Hexánica

A partir de 3.8 gramos de muestra de la fracción hexánica de *A. pleiakantha* (Figura 4), se obtuvieron 173 fracciones eluidas en cromatografía en columna con un volumen de 200 mL cada una, las cuales se compararon mediante cromatografía en capa fina, para juntar aquellas con bandas similares dando como resultado un conjunto de 34 subfracciones.

Se analizó la actividad antiproliferativa de los 34 conjuntos de fracciones obtenidas a la concentración de 50 µg/mL (Figura 5) sobre la línea celular M12.C3F6. Se seleccionaron aquéllas que presentaban mejor actividad y éstas se probaron a una concentración más baja (25 µg/mL) en la misma línea celular (Figura 6), encontrando 5 subfracciones activas (19, 20, 21, 22 y 25).

Para determinar con cual subfracción se continuarían los estudios biológicos y de caracterización, se realizó una tercera selección de las subfracciones que resultaron activas a 25 µg/mL, basados en dos aspectos: a) la cantidad de muestra obtenida y b) en base al número de bandas reveladas por lámpara de UV ($\lambda = 254$ y a 365 nm) en cromatografía en capa fina. Con base en los dos aspectos anteriores se seleccionó a la subfracción 22 (S22), la cual fue extraída en cromatografía en columna con una fase móvil de hexano/acetato de etilo 7:3-6:4 que corresponde a las fracciones eluidas de la 94 a la 105 y misma que presentó una sola banda bajo el UV ($\lambda = 254$ y a 365 nm) de color rojo en un sistema de solventes de hexano/acetato de etilo 7:3 en cromatografía en capa fina, la fluorescencia roja bajo UV nos dice que muy probablemente se trate de la existencia de clorofilas en la muestra (Kingsley, 1989). Debido a lo anterior se seleccionó para sus posteriores análisis estructurales y de actividad biológica.

MATERIAL VEGETAL

Parte aérea de *Argemone pleiacantha*



Extracto Crudo

Extracción

Fracciones primarias

Hexano* AcOEt* Etanol* Residual

Cromatografía Columna

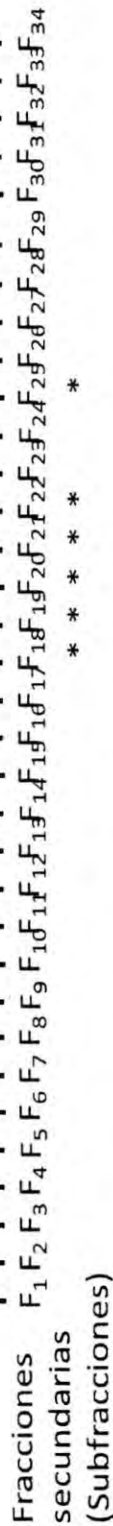


Figura 4. Procedimiento de fraccionamiento de la fracción de hexano de *Argemone pleiacantha*. * Fracciones con actividad biológica.

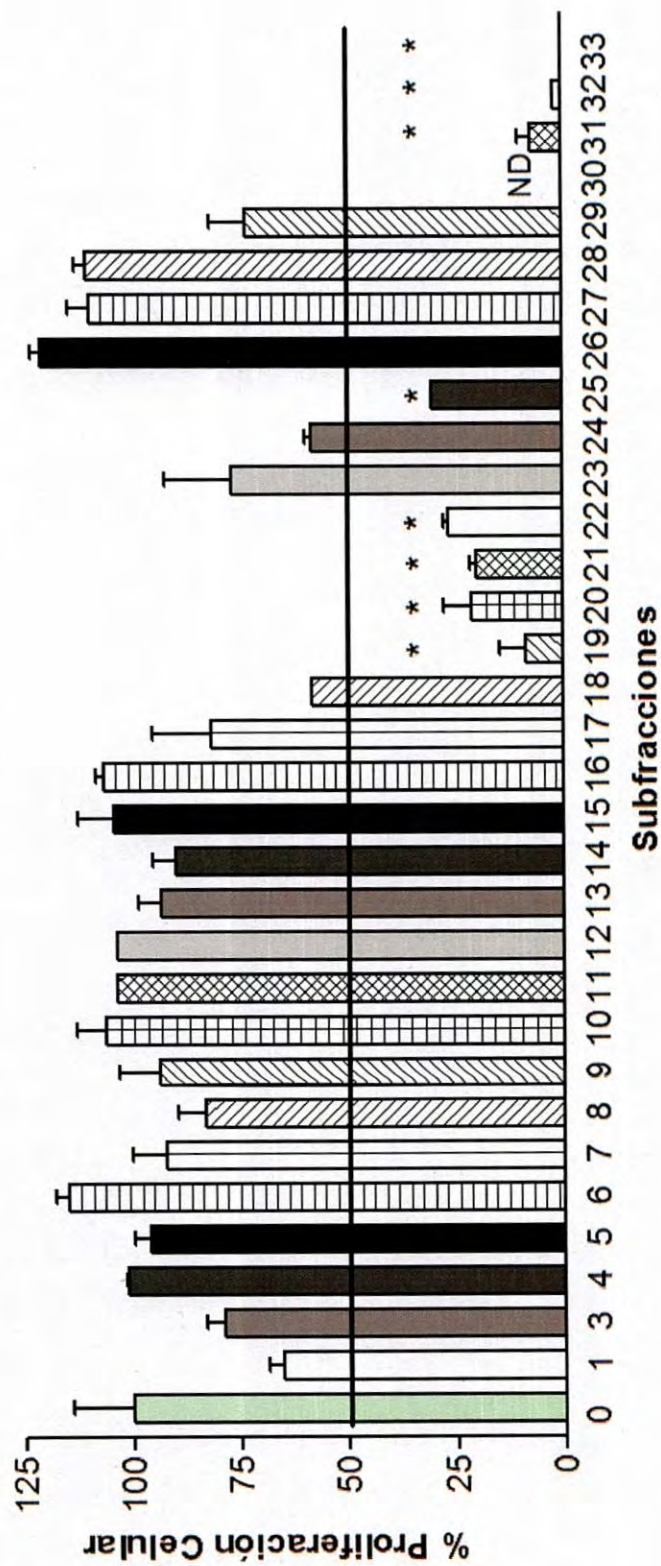


Figura 5. Actividad antiproliferativa de las 34 subfracciones a una concentración de 50 µg/mL, separadas mediante cromatografía en columna de la fracción de hexano de *Argemone pleiacantha* frente a la línea celular cancerosa M12.C3F6. Los resultados representan un ensayo por duplicado. * Subfracciones activas. ND no determinado.

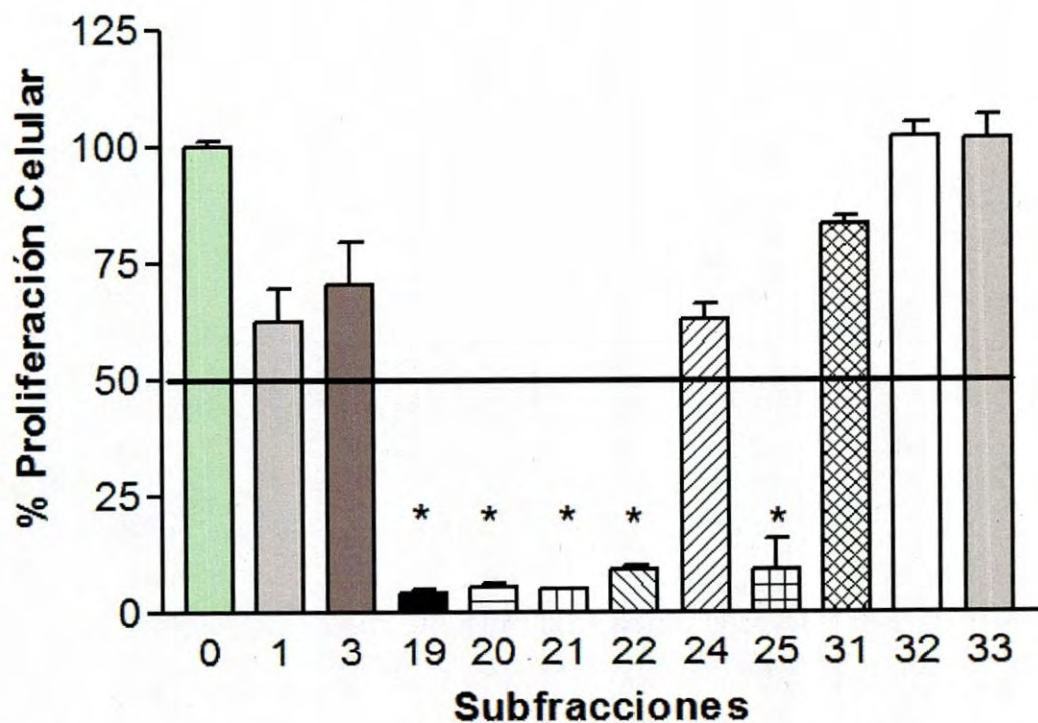


Figura 6. Actividad antiproliferativa de las subfracciones activas a una concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, separadas mediante cromatografía en columna de la fracción de hexano de *Argemone pleiacantha* frente a la línea celular cancerosa M12.C3F6. * Subfracciones activas.

Fracción Etanólica

La separación de los compuestos presentes en la fracción de etanol se realizó como lo muestra la Figura 7. A partir de 6 gramos de muestra de la fracción etanólica de *A. pleiacantha*, se obtuvieron 255 fracciones de 200 mL cada una, en la cromatografía en columna, las cuales tenían una polaridad creciente. Estas 255 fracciones obtenidas se compararon mediante cromatografía en capa fina para juntar aquéllas con bandas similares, dando como resultado un conjunto de 32 subfracciones.

A los 32 conjuntos de fracciones obtenidos se les probó la actividad antiproliferativa a las concentraciones de 50 µg/mL (Figura 8) sobre la línea celular M12.C3F6. Se seleccionaron aquellas que presentaban mejor actividad y para hacer un segundo proceso de selección se probaron a una concentración más baja (25 µg/mL) en la misma línea celular (Figura 9), en este punto sobresalieron 3 subfracciones (3, 18 y 27).

De estas 3 subfracciones activas se seleccionó la subfracción 27 (SE27), la cual fue extraída con una fase móvil de acetato de etilo/metanol 6:4 que corresponde a las fracciones de la 209 a la 214 y que presentó dos bandas bajo el UV ($\lambda = 254$ y a 365 nm) de color amarillo y azul en un sistema de solventes de acetato de etilo/metanol 8:2 y la cual dio positiva a la prueba de Dragendorff, para alcaloides.

La subfracción SE27 mantuvo constante su actividad antiproliferativa, tanto a la concentración de 50 µg/mL como a 25 µg/mL. Las otras subfracciones que mostraban una alta actividad a la mayor concentración analizada, perdieron dicha actividad al ser probadas a una concentración más baja (25 µg/mL) resultando con una proliferación mayor al 50%. Debido a lo anterior se seleccionó SE27 para su posterior análisis estructural.

MATERIAL VEGETAL

Parte aérea de *Argemone pleiacantha*



Extracto Crudo

Extracción

Fracciones primarias

42

Hexano* AcOEt* Etanol* Residual

Cromatografía Columna



Figura 7. Procedimiento de fraccionamiento de la fracción de etanol de *Argemone pleiacantha*. * Fracciones con actividad biológica.

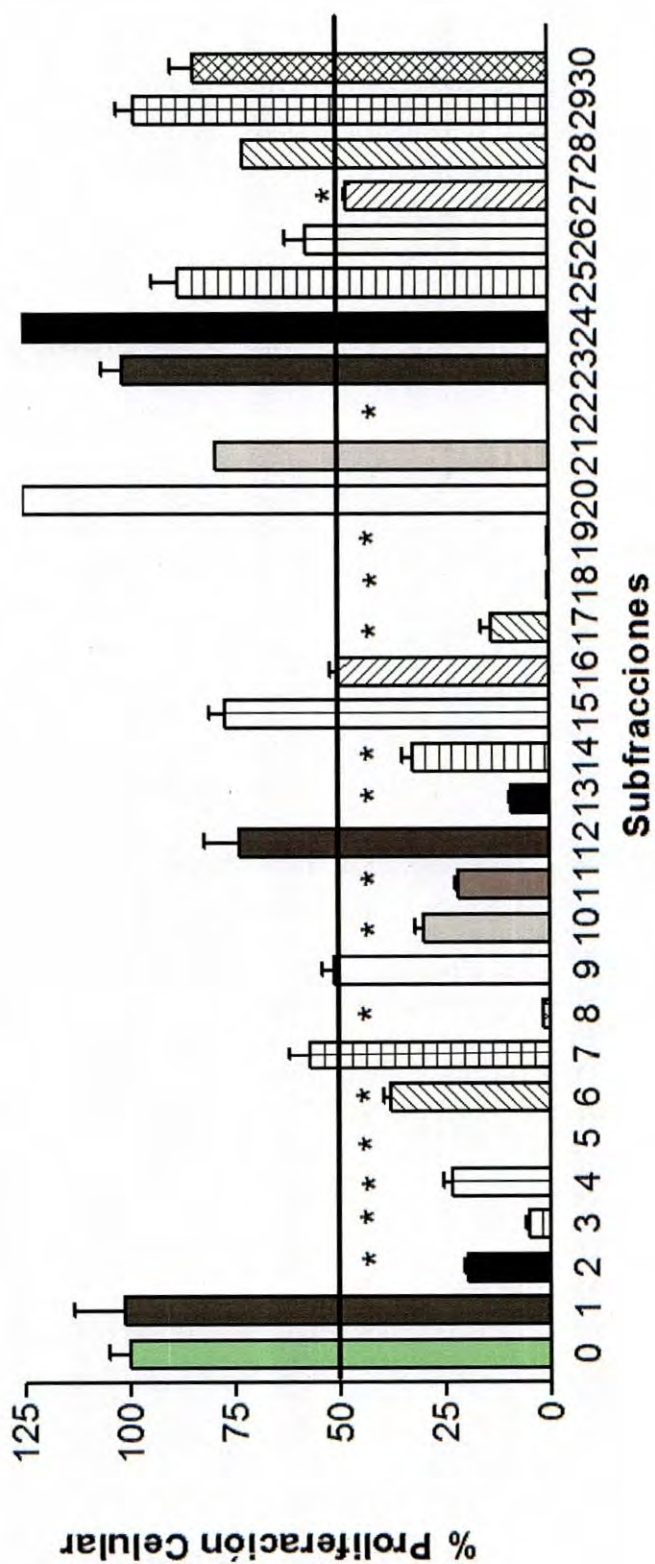


Figura 8. Actividad antiproliferativa de las subfracciones a una concentración de 50 µg/mL, separadas mediante cromatografía en columna de la fracción de etanol de *Argemone pleiacantha* frente a la línea celular cancerosa M12.C3F6. Los resultados representan un ensayo por duplicado. * Subfracciones activas.

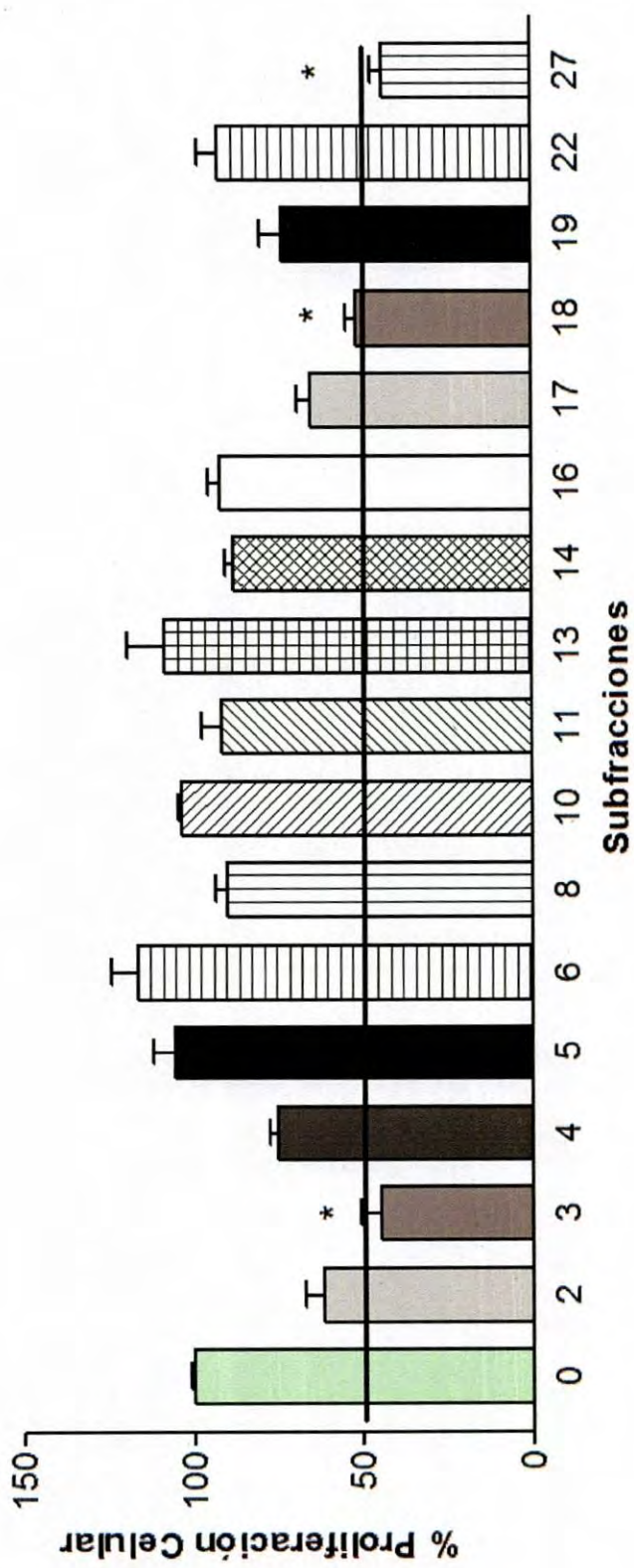


Figura 9. Actividad antiproliferativa de las subfracciones activas a una concentración de 25 µg/mL, separadas mediante cromatografía en columna de la fracción de etanol de *A. pleiakantha* frente a la línea celular cancerosa M12.C3F6. Los resultados representan un ensayo por triplicado. * Subfracciones activas.

Efecto de las Subfracciones Activas en Líneas TumORAles

Subfracción S22

Se analizó la actividad antiproliferativa de las subfracciones obtenidas por cromatografía en columna de la fracción de hexano y se encontró que cinco de las subfracciones (19, 20, 21, 22 y 25) mostraron valores de IC_{50} menor a 6 $\mu\text{g/mL}$. Basados en los aspectos de selección anteriormente mencionados se optó por la subfracción S22, ya que presentó una sola banda bajo la luz UV en cromatografía en capa fina y se disponía de una cantidad 74.6 mg. Esta subfracción se analizó frente a las líneas RAW, HeLa, LS-180, A-549 y L-929 (Tabla VIII).

En la evaluación de la actividad antiproliferativa de S22 sobre la línea celular normal de tejido conectivo subcutáneo (L-929), se observó que la concentración requerida para lograr el IC_{50} es menor con respecto a la concentración presentada por la fracción hexánica sobre esta misma línea. Sin embargo, la concentración requerida de S22 para generar el 50% de inhibición de la proliferación sobre las líneas HeLa, LS-180, RAW y M12.C3F6 es mucho menor con respecto a la línea control. Por lo que aun se puede considerar como un prometedor agente anticancerígeno selectivo.

Subfracción SE27

Haciendo un análisis de los resultados obtenidos para SE27, que corresponde a la fracción activa obtenida de la fracción etanólica, se puede considerar con actividad baja frente a la línea L-929, ya que mostró una IC_{50} de $73.5 \pm 5 \mu\text{g/mL}$. Actividad media frente al cáncer de macrófago (RAW) y altamente activa frente a las líneas HeLa y M12.C3F6. Comparando estos resultados con los de la fracción de etanol, se nota un aumento la actividad sobre L-929 de un IC_{50} mayor a 200 $\mu\text{g/mL}$ (etanol) a $53.6 \pm 4.2 \mu\text{g/mL}$ (SE27), en RAW se dio una

Tabla VIII. Efecto antiproliferativo de las subfracciones activas S22 y SE27 en diferentes líneas tumorales.

	IC ₅₀	
	S22	SE27
M12.C3F6	< 1.5**	19.8 ± 2
L-929	53.6 ± 4.2 ^B	73.5 ± 5 ^A
RAW 264.7	0.7 ± 0.2 ^B	49.9 ± 8.2 ^A
HeLa	< 1.5**	2.2 ± 0.2
LS-180	3.7 ± 1	ND
A-549	69.7 ± 1.6	ND

*Los valores de IC₅₀ se muestran en µg/mL. Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. Valores con letra distinta dentro de una misma fila son estadísticamente diferentes con una $p \leq 0.05$. ND es no determinado. ** Concentración mínima probada para S22 en M12.C3F6 y en HeLa.

disminución de la actividad de un IC_{50} de 28.3 ± 4.9 $\mu\text{g/mL}$ (etanol) a 49.9 ± 8.2 $\mu\text{g/mL}$ (SE27), mientras que la actividad se mantuvo para M12.C3F6. Sin embargo, SE27 presentó una actividad alta frente HeLa, que no se ve inhibida por la fracción de etanol.

En un estudio realizado en Bogotá, Colombia (Léon y col., 2006) se llevó a cabo un perfil de sensibilidad a los fármacos antineoplásicos doxorubicina HCl, taxol, cisplatino, ciclofosfamida y carmustina en siete líneas celulares (HeLa, MKN-45, MCF-7, SiHa, U-937, HEp-2 y HT-29), mediante la valoración de la citotoxicidad por el método de MTT. Se encontró que la línea celular HeLa fue una de las más resistentes a los agentes antineoplásicos doxorubicina (1.63 ± 0.35 μM), taxol (9.9 ± 1.7 μM) y cisplatino (15.9 ± 5.6). Esto brinda más importancia a la identificación de los compuestos presentes en la subfracción SE27, que mostró gran actividad antiproliferativa sobre esta línea celular.

En el estudio realizado por Becerra, 2011, se reporta la actividad de algunos fármacos anticancerígenos (doxorubicina, 5 fluoracilo y colchicina) sobre las líneas celulares M12.C3F6, RAW, HeLa, A-549, LS-180 y L-929. Con base en ese estudio la subfracción S22 mostró una actividad similar a la presentada por los fármacos doxorubicina y 5-fluoracilo sobre la línea celular de cáncer de macrófago (RAW), para los cuales se reporta un IC_{50} de 0.8 ± 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 0.6 ± 0.1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente y que son muy similares a la actividad reportada para S22 sobre esta línea ($IC_{50} = 0.7 \pm 0.2$ $\mu\text{g/mL}$). Además, se reporta que doxorubicina muestra una IC_{50} de 2.3 ± 0.3 ($\mu\text{g/mL}$) frente a la línea celular HeLa. Este valor es muy similar a los resultados de IC_{50} que mostraron S22 y SE27, sobre esta línea celular, los cuales fueron de <1 y 2.25 ± 0.2 ($\mu\text{g/mL}$), respectivamente. Por lo anterior, los compuestos presentes en dichas fracciones pueden ser un punto de partida para el tratamiento de este tipo de cáncer en un futuro.

La evaluación de la actividad *in vitro* sigue siendo una herramienta válida y

útil en las primeras etapas de selección de compuestos promisorios (Alzamora y col., 2007). Por lo que el siguiente paso en el presente trabajo fue la identificación de los compuestos presentes en SE27 y S22.

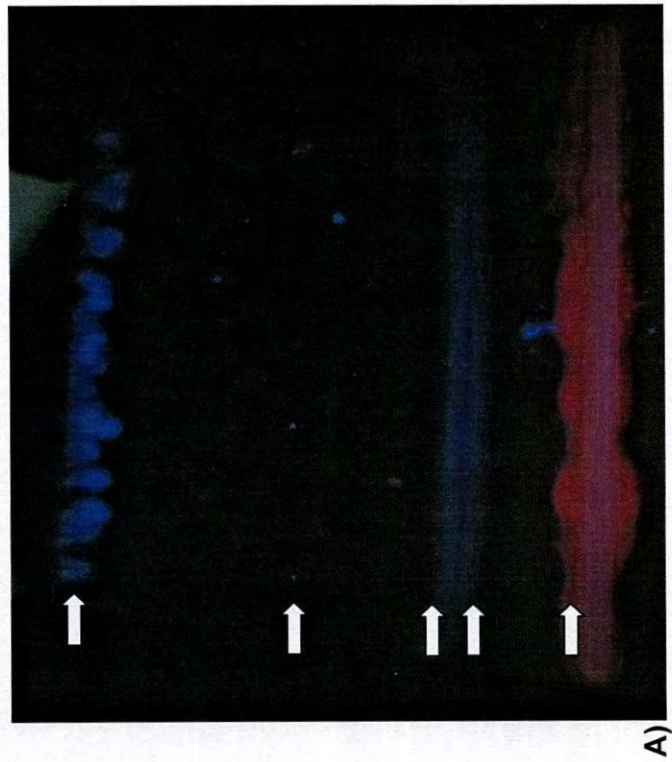
Cromatografía en Placa Preparativa de las Subfracciones Activas S22 y SE27 de *A. pleiacantha*

Después de la evaluación de la actividad antiproliferativa de las subfracciones activas S22 y SE27, estas fueron sometidas a cromatografía en placa preparativa de sílica gel para la separación de sus constituyentes.

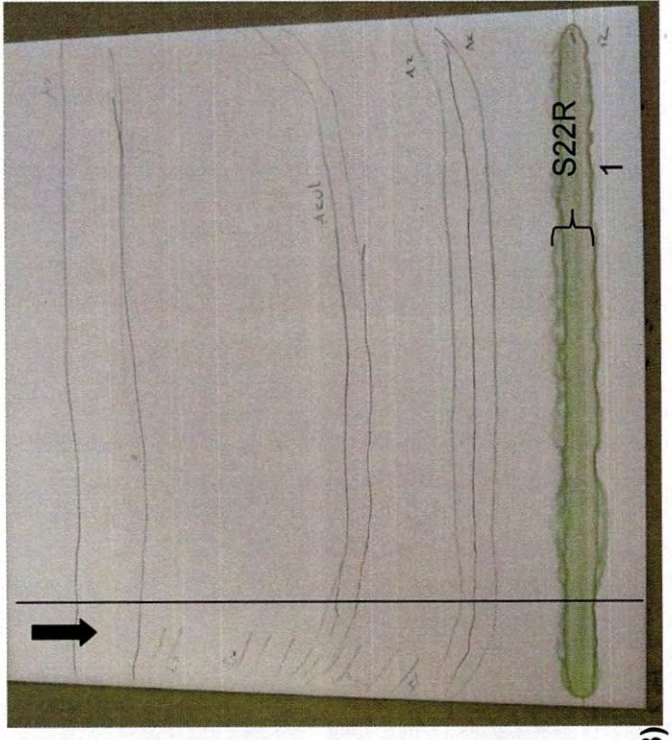
Subfracción S22

La subfracción activa S22 (34 mg) se fraccionó en cromatografía en placa preparativa con sílica gel como fase estacionaria y con fase móvil de hexano/acetato de etilo 9:1. Se escogió esta fase para quitar los compuestos de baja polaridad presentes en esta fracción. Se obtuvieron nueve subfracciones, de las cuales 5 fueron reveladas con lámpara de UV a una longitud de onda de 365 nm. De estas 5 subfracciones, 4 presentaron fluorescencia azul bajo la luz UV y sólo una presentó fluorescencia roja bajo el UV. Las otras cuatro restantes fueron reveladas con vapores de yodo en un área determinada de la placa. En la Figura 10 se muestra el resultado de la cromatografía en placa preparativa.

Esta diferenciación de identificación de bandas se debe a las características particulares que muestra cada compuesto presente en dicha banda. Las bandas reveladas con vapores de yodo denota la presencia de compuestos con dobles enlaces. Por otra parte, según Connors, 1981, para que una molécula presente fluorescencia debe, ante todo, absorber radiación. Puesto que la fluorescencia es emisión por retorno, desde el singulete excitado de energía más baja hasta el singulete fundamental, esto significa que aquellos compuestos cuyo singulete excitado inferior es un estado $\pi \rightarrow \pi^*$ tienen mayor probabilidad de presentar fluorescencia que aquellas cuyo singulete excitado inferior es un estado $n \rightarrow \pi^*$.



A)



B)

Figura 10. Cromatografía en placa preparativa de la subfracción S22 en un sistema de solventes hexano/acetato de etilo 9:1. (A) Cuatro bandas observadas bajo Luz UV a $\lambda=365$ nm, (B) Todas las bandas obtenidas bajo luz visible, la flecha indica la región de la placa donde fue revelada con vapores de yodo.

Por ejemplo, el benceno es fluorescente, mientras que la piridina no.

Posteriormente se seleccionó la banda de mayor polaridad y que corresponde a la banda que quedó en el punto de aplicación y que se denominó S22R1 (18 mg), misma que exhibía fluorescencia roja en solución con acetato de etilo, la cual puede deberse a la presencia de clorofilas en la muestra. Esta fracción fue seleccionada para posteriores análisis de actividad e identificación de compuestos, debido a que la mayoría de las bandas se desplazaron con la fase móvil (hexano/acetato de etilo 9:1) es muy probable que se traten de compuestos poco polares como algún tipo de cera y de los cuales no se obtuvo una cantidad suficiente para realizar los análisis posteriores.

Subfracción SE27

Para purificar la subfracción SE27 (123 mg), la cual dio positiva a la prueba de Dragendorff, se le realizó una placa preparativa utilizando sílica gel como fase estacionaria y como fase móvil un sistema de solventes polares (metanol/agua destilada 1:1), ya que esta fase ha sido reportada como útil en la separación de algunos alcaloides (Al-Hayyan, 2006).

Como resultado se obtuvieron cuatro bandas, de las cuales tres exhibían fluorescencia amarilla bajo UV a $\lambda = 365$ nm y la cuarta banda fluorescencia azul. Estas bandas fueron reveladas con el reactivo de Dragendorff y el revelador de sulfato cérico en una parte exclusiva de la placa. Los resultados para la cromatografía en placa preparativa de SE27 se muestran en la Figura 11. Las tres bandas con fluorescencia amarilla dieron positiva la prueba de Dragendorff. Dichas fracciones fueron raspadas y extraídas con metanol, los filtrados fueron concentrados en un rotavapor.

Se seleccionaron dos bandas que dieron positiva la prueba presuntiva para alcaloides, la banda SE27A1 (punto de aplicación) y la SE27A3. La banda SE27A2 se descartó por que en esta banda se observó mezcla de las bandas

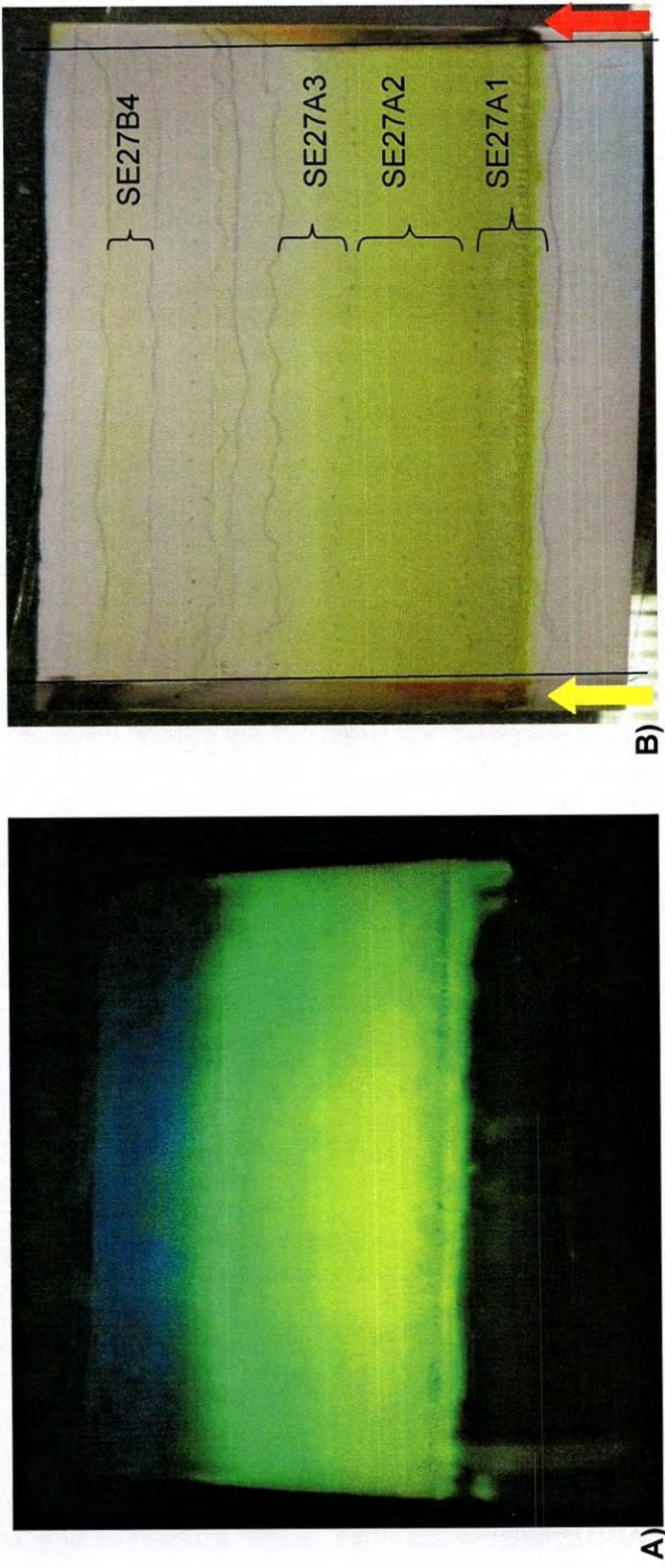


Figura 11. Cromatografía en placa preparativa de la subfracción SE27 en un sistema de solventes metanol/agua destilada 1:1. (A) Bandas observadas bajo luz UV a $\lambda=365$ nm, (B) Bandas obtenidas bajo luz visible de SE27. La flecha amarilla indica la región de la placa donde fue revelada con vapores de sulfato sérico y la flecha roja indica la región revelada con reactivo de Dragendorff.

anteriormente mencionadas. La banda cuatro fue descartada ya que dio negativa la prueba de Dragendorff.

Posteriormente a las subfracciones seleccionadas (SE27A1 y SE27A3) se les evaluó la actividad antiproliferativa, para seleccionar la más activa y posteriormente identificar los principios activos presentes en dichas subfracciones.

Evaluación de la Actividad Biológica de las Subfracciones S22R1, SE27A1 y SE27A3 Obtenidas en Cromatografía en Placa Preparativa

Las subfracciones obtenidas por cromatografía en placa preparativa fueron evaluadas frente a la línea celular tumoral M12.C3F6 y la línea control normal L-929 (Tabla IX), con el fin de seleccionar las subfracciones con mayor actividad para su posterior análisis.

Como se puede ver en los resultados mostrados en la Tabla IX, la subfracción que presentó mayor actividad antiproliferativa sobre la línea tumoral analizada fue S22R1, seguida de SE27A1 y por último SE27A3. Mientras que los resultados de las subfracciones cromatográficas sobre L-929 indican que la subfracción con menor actividad sobre la línea control fue SE27A1.

En resultados del fraccionamiento biodirigido para ambas fracciones se puede observar la forma en que ha ido variando la actividad biológica con respecto al fraccionamiento cromatográfico. Para la subfracción S22R1 la actividad sobre L-929 ha ido aumentando desde $90.5 \pm 3.7 \mu\text{g/mL}$ (hexano), $53.6 \pm 4.2 \mu\text{g/mL}$ (S22) hasta $29.8 \pm 8.2 \mu\text{g/mL}$ (S22R1). Sin embargo, los resultados de la actividad para SE27 sobre la línea control se han mantenido constantes con respecto al fraccionamiento, ya que ésta solo afecta la proliferación celular a concentraciones elevadas (IC_{50} mayores de $70 \mu\text{g/mL}$).

Tabla IX. Resultados de IC₅₀ (µg/mL) para las subfracciones extraídas de cromatografía en placa preparativa de *A. pleiakantha* contra las líneas M12.C3F6 y L-929.

Subfracciones terciarias	IC ₅₀	
	M12.C3F6	L-929
S22R1	14.8 ± 2.2 ^A	29.8 ± 8.2 ^B
SE27-A1	15.3 ± 3.3 ^A	124.0 ± 1.8 ^A
SE27-A3	20.7 ± 5.6 ^A	ND

Los valores de IC₅₀ se muestran en µg/mL. Valores promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. Valores con letra distinta dentro de una misma columna son estadísticamente diferentes con una $p \leq 0.05$. ND es no determinado.

Por otro lado, el comportamiento antiproliferativo de las subfracciones SE27 y S22 sobre la línea celular cancerosa M12.C3F6, ha presentado disminución leve de la actividad antiproliferativa para ambas subfracciones desde las fracciones primarias. Esto puede deberse a que los constituyentes presentes en dichas subfracciones ejerzan un efecto sinérgico.

Identificación de los Compuestos Químicos de la Subfracción S22R1

La identificación de los compuestos presentes en S22R1 se llevó a cabo por medio de técnicas como espectroscopia de infrarrojo, resonancia magnética de protón (RMN ^1H) y de carbono (RMN ^{13}C), así como espectroscopia de masas.

Análisis por infrarrojo

La absorción infrarroja de las moléculas presentes en la subfracción S22R1 (Figura 12), presentó bandas en la región 3456.5 cm^{-1} que indica la presencia de grupos OH (Silverstein, 2007). La absorción a 2925.4 cm^{-1} y 2854.4 cm^{-1} corresponde a bandas de estiramientos C-H de CH_3 y CH_2 respectivamente (Silverstein, 2007). La absorción de 1021.70 cm^{-1} se puede asignar a bandas de estiramientos C-O (Silverstein, 2007).

Según Brahmachari y col., 2010, las bandas de absorción a 2918 cm^{-1} y 2853 cm^{-1} corresponden a estiramientos C-H; mientras que las señales a 1470 cm^{-1} y 1380 cm^{-1} corresponde a CH_3 asimétricos y a la flexión simétrica de C-grupo metilo, respectivamente. Lo anterior concuerda con las bandas de absorción presentadas por S22R1 para los estiramientos C-H y las bandas en la región de 1436.50 y 1376.92 cm^{-1} . Las señales observadas en la región de 1739.69 cm^{-1} se puede asignar a estiramientos C=O (Silverstein, 2007).

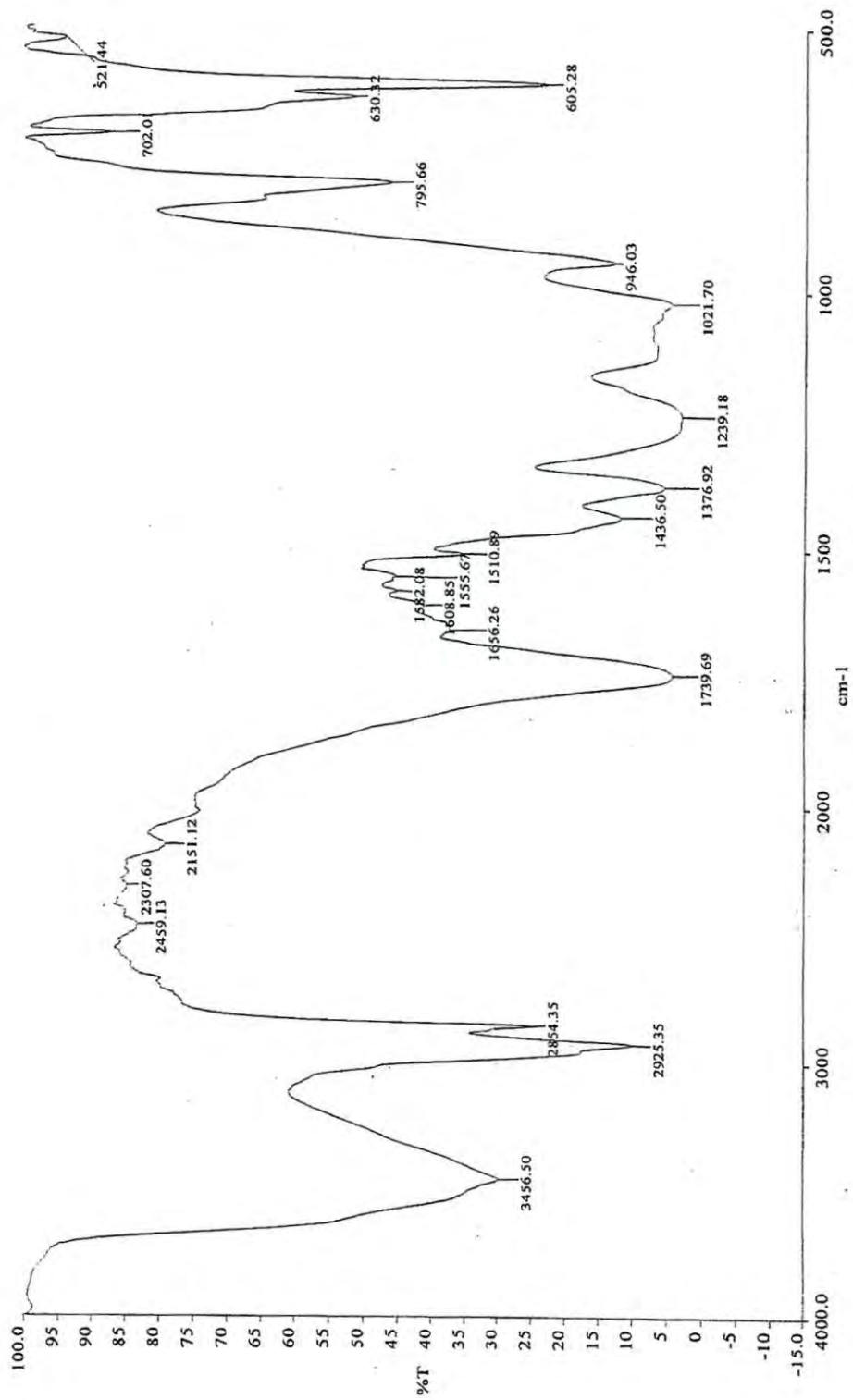


Figura 12. Espectro de infrarrojo de la subfracción S22R1 (hexano/acetato de etilo 9:1) obtenida de la fracción hexánica de *A. pleiakantha*.

Análisis por IE-MS

Debido a las cantidades obtenidas de S22R1 (18 mg) no se logró realizar mayores estudios en su estructura. En el espectro de masas (EI-MS) obtenido para S22 (Figura 13), se puede observar un patrón de fragmentación correspondiente a estructuras lineales, ya que se detecta la pérdida de una gran cantidad de fragmentos que corresponden a grupos CH_2 .

De acuerdo con la información obtenida del IR sobre las bandas de absorción presentes en la subfracción S22R1 y con ayuda del espectro de masas obtenido de la S22 se puede destacar la presencia de bandas relacionadas con una estructura molecular larga, indicando un hidrocarburo alifático saturado de cadena larga que contenga grupos OH, e incluso se puede tener la presencia de ésteres o acetales debido a la presencia de la banda a 1740 cm^{-1} en el IR de S22R1. Con esto podemos concluir que el fraccionamiento por cromatografía en placa preparativa no fue suficiente para obtener la muestra S22R1 pura.

Análisis de RMN

En el espectro de RMN de ^{13}C para S22R1 (Figura 14) podemos observar señales en la región de campo alto que corresponde a carbonos de tipo alifático, también se observan señales entre 100 y 120 ppm que pueden corresponder a señales $\text{C}=\text{C}$ y por último se muestra una señal a 170 ppm que puede corresponder a un carbono de grupo éster, los que concuerda perfectamente con las señales obtenidas en el espectro de IR de S22R1.

El espectro de RMN de ^1H de la subfracción S22R1 (datos no mostrados) presentó señales en la región de campo alto principalmente a 0.88, 1.3, 1.5, 3.3 y entre 3.5 y 3.6, ppm (partes por millón), respectivamente. Estas señales corresponden a compuestos tipo alifáticos. Se ha reportado que las señales a 0.88 ppm corresponde a los desplazamientos químicos de grupos metilos y los

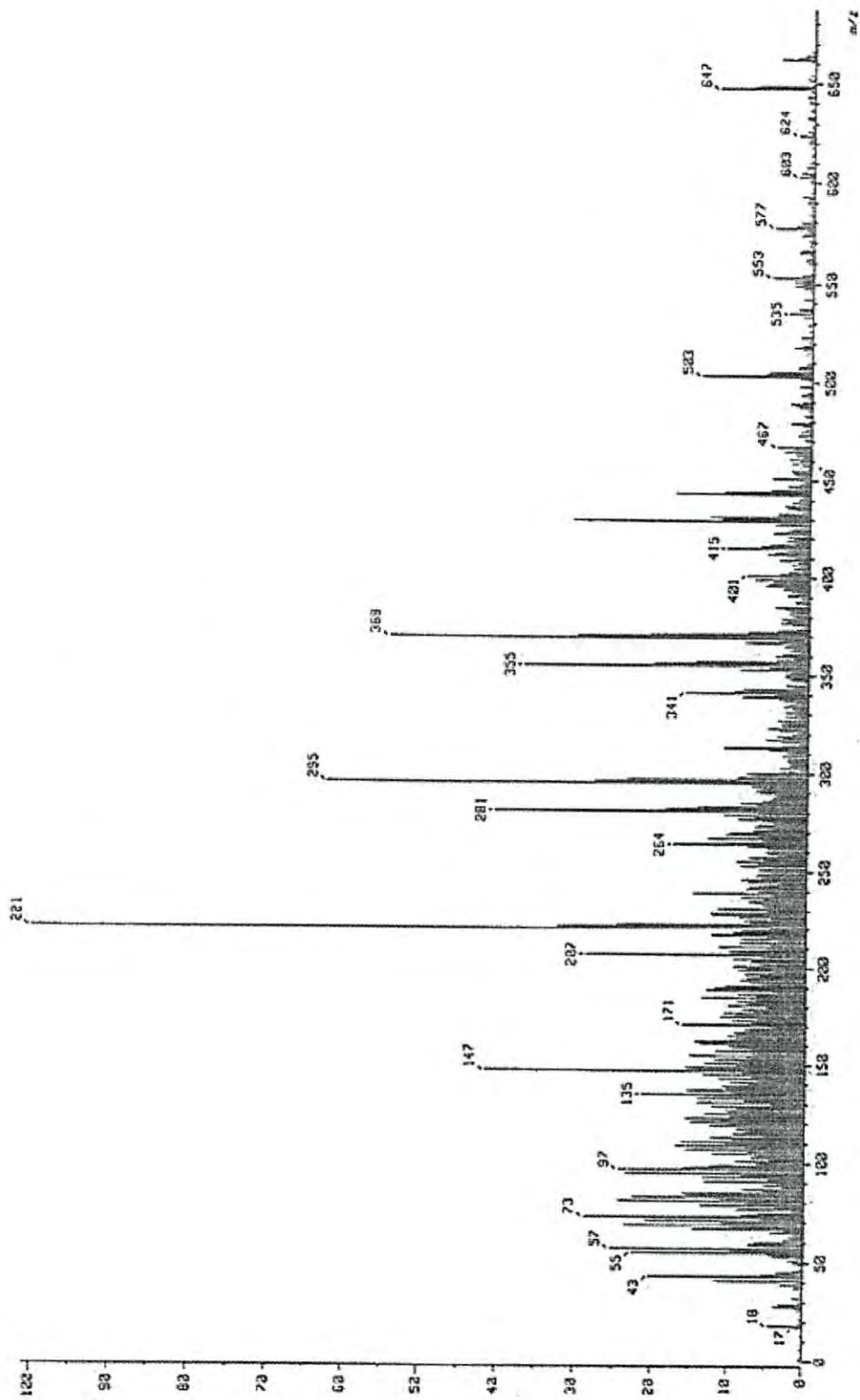


Figura 13. Espectro de EI-MS de la subfracción S22 obtenida de la fracción hexánica de *A. pleiathantha*.

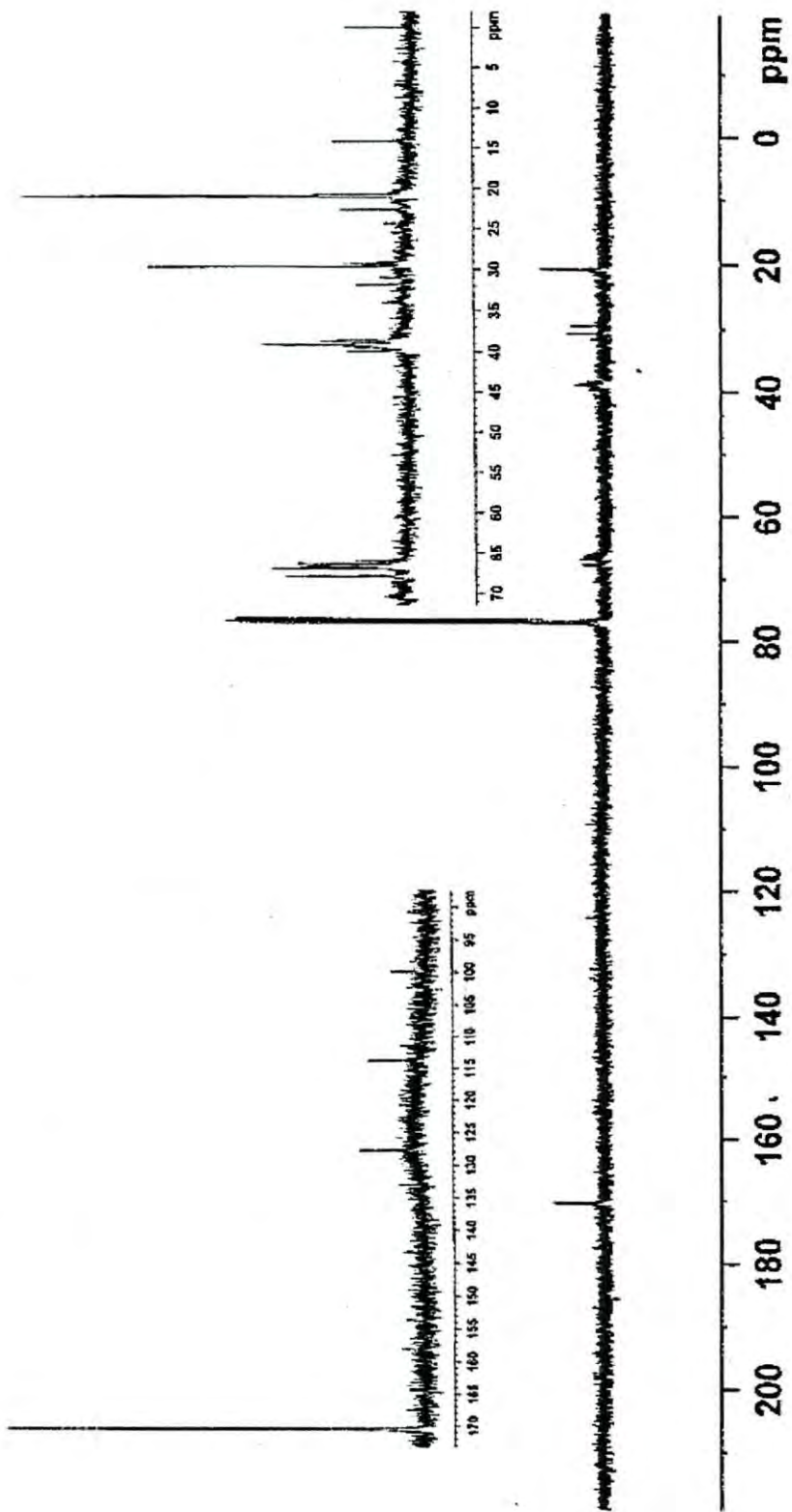


Figura 14. Espectro de RMN ^{13}C de la subfracción S22R1 (hexano/acetato de etilo 9:1) en CDCl₃, extraída de la fracción de hexano de *A. pleiacantha*.

desplazamientos en la región de 1.25 ppm pueden corresponder a grupos CH₂ (Brahmachari y col., 2010).

Brahmachari y col., 2010, reportaron la presencia de un alcanodiol en los pétalos de las flores de *Argemone mexicana*. También se ha reportado el aislamiento y caracterización del 11-triacontanol de las partes aéreas de esta especie (Ballini y col., 2005). Estas estructuras concuerdan con los desplazamientos de RMN ¹³C generados por S22R1, por lo que se decidió comparar los desplazamientos generados de estos dos compuestos con los de S22R1, obteniendo que todas las señales generadas del 11-triacontanol se encuentren presentes en S22R1. Sin embargo, se tiene la presencia de otro tipo de compuestos en dicha subfracción, ya que ésta presentaba fluorescencia de color rojo bajo en UV a una $\lambda=365$ nm y que los compuestos alifáticos no pueden presentar. Sin embargo, una fluorescencia roja en UV se ha asociado a la presencia de clorofilas (Orantes, 2008).

Para asegurarnos de que en S22R1 se encuentra presente el 11-triacontanol se procedió hacer el análisis comparativo de los desplazamientos de dicho compuesto en RMN ¹³C con respecto a S22R1 (Figura 15). Los resultados mostrados por los desplazamientos de S22R1 concuerdan con los desplazamientos de 11-triacontanol (ChemBioDraw Ultra 11.0) ya que la subfracción presenta las señales a 14.2 ppm que corresponde a los grupos metilo, señales a 22.7 ppm que corresponden a los CH₂-CH₃, así como las señales a 29.4 ppm, 29.7 ppm y 31.9 ppm que corresponden a los diferentes carbonos de CH₂, al igual presenta señales a 38.7 ppm generados por los CH₂ unidos al carbono quiral y la señal del carbono (quiral) unido al grupo hidroxilo en 67.9 ppm.

Los resultados de IR y RMN sugiere que los posibles compuestos presentes en la subfracción S22R1 sean de tipo alcoholes alifáticos y los metabolitos que más se acercan son alcoholes grasos, como el triacontanol-11 aislado de

Argemone mexicana por Ballini y col., 2005. Recientemente, se ha informado que los compuestos como alcanodiolos ópticamente activos poseen propiedades antitumorales y antiinflamatorias y el efecto es altamente dependiente de la longitud de la cadena principal (Brahmachari y col., 2010).

Estudios preliminares indican que el 1-triacontanol (TRIA), posee propiedades como: potencial anti-inflamatorio (McBride y col., 1987), activo frente a la infección del virus de herpes simplex (Katz y col., 2991) y como estimulante en el crecimiento en plantas (Knowles y Ries, 1981; Khan y col., 2006). Lu, 2009, demostró que el uso de nano-preparaciones del 1-triacontanol (TRIA) mejora la regulación, efecto del control de crecimiento y tasa de germinación de los cultivos, tales como las semillas del frijol verde, y semillas y plántulas de col.

Identificación de los Compuestos Químicos de la Subfracción SE27A1

La identificación de los compuestos presentes en SE27A1 se llevó a cabo por medio de técnicas como resonancia magnética de protón (RMN ^1H) y resonancia de carbono (RMN ^{13}C).

Análisis de RMN

La subfracción SE27A1 fue obtenida con la mezcla de solventes metanol/agua destilada 1:1 en el punto de aplicación. Fue soluble en diclorometano y metanol, presenta fluorescencia amarilla bajo el UV y dio positiva la prueba de Dragendorff. Con base en esto, podemos inferir que se trata de un alcaloide. Para confirmar la presencia del alcaloide se realizó el análisis de esta subfracción en RMN de protón (RMN ^1H) los desplazamientos químicos de los distintos protones se muestran en la Figura 16. La presencia de señales en la región de 9 ppm a 6 ppm corresponden a anillos aromáticos (Silverstein 2007). SE27A1 presentó señales a 9.76 ppm, 8.70 ppm, al igual presentó dos dobletes

a 8.12 ppm, 8.10 y 8.00 ppm, 7.66 ppm; y una señal sencilla a 6.96 ppm que son característicos de compuestos aromáticos y los cuales concuerdan con los desplazamientos de los protones del núcleo de alcaloides protoberberínicos (Al-Hayan, 2006). La señal a 6.10 ppm corresponde a desplazamientos químicos de protones en anillos heterocíclicos tipo O-CH₂-O (Silverstein, 2007).

Los desplazamientos observados en 4.20 ppm y 4.11 ppm corresponde a los protones provenientes de tipo OCH₃. Mientras que el triplete presentado a 4.92 ppm corresponde a desplazamientos químicos generados por CH₂-N=C (Silverstein, 2007). Las señales en la región de 3 ppm a 4 ppm se encuentra un poco difusas por la presencia de un gran número de bandas. Para ver si estas señales forman parte del compuesto se realizó un espectro de COSY (Correlación homonuclear ¹H-¹H) de S22R1 (Figura 17) que indicaría claramente cuales protones están correlacionando entre sí.

Los desplazamientos del protón en 8.12 ppm y 8.10 ppm están relacionados con el protón con desplazamientos en 8.00 ppm y 7.99 ppm, los cuales corresponden a los protones del anillo aromático. Los protones que corresponden al CH₂ con desplazamiento en 4.92 ppm, están acoplados a dos protones adyacentes que corresponde a un grupo metileno (CH₂) el cual aparece en 3.20 ppm. Siguiendo con el trazado de la correlación los protones del OCH₃ con desplazamiento en 4.11 ppm están acoplados con los protones adyacentes del grupo OCH₃. Haciendo el trazado de la correlación de los protones en la región entre 3.5 ppm y 4 ppm podemos observar que estos protones sólo correlacionan entre sí y no con los protones del compuesto berberina. Según Domínguez, 1979, en ciertas plantas puede haber un ácido especial unido a los alcaloides; como el ácido quínico el cual se encuentra unido a los alcaloide de la quina, el ácido aconítico con las aconitinas, también algunos alcaloides pueden encontrarse como glicosidos o en forma de ésteres de ácidos orgánicos de complejidad variable.

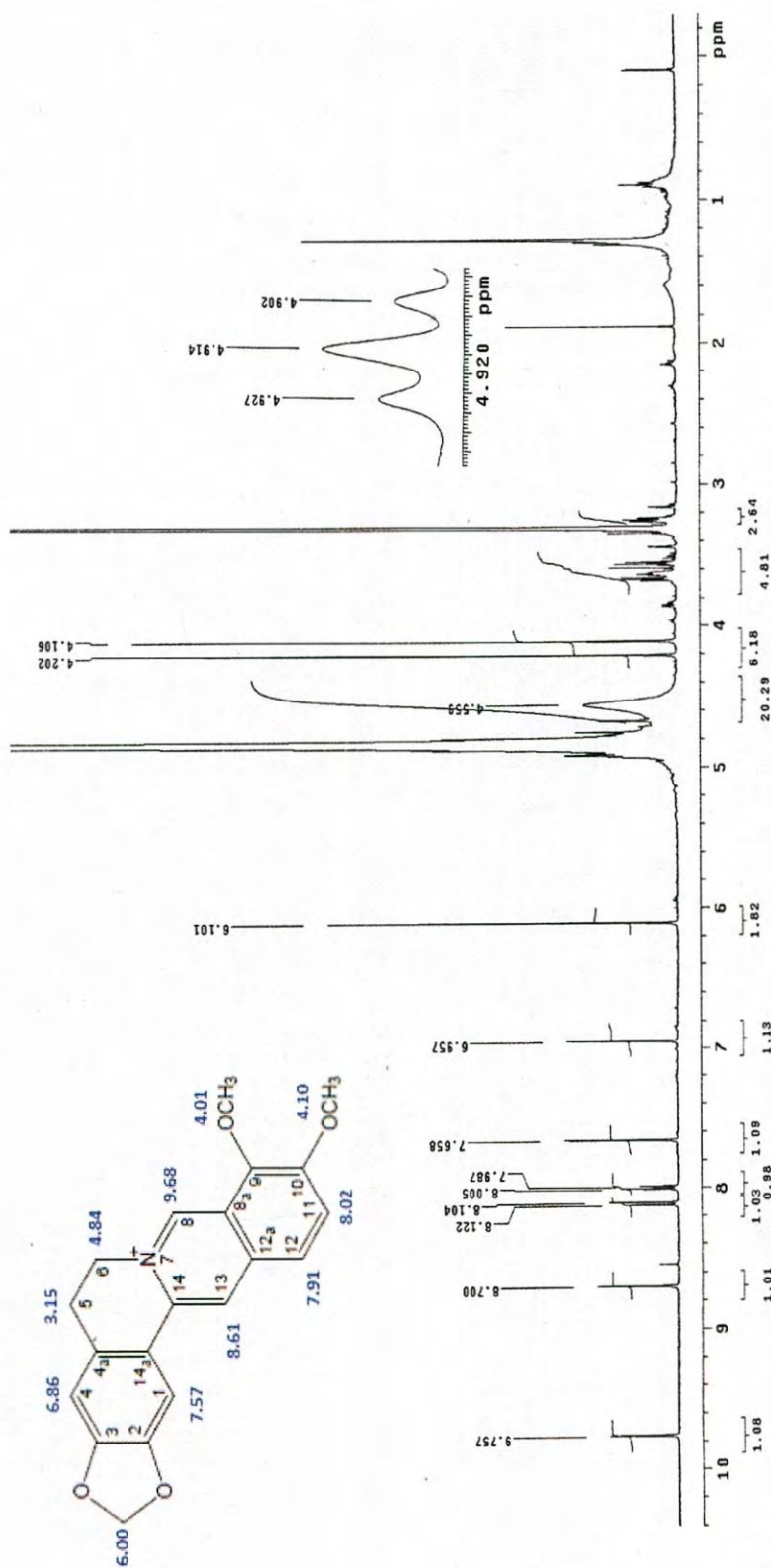


Figura 16. Espectro de RMN ¹H de la fracción cromatográfica SE27A1 en MeOD, extraída de la subfracción SE27 de *Argemone pleiakantha*. En la parte superior, desplazamientos reportados para el alcaloide berberina (Al-Hayyan, 2006).



Figura 17. Espectro COSY de SE27A1 extraída de la subfracción SE27 obtenida de la fracción etanólica de *Argemone pleiakantha*. En la parte superior se señalan los desplazamientos de los protones de berberina y se señalan las correlaciones con distintos colores.

Posteriormente se realizó el experimento NOESY (Espectroscopía del Efecto Nuclear Overhauser) de la subfracción SE27A1 (Figura 18) para obtener información de la proximidad de los protones a través del espacio. Con base a los resultados de NOESY el protón presente a 9.76 ppm tiene proximidad espacial con respecto a los protones en 4.92 ppm del CH₂ adyacentes. Continuando con el trazado de correlación de estos dos protones se evidencia su relación con otros dos protones a 3.20 ppm del CH₂. En esta misma sección se relaciona el protón a 6.96 ppm a los dos protones de 3.20 ppm. Los protones del OCH₃ presentes en 4.11 ppm están relacionados espacialmente con el protón a 8.10 ppm del anillo aromático, mismo que está relacionado con el protón a 7.99 ppm del anillo. Siguiendo a campo bajo el protón presente en 8.70 ppm esta próximo espacialmente al protón en 7.99 ppm y por último el protón de 7.66 ppm está relacionado espacialmente con el presente a 8.70 ppm.

En la Figura 19 se resumen los acoplamientos mostrados entre los protones en cuanto a su proximidad en el espacio (NOESY), como por su relación entre enlaces (COSY) en el compuesto berberina identificado en la subfracción SE27A1 extraída de la fracción de etanol de *Argemone pleiacantha*

En el espectro de RMN ¹³C obtenido para la subfracción SE27A1 (Figura 20) donde se observan 33 señales que corresponden al mismo número de carbonos. Adicionalmente, a esta muestra se le realizó el análisis DEPT (ampliación sin distorsión por transferencia de polarización) 135 y 90 (Figura 20).

Con la información aportada por DEPT 135 y 90 pudimos determinar la presencia de seis carbonos correspondientes a CH₂ (metilenos), dos CH₃ (metilos), quince CH (metinos) y once carbonos cuaternarios (C), estos últimos debido a su ausencia en DEPT y presencia en RMN¹³C.

Para poder establecer la relación entre los carbonos presentes en SE27 con las señales de los protones de la misma muestra, se realizó la correlación

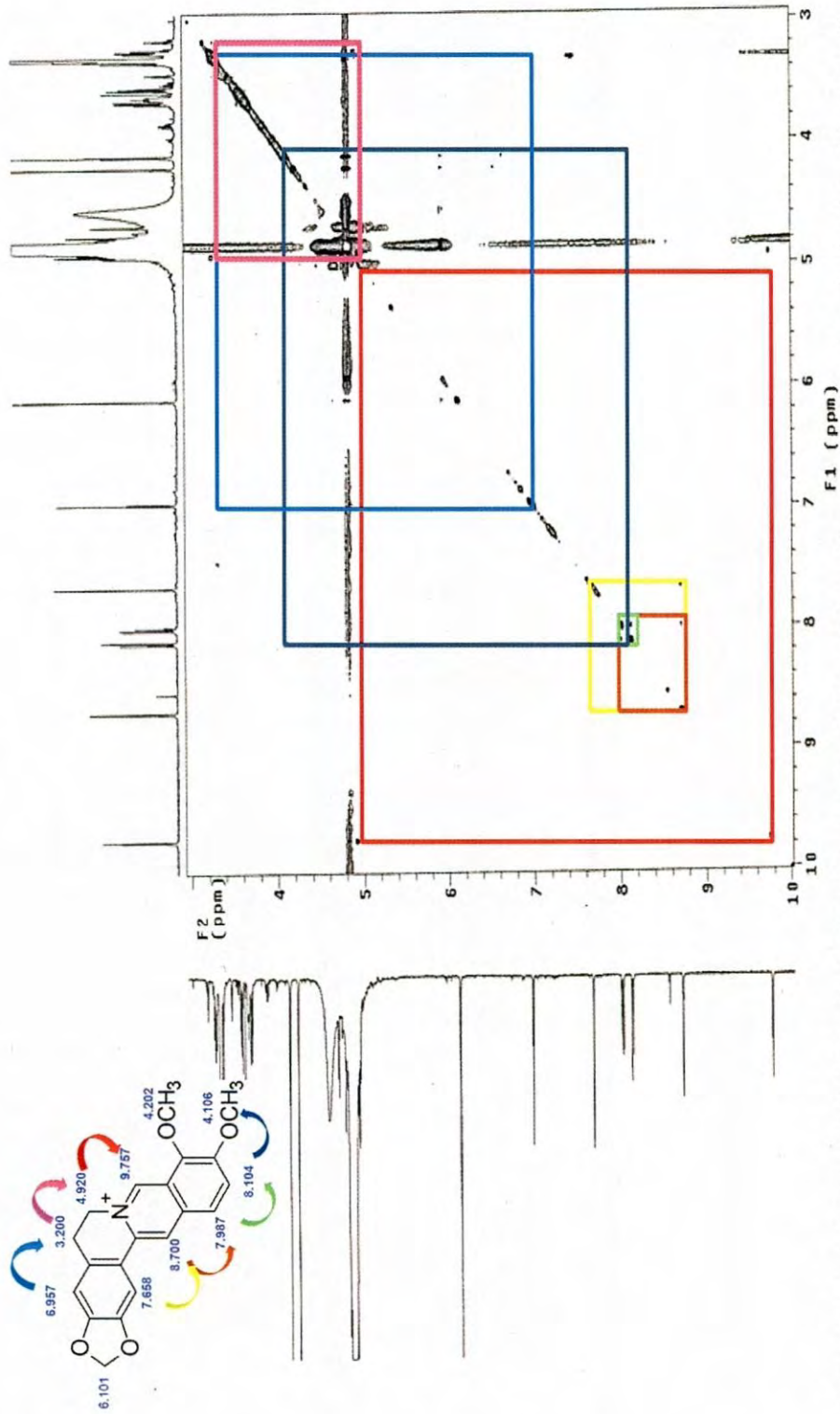


Figura 18. Espectro NOESY de SE27A1 extraída de la subfracción SE27 obtenida de la fracción etanólica de *Argemone pleiacantha*. En la parte superior se señalan los desplazamientos de los protones de berberina y se señalan los acoplamientos NOESY con distintos colores.

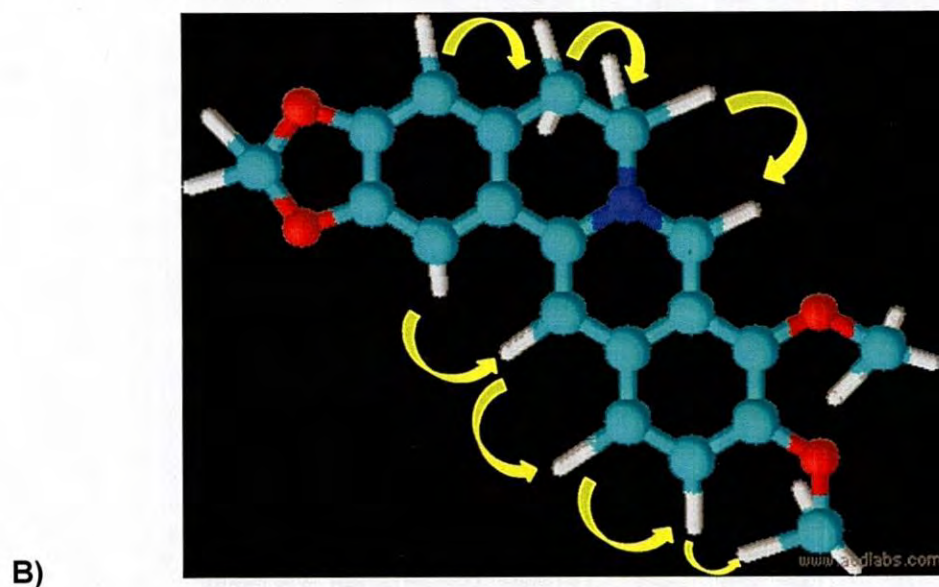
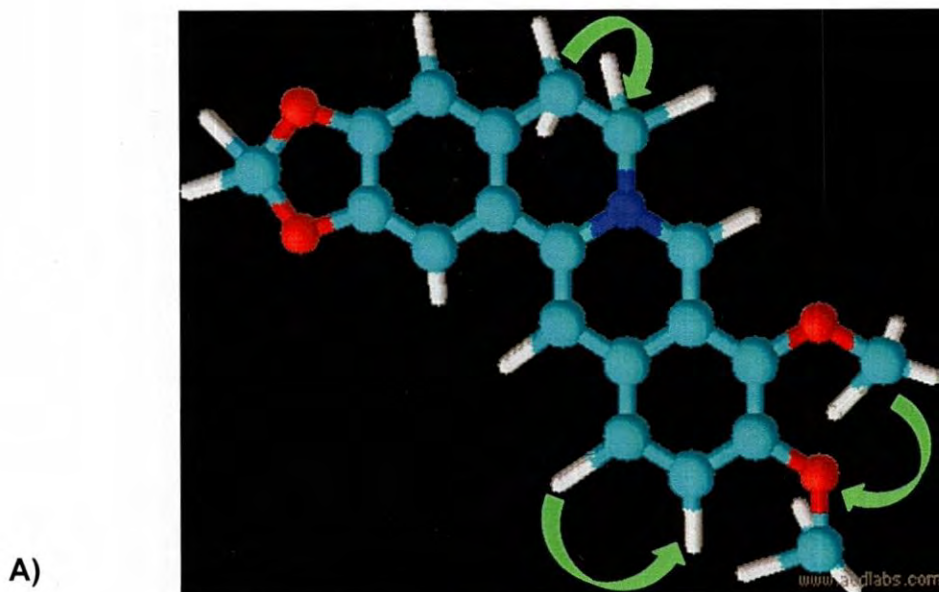


Figura 19. Acoplamiento COSY y NOESY de los protones presentes en berberina identificada en la subfracción SE27A1 obtenida de la fracción etanólica de *A. pleiacantha*. A) Acoplamiento COSY para el compuesto berberina, B) acoplamiento NOESY de berberina.

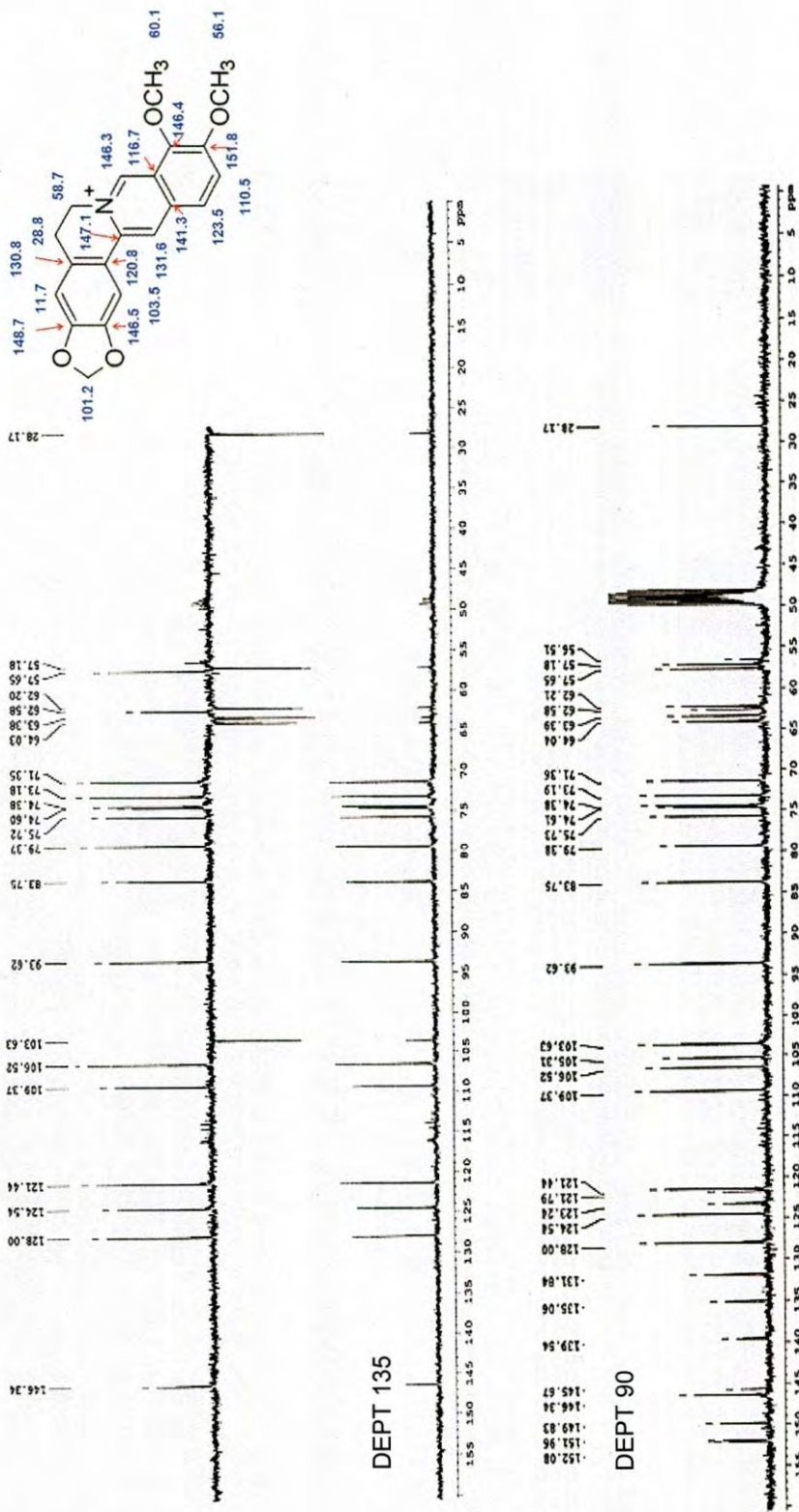


Figura 20. Espectro DEPT 135, DEPT 90 y RMN ^{13}C de SE27 en CD_3OD , obtenida de la fracción etanólica de *A. pleiacantha*. En la parte superior derecha se muestran los desplazamientos para los distintos carbonos de berberina generados con el programa ChemBioDraw Ultra 11.0.

heteronuclear (HETCOR) (Figura 21). Con la información aportada por el DEPT y el espectro de correlación heteronuclear (HETCOR) de la subfracción SE27, fue posible observar la correspondencia de protones con carbonos del compuesto berberina, cuyos desplazamientos químicos y acoplamientos corresponden a los presentados por la subfracción SE27A1.

El alcaloide berberina ha sido aislado anteriormente de *Argemone ochroleuca* en Arabia Saudita y en Hermosillo, Sonora por Al-Hayyan, 2006 y Becerra, 2011, respectivamente. Este compuesto ha sido altamente investigado por diferentes propiedades entre las que destaca como antidiabético (Lee y col., 2006) actividad antimutagénica (Cernáková y col., 2002), antimicrobiana (Reyes y col., 2011) en el tratamiento de hiperlipidemia y en enfermedades intestinales (Lu y col., 2010).

Estudios realizados por Lu y col., 2010, evidencian el efecto antiproliferativo de berberina en la línea celular HeLa. En este estudio se reporta una reducción significativa de la relación de Bcl-2/Bax, así como la liberación del citocromo c de la mitocondria al citosol, y por último la sobre regulación de Fas, FasL, TNF α y TRAF 1 indicando la participación del receptor de muerte en el proceso de apoptosis, además las caspasas 3 y 8 son activadas como un evento central de apoptosis por berberina, indicando que la vía de apoptosis implicada es de tipo extrínseca (receptor).

Análisis del Mecanismo de Acción

Con la finalidad de establecer el mecanismo de acción mediante el cual *A. pleiacantha* ejerce su efecto antiproliferativo, se realizaron las pruebas de tinción con el colorante JC-1 que mide el potencial de membrana mitocondrial así como anexina V/yoduro de propidio y la evaluación de la activación de las caspasas 3, 8 y 9 en células M12.C3F6.

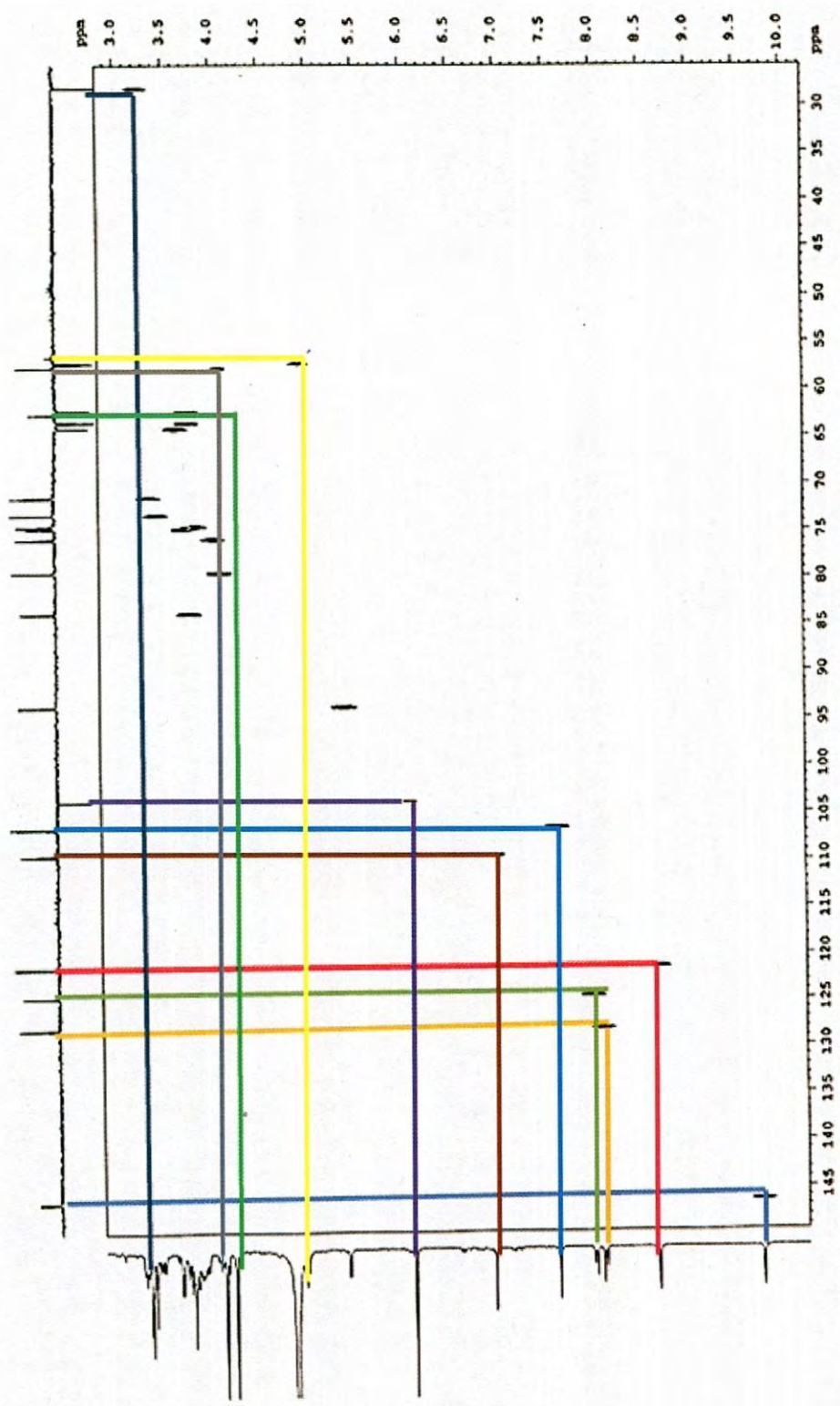


Figura 21. Espectro de correlación heteronuclear de la subfracción SE27 en CD₃OD, obtenida de la fracción etanólica de *A. pleiacantha*. Se muestran en líneas de colores las señales correspondientes al compuesto berberina, presentes en SE27A1.

Para realizar el análisis del mecanismo de acción de los compuestos con actividad antiproliferativa provenientes de *A. pleiacantha*, se utilizaron las fracciones extraídas con los solventes poco polares, debido a que en la fracción SE27 se identificó al compuesto berberina, para el cual se ha reportado el mecanismo de acción en células HeLa (Lu y col., 2010).

En la Figura 22 se observan los cambios morfológicos más evidentes en la línea celular M12.C3F6 con tratamiento de S22 y S22R1, con respecto al crecimiento normal de esta línea. Se observan cambios evidentes con ambos tratamientos (S22 y S22R1) a partir de las 24 h, observando la pérdida del contacto célula-célula, deformación celular (células alargadas, disminuidas en tamaño y algunas redondas), así como disminución de la proliferación celular.

A las 48 h con el tratamiento con S22R1 se observan células vesiculadas y mayor cantidad de detrito celular con respecto al tratamiento con S22 a las 48 h. En contraparte los controles de inicio y final a las 24 h y 48 h muestran células íntegras en su morfología.

Análisis del Mecanismo de Acción de *A. pleiacantha* sobre la Línea Celular M12.C3F6 Mediante Marcaje con Anexina V/Yoduro de Propidio

La anexina V conjugada con biotina se utiliza para la detección de cambios en la superficie celular que se presentan de manera temprana en el proceso apoptótico. La pérdida de asimetría en los fosfolípidos de membrana se produce en aquellas células que sufren apoptosis dando lugar a la externalización de la fosfatidilserina (PS) en la superficie celular. La anexina V es una proteína anticoagulante que preferentemente se une a la PS cargada negativamente en la superficie celular, posibilitando la detección de esta externalización en células apoptóticas. El conjugado de anexina V-biotina tiene un fluorocromo (FITC) por lo que es posible el proceso de detección por citometría (Matta y col., 2006).

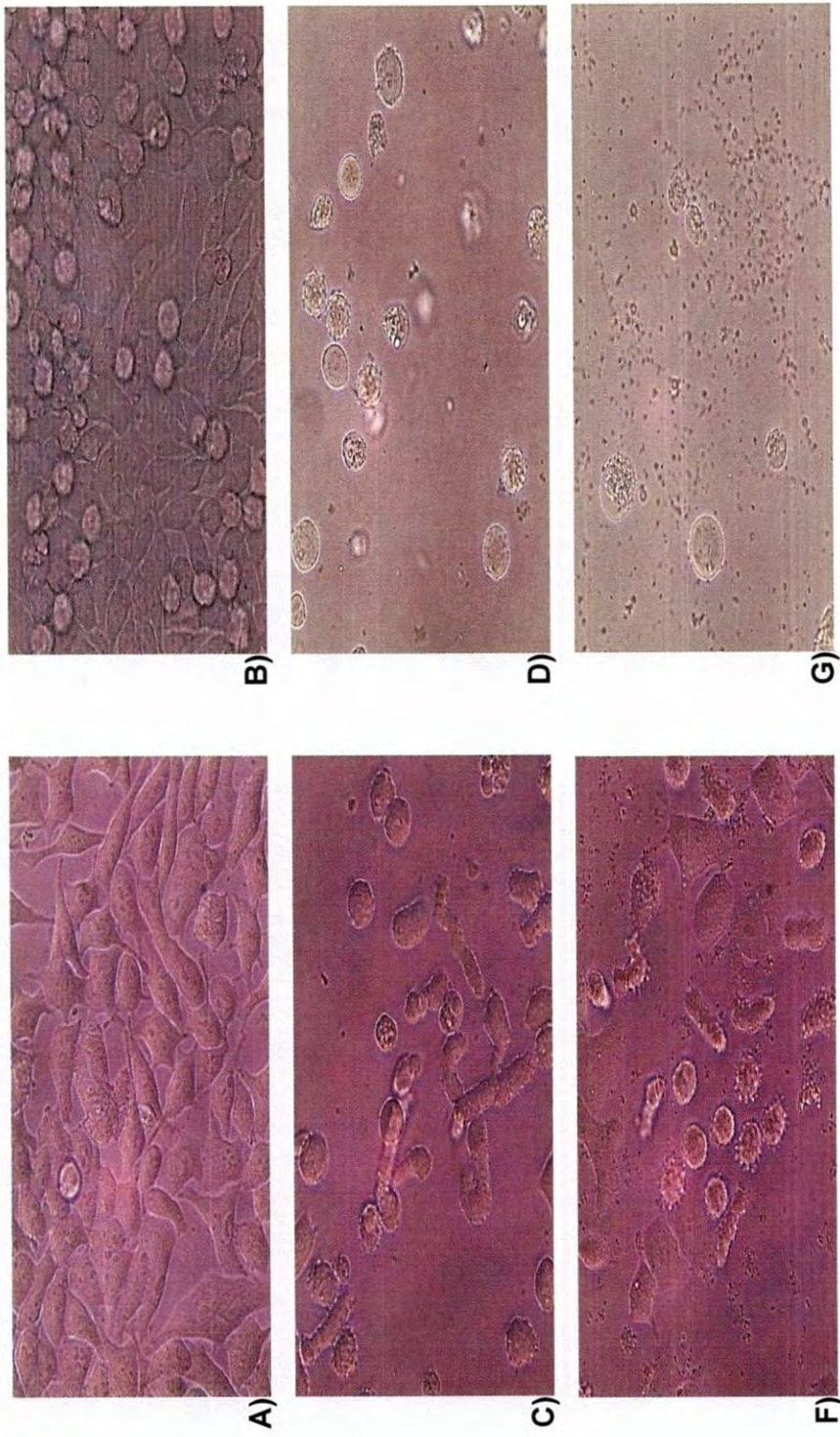


Figura 22. Cambios morfológicos inducidos por las subfracciones extraídas de la fracción de hexano sobre la línea celular M12.C3F6. A) M12.C3F6 40x, 24h, B) M12.C3F6 40x, 48h, C) S22 40x 24h, D) S22 40x 48h, F) S22R1 40x, 24h, G) S22R1 40x, 48h.

La combinación de anexina V con el colorante supravital yoduro de propidio (IP) hace posible que se diferencie entre las células apoptóticas tempranas (anexina V positivas). Se ha informado que anexina V se une a la cara interna de la membrana plasmática que ha perdido su integridad durante la etapa tardía de la apoptosis, también conocida como necrosis secundaria (Chen y col., 2008), por lo que se pueden diferenciar las células apoptóticas tardías/células necróticas tempranas (anexina V y yoduro de propidio positivos), células muertas (positivas a yoduro de propidio) y células normales (anexina negativo y yoduro de propidio negativo). Esto se debe a la capacidad de anexina V de unirse a PS de un modo dependiente de calcio (Matta y col., 2006; Chen y col., 2008; Valencia, 2012).

En la Figura 23 se muestran los controles usados en los ensayos para la tinción con anexina V/yoduro de propidio. En la Tabla X se muestran los resultados obtenidos para anexina V-FITC/yoduro de propidio de las células tumorales M12.C3F6 después de haber sido incubadas por 48 h con las subfracciones S22 y S22R1 a 25 µg/mL extraídas de la fracción de hexano de *A. pleiacantha*.

Las subfracciones S22 y S22R1 indujeron apoptosis (total) en las células tumorales M12.C3F6, ya que estas mostraron un aumento en el porcentaje de apoptosis con respecto a los controles negativos (DMSO) (AN⁻/IP⁻). El análisis estadístico nos dice que existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos para la apoptosis entre las subfracciones (S22 y S22R1) y el control de DMSO.

Las células muertas (IP⁺) para CAPE fue el porcentaje menor reportado en este trabajo comparado con las células muertas reportadas para los controles normal y DMSO. Sin embargo el análisis estadístico no refleja diferencias significativas entre los controles negativos a apoptosis (normal y DMSO) con el control positivo a apoptosis (CAPE), al igual no se encuentran diferencias

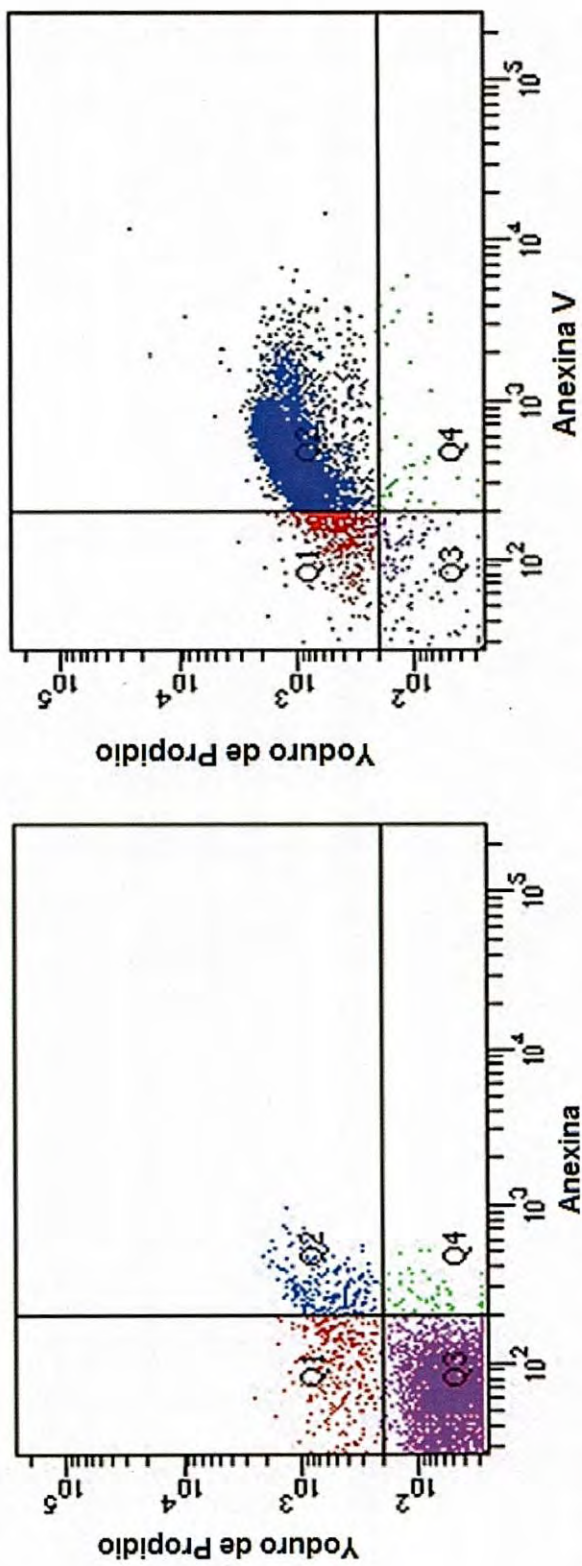


Figura 23. Citograma de las células cancerosas M12.C3F6 con anexina V/yoduro de propidio después de 12h de incubación con el disolvente DMSO (25 µg/mL) izquierda y CAPE (3.75 µM) derecha. En el histograma se representa los siguiente: El cuadrante inferior izquierdo (Q3) muestra las células viables las cuales excluyeron al IP (yoduro de propidio) y fueron negativas a la unión de anexina V-FITC; el cuadrante superior derecho (Q2) representa las células necróticas (incorporaron IP en su DNA y unieron anexina V-FITC); en el cuadrante inferior derecho (Q4) se observan las células apoptóticas (Valencia, 2012).

Tabla X. Evaluación de apoptosis inducida en células tumorales M12.C3F6 por las subfracciones de hexano de *A. pleiacantha*.

	Control de crecimiento normal	Control de disolvente (DMSO)	Control positivo (CAPE)	S22	R1S22
Células Vivas	86.4±4.2 ^A	86.8±5.2 ^A	5.7±3.6 ^C	25.4±4.1 ^B	37.6±2.3 ^B
Células Muertas	13.9±2 ^B	14.2±1.4 ^B	4.4±1.1 ^B	12.4±1.7 ^B	31.6±1.4 ^A
Apoptosis Tardía/Necrosis Temprana	1.7±0.1 ^C	2±0.3 ^C	85.2±5.3 ^A	29.6±2.9 ^B	28.4±1.3 ^B
Apoptosis Temprana	1.1±0.4 ^A	0.9±0.2 ^A	0.9±0.4 ^A	11.7±6 ^A	2.7±0.1 ^A
Apoptosis Total	2.8±0.5 ^D	2.9±0.3 ^D	89.9±3.6 ^A	65.0±3 ^B	31.1±1.4 ^C

Todos los valores representan la media de tres experimentos independientes ± desviación estándar. Las subfracciones fueron evaluadas a 25 µg/mL. DMSO fue utilizado como control de disolvente. CAPE fue utilizado como inductor positivo de apoptosis (3.75 µM). Valores con letra distinta dentro de una misma fila son estadísticamente diferentes con una $p \leq 0.05$.

significativas entre los anteriores controles y la subfracción S22 para las células muertas. Siendo S22R1 la única que mostró una elevación de las células muertas con diferencias significativas respecto a todos los tratamientos anteriores.

Cabe destacar que la apoptosis temprana para todos los tratamientos usados fueron estadísticamente iguales, así como también la apoptosis tardía/necrosis temprana presentada en las subfracciones fueron estadísticamente iguales y ambas fueron estadísticamente diferentes con respecto a la apoptosis tardía/necrosis temprana generada por CAPE y los controles de crecimiento normal y DMSO.

Con base en los resultados anteriores podemos decir que, de las subfracciones analizadas, la subfracción S22 indujo mayor porcentaje de células apoptóticas con respecto al control de crecimiento normal y el control de disolvente (DMSO), y que la separación de los compuestos presentes en la subfracción de S22 a S22R1 esté provocando el aumento de células yoduro de propidio positivo, en la línea celular M12.C3F6.

Efecto de *A. pleiacantha* sobre el Potencial de Membrana Mitocondrial (Ψ_m)

En la búsqueda de fracciones con potencial antitumoral además de la inhibición en la proliferación es importante caracterizar el tipo de muerte inducido por la fracción. Una de las formas para visualizar la apoptosis celular es midiendo los cambios en el potencial de membrana mitocondrial. Por lo que se analizó el extracto metanólico, la fracción de hexano y la subfracción 22 frente a la línea celular tumoral M12.C3F6 a las concentraciones de 12.5, 25 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con la tinción del colorante catiónico JC-1 a las 48 h (Figura 24). Se utilizó como control positivo CAPE (7 μM) (Valencia, 2012).

En los resultados obtenidos (Figura 24) se observa una disminución de la

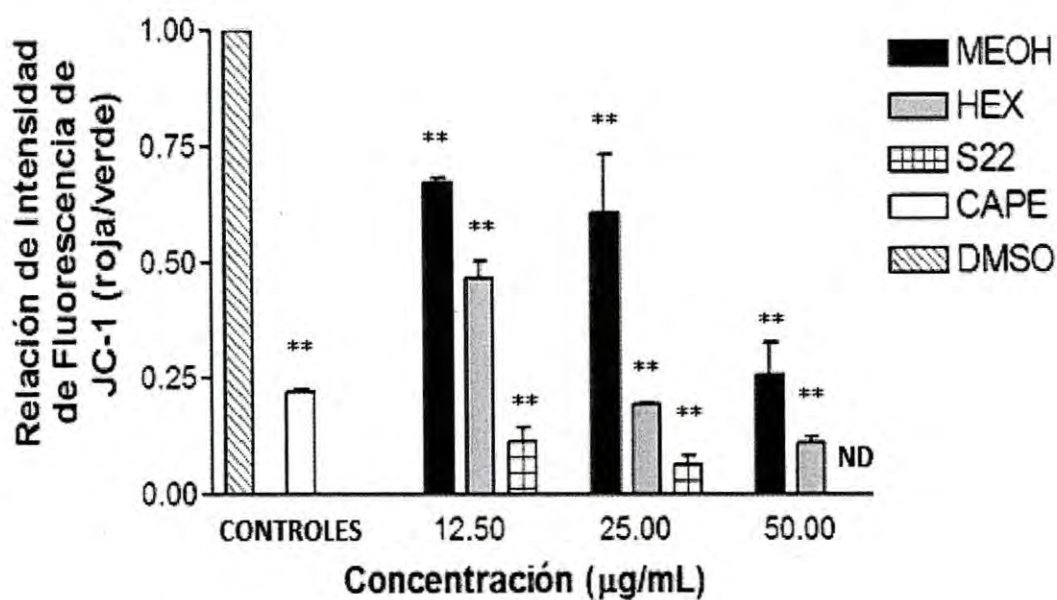


Figura 24. Efecto del extracto metanólico, de la fracción de hexano y de la subfracción 22 (S22) sobre el potencial de la membrana mitocondrial (Ψ_m) en células M12.C3.F6. Relación de la intensidad de fluorescencia de JC-1 (roja/verde) para células M12.C3.F6 tratadas con el extracto metanol y fracción de hexano a las concentraciones de 12.5, 25 y 50 µg/mL, mientras que S22 se analizó a 12.5 y 25 µg/mL, se usó como control positivo de apoptosis CAPE (7 µM). Los resultados representan tres ensayos por triplicado. ** La diferencia de medias es significativa a nivel 0.05 con respecto al control de DMSO.

relación de fluorescencia roja/verde para la línea M12.C3.F6 que ha sido tratada con los extractos y fracciones de *A. pleiakantha* a las distintas concentraciones usadas, comportándose de manera muy similar al control positivo (CAPE), lo que se traduce en una disminución del potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m). Esto sugiere que la apoptosis se induce de forma dependiente de la mitocondria. El análisis estadístico nos dice que los tratamientos a las distintas concentraciones, muestran diferencias significativas con una $p=0.05$ con respecto al control.

La medida del potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m), está asociada con la permeabilidad de la membrana interna de ésta. Por lo que la disipación del Ψ_m puede realizarse al inicio o al final del proceso apoptótico (Kromer y Martin, 2005; Kromer y col., 2007). Los análisis del Ψ_m para los extractos y fracciones de *A. pleiakantha* se realizaron a las 48 h, por lo que es probable que la despolarización de la membrana se realice de manera tardía, esto nos dice que en este proceso de apoptosis la integridad de la membrana celular se mantienen hasta fases tardías de la apoptosis.

Análisis de la Inducción de Apoptosis por Activación de Caspasas

La activación de las caspasas es un evento utilizado para verificar la muerte celular por apoptosis. La activación de apoptosis mediada por la vía dependiente de la mitocondria (vía intrínseca) está generalmente asociada a la activación de la caspasa 9 (iniciadora) y la subsecuente activación de la caspasa 3 (efectora).

Con fin de determinar la vía de apoptosis (intrínseca o extrínseca) se analizó la activación de las caspasas 3, 8 y 9 sobre la línea tumoral M12.C3F6 tratadas con el extracto metanólico (50 $\mu\text{g/mL}$), la fracción de hexano (50 $\mu\text{g/mL}$) y la S22 (25 $\mu\text{g/mL}$) de *A. pleiakantha* (Figura 25). Se utilizó como control positivo CAPE (50 μM). Se mostró una elevación en la activación para

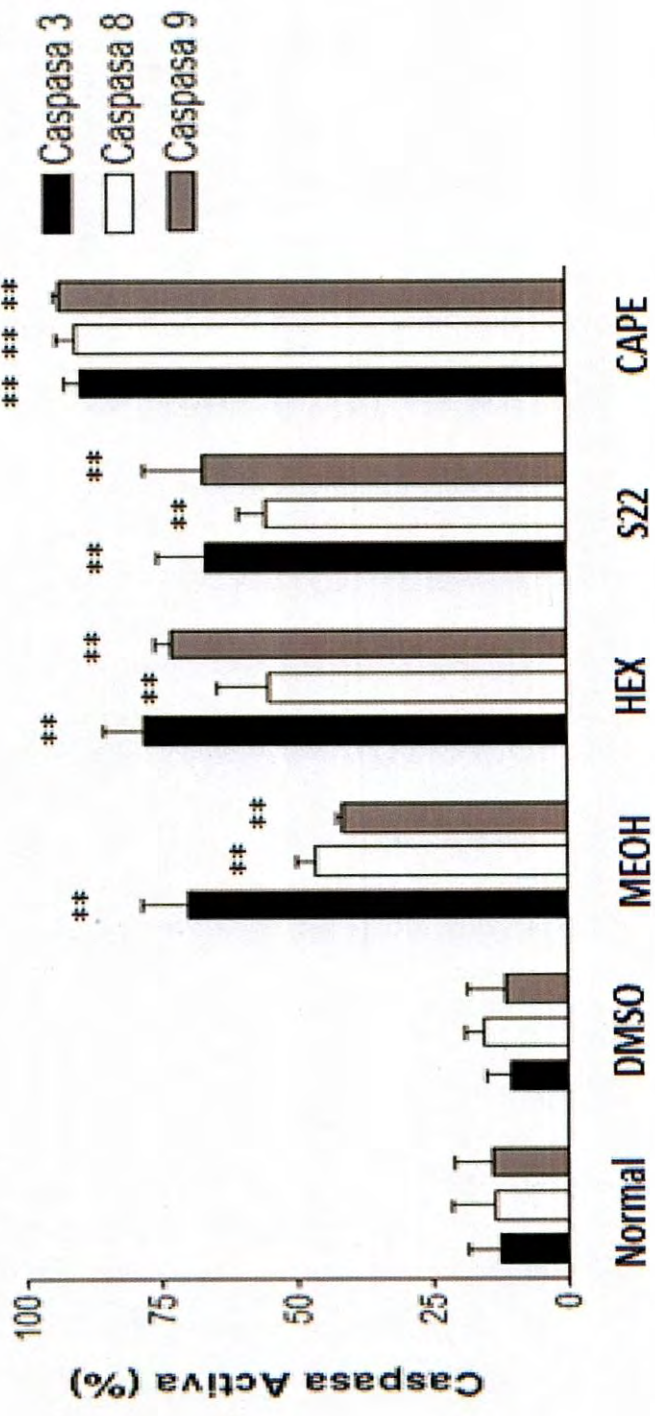


Figura 25. Efecto de los extractos y fracciones de *A. pleiakantha* en la activación de las caspasas 3, 8 y 9 en la línea M12.C3F6. Extracto metanólico y fracción hexánica se analizaron a la concentración de 50 µg/mL, como control positivo se usó CAPE (7.5 µM). Se analizaron a las 48 h. Los resultados representan tres ensayos por triplicado. ** La diferencia de medias es significativa a nivel 0.05 con respecto al control normal.

las caspasas 3, 8 y 9 (con referencia a la activación basal que presentaron las células control) de manera notable, siendo este incremento más evidente con las células tratadas con la fracción de hexano y la S22. Es importante destacar que el efecto de la activación de la caspasa 8 y 9 se va aumentando conforme más pura se encuentra la muestra de la planta.

La activación de ambas vías puede deberse a Bid, ya que según Lagunas y col., 2010, la caspasa 8 puede mediar la ruptura de Bid lo que resulta en su translocación a la mitocondria promoviendo la liberación de citocromo c al citosol. Los niveles elevados de citocromo c forman el complejo conocido como apoptosoma el cual está constituido por Apaf-1, procaspasa 9 y citocromo c. La oligomerización de Apaf-1 provoca la autoactivación de procaspasa 9, la cual activa caspasa 3.

Con base en lo anterior, se puede pensar que la vía de apoptosis inicial es de tipo extrínseca, seguido de la activación de caspasa 9 y posterior despolarización de la membrana. Sin embargo, ambas vías también pudieran estar siendo activadas por uno o más compuestos activos presentes en las muestras analizadas. En el estudio realizado por Valencia, 2012, se analizó el mecanismo de acción de la actividad antiproliferativa de los propóleos de Ures, Sonora encontrando que éstos activan indistintamente a caspasa 8 y 9, con la posterior despolarización de la membrana mitocondrial, sin embargo se requieren más estudios para aseverar la vía inicial de activación.

Con los resultados obtenidos hasta el momento no es posible discernir cual de las dos vías principales de apoptosis (intrínseca o extrínseca) es activada inicialmente, por lo que es necesario realizar la evaluación de la activación de otras proteínas mediadoras de apoptosis. Sin embargo, un dato importante es que la inhibición de proliferación de los compuestos activos de *A. pleiacantha* ejercen un mecanismo de apoptosis dependiente de caspasas.

CONCLUSIONES

- Las fracciones de hexano y etanol del extracto metanólico de *A. pleiakantha* presentaron actividad antiproliferativa sobre las líneas cancerosas usadas, sin afectar la línea celular normal.
- De la fracción de hexano, la subfracción más activa fue la S22 y mostró un amplio espectro de actividad antiproliferativa frente a líneas celulares murinas (RAW, M12.C3F6) y de humano (Hela y LS-180) siendo poco activo frente a L-929.
- En el caso de la fracción de etanol, la subfracción más activa fue la SE27 y presentó actividad frente a líneas celulares M12.C3F6 y HeLa, siendo poco activo sobre L-929.
- Dentro de los probables compuestos mayoritarios presentes en la subfracción S22 puede estar el 11-triacontanol, mientras que en la fracción SE27 se identificó al alcaloide berberina.
- El mecanismo implicado en la actividad antiproliferativa de la fracción S22 sobre la línea celular M12.C3F6 es a través de apoptosis.

PERSPECTIVAS

- Continuar con el aislamiento del compuesto activo en la subfracción activa S22, para confirmar o descartar al 11-triacontanol como compuesto responsable de la actividad biológica.
- Evaluar el efecto del 11-triacontanol puro en diversas líneas celulares.
- Generar sistemas nanoestructurado con base en 11-triacontanol y evaluar su efecto en líneas celulares cancerosas.
- Realizar cambios estructurales al 11-triacontanol para mejorar su actividad biológica y probarlo en un panel líneas celulares tumorales.

BIBLIOGRAFÍA

- Abril-Montes, D. 2006. Algunas plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Tesis de Licenciatura. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.
- Al-Hayyan, A. 2006. Study of the alkaloids of *Argemone ochroleuca* growing in Saudi Arabia. Departamento de Farmagnostia, Facultad de Farmacia. Universidad Rey Saud. Tesis de Maestría.
- Alzamora, L., Colona, E., Acero, N., Galán, A., Muñoz, D., Linares, F., Domínguez, T. y Álvarez, E. 2007. Efecto citotóxico del extracto metanólico de tres ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón sobre líneas celulares HeLa y HT-29. *Rev. Peru. Biol.*, 13, 219-221.
- Ballini, R., Fiorini, D. y Palmieri, A. 2005. 1-Nitroicosane as the key building block for the first synthesis of triacontan-11-ol, a new fatty alcohol isolated from *Argemone mexicana*. *Synthesis*, 17, 2835-2837.
- Becerra, J. 2011. Aislamiento y caracterización química de compuestos con actividad antiproliferativa del extracto metanólico de *Argemone ochroleuca*. Tesis de Maestría, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.
- Brahmachari, G., Roy, R., Mandal, L., Patrim, P. y Gorai, D. 2010. A new long-chain secondary alkenediol from the flowers of *Argemone mexicana*. *Journal of Chemical Research*, 656-657.
- Burgués, J., Pontones, J., Vera, C., Jiménez, J. y Ozonas, M. 2005. Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urológicas Españolas*, 29, 846-859.
- Capasso, A., Piacente, S., De Tommasi, N., Rastrelli, L. y Pizza, C. 2006. The effect of isoquinoline alkaloids on opiate withdrawal. *Current Medicinal*

- Chemistry*, 13, 807-812.
- Carrasco, L. 2010. Aislamiento y caracterización parcial de compuestos responsables de la actividad antiproliferativa de la fracción residual del extracto metanólico de *Argemone ochroleuca* en líneas celulares M12.Ak.C3F6 y L-929. Tesis de Licenciatura, Departamento de Ciencias Químico Biológicas y de la Salud, Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.
- Cavia, M., López, A., Hernando, B., López, S., García, C., Coma, M. y Muñiz, P. 2007. Estado redox celular y cáncer. Influencia sobre el tratamiento con citostáticos. *Rev. Electron. Biomed*, 2, 51-45.
- Cernáková, M., Kostálová, D., Kettmann, V., Plodovas, M., Tóth, J. y Drímal, J. 2002. Potential antimutagenic activity of berberine, a constituent of *Mahonia aquifolium*. *BMC*, 2, 1-6.
- Chang, Y., Chang, F., Khalil, A., Hsieh, P. y Wu, Y. 2003. Cytotoxic benzophenanthridine and benzyloquinoline alkaloids from *Argemone mexicana*. *Z. Naturforsch.*, 58, 521-526.
- Chen, S., Cheng, A., Wang, M. y Peng, X. 2008. Detection of apoptosis induced by new type gosly viral enteritis virus in vitro through fluorescein annexin V-FITC/PI double labeling. *World J Gastroenterol*, 14, 2174-22178.
- De Rzedowski, G. 1991. Papaveraceae. Flora del bajío y de regiones adyacentes. Base de datos. Fuente académica, (1) 1-35.
- Devi, S. y Sastry, G. 2002. HPLC method for the determination of sanguinarine in *Argemone* and in *Argemone* adulterated edible oils. *Journal of planar Chromatography and Modern TLC*, 15, 223-225.
- Donalson, J. y Cates, R. 2004. Screening for anticancer agents from Sonoran desert plants: a chemical ecology approach. *Pharmaceutical Biology*, 42, 478-487.
- Fernández, J., Reyes, R., Ponce, H., Oropeza, M., VanCalsteren, M.,

- Jankowski, C. y Campos, M. 2005. Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D (SUB)4(/SUB) induced contraction in guinea-pig airways. *European Journal of Pharmacology*, 522, 108-115.
- Fernández, J. 2005. Estudio químico biodirigido de la actividad antiasmática de *Argemone platyceras*. Tesis de Doctorado, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.
- Flores, F. 2009. Evaluación de la eficacia de un producto herbario en el tratamiento de neoplasias. Tesis de Maestría, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
- Frago, L., Arroba, A. y Chowen, J. 2001. Fundamentos de la apoptosis celular: interés en endocrinología. *Endocrinol Nutr.*, 48, 272-280.
- Graz, B., Willcox, M., Diakite, C., Falquet, J., Dackuo, F., Sidibe, O., Giani S. y Diallo, D. 2010. *Argemone mexicana* decoction versus artesunate-amodiaquine for the management of malaria in mali: policy and public-health implications. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104, 33-41.
- Guízar, C., Trujillo, K., Monforte, M. y Vázquez, F. 2012. Sanguinarine and dihydrosanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* (L) cell suspension cultures exposed to yeast extract. *J. Mex. Chem. Soc.*, 56, 19-22.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57.
- Hanahan, D. y Weinberg, R. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144, 646-674.
- Harborne, J. y Williams, A. 1983. Flavonoids in the seeds of *Argemone mexicana*: a reappraisal. *Phytochemistry*, 22, 1520-1521.
- Hernández, G., Ortiz, P., Lerma, J., Domínguez, J., Jave, L., Aguilar, A., de Celis, R., del Toro, S., Castellanos, Y. y Bravo, A. 2011. Pentoxifylline sensitizes human cervical tumor cells to cisplatin-induced apoptosis by

- suppressing NF-kappa B and decreased cell senescence. *BMC*, 11, 483.
- Hernández, J., Goycoolea, F., Quintero, J., Acosta, A., Castañeda, M., Domínguez, Z., Robles, R., Vázquez, L., Velázquez, E., Astiazaran, H., Lugo, E. y Velázquez, C. 2007. Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Med.*, 73, 1469-1474.
- Hill, J. 1999. Química para el nuevo milenio. Prentice Hall, México.
- Indranil, B., Soroj, K., Soumendranath, C. y Goutam, C. 2006. Antibacterial potentiality of *Argemone mexicana* solvent extracts against some pathogenic bacteria. *Mem. Inst.*, 101, 645-648.
- INEGI. 2010. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
- INEGI. 2011. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
- INEGI. 2012. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
- Karlsson, L., Tamado, T. y Milberg, P. 2003. Seed dormancy pattern of the annuals *Argemone ochroleuca* and *A. mexicana* (Papaveraceae). *Flora*, 198, 329-339.
- Katz, D., Marcelletti, J., Khalil, M., Pope, L. y Katz, L. 1991. Antiviral activity of 1-docosanol, an inhibitor of lipid-envolved viruses including herpes simplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10825-10829.
- Khan, A., Mujibur, M., Naeem, M., Mohammad, F., Siddiqui, M. y K. M. 2006. Triacantanol-induced changes in growth, yield and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* mill.). *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.*, 5, 1492-1499.
- Kingsley, S. 1989. Photosynthetic pigments of algae. United States of America. Cambridge University. p 107
- Knowles, R. y Ries, S. 1981. Rapid growth and apparent total nitrogen increases

- in rice and corn plants following applications of triacontanol. *Plant Physiol.*, 68, 1279-1284.
- Kumar, S., Dhar, V., Singh, A. y Singh, C. 2009. Antibacterial activity of seed extracts of *Argemone mexicana* L. on some pathogenic bacterial strains. *African Journal of Biotechnology*, 8, 7077-7081.
- Lagunas, A., Madrid, V. y Gariglio, P. 2010. Modulation of apoptosis by early human papillomavirus proteins in cervical cancer. *Biochemical Biophysical Act (BBA) - Reviews on Cancer*, 1805, 6-16.
- Lee, Y., Kim, W., Kim, K., Yoon, M., Cho, H., Shen, Y., Ye, J., Lee, C., Oh, W., Kim, C., Hohnen, C., Gosby, A., Kraegen, E., James, D. y Kim, J. 2006. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin resistant states. *Diabetes*, 55, 2256-2264.
- Leyva, M. 2010. Evaluación del efecto antiproliferativo y actividad antioxidante de *Argemone pleiacantha*. Tesis de Licenciatura. División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.
- León, C., Gómez, S., Morantes, S., Cordero, C. y Aristizábal, F. 2006. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad in vitro. *Biomédica*, 26, 161-168.
- Lu, B., Hu, M., liu, K. y Peng, J. 2010. Cytotoxicity of berberine on human cervical carcinoma HeLa cells through mitochondria, death receptor and MAPK pathways, and in-silico drug-target prediction. *Toxicology in Vitro*, 24, 1482-1490.
- Lu, J. 2009. Triacontanol biological nano-preparation and method for preparing same. Diciembre 15, 2009. CN200910248489. China.
- López, R. & A. Hinojosa. 1988. Catálogo de plantas medicinales sonorenses. Hermosillo, Sonora, México. p 130.
- Martínez, M. 2009. Técnicas para la detección de apoptosis y senescia celular

- in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, XI, 152-166.
- Matta, J., Ramos, J., Armstrong, R. y D'Antoni, H. 2006. Niveles de luz ultravioleta ambiental asociados con apoptosis y necrosis en fibroblastos humanos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 40, 553-560.
- McBride, P., Clark, L. y Krueger, G. 1987. Evaluation of triacontanol-containing compounds as anti-inflammatory agents using guinea pig models. *J. Invest. Dermatol.*, 89, 380-383.
- Monroy, M., Soto, M., Cadena, J., Santiago, E., Ruiz, L. y Rosas, H. 2009. Estudio biodirigido de un extracto alcohólico de frutos de *Sechium edule* (Jacq.) Swartz. *Agrociencia*, 43, 777-790.
- O'Connor, R. 2009. A review of mechanisms of circumvention and modulation of chemotherapeutic drug resistance. *Current Cancer Drug Targets*, 9, 273-280.
- Ocegueda, S., Moreno, E. y Koleff, P. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *CONABIO: Biodiversitas*. 12-15.
- Orantes, E. 2008. Tamizaje fitoquímico de la especie vegetal guatemalteca *Quararibea yunckeri* Standley Subsp. *izabalensis* W.S. Alverson ex Véliz (Bombacaceae). Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlo de Guatemala. Guatemala.
- Palacios, N. y Leech, M. 2004. Análisis de irinoides y expresión de genes que codifican enzimas tempranas en la síntesis de alcaloides indol terpenicos en *Cantharanthus roseus*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, VI, 36-42.
- Perumal, P., Sekar, V., Rajesh, V., Gandhimathi, S., Sampathkumar R. y Shuja, K. 2010. In vitro antioxidant activity of *Argemone mexicana* Roots. *International Journal of Pharm Tech Research*, 2, 1477-1482.
- Páez, E., Fernández, G., y Magos, G. 2006. Vasoconstrictor and vasorelaxant effects of a methanolic extract from *Argemone Mexicana* Linn

- (Papaveraceae) in rat aortic rings. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 49, 63-65.
- Pérez, R., Ávila, A., Edgill, R., Colon, Y., Quesada, W., Bello, J. y Panfet, C. 2005. Actividad antitumoral de una mezcla de polisacáridos obtenida de la especie *Argemone mexicana* L. *Rev. Cubana Plant. Med.*, 10, 3-4.
- Reyes, F., Peña, C., Canales, M., Jiménez, M., Meráz, S. y Hernández, T. 2011. Antimicrobial activity of *Argemone ochroleuca* Sweet (Chicalote). *Boletín Latinoamericano y Del Caribe De Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10, 139-146.
- Saleh, M., Fawzia, H., Rahman, A., Ibrahim, N. y Taha, N. 1987. Isolation and structure determination of new nematocidal triglyceride from *Argemone mexicana*. *Journal of Chemical Ecology*, 13, 1361-1370.
- Satish, V., Santosh, K., Abhishek, M. y Shivsharan, S. 2010. In vitro cytotoxicity of *Argemone mexicana* against different human cancer cell lines. *International Journal of Chemical, Environmental and Pharmaceutical Research*, 1, 37-39.
- Schlaepfer, L. y Mendoza, A. 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 18-27.
- Schlie, M., González, A. y Luna, L. 2009. Las acetogeninas de Annonaceae: efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8, 245-257.
- Senra, A. 2002. El cáncer: Epidemiología, etiología, diagnóstico y prevención. Madrid, España. Elsevier Science. p 7.
- Sharma, S., Sharma, M. y Kohli, D. (2010). Pharmacological screening effect of ethanolic and methanolic extract of fruits of medicinally leaves. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5, 229-232.
- Silverstein, R. 2007. Spectrometric identification of organic compounds. New York, USA. 7a ed. Ed. John Wiley and Sons.

- Singh, S., Singh, A., Jaiswal, J., Singh, T. , Singh, T., Singh, V., Pndey, V., Tiwari, A. y Singh, U. 2010. Antifungal activity of the mixture of quaternary alkaloids isolated from *Argemone mexicana* against some phytopathogenic fungi. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43, 769-774.
- Stermitz, F. y Coomes, R. 1969. Alkaloids of the three subspecies of *Argemone pleiacantha* greene. *Phytochememistry*, 8, 611-614.
- Steve, W. 2000. Northern Chihuahua desert: wild Flowers. Afalcon Guide. p 67.
- Sánchez, S. y Benítez, B. 2006. Procesos biomoleculares de la resistencia a drogas. *Cancerología* 1, 187-199.
- Valencia, D. 2012. Evaluación de Propóleos de Ures, Sonora como material bioactivo/efecto de la temporalización sobre su composición química y sus actividades biológicas. Tesis de Doctorado. Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.
- Velázquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Angulo, A., Dominguez, Z., Robles, R., Robles-Zepeda, R., Lugo, E., Goycoolea, F., Velazquez, E., Astiazaran, H. y Hernández, J. 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1747-1756.
- Vidal, J., Carbajal, A., Sisniegas, M. y Bobadilla, M. 2009. Efecto tóxico de *Argemone subfusiformis* Ownb. y *Tagetes patula* Link sobre larvas del IV estadio y pupas de *Aedes aegypti* L. *Rev. peru. biol.*, 15, 103-109.
- Yong-Hong, Z., Anirban, B., Kah, F., Mei, C., Shing-Leng, C., Victor, Y. y Yu-Keung, M. 2006. Chelerythrine and sanguinarine dock at distinct sites on BclXL that are not the classic BH3 binding cleft. *J. Mol. Biol.*, 364, 1294-305.

ANEXOS

Tabla XI. Sistema de solventes utilizados para el fraccionamiento en cromatografía en columna y capa fina para la fracción de hexano de *A. pleiacantha*.

Subfracción de hexano	Fracción eluída (200 mL % _{v/v})	Disolvente en columna	Disolvente en cromatografía en capa fina
S1	1-3	Hexano 100 %	Hexano
S2	4-5	Hexano 100 %	Hexano / acetato de etilo 9:1
S3	6-7	Hexano / acetato de etilo 9:1	9:1
S4	8	9:1	9:1
S5	9	9:1	9:1
S6	10	9:1	9:1
S7	11-12	9:1	9:1
S8	13-15	9:1	9:1
S9	16-20	9:1	9:1
S10	21	9:1	9:1
S11	22-33	9:1	9:1
S12	34-35	9:1	9:1
S13	36-39	9:1	8:2
S14	40-69	9:1	8:2
S15	70-71	9:1	7:3
S16	72-79*	9:1	7:3
S17	72-79*	9:1	7:3

* Fracción separada en dos porciones (S16 polvo blanco y S17 fracción verde).

Tabla XI. Sistema de solventes utilizados para el fraccionamiento en cromatografía en columna y capa fina para la fracción de hexano de *A. pleiacantha* (Continuación).

S18	80	8:2	7:3
S19	81-85	8:2	7:3
S20	86-90	8:2	7:3
S21	93	8:2, 7:3	7:3
S22	94-105	7:3, 6-4	7:3
S23	106-107	6-4	7:3
S24	109-111	6-4	7:3
S25	112-130	5:5	Acetato de etilo 100%
S26	131-142	1:1	Acetato de etilo / metanol 9:1
S27	143-150	Acetato de etilo 100%	9:1
S28	151-153	Acetato de etilo 100%	9:1
S29	154	Acetato de etilo / metanol 9:1	9:1
S30	155	9:1	9:1
S31	156	9:1	Acetato de etilo / metanol 1:1
S32	157-162	9:1	1:1
S33	163-169	8:2, 1:1	1:1
S34	170-176	Metanol 100%	1:1

Tabla XII. Sistema de solventes utilizados para el fraccionamiento en cromatografía en columna y capa fina para la fracción de etanol de *A. pleiakantha*.

Subfracción de etanol	Fracción eluída (200 mL % _{v/v})	Disolvente en columna	Disolvente en cromatografía en capa fina
SE1	1-9	Hexano y hexano/ acetato de etilo 9:1	Hexano/ acetato de etilo 9:1
SE2	10-12	9:1	9:1
SE3	13-17	9:1	9:1
SE4	18-19	9:1	9:1
SE5	20-22	9:1	9:1
SE6	23-41	9:1	9:1
SE7	41-43	9:1	9:1
SE8	44-62	9:1	9:1
SE9	63-70	9:1	8:2
SE10	71-86	9:1, 8:2	8:2
SE11	87-89	8:2	8:2
SE12	90-91	8:2	8:2
SE13	92-101	8:2	7:3
SE14	102-106	8:2, 7:3	7:3
SE15	107-110	7:3	7:3
SE16	11-112	7:3	6:4

Tabla XII. Sistema de solventes utilizados para el fraccionamiento en cromatografía en columna y capa fina para la fracción de etanol de *A. pleiakantha*. Continuación de la Tabla XII (Continuación)

SE17	113-130	7:3, 6:4	6:4
SE18	131-158	6:4, 1:1	1:1
SE19	159-160	1:1, Acetato de etilo 100%	Acetato de etilo 100%
SE20	161-167	Acetato de etilo 100%	Acetato de etilo / metanol 9:1
SE21	168-179	Acetato de etilo / metanol 9:1	9:1
SE22	180-182	9:1	9:1
SE23	183-184	9:1	9:1
SE24	185-196	9:1	8:2
SE25	197-199	8:2	8:2
SE26	200-208	8:2	8:2
SE27	209-214	8:2	Acetato de etilo / metanol 8:2
SE28	215-221	8:2, 7:3	7:3
SE29	222-230	7:3, 6:4	6:4, 1:1
SE30	231-237	6:4, 1:1, metanol 100%	metanol 100%
SE31	238-244 y 246-255	Metanol / agua 9:1, 8:2, 1:1	Metanol / agua 9:1, 8:2, 1:1
SE32	245	Metanol / agua 8:2	Metanol / agua 8:2