



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Determinación de la actividad antiinflamatoria por el método de inducción de edema por TPA y propiedades citotóxicas utilizando el método de la sulforrodamina B de extractos de *Heterotoma lobelioides* Zucc (Campanulaceae)

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

P R E S E N T A:

DIANA URIBE CERVANTES

DIRECTOR: Dr. Mariano Martínez Vázquez

ASESORA INTERNA: Dra. Francisca Leonora Sánchez García
Figueroa

MÉXICO D. F., SEPTIEMBRE, 2009





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se desarrolló en
el laboratorio 1-4 del Instituto de Química de la Universidad Nacional
Autónoma de México

Bajo la dirección del
Dr. Mariano Martínez Vázquez

AGRADECIMIENTOS

A mi Director de Tesis, Dr. Mariano Martínez Vázquez por la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo y sobretodo por el apoyo para la concreción de este trabajo.

A la Doctora Hortensia Rosas por las sugerencias realizadas a este trabajo, las cuales ayudaron a enriquecer el mismo.

A los integrantes del laboratorio 1-4 del Instituto de Química por todas las enseñanzas, el apoyo y por todas las atenciones.

A la Doctora Aída García por su orientación en los inicios de esta investigación.

A los miembros del jurado: Dra. F. Leonora Sánchez García Figueroa, Biól. J. M. Vicente Hernández Vázquez, Biól. Reynalda Roldán Pérez. A todos, les agradezco por sus valiosos comentarios y sugerencias.

A Antonio Nieto y Teresa Ramírez Apan por su apoyo en la realización de las pruebas biológicas y a los técnicos de RMN, EM, IR y Rayos X.

DEDICATORIAS

A mi madre Esther, que en su momento, buscó lo mejor para mí y me hizo una persona con valores y principios para toda la vida. Serás siempre mi inspiración para alcanzar mis metas, por enseñarme que todo se aprende y que todo esfuerzo es al final recompensa.

A mi padre Eduardo, por darme la estabilidad emocional, económica, sentimental; para poder llegar hasta este logro. Soy afortunada por contar siempre con su amor y comprensión.

A mis hermanos Eduardo y Alejandro, con mucho cariño, que definitivamente sin ustedes no hubiese podido efectuar la realización de mis sueños.

A mis amigas por ser unas personas increíbles y con quienes he compartido muchos momentos que siempre llevaré en mi corazón. Ustedes han enriquecido mi vida con su cariño y su alegría. Gracias por recordarme que hay personas valiosas en el mundo y gracias por estar en el mío.

A Naye, que definitivamente sin ti no hubiese podido efectuar la realización de mis sueños.

A mi novio por apoyarme y ayudarme a sacar mi tesis adelante y llegar en el momento que más lo necesitaba. Eduardo Te Amo

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE CUADROS	8
ABREVIATURAS	9
1 RESUMEN	10
2 INTRODUCCIÓN	11
3 MARCO TEORICO	14
3.1 ANTECEDENTES	14
3.1.1 Cáncer	14
3.1.2 Inflamación	15
3.1.3 Inflamación y cáncer	17
3.1.4 Metabolitos secundarios con actividad antitumoral	18
3.1.5 Síntesis de metabolitos secundarios	21
3.1.6 Flavonoides	23
3.1.6.1 Actividad biológica de los flavonoides	25
3.1.7 Modelos de determinación de actividades antiinflamatorias y citotóxicas	25
3.1.7.1 Ensayo de edema en oreja de ratón por TPA	26
3.1.7.2 Determinación de la actividad citotóxica	27
3.2 Género <i>Heterotoma</i>	27
3.3 Clasificación taxonómica de <i>H. lobelioides</i>	27
3.4 Descripción botánica	28
3.5 Distribución geográfica	28
3.6 Antecedentes de metabolitos secundarios activos de <i>Heterotoma lobelioides</i>	29
4 JUSTIFICACIÓN	32
5 HIPÓTESIS	33

6 OBJETIVOS	34
7 MATERIAL Y MÉTODO	35
7.1 Material vegetal	35
7.2 Preparación de los extractos	35
7.2.1 Fraccionamiento del extracto hexánico del tallo sin corteza	36
7.2.2 Fraccionamiento del extracto hexánico de la corteza del tallo	36
7.2.3 Fraccionamiento del extracto metanólico del tallo sin corteza	37
7.3 Determinación de la actividad citotóxica	37
7.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria	40
8 RESULTADOS	42
8.1 Pruebas biológicas de los extractos	42
8.1.1 Actividad citotóxica	42
8.1.2 Actividad antiinflamatoria	43
8.2 Fracciones colectadas de las columnas	45
8.3 Metabolitos secundarios aislados de los extractos	46
8.3.1 Actividad citotóxica de los metabolitos secundarios aislados	48
8.3.2 Actividad antiinflamatoria de los metabolitos secundarios aislados	49
9 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	50
10 CONCLUSIONES	52
11 LITERATURA CITADA	53

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Vinblastina, vincristina y paclitaxel

FIGURA 2. Compuestos y derivados con importancia clínica en el tratamiento del cáncer

FIGURA 3. Estructura general de los flavonoides

FIGURA 4. Estructuras químicas de las subclases de flavonoides más usuales

FIGURA 5. *Heterotoma lobelioides*

FIGURA 6. Mapa de la distribución de *Heterotoma lobelioides* en México

FIGURA 7. Fortunelina, (7-O-neohesperósido de acetina) aislada del extracto metanólico de hojas de *Heterotoma lobelioides*

FIGURA 8. Estigmasterol y β -sitosterol

FIGURA 9. 5,6,7-trihidroxi, 4'-metoxi flavona

FIGURA 10. Ácido 5-hidroxi-2-metoxi-benzoico

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Origen biosintético de los grupos principales de metabolitos

secundarios en los vegetales

CUADRO 2. Características de las líneas celulares

CUADRO 3. Rendimiento de los extractos obtenidos del tallo de *H. lobelioides*

CUADRO 4. Porcentajes de inhibición de crecimiento celular de extractos

hexánicos y metanólicos del tallo de *H. lobelioides*

CUADRO 5. Actividad antiinflamatoria de los extractos del tallo de *H. lobelioides*

CUADRO 6. Fraccionamiento del extracto hexánico de la corteza por

cromatografía en columna

CUADRO 7. Fraccionamiento del extracto metanólico del tallo sin corteza

CUADRO 8. Rendimiento de los productos aislados de *H. lobelioides*

CUADRO 9. Porcentajes de inhibición de crecimiento celular de la 5,6,7

trihidroxi, 4'-metoxi flavona (4)

ABREVIATURAS

AcOEt: Acetato de etilo

CCF: Cromatografía capa fina

DMSO: Dimetilsulfoxido

D.O: Densidad óptica

EDTA: Etilen-diamin-treta acético

INEGI: Instituto Nacional de Información Geográfica y Estadística

MS: Metabolitos secundarios

OMS: Organización Mundial de la Salud

SRB: Sulforrodamina B

TPA: 13-acetato de 12-O-tetradecailforbol

TCA: tricloroacético

1 RESUMEN

La especie *Heterotoma lobelioides*, popularmente conocida como "gallito", es una especie con escasos estudios tanto en su contenido químico como en sus propiedades biológicas. Esta especie habita desde el bosque tropical seco de la Sierra del Sur en Jalisco, hasta Chiapas. A esta especie, de manera popular, se le atribuyen propiedades tóxicas, pero no existe ningún estudio científico que confirme esta información.

Estudios fitoquímicos previos, realizados por nuestro grupo, han señalado la presencia de fortunelina, un flavonoide con efectos antiinflamatorios.

En el presente trabajo se da a conocer los resultados de la composición química, así como la evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica por medio de los ensayos de 13-acetato de 12-O-tetradecailforbol (TPA) y Sulforrodamina B (SRB) respectivamente, de los extractos orgánicos y compuestos aislados, a partir del tallo de *H. lobelioides* recolectada en Guerrero, México.

Los resultados indicaron que los extractos de hexano y metanólico del tallo presentan actividad citotóxica, sin embargo, ninguno fue activo como agente antiinflamatorio.

De la cromatografía del extracto metanólico del tallo sin corteza se obtuvieron la 5,6,7-trihidroxi, 4'-metoxi flavona y el ácido 5-hidroxi-2-metoxi-benzoico.

Los resultados indican que la 5,6,7-trihidroxi, 4'-metoxi flavona, en la línea de cáncer de próstata mostró una inhibición de 25.12% y en el modelo de edema inducido por TPA se mostró un 41.2% de inhibición de edema a la dosis de 1mg/oreja.

2 INTRODUCCIÓN

Desde sus inicios, la humanidad ha usado diversas especies vegetales para su desarrollo. Así el hombre las ha utilizado, como alimento, para la procuración de salud así como para proveerse de abrigo (Anderson, 2001).

La ubicación geográfica y las condiciones fisiográficas del territorio mexicano han privilegiado el desarrollo de una amplia variedad de especies animales y vegetales. De tal forma que México se considera un país megadiverso (Rzendowski, 1978). Indiscutiblemente que ésta riqueza de especies vegetales ha influido en el desarrollo de una medicina tradicional importante en el país. Por ejemplo, se sabe que los antiguos habitantes de México, conocían las propiedades terapéuticas de un gran número de plantas. Conocimientos que han sido heredados de forma verbal, hasta nuestros días. No obstante la gran riqueza y la variedad de la flora que se utiliza en la medicina tradicional, el porcentaje de especies que poseen estudios botánicos y farmacológicos es muy escaso (Torres *et al.*, 2005).

Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS), pronostica que para el año 2030 habrá 27 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados en todo el mundo, con lo que 75 millones de personas padecerán ésta enfermedad y de ellos, cada año, fallecerán 17 millones (Boyle *et al.*, 2008). En México, en el año 2006 el INEGI informó que existieron 63 mil 878 defunciones a causa de este padecimiento, colocando al cáncer como la tercera causa de muerte. Hoy en día, existen varios métodos terapéuticos para combatir el cáncer, entre ellos destaca la llamada quimioterapia, la cual utiliza varios fármacos tanto sintéticos como naturales para combatir este mal. Actualmente, existen varios agentes anticancerosos utilizados en la clínica, sin embargo todos presentan efectos secundarios, varios de ellos bastante agresivos al paciente. Aunado a lo anterior,

a la larga, las células cancerosas desarrollan resistencia a los fármacos antitumorales. Por todo lo anterior, es una prioridad, la búsqueda continua de nuevos compuestos potencialmente útiles como fármacos anticancerosos (García-Argáez *et al.*, 2000).

Una de las aproximaciones más atractivas para la búsqueda de nuevos fármacos es la representada por las llamadas plantas medicinales. Por ejemplo, el paclitaxel® (taxol) uno de los fármacos anticancerosos más usado en la clínica se obtuvo del tejo del pacífico (*Taxus brevifolia*). Otro ejemplo es la mandrágora, *Podophyllum peltatum*, de la cual se tiene aplicación en el cáncer testicular y en el carcinoma de del pulmón (García- Argáez *et al.*, 2000).

Indiscutiblemente, las posibles acciones farmacológicas que puedan presentar las plantas medicinales, se deben a la composición química de las especies vegetales. Entre los compuestos sintetizados por las plantas (más importantes por su acción biológica) se encuentran los llamados metabolitos secundarios (Croteau *et al.*, 2002).

Estos metabolitos se producen a partir de compuestos del llamado metabolismo primario, los cuales son modificados por varias enzimas. Los metabolitos secundarios generalmente se clasifican de acuerdo con su estructura química. Por ejemplo tenemos a los alcaloides (cafeína, teobromina, cocaína, etc), terpenos, (geraniol, mentol, limoneno, etc.), las antraquinonas y los flavonoides (apigenina, rutina, etc.) entre otros (Kliebenstein, 2004).

Diferentes estudios han demostrado que una gran variedad de metabolitos secundarios presentan actividades citotóxicas y antiinflamatorias (García- Argáez *et al.*, 2000). Ejemplo de ello, lo constituye el *Catharantus roseus*, conocida comúnmente como vinca. El estudio químico de esta especie permitió el aislamiento de cuatro alcaloides diméricos activos: vinblastina, vincristina, vinleurosina y vinrosina. Los dos primeros, se convirtieron en agentes

clínicamente importantes para el tratamiento de leucemias, linfomas y cáncer testicular (Cragg, 2005).

Por otro lado, en algunas especies de la familia Campanulaceae se han informado la presencia de metabolitos secundarios, por ejemplo en *Campanula barbata* se han aislado flavonas, (Cuendet, 2001), y de especies del género *Lobelia*, se han aislado alcaloides, estos últimos han demostrado su uso potencial como agentes anticancerígenos, ya que fueron capaces de inhibir tanto algunos tumores, así como el crecimiento de ciertas células tumorales (González, 1989, Cuendet, 2001).

Tomando en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se propuso la evaluación de las propiedades antiinflamatorias y citotóxicas de algunos extractos obtenidos a partir de *Heterotoma lobelioides* (Campanulaceae)

3 MARCO TEORICO

3.1 ANTECEDENTES

3.1.1 Cáncer

El cáncer en realidad no es una enfermedad, sino que es un término que agrupa varias enfermedades. La American Cancer Society define al cáncer, como un proceso de crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales de hecho, una característica del cáncer es la alteración en los mecanismos de control que regulan la proliferación y diferenciación de las células (Katzung, 1999).

Existen diferentes factores que contribuyen a desarrollar algún tipo de cáncer; los exógenos y los endógenos. El primer grupo incluye agentes físicos (radiación), compuestos químicos, hábitos nutricionales, agentes biológicos (virus) e inflamación. El segundo grupo incluye la predisposición genética, edad, hormonas, daño del sistema inmune. (Gutiérrez *et al*, 2001)

Por otro lado, Sir Rupert Willis definió a una neoplasia como una masa anormal de tejido que no está coordinado por los mecanismos reguladores normales y cuyo crecimiento excede al tejido normal. Adicionalmente, varios tipos de neoplasia persisten, aunque haya finalizado el estímulo que suscitó su alteración. De manera formal, una neoplasia no constituye un cáncer hasta que presente metástasis. Las neoplasias malignas tienen la capacidad de desarrollar metástasis, esto es, la propagación del cáncer a otros tejidos partir del tumor inicial y formar tumores secundarios. (Katzung, 1999).

La transformación neoplásica involucra tres etapas: iniciación, promoción y progresión. La iniciación es el proceso por el cual un daño crítico del ADN se

hace permanente en la célula, debido a que ésta se divide antes de que se repare, o bien por un fallo en el proceso de reparación. (Oliveira *et al.*, 2007). Una vez que la célula ha sufrido alteraciones genéticas, se pueden activar o no los eventos destinados a preservar la normalidad celular; entre ellos, están los relacionados a la acción de los mecanismos reparadores que son productos de genes que cesan los errores genéticos y los reparan para que no sean heredados por las células hijas y los relacionados a la apoptosis o muerte celular programada que excluirá a las células que acumularon varias mutaciones. La falla de estos mecanismos, induce a la célula a que entre a fase de promoción con defectos genéticos. En la etapa de promoción, aumentan las alteraciones en la expresión de genes y causan cambios en el control de crecimiento celular, confiriendo proliferación anormal a células iniciadoras y con ello el desarrollo de células pre-neoplásicas por carencia de agentes supresores presentes en células normales adyacentes (Oviedo *et al.*, 2005). Al igual que en la iniciación, en esta etapa la apoptosis puede actuar como mecanismo para evitar la duplicación de células con alteraciones genéticas. La inestabilidad entre el crecimiento y la muerte celular pueden llevar a la aparición de una neoplasia maligna. Finalmente en la progresión, un fenotipo neoplásico es adquirido a través de mecanismos genéticos que dan a las células mayor ventaja de crecimiento, que permite la ocurrencia de crecimiento tisular con la formación del tumor; desencadenándose la invasión de tejidos vecinos y metástasis. (Trosko, 2003)

3.1.2 Inflamación

La inflamación se desarrolla como parte de los mecanismos de defensa del organismo en respuesta a distintos agentes patógenos de acción local de naturaleza diversa. Estos pueden ser externos, como traumatismos mecánicos y productos químicos; o internos, como lesiones provocadas por procesos isquémicos, o producidos por patógenos como virus, bacterias y parásitos, así como por enfermedades del sistema inmunológico.

El proceso de inflamación, como parte del mecanismo de defensa inmune, es normal y, en consecuencia es benéfico para el organismo. No obstante, en algunas condiciones se prolonga en forma indebida dando lugar a daño tisular y manifestaciones clínicas muy importantes (Nathan, 2002).

El proceso de inflamación se desarrolla en tres fases: 1) Respuesta inflamatoria inmediata, relacionada con la causa. 2) Amplificación de la respuesta inicial por la acción de mediadores químicos que potencian la reacción vascular. 3) Cronificación de la inflamación y/o reparo de los tejidos (Kumar *et al.*, 2005)

La inflamación según su duración se divide en aguda y crónica. La inflamación aguda es inmediata y de corta duración se inicia por dilatación de los vasos sanguíneos y escape de leucocitos y líquidos. En términos generales, se produce enrojecimiento (eritema) por dilatación de los vasos, hinchazón (edema) por escape de líquido a los tejidos blandos y endurecimiento (induración) por acumulación de líquidos y células. Si estos mecanismos inflamatorios no logran devolver al tejido lesionado su estado original o si no es posible la reparación del tejido, la situación evoluciona hasta un estado de inflamación crónica que se caracteriza por la presencia constante de linfocitos, monocitos, neutrófilos, fibroblastos, células plasmáticas, proliferación de pequeños vasos sanguíneos, incremento del tejido conjuntivo y destrucción tisular (Kumar *et al.*, 2005).

Estudios previos relacionados con la actividad antiinflamatoria han demostrado que la inflamación, consiste en la participación de un sin número de células y compuestos, los cuales crean un microambiente favorable a la transformación neoplásica y potencia la progresión de cáncer. De aquí que la inhibición o atenuación del proceso de inflamación puede ser de ayuda en los tratamientos del cáncer (Oviedo-Chávez *et al.*, 2005).

3.1.3 Inflamación y cáncer

La percepción de que procesos inflamatorios pueden estar vinculados a procesos cancerosos no es nueva. En 1863 Virchow hipotetizó que los cánceres se desarrollaban en lugares donde se presentaban procesos de inflamación crónica. Su hipótesis se fundamentó, principalmente, en la observación que de algunos irritantes, que aunado a un daño tisular y un proceso inflamatorio causaban un incremento en la proliferación celular (Nathan, 2002)

Hoy en día se conoce que la proliferación celular por si misma no constituye un cáncer, sin embargo, una proliferación celular sostenida en un ambiente rico en células inflamatorias, factores de crecimiento, estroma activado, ciertamente potencian y promueven riesgos neoplásicos. (Pollard, 2004; Coussens y Werb., 2002). De manera natural, durante un daño tisular asociado a una herida, la proliferación celular se aumenta mientras el tejido se regenera. La proliferación y la inflamación asociada al daño desaparecen cuando el agente dañino es removido y la reparación tisular es completa. En contraste, células en proliferación con daño en el ADN y que continúan en proliferación, a pesar de la remoción del agente causante del daño tisular, y que se ubique en microambientes ricos en células inflamatorias y factores de crecimiento impulsan la instalación y crecimiento tumoral (Katzung, 1999; Coussens y Werb., 2002)

A pesar de la importancia de esta relación, ésta pasó inadvertida en el pasado. Recientemente se ha generado una vasta información que indica a los procesos inflamatorios como contribuyentes o quizá la causa de una gran variedad de procesos cancerosos. (Nathan, 2002). Actualmente, se conoce que por lo menos el 15% de los tumores, a nivel mundial, tienen su origen en procesos infecciosos. (Boyle *et al.*, 2008) Generalmente los patógenos, causan una inflamación persistente. Quizá, los casos más documentados son los papeles desempeñados por el *Helicobacter pylori* en el cáncer gástrico (Uemura *et al.*, 2001), los virus del papiloma humano en el cáncer cervical (Bernal *et al.*, 2002) y los

esquistosomas en el cáncer de vejiga y uretra. (Villar *et al.*, 2000). Irritantes, tales como, asbestos, sílice, y el humo del cigarro, también incrementan la probabilidad de desarrollar cáncer bronquial. (Shields, 2002) La inflamación del colon así como la asociada a la colitis ulcerativa o la enfermedad de Crohn, predispone a los pacientes a sufrir cáncer colorectal (Eaden *et al.*, 2001)

En conjunto, estos datos indican que la inflamación crea un microambiente que promueve una transformación tisular produciendo neoplasias y potenciando la instalación de procesos cancerosos (Pollard 2004). Por lo tanto, la inhibición o la atenuación de procesos inflamatorios pueden ser útiles para el tratamiento de algunos cánceres.

3.1.4 Metabolitos secundarios con actividad antitumoral

El término “Productos Naturales” generalmente se refiere a los metabolitos secundarios (MS) de origen vegetal, los cuales son sintetizados por el metabolismo secundario. Durante muchos años se pensó que los metabolitos secundarios eran productos de desecho, sin ninguna función aparente (Verpoorte, 1998). En la actualidad, el origen y la utilidad de estos metabolitos se ha sido tratado de explicar por varias hipótesis. Una de ellas propone que estos compuestos juegan un papel importante en la supervivencia de las especies vegetales, proporcionando sustancias para su defensa u otro significativo papel fisiológico. Algunos de estos compuestos son responsables de la coloración, de los aromas de las flores y los frutos, otros están vinculados con la interacción ecológica, como la atracción de polinizadores y otros participan en el mecanismo de defensa de las plantas, actuando como repelentes o protección contra condiciones abióticas adversas (Loyola *et al.*, 2006).

Una de las razones para el estudio de los MS, es que varios de estos compuestos, en los mamíferos principalmente, desencadenan respuestas fisiológicas

específicas y que en varios casos se unen a diversos receptores celulares (Williams *et al.*, 1989).

Estas propiedades han permitido que algunos MS hayan sido fuente importante de fármacos anticancerosos utilizados en la clínica. En el año 2000, aproximadamente 53% de los compuestos bajo ensayos clínicos, como fármacos antitumorales, fueron MS o compuestos derivados de productos naturales (Newman *et al.*, 2003). Ejemplo de ello son vinblastina, vincristina, camptotecina, topotecan, irinotecan y paclitaxel (taxol®)

Los alcaloides Vinca (Fig.1) aislados de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) se utilizan para combatir cáncer de testículo, mama y pulmón (vinblastina y vincristina).

Los Taxanos como el paclitaxel® (Fig.1), el cual se obtuvo de la corteza del árbol conocido como tejo del pacífico (*Taxus brevifolia Nutt*) es usado, en la clínica para tratar el cáncer de ovario y mama (Cragg y Newman, 2005).

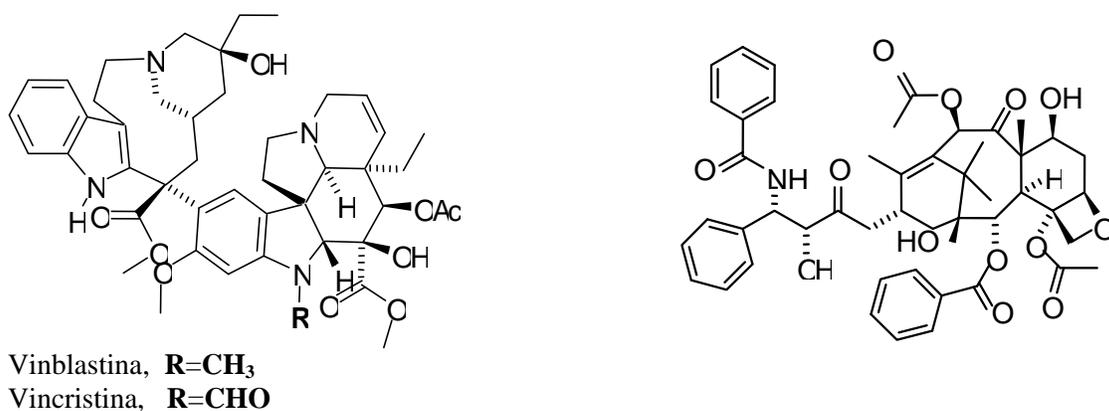


Fig. 1 Vinblastina, vincristina y paclitaxel®

Otros compuestos con importancia clínica son la Camptotecinas y sus derivados, el irinotecano y el topotecano; así como la homoharringtonina, la elipticina y su

derivado, el eliptinium (Fig. 2). Este último empleado en Francia para el tratamiento del cáncer de mama. (Cragg y Newman, 2005).

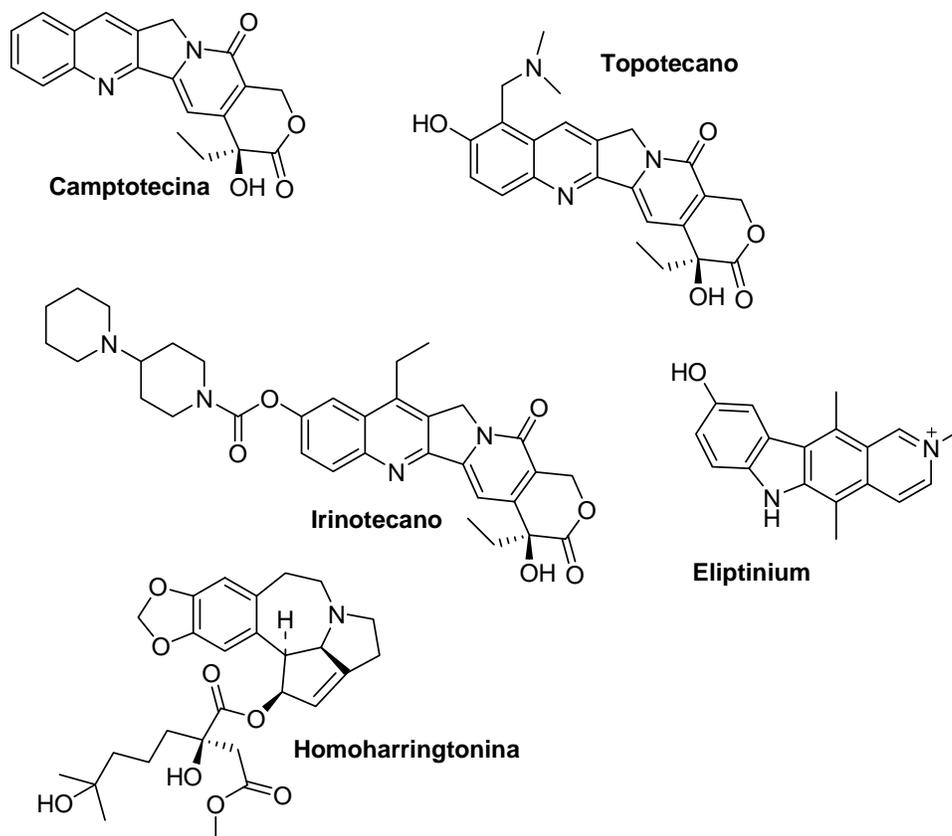


Fig. 2 Compuestos y derivados con importancia clínica en el tratamiento del cáncer

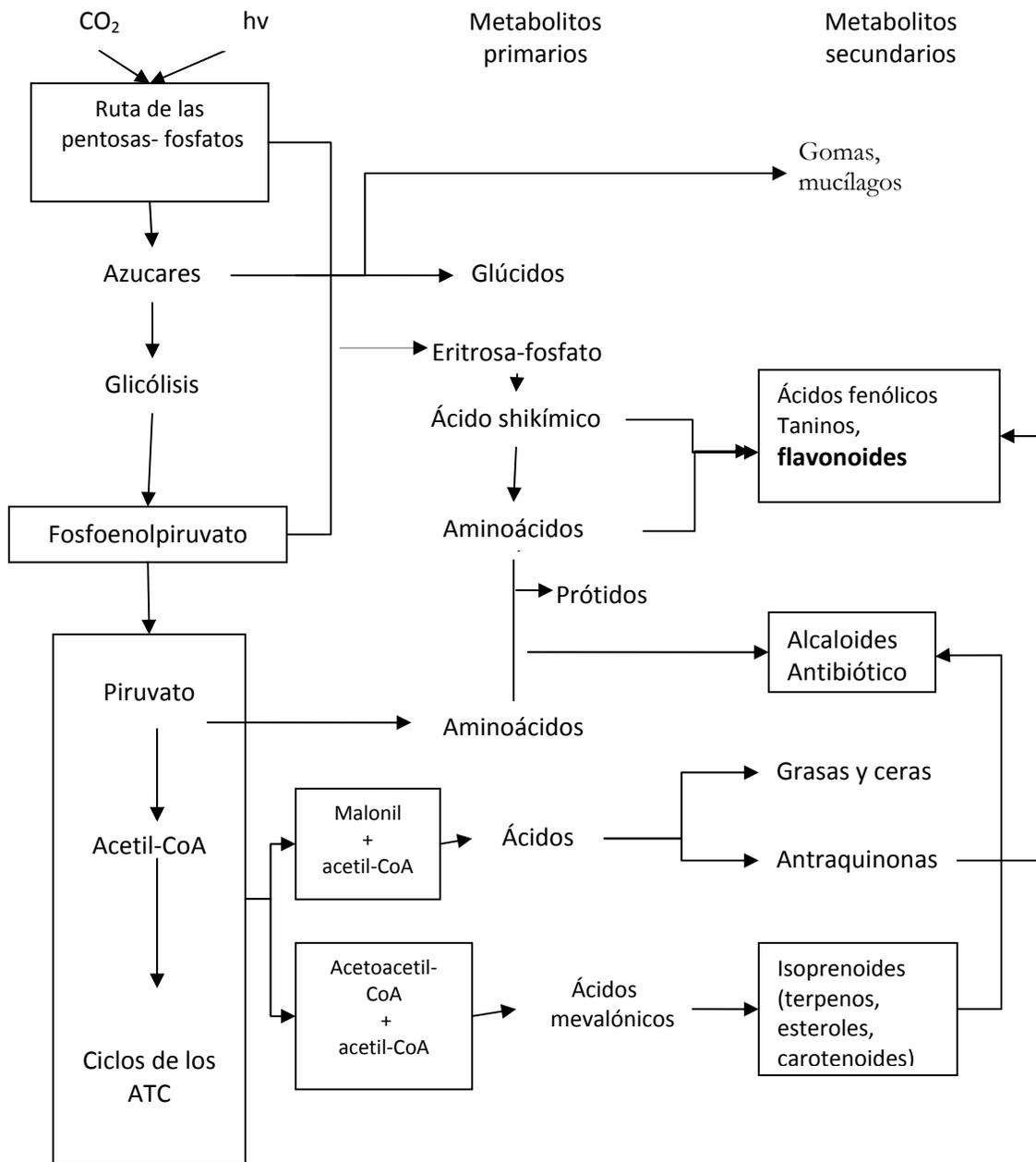
Aunque los MS a los que hacemos referencia, son los de mayor importancia clínica, existe una gran cantidad de metabolitos estructuralmente diversos, con probada actividad contra líneas celulares de cáncer. Como las son las cumarinas, los alcaloides, los terpenos, triterpenos y flavonas, entre otros; de tal forma que es posible encontrar, en cada grupo de metabolitos secundarios, algún representante con propiedades anticancerosas o antiinflamatorias (Kinghorn *et al.*, 2003).

En la actualidad se conocen más de 100,000 compuestos secundarios (Goossens *et al.*, 2003). Por el potencial terapéutico que representan estos metabolitos, las investigaciones se han dirigido principalmente a la evaluación de su actividad biológica. Los resultados han indicado que hay una gran variedad de metabolitos secundarios que no solo son anticancerosos sino que también tienen actividad antiinflamatoria (Croteau *et al.*, 2002).

3.1.5 Síntesis de metabolitos secundarios

La síntesis de los MS, por las diferentes especies vegetales, sigue varias rutas; entre las más importantes, tenemos la ruta del acetato/mevalonato y la ruta del ácido shiquímico.

Metabolito Secundario	Ruta de síntesis
Ácidos fenólicos	Ruta del ácido shiquímico
Taninos	Ruta del ácido shiquímico
Alcaloides	Ruta del ácido shiquímico y ruta del ácido mevalónico
Antraquinonas	Ruta de los policétidos
Lignanós y Cumarinas	Ruta del ácido shiquímico
Terpenos	Ruta del ácido mevalónico
Flavonoides	Ruta del ácido shiquímico y ruta de los policétidos



Cuadro 1 Origen biosintético de los principales metabolitos secundarios (Tomado de Kuklinski, 2000)

3.1.6 Flavonoides

Los flavonoides constituyen un extenso grupo de metabolitos secundarios que se encuentran distribuidos en la naturaleza en forma de glucósidos o agliconas. Hasta la fecha se han identificado, en plantas vasculares, más de 9000 diferentes flavonoides y su concentración dentro de la especie vegetal varía según el tipo de planta, edad, condiciones de crecimiento y ubicación geográfica (Williams, *et al*, 2004).

Estos metabolitos secundarios son responsables de las diferentes coloraciones de las flores. Esta coloración es vital para la especie vegetal, ya que sirve como polo de atracción para los polinizadores. Por consiguiente los flavonoides ayudan a establecer la relación entre el polinizador y la especie vegetal (Koopman *et al*, 2005).

Los flavonoides, son compuestos de bajo peso molecular. Estructuralmente, poseen 15 átomos de carbono, con esqueleto C₆-C₃-C₆, es decir, dos anillos bencénicos (anillos A y B) unidos mediante un anillo heterocíclico de pirano o pirona (anillo C) (Fig. 6) (Middleton *et al.*, 2000).

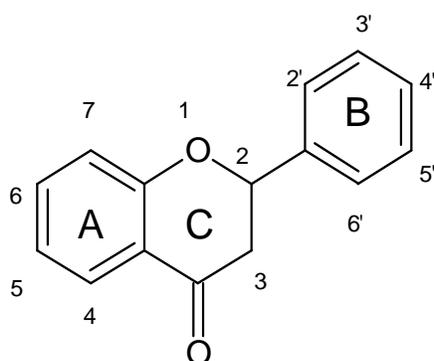


Fig. 3 Estructura general de los flavonoides

De acuerdo a los sustituyentes presentes, se subdividen en función de la presencia o ausencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C, y de la presencia de grupos hidroxilo en el anillo B. Tomando en cuenta lo anterior estos MS se clasifican en: (1) flavanoles, (2) antocianidinas, (3) flavonas, flavanonas y chalconas (Fig. 4) (Middleton *et al.*, 2000).

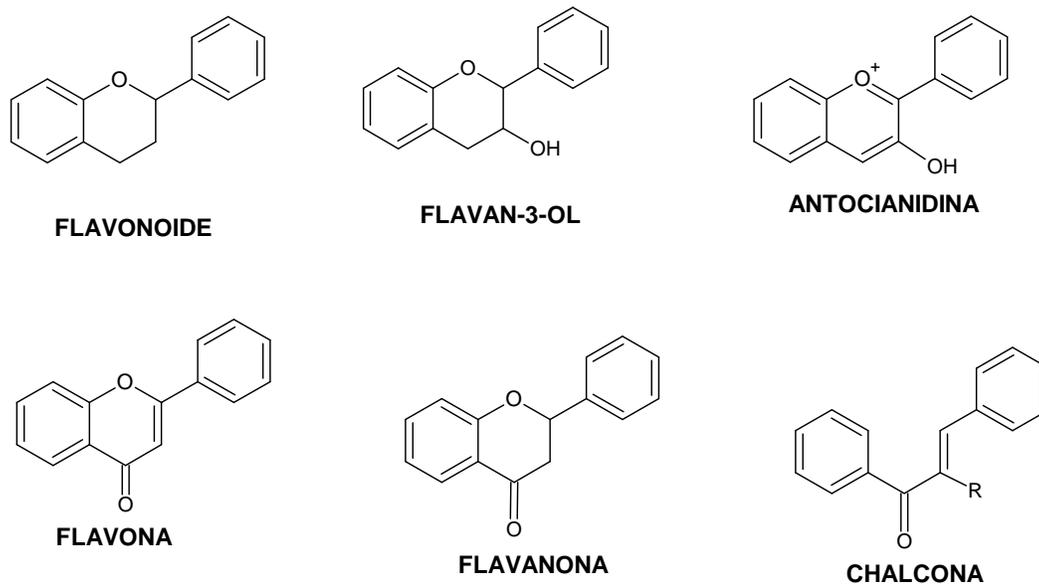


Fig. 4 Estructuras químicas de las subclases de flavonoides más usuales

La biosíntesis de los flavonoides se realiza a través de una ruta mixta (Cuadro 1), que comprende tanto la ruta del ácido shiquímico como la ruta de los policétidos y los diferentes tipos de flavonoides que se dan dependiendo de las modificaciones en algún estadio de estas rutas (Kuklinski, 2000).

3.1.6.1 Actividad biológica de los flavonoides

Los flavonoides poseen actividad antiviral, antibiótica, antiinflamatoria y anticarcinogénica, (Kuklinski, 2000) entre otras. Lo que sugiere que este tipo de metabolitos pueden afectar significativamente, en mamíferos, la función de múltiples sistemas celulares (Williams, *et al*, 2004).

Estudios experimentales realizados *in vitro* han demostrado que algunos flavonoides pueden inhibir y algunas veces inducir, una gran variedad de sistemas enzimáticos. Algunas de estas enzimas están involucradas en importantes rutas que regulan la división y proliferación celular, agregación plaquetaria, desintoxicación y respuesta inmune e inflamatoria (Middleton *et al.*, 2000).

3.1.7 Modelos de determinación de actividades antiinflamatorias y citotóxicas.

3.1.7.1 Ensayo de edema en oreja de ratón por TPA

Entre los métodos para evaluar la actividad antiinflamatoria se encuentran los estudios *in vivo* en los cuales se valoran los principales signos de la inflamación como presencia de edema. En este trabajo se utilizó el modelo de edema inducido por el 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA), que se caracteriza por inducir una respuesta local e inhibición del edema que es un indicativo del efecto antiinflamatorio de la sustancia a evaluar (De Young *et al.*, 1989; Monks *et al.*, 1991; Argumedo *et al*, 2003).

La aplicación tópica de TPA induce una reacción inflamatoria caracterizada por edema, acumulación de células y a nivel molecular la inducción de TNF- α y

eicosanoides tales como leucotrienos B₄ (LTB₄) y prostaglandinas E₂ (PGE₂) (De Young *et al.*, 1989).

Así mismo, la magnitud de la inflamación puede estar correlacionada con la inducción de la cicloxigenasa 2 (COX-2), la cual alcanza su máxima concentración 6 horas después de la aplicación del edemógeno (De Young *et al.*, 1989).

Es conocido que los mecanismos involucrados en el método de inducción de edema por carragenina, son diferentes a aquellos que se presentan en el edema inducido por 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA). La inyección subplantar de carragenina en ratas, induce un edema caracterizado por 3 fases: una fase inicial mediada por histamina y 5-hidroxitriptamina (las dos primeras horas), en una fase intermediaria involucrando la actividad de la braquidina y, una tercera fase, (3-6 horas) inducción de síntesis de prostanoides inducida por ciclooxigenasas. (Di Rosa, 1972).

3.1.7.2 Determinación de la actividad citotóxica

Por otro lado, el ensayo de citotoxicidad *in vitro*, propuesto en este trabajo, consiste en la incubación de cultivos celulares de líneas tumorales en presencia o ausencia de sustancias de prueba; posteriormente, las células se fijan y el efecto de viabilidad se determina mediante el ensayo colorimétrico de sulforrodamina B (SRB)

El método depende de la habilidad de la SRB a unirse con los componentes proteicos de la célula que han sido fijados en cultivos celulares por el ácido tricloroacético (TCA). La SRB es un colorante rosa brillante, el cual tiene dos grupos sulfónicos que se unen a los residuos básicos de los aminoácidos bajo ligeras condiciones ácidas, y son disociadas bajo condiciones básicas. La Sulforodamina B es fuertemente detectada con un rayo de luz a 488 nanómetros y se puede medir cuantitativamente a través de citometría de flujo fundamentada en la tinción de proteínas celulares totales con el colorante SRB y la intensidad

del color es directamente proporcional Al numero de células (Monks *et al.*, 1991).

3.2 Género *Heterotoma*

La familia Campanulaceae está representada por 84 géneros y cerca de 2400 especies de distribución cosmopolita (Lammers, 2007).

La familia se divide en 5 subfamilias: Campanuloideae Burnett, Lobelioideae Burnettcon, Nemacladoideae Lammers, Cyphioideae Walp. y Cyphocarpoideae Miers

Debido a similitud de algunos caracteres fenotípicos entre los géneros *Heterotoma* y *Lobelia*, la mayoría de las especies inicialmente pertenecientes al género *Heterotoma* fueron reubicados dentro del género *Lobelioides*, excepto la *H. lobelioides* (Koopman *et al*, 2005).

Actualmente el género *Heterotoma* (Campanulaceae) solo está conformado por la especie *H. lobelioides* Zucc.

3.3 Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Campanulales

Familia: Campanulaceae

Género: *Heterotoma*

Especie: *Heterotoma lobelioides* Zucc.

3.4 Descripción botánica.

Plantas de 0.5 a 1.5 m de alto, perennes, arbustivas. Tallos erectos, pubescentes. Hojas inferiores ovoides, ápice acuminado, margen denticulado, base redondeada, cordada.

Inflorescencias de 25 a 45 cm de largo; pedicelos de 5 a 6.3 cm de largo, pubescentes; hipantio de 5 a 7 mm de largo, con espolón de 1.5 a 2.5 cm de largo; lóbulos del cáliz enteros, ciliados o estrechamente triangulares; tubo de la corola rojo oscuro-amarillo, con hendidura dorsal, fenestrada, de 2.1 cm de largo, pubérula, lóbulos de la corola amarillos, dos de ellos curvados, triangulares o lanceolados, de 5 a 8 mm de largo, los otros 3 triangulares, de 1.5 a 3 mm de largo, glabros o puberulentos; tubo de los filamentos inserto en la corola, estos connados a casi la mitad de su longitud, de 1.3 a 1.8 cm. de largo, pubérulos en la base, tubo de las anteras de 4 a 5 mm de largo, con mechón de tricomas en el ápice de 1 mm de largo; ovario de 4 a 7 mm de largo, estilo de 1.7 a 2.3 cm de largo, estigma de 1 a 2 mm de largo. Cápsula de 5 a 6 mm de largo, Semillas numerosas, elipsoides, fusiformes, lisas, algunas lustrosas, de aproximadamente 0.5 mm de largo (Belmont, 1996).



Fig. 5 *Heterotoma lobelioides*
(Tomado de CONABIO, 2008)

3.5 Distribución geográfica

En México, *H. lobelioides* habita en el bosque tropical seco de la Sierra del Sur, que comprende el territorio que va del estado de Jalisco hasta el estado de Chiapas. De igual forma se le puede encontrar en las regiones montañosas

volcánicas centroamericanas como en el Volcán Irazu, en Costa Rica, (Fig. 6) su distribución también abarca El Salvador y Honduras (Ayers, 1990 y Belmont, 1996).



Fig. 6 Mapa de la distribución de *Heterotoma lobelioides* en México

3.6 Antecedentes de metabolitos secundarios activos de *Heterotoma lobelioides*

De especies de la familia Campanulaceae se han aislado un alcaloide, la lobelina, (González, 1989) así como diferentes flavonoides con uso potencial anticancerígeno (Muriel C. et al, 2000).

Por otro lado, se ha informado que la ingestión de las hojas de *H. lobeloides*, comúnmente conocida como la hierba gallito, provoca vómito, anorexia, salivación excesiva y se le ha ligado con la muerte de animales de pastoreo (López, 1994,; Gómez, 1990 y González, 1989). Posiblemente a su supuesta toxicidad y a pesar de su relativa abundancia, la *H. lobeloides* no se ha utilizado como planta medicinal.

Como parte de nuestra búsqueda sistemática de metabolitos secundarios, de origen vegetal, con propiedades antiinflamatorias y citotóxicas, se realizó el estudio fitoquímico de un extracto metanólico de hojas de *H. lobeloides*. Este estudio permitió el aislamiento de fortunelina (7-O-neohesperósido de acetina) (1), flavona que mostró efectos antiinflamatorios en la prueba de edema inducido por carragenina (Villatoro-Vera, 2001) inhibiendo un 92.65% la inflamación.

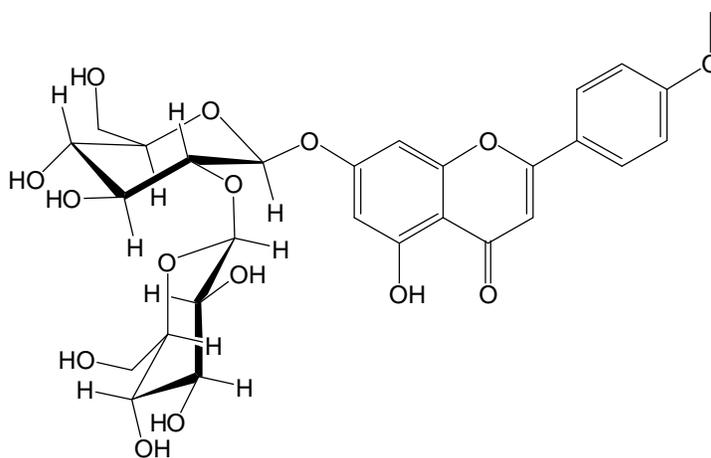


Fig. 7 Fortunelina, (7-O-neohesperósido de acetina) aislada del extracto metanólico de hojas de *Heterotoma lobeloides*

Con la finalidad de aportar más datos acerca de la composición química y sus propiedades biológicas, se realizó el estudio fitoquímico y la evaluación de las propiedades antiinflamatorias, en el modelo de inducción de edema por TPA, de un extracto metanólico de tallos de *H. lobelioides*.

4 JUSTIFICACIÓN

La búsqueda permanente de nuevos fármacos capaces de ofrecer una mejor acción terapéutica y que simultáneamente permitan disminuir los efectos secundarios nocivos, demanda la exploración de todas las estrategias posibles. Una de las más importantes es la utilización de productos naturales, la cual ha permitido realizar contribuciones significativas.

Se conoce que las células cancerosas desarrollan resistencia a los fármacos antitumorales, por lo cual se requiere de una búsqueda continua de fármacos anticancerosos.

Estudios previos han demostrado que varias flavonas aisladas de diferentes fuentes presentan actividad antitumoral y citotóxica a varias líneas de cáncer humano (González et al, 2007, Kuklinski, 2000; Villatoro-Vera, 2001). Por otro lado, los estudios realizados previamente en han mostrado la presencia de compuestos flavonoides en extractos de *H. Lobelioides*. Por lo tanto, se decidió evaluar tanto las posibles propiedades citotóxicas en líneas de cáncer humano, así como sus eventuales propiedades antiinflamatorias de los compuestos flavonoides aislados de *H. lobelioides*.

5 HIPÓTESIS

Tomando en cuenta que, estudios previos de las hojas de *H. lobelioides* permitieron el aislamiento de la fortunelina, un glicósido de acetina con propiedades antiinflamatorias, es factible suponer que de los extractos orgánicos y metabolitos secundarios obtenidos de los tallos de esta especie posiblemente presenten actividad antiinflamatoria y citotóxica a diferentes líneas de cáncer humano.

6 OBJETIVOS

Objetivo general:

- Determinar las propiedades antiinflamatorias, mediante el modelo de edema inducido por 13-acetato de 12-*O*-tetradecailforbol (TPA), y las propiedades citotóxicas, mediante el modelo de sulforrodamina B, de extractos orgánicos de *Heterotoma lobelioides* Zucc.

Objetivos particulares:

- Obtener el extracto hexánico y metanólico de *Heterotoma lobelioides* Zucc
- Determinar la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA, así como la actividad citotóxica de los extractos hexánico y metanólico de la especie en estudio.
- Extraer, purificar e identificar de los metabolitos secundarios mayoritarios del tallo de *Heterotoma lobelioides* Zucc
- Evaluar la actividad antiinflamatoria a través del modelo de TPA de los metabolitos secundarios mayoritarios aislados del tallo de *Heterotoma lobelioides* Zucc
- Evaluar la actividad citotóxica a través del modelo de sulforrodamida B de los metabolitos secundarios mayoritarios aislados del tallo de *Heterotoma lobelioides* Zucc

7 MATERIAL Y MÉTODO

7.1 Material vegetal

El material vegetal empleado, fue colectado en la localidad de Coatepec de la Escalera en Guerrero (1700 m.s.n.m.) y un ejemplar se depositó en el Herbario de la Facultad de Ciencias (N. Diego 76080, 8711). El material vegetal se seco a temperatura ambiente. Posteriormente se separo el tallo de la corteza, las cuales se molieron por separado. Se obtuvieron 1143 g de tallo sin corteza y 322.23 g de corteza.

7.2 Preparación de los extractos

Extracto hexánico:

El material seco (1143 g de tallo sin corteza) se trató con hexano (3 x 4 l) durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, el disolvente se evaporó a presión reducida con un rotavapor (Büchi B-480), obteniéndose un extracto de color amarillo (1.66 g, rendimiento 0.15%, con respecto al peso seco). La corteza (322.23 g peso seco) se le realizó el mismo tratamiento obteniendo 5.74 g de un extracto color verde oscuro (1.8% de rendimiento)

Extracto metanólico:

Los tallos, previamente tratados con hexano (1143 g de tallo sin corteza) se sometieron a una extracción con metanol (3 veces x 4 l cada vez) durante 24 horas a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida y se obtuvo un extracto de color café (74.78 g, rendimiento 6.55%). A la corteza se le

realizó el mismo procedimiento y se obtuvo un concentrado color café oscuro (23.22 g, rendimiento 7.2%)

7.2.1 Fraccionamiento del extracto hexánico del tallo sin corteza

Del extracto hexánico (1.66 g) se observó una mezcla de precipitados, los cuales fueron separados con metanol frío, obteniendo así, una mezcla de β -sitosterol y estigmasterol, que se identificaron por comparación del RF con las de una muestra original.

7.2.2 Fraccionamiento del extracto hexánico de la corteza del tallo

El extracto hexánico de corteza (5.74 g) fue sometido a cromatografía en columna abierta (CC), empleando como fase estacionaria gel de sílice (MN-Kieselgel G), en una proporción de 1:3 con respecto al peso del extracto. Como fase móvil se utilizaron mezclas de polaridades ascendentes de hexano, hexanoacetato de etilo (9:1, 8:2, 7:3, 1:1, 3:7), acetato de etilo, acetato de etilometanol (7:3, 1:1, 3:7) y metanol. Se reunieron las fracciones que presentaron patrones semejantes en cromatografía de capa fina (CCF). Las placas de CCF se realizaron en cromatofolios de aluminio recubiertos con gel de sílice con un espesor de 0.2 mm. Como reveladores se emplearon Sulfato de cerio (Ce_2SO_4) y una lámpara de luz UV.

7.2.3 Fraccionamiento del extracto metanólico del tallo sin corteza

Al extracto metanólico se le realizó una partición con acetato de etilo. La evaporación del acetato de etilo, a presión reducida permitió la obtención de 6.62 g, los cuales fueron adsorbidos en gel de sílice (MN-KieSelgel G), en una proporción de 1:3 con respecto al peso del extracto. La mezcla se separó por cromatografía en columna. La elusión se realizó con un gradiente de hexano, hexano/AcOEt, AcOEt y AcOEt /MeOH. Se reunieron las fracciones con un patrón similar en CCF.

7.3 Determinación de la actividad citotóxica

La determinación de la actividad citotóxica se realizó mediante el ensayo de Sulforodamina B, propuesta por Monks y colaboradores (1991).

Cultivos celulares. Para evaluar la actividad citotóxica de los extractos de *H lobelioides* se emplearon cinco líneas celulares de cáncer humano: colón HCT-15, mama MCF-7, glioma U251, leucemia K-562 y próstata PC-3.

Estas fueron cultivadas en medio RPMI-1640 adicionado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), 2 mM glutamina y se adiciono diversos antibióticos como la penicilina, estreptomina y anfotericina B al 10%. Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora a una atmósfera de 5% de CO₂, a una temperatura de 37 °C y un ambiente saturado de humedad.

Preparación e inoculación de las células. Las células adheridas a los frascos de cultivo fueron removidos con 3 ml de solución tripsina-EDTA (Etilen-diamin-treta acético) al 0.05%. Posteriormente la tripsina fue inactivada adicionando 10 ml de medio RPMI-1640 con 5% de SFB. Las células se disociaron con un pipeteo suave.

La viabilidad de las líneas celulares fue evaluada por exclusión con azul de tripano. Después de que ello, se procedió a hacer una dilución para obtener una densidad de 5000-10000 células por pozo dependiendo de la línea celular. Esto se debe a que el crecimiento de cada una de las líneas celulares es diferente (cuadro 2).

Línea celular	Tejido de origen	Tiempo de duplicación (h)	Densidad del inóculo (Cel-mL)	Cel/pozo (100µL)
U-251	Sistema nervioso central	25.4	7.5 X10 ⁴	7 500
PC-3	Próstata	28.7	7.5 X10 ⁴	7 500
HCT-15	Colón	18.1	10 X10 ⁴	10 000
K-562	Leucemia mioblástica crónica	19.0	5 x10 ⁴	5 000
MCF-7	Mama	20.1	5 x10 ⁴	5 000

Cuadro 2 Características de las líneas celulares

La suspensión celular se sembró en placas de 96 pozos. Una vez hecho lo anterior, todas las líneas celulares fueron incubadas por un período de 24 h a 37°C antes de adicionar los compuestos a evaluar.

Dilución de los compuestos a evaluar. Los extractos hexánico y metanólico del tallo, así como los compuestos purificados de *H. lobelioides* fueron solubilizados en Dimetilsulfoxido para ser evaluados en una concentración de 50 µg/ml. Esta concentración se utilizó con base en datos obtenidos del INC (Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos) para este modelo. Por otro lado, esa concentración

se ha establecido para comparar una posible discriminación en diferentes líneas de cáncer humano a una misma concentración (Monks *et al.*, 1991).

Inmediatamente después de la preparación de las soluciones, se agregó 100 µl de la solución a cada uno de los pozos en la placa de fondo plano de 96 pozos. Obteniendo un volumen total de 200 µl.

Se usó como control negativo diferentes concentraciones de Dimetilsulfoxido (DMSO).

Los cultivos se incubaron por un período de 48 h a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

El crecimiento celular se evaluó mediante la técnica de Sulforodamina B (SRB).

Ensayo sulforrodamina B. Transcurridas 48 horas, los cultivos celulares se fijaron *in situ* adicionado 50 µl ácido tricloroacético (TCA) frío (50% p/v), los cultivos se incubaron por 60 minutos a 4 °C.

Cumplido ese tiempo se desechó el sobrenadante y los cultivos se lavaron cinco veces con agua desionizada.

Posteriormente se adicionó a los pozos 100 µl de solución SRB (0.4% p/v en ácido acético al 1%). En seguida se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, el exceso de SRB se removió lavando cinco veces con ácido acético al 1%.

Finalmente, las células que se tiñeron con el colorante, fueron solubilizadas con buffer Tris y la densidad óptica (DO) fue medida en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm.

La densidad óptica es proporcional a la cantidad proteica celular total e inversamente proporcional al grado de citotoxicidad del compuesto a prueba.

La citotoxicidad fue reportada como el porcentaje de inhibición del crecimiento celular y se determinó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{Inhibición del crecimiento} = 100 - [\text{DOr (muestra)} / \text{DOr (vehículo)}] * 100$$

7.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria

La evaluación de la actividad antiinflamatoria se realizó mediante el ensayo de edema en oreja de ratón por 13-acetato de 12-*O*-tetradecailforbol (TPA), siguiendo la metodología propuesta por Della (1985).

Para evaluar la actividad antiinflamatoria de cada uno de los extractos y compuestos químicos se utilizó un promedio de 7 animales en cada prueba y el vehículo (disolvente en el cual se disolvían las sustancias en estudio) metanol.

Ensayo de TPA: la determinación cuantitativa de la actividad antiinflamatoria de los extractos y compuestos químicos puros, se realizaron utilizando el método de inducción de edema en oreja de ratón por el 13-acetato de 12-*O*-tetradecailforbol (TPA).

Se emplearon ratones machos (cepa CD1, de 20 a 25 g) los cuales fueron pesados y separados en dos grupos: un grupo control y un grupo tratado.

Cada grupo fue anestesiado con pentobarbital sódico a una dosis de 0.1ml de pentobarbital por cada 10g de peso del ratón. La anestesia fue vía intraperitoneal.

En ambos grupos la solución etanólica de 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (20 µg/ml) se aplicó tópicamente sobre la superficie posterior e inferior de la oreja derecha del ratón (10 µl x cada lado) para provocar la inflamación.

Posteriormente a los dos grupos se les aplicó 10 µl de etanol en la superficie posterior de la oreja izquierda y 10 µl de etanol en la superficie inferior de la oreja izquierda.

Diez minutos después de la aplicación del TPA, al grupo tratado se le aplicó 20 µl de la sustancia en estudio (extracto metanólico, hexánico del tallo ó compuestos químicos purificados) en ambas caras de la oreja derecha (10 µl en la superficie inferior y 10 µl en la superficie posterior) con una dosis de 1.0 µmol/oreja disueltos con metanol.

Mientras que en la oreja izquierda del mismo grupo solo se aplicaron 20 µl del vehículo (10 µl en la superficie inferior y 10 µl en la superficie posterior).

4 horas después de la aplicación cada grupo fue sacrificado por dislocación cervical. Se tomaron biopsias de 9 mm de diámetro de cada oreja.

Cada una de las orejas (control y tratadas) fueron depositadas en tubos de eppendorff previamente pesados y se obtuvieron las diferencias de pesos entre la oreja control y la tratada de cada animal.

El porcentaje de inhibición fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \left[\frac{\bar{X} \text{ tratado}}{\bar{X} \text{ control}} \right] 100$$

Los datos fueron sometidos a un análisis estadístico mediante una prueba de *t* de student y una prueba de Dunnet, utilizando el programa Sigma-stat (2.0). El nivel de significancia en todos los análisis fue de $p < 0.05$.

8 RESULTADOS

Los rendimientos de cada extracto se cuantificaron a partir del material vegetal extraído: (cuadro 3)

Extractos	Peso del material vegetal (g)	Rendimiento (g)	Rendimiento (%)
EMT	1143	74.78	6.55
EHT	1143	1.66	0.15
EMC	322	23.22	7.2
EHC	322	5.74	1.8

Extractos: (EMT) metanólico del tallo sin corteza, (EHT) hexánico del tallo sin corteza, (EMC) metanólico de la corteza y (EHC) hexánico de la corteza

Cuadro 3 Rendimiento de los extractos obtenidos del tallo de *H. lobelioides*

El extracto metanólico de la corteza fue el de mayor rendimiento con 7.2%, seguido de extracto metanólico del tallo sin corteza con 6.55%. El extracto hexánico de la corteza mostró un rendimiento del 1.8% y el extracto hexánico del tallo sin corteza fue el de menor rendimiento con 0.15%.

8.1 Pruebas biológicas de los extractos

8.1.1 Actividad citotóxica

Los resultados de la actividad citotóxica de los extractos orgánicos fueron diferentes para cada línea de cáncer evaluada. El extracto hexánico de la

corteza (EHC) fue el único con actividad citotóxica a todas las líneas probadas. A continuación se muestran los resultados de la actividad citotóxica para cada uno de los extractos.

Extracto	Línea celular					
	MCF-7 (mama)	K-562 (leucemia)	U-251 (sistema nervioso central)	PC-3 (próstata)	SKUL-1 (pulmón)	HCT-15 (colon)
EMT	S.A	S.A	3.72	S.A	S.A	S.A
EHT	S.A	S.A	10.48	S.A	3.46	S.A
EMC	S.A	24.65	11.76	S.A	17.33	S.A
EHC	21.93	75.49	36.74	14.18	50.0	20.93

Extractos: (EMT) metanólico del tallo sin corteza, (EHT) hexánico del tallo sin corteza, (EMC) metanólico de la corteza y (EHC) hexánico de la corteza. S. A.= sin actividad

Cuadro 4 Porcentajes de inhibición de crecimiento celular de extractos hexánicos y metanólicos del tallo de *H. lobelioides*

8.1.2 Actividad antiinflamatoria

En un estudio previo realizado por nuestro grupo, los extractos y los compuestos provenientes de la hojas de esta especie mostraron actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido por carragenina (Villatoro-Vera, 2001). Por el contrario, ahora nuestros estudios demostraron que los extractos EHT, EMT, EHC Y EMC fueron inactivos en el modelo de edema inducido por TPA.

Cuadro 5 Actividad antiinflamatoria de los extractos del tallo de *H. lobelioides*
(Dosis 1mg/oreja)

Extractos	Inhibición del edema
Metanólico del tallo sin corteza	S.A.
Hexánico del tallo sin corteza	S.A.
Metanólico de la corteza del tallo	S.A.
Hexánico de la corteza del tallo	S.A.

S. A.= sin actividad

8.2 Fracciones colectadas de las columnas

De la cromatografía en columna del extracto hexánico de corteza se colectaron 310 fracciones de 500 ml (Cuadro 6) y del extracto metanólico del tallo sin corteza se colectaron 360 fracciones de 100 ml (Cuadro 7).

Fracciones	Eluyente
1-10	Hexano
11-20	Hexano-AcOEt 9:1
21-30	Hexano-AcOEt 8:2
31-49	Hexano-AcOEt 7:3
50-70	Hexano-AcOEt 6:4
71-90	Hexano-AcOEt 1:1
91-120	AcOEt- Hexano 6:4
121-135	AcOEt- Hexano 7:3
137-150	AcOEt- Hexano 9:1
151- 166	AcOEt
167-183	AcOEt- MeOH 8:2
184-204	AcOEt- MeOH 6:4
205-229	AcOEt- MeOH 1:1
230-242	AcOEt- MeOH 4:6
243-268	AcOEt- MeOH 2:8
283-310	MeOH

Cuadro 6 Fraccionamiento del extracto hexánico de la corteza por cromatografía en columna

Fracciones	Eluyente
1-10	Hexano
11-19	Hexano-AcOEt 9:1
20-80	Hexano-AcOEt 8:2
81-166	Hexano-AcOEt 7:3
167- 171	Hexano-AcOEt 6:4
172-197	Hexano-AcOEt 1:1
198-217	AcOEt- Hexano 6:4
218-233	AcOEt- Hexano 7:3
234-252	AcOEt- Hexano 9:1
253-288	AcOEt
289-305	AcOEt- MeOH 7:3
306-328	AcOEt- MeOH 6:4
329-337	AcOEt- MeOH 1:1
338-349	AcOEt- MeOH 7:3
350-360	MeOH

Cuadro 7 Fraccionamiento del extracto metanólico del tallo sin corteza

8.3 Metabolitos secundarios aislados de los extractos

Obtención de la mezcla de estigmasterol (2) y β -sitosterol (3)

La cromatografía en placa preparativa gruesa del extracto hexánico del tallo sin corteza (EHT) permitió el aislamiento de una mezcla de estigmasterol y β -sitosterol, que se identificó comparando el Rf con el de una muestra original (Fig. 8).

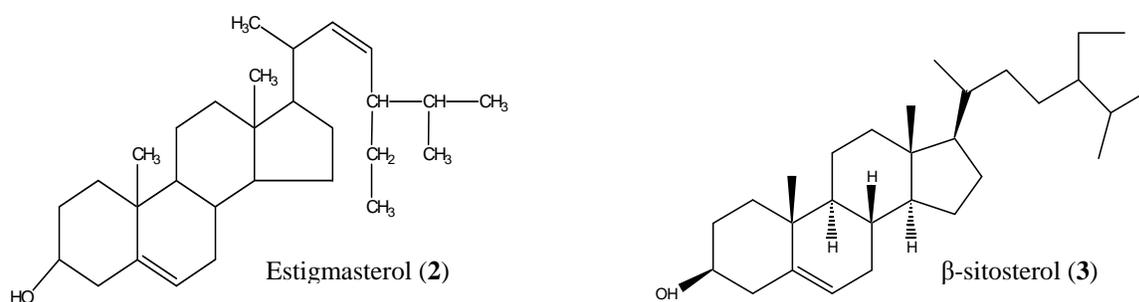


Fig. 8 Estigmasterol y β -sitosterol

Aislamiento de la 5,6,7-trihidroxi, 4'-metoxi flavona (4)

Por otro lado, a partir de la cromatografía del extracto metanólico del tallo sin corteza (EMT), de las fracciones 23-29 (Hex-AcOEt 8:2) se aislaron 116.5 mg de 5,6,7-trihidroxi, 4'-metoxi flavona (Fig. 9). La identificación de 4 se logró por la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con aquellos informados en la literatura (Harborne *et al.*, 1971).

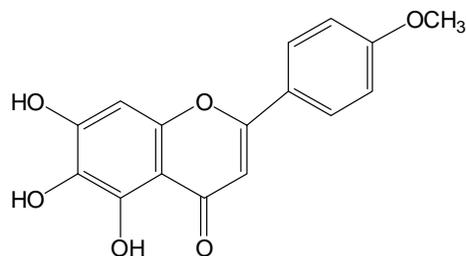


Fig. 9 5,6,7-trihidroxi, 4'-metoxi flavona (4)

También de esta cromatografía se obtuvieron 58.4 mg de un precipitado color naranja, el cual fue identificado como el ácido 5-Hidroxi-2-metoxi-benzoico (5). (Fracciones 50-84 AcOEt).

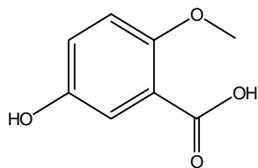


Fig. 10 Ácido 5-Hidroxi-2-metoxi-benzoico (5)

La elucidación estructural de estos compuestos se logró por medio de sus datos espectroscópicos y espectrométricos.

De la cromatografía del extracto metanólico de la corteza del tallo (EMC) eluida con metanol se obtuvieron 86.8 mg de una mezcla color naranja (Producto D) la cual se descompuso al tratar de obtener sus componentes.

Rendimiento de los productos aislados de los extractos hexánico y metanólico del tallo de *Heterotoma lobelioides*.

Producto	Peso (mg)	Rendimiento (%) Con respecto al material vegetal
2 + 3	32.8	.002869
4	116.5	.010192
5	58.4	.005109
D	86.8	.02693

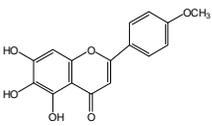
Cuadro 8 Rendimiento de los productos aislados de *H. lobelioides*

8.3.1 Actividad citotóxica de los metabolitos secundarios aislados

Debido a que las propiedades antiinflamatorias y citotóxicas del estigmasterol y el β -sitosterol han sido informadas previamente (Akihisa *et al.*, 2001) (Gomes *et al.*, 2007), se decidió no evaluarlos en nuestros modelos.

Nuestros resultados indicaron que el ácido 5 no mostró actividad citotóxica o antiinflamatoria. Mientras que la mezcla D, a 50 $\mu\text{g/ml}$, mostró un 100% de inhibición para la línea de leucemia, así como un 52.8% para la línea de cáncer de pulmón. Desgraciadamente, ésta mezcla se descompuso al tratar de obtener sus componentes.

Como se puede observar en EL cuadro 9, los resultados de la actividad citotóxica de 4, en general son alrededor del 10 -15%, excepto en la línea de próstata de cáncer en donde mostró una inhibición de 25.12%.

Línea celular de cáncer	MCF-7 (mama)	K-562 (leucemia)	U-251 (sistema nervioso central)	PC-3 (próstata)	SKUL-1 (pulmón)	HCT-15 (colon)
	10.48	14.74	13.13	25.12	10.39	S.A

Cuadro 9 Porcentajes de inhibición de crecimiento celular de la 5,6,7-trihidroxi, 4'-metoxi flavona (4)

8.3.2 Actividad antiinflamatoria

Todos los metabolitos secundarios aislados de *H. lobelioides*, excepto la mezcla de estigmasterol y β -sitosterol, fueron evaluados como agentes antiinflamatorios en el modelo del edema inducido por TPA. Los resultados señalaron que solamente la flavona 4, fue activa, mostrando 41.2% de inhibición de edema a la dosis de 1mg/oreja.

9 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En un estudio previo realizado por nuestro grupo, de las hojas de esta especie se logró aislar la flavona antiinflamatoria fortunelina (7-O-neohesperósido de acetina) (1) (Villatoro-Vera, 2001), ahora, en este estudio logramos aislar, de la corteza de los tallos, la 5,6,7-trihidroxi, 4'-metoxi flavona (4). Esta flavona también mostró actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA. Los resultados indican que las flavonas constituyen el principal tipo de metabolitos secundarios que sintetiza *H. lobelioides*.

A pesar de que el extracto metanólico del tallo no presentó actividad antiinflamatoria en el modelo de inducción de edema por TPA se logró aislar la flavona (4) que inhibió la inflamación en un 41.2% a una dosis de 1mg/oreja. Esto da la pauta a pensar que a medida que aumenta la pureza y la concentración, la efectividad en la disminución del edema por TPA se incrementa.

En cuanto a la actividad citotóxica evaluada, en el extracto, se encontró que solo en la línea celular del sistema nervioso central (glioma) fue activo y al evaluar el metabolito secundario mayoritario de este extracto (flavona 4), se halló selectividad hacia esta línea celular, ya que también fue presente actividad en esta.

Así mismo, datos bibliográficos indican que 4 ha sido aislada de otras especies como *Phyllanthus urinaria* (Euphorbiaceae) L. (Tran *et al.*, 2007), *Linaria aeruginea* (Scrophulariaceae) (Harborne *et al.*, 1971) *Digitalis lanata* (Plantaginaceae) (Rangswamy *et al.*, 1961) y *Scutellaria baicalensis* Georgi (Lamiaceae), (Wang *et al.*, 2002).

En años recientes, se ha informado que flavonas naturales y sintéticas poseen propiedades ansiolíticas sin efectos sedantes y miorelajantes. La mayoría de

estas flavonas son ligandos parciales a receptores de benzodiazepina. Estudios sobre estas propiedades indicaron que la 5,6,7-trihidroxi, 4'-metoxi flavona (4) se une al sitio de benzodiazepina del complejo receptor GABA_A (Wang, et al 2002). Estos resultados revelan que (4) puede estar implicado en acciones, ansiolíticas, depresoras del sistema nervioso central y epilepsia, justificando de esta manera la observación etnobotánica de la toxicidad de ésta especie al ser ingerida por los animales de pastoreo.

Por otro lado, los resultados indicaron que 5,6,7-trihidroxi, 4'-metoxi flavona (4) mostró solo una actividad citotóxica mínima contra las líneas de cáncer evaluadas. Sin embargo su actividad antiinflamatoria fue de 41.2% en el modelo del TPA en el ratón a la dosis de 1mg/oreja. Estos hallazgos, aunados a las propiedades antiinflamatorias, de la fortunelina, aislada previamente de las hojas de esta especie, indican que *H. lobelioides* sintetiza, principalmente, flavonas con propiedades antiinflamatorias. Aunque 4 puede estar implicada en efectos sobre el sistema nervioso central.

A pesar de la presencia del β -sitosterol (2) y el estigmasterol (3), esteroides con probadas actividades citotóxicas y antiinflamatorias (Bittner *et al.*, 2001; Perera *et al.*, 2006), en el extracto hexánico de esta especie, éste no presentó propiedades antiinflamatorias ni citotóxicas. Posiblemente la baja concentración de 2 y 3 (cuadro 8) en el extracto sea la explicación de su inactividad biológica.

También solo se logró aislar el ácido 5-Hidroxi-2-metoxi-benzoico que no presentó ni actividad citotóxica ni antiinflamatoria.

10 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que:

1. El extracto hexánico de la corteza, presentó actividad citotóxica selectiva hacia la línea celular leucemia y pulmón. Y para los demás extractos, no se muestra alguna inclinación hacia alguna línea celular.
2. Ninguno extracto obtenido mostró actividad antiinflamatoria.
3. El estudio fitoquímico permitió el aislamiento e identificación estructural de la 5,6,7-trihidroxi, 4'-metoxi flavona y el 5-Hidroxi-2-metoxi-benzoico.
4. También se aislaron e identificaron el β -sitosterol y el estigmasterol.
5. Los resultados de la actividad antiinflamatoria mostraron que la 5,6,7-trihidroxi, 4'-metoxi flavona (4) no presentó actividad, sin embargo, de acuerdo con la literatura, esta flavona presenta uniones a receptores del complejo GABA_A lo cual hace que su posible utilización como agente antiinflamatorio sea restringido.

11 LITERATURA CITADA

- Anderson, E. F. 2001. The Cactus Family. Timber Press. 36
- Ayers, T. J. 1990. Systematics of *Heterotoma* (Campanulaceae) and the Evolution of Nectar Spurs in the New World Lobelioideae *Systematic Botany*. 15: 296-327.
- Argumedo, R. D.; Parra-Delgado, H.; Ramírez, A. T.; Antonio Nieto, C. A. and Martínez-Vázquez, M. 2003. Isolation and Chemical Transformations of Some Anti-inflammatory Triterpenes from *Salvia mexicana* L. var. minor Benth. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 47: 167-172
- Belmont, F. F. 1996. Campanulaceae y Sphenocleaceae de Guerrero, flora y palinología. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, 93
- Bernal, D.; Carvajal, L.; Guadarrama, G.; Hernández, R.; Herrera, M.; Hidrovo, A.; Sánchez- Alemán, M. y Angeles-Llerenas, A. 2002 .Infección por virus del papiloma humano y lesiones precancerosas de cérvix en mujeres del estado de Morelos, México.
- Boyle, P.; Levin, B. 2008. World cancer report, International Agency for Research on Cancer, Lyon Cedex , France
- Cragg, G. M. y Newman, D. J. 2005. Plants as source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnofarmacology*. 100:72-79
- Cuendet, M., Potterat, O. y Hostettmann, K. 2001, Flavonoids and phenylpropanoid derivatives from *Campanula barbata*, *Phytochemistry*, 56: 631-636
- Croteau, R.; Kutchan, T.M.; Lewis, N.G. 2002, Natural Products (Secondary Metabolitos). In: Buchanan, B., Grisse, W., Jones, R. Eds. *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. American Society of Plants Physiology. USA.
- De Young, L. M.; Kheifets, J. B.; Ballaron, S. L.; Young, J. M. 1989. Agents Actions. 26: 335-341.
- Eaden, J. A.; Abrams, K. R. and Mayberry, J. F. 2001. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 48:526-535.

- García-Argaez, A. N.; Ramírez, T. O; Parra, D. H. y Martínez-Vázquez, M., 2000. Anti-inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model, *Planta Med.* 66. 279-281
- Della, L. R.; Tubazo, A.; Dri, P.; Delbello, G. and Zilli, C. 1985. The cortón oil ear test revisited. *Agents Actions* 17: 347-349
- Gómez, J. J. 1990. Plantas tóxicas para la ganadería extensiva en el municipio de Cañadas de Obregón, Jalisco. Facultad de Agronomía. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco.
- González, A. E. 1989. Plantas tóxicas para el ganado. Ed. Limusa, México D. F.
- González, G.; Soto, H. M; Geoffrey, K y Martínez-Vázquez, M. 2007. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Rev. Fitotec. Mex.* 30: 43 - 49
- Gutiérrez, J. B. y Salsamendi, A. L. 2001. Fundamentos de ciencia toxicológica. Díaz de Santos España
- Harborne, J. B and Valdes, B. 1971. Identification of Scutellarein 4'-Methyl Ether in *Linaria aeruginea*
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, (2006). Estadísticas Vitales 2005 (Base de datos).
- Katzung, B. G. 1999. Farmacología básica y clínica. El Manual Moderno. México. 1011-1013
- Kliebenstein, D. J. 2004. Secondary Metabolites and Plant/Environment Interactions: A View Through *Arabidopsis thaliana* Tinged Glasses. *J. Plant, Cell and Environment.* 27: 675-684
- Kuklinski, C. 2000. Farmacognosis, Omega S.A. 51-53
- Kumar, V.; Abbas, A. K. y Fausto, N. 2005. Patología estructural y funcional. Elsevier, España, 48-81
- Lammers, T. G. 2007. Campanulaceae, In: Kubitzki, K. Ed. World checklist and Bibliography of Campanulaceae. Kew Publishing
- Koopman, M. M. and Ayers J. T. 2005. Nectar spur evolution in the Mexican lobelias (Campanulaceae: Lobelioideae). *American Journal of Botany.* 92: 558-562

- López, R.; Martínez-Burnes, J.; Vargas, G.; Loredó, J.; Medellín, J. 1994. Taxonomical, Clinical and Photological Findings in Moradilla (Lobelia-Like) Poisoning in Sheep. *Vet Human Toxicol.* 36: 195-198
- Middleton, E.; Kandaswami, C.; Theoharides, T. 2000. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev;* 52: 673-75
- Monks, A.; Scudeiro, D.; Skehan, P.; Schoemaker, R.; Paul, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, A.; Vaigro, W. A.; Gray, G. M.; Campbell, H.; Mayo, J. and Boyd, M. 1991. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *J. National Cancer Institute.* 83:757-766
- Muriel, C.; Oliver, P. and Kart, H. 2000. Flavonoids and Phenylpropanoid derivatives from *Campanula barbata*. *Phytochemistry* 56: 631-636
- Nathan, C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature.* 420:846-852
- Newman, D.J.; Cragg, G. M. and Kingston, D. G. 2003. Natural Products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In *The Practice of Medicinal Chemistry*, Wermuth. Elsevier, 91-109
- Oliveira, P. A.; Colaço, A.; Chaves, R.; Guedes, P. H.; De la Cruz, L. F. y López, C. 2007. Chemical carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 79:593-616
- Oviedo, I; Ramírez, T. y Martínez-Vázquez, M. 2005. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57:1087-1091
- Pollard, J. W. 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Natural Review Cancer.* 4: 71-78
- Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México.* Ed Limusa. México. 432
- Shields, P. G. 2002. Molecular epidemiology of smoking and lung cancer. *Oncogene.* 21: 6870-6876
- Torres, O.; Tapia, P. y Aguilar, C. A. 2005. *Plantas Tradicionales De La Medicina Tradicional Mexicana Para Tratar Afecciones Gastrointestinales, Estudio Etnobotánico, Fotoquímico y Farmacológico.* Universidad de Barcelona
- Tran, D. T; Bui, Q. C. and Hoang, V. L. 2007. Isolation and structural elucidation of some phenolic compounds from *Phyllanthus urinaria* L. in Vietnam. *Tap Chi Duoc Hoc.* 47(3):14-17

- Trosko, J. E. 2003. The Role of Stem Cells and Gap Junctional Intercellular Communication in Carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 36:43-48
- Uemura, N.; Okamoto, S.; Yamamoto, S.; Matsumura, N.; Yamaguchi, S.; Yamakido, M.; Taniyama, K.; Sasaki, N. y Schlemper, R. J. 2001. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. *New Engl J Med.* 345: 784-789
- Verpoorte, R. 1998. Exploration of nature´s chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in Drug Discovery Today. 3: 232-238
- Villar, C. M.; López, R. A.; López, B. y Alameda, A. 2000. Carcinoma epidermoide vesical de tipo verrucoso asociado a esquistosomiasis. *Rev Esp Patol.* 33: 153-156
- Villatoro-Vera, R. A, 2001. Antiinflammatory activity of 7-O-acacetin diglucoside, IV Congreso Internacional de Química, Palacio de Convenciones de La Habana, 16 - 20 Abril 2001
- Wang, H.; Hui, K. M.; Chen, Y.; Xu, S. and Wong, J. T., Xue, H. 2002, Structure-activity relationships of flavonoids isolated from *Scutellaria baicalensis*, binding to benzodiazepine site of GABA receptor complex. *Planta Med* 68, 1059-1062.
- Williams, D. H.; Stone, M. J.; Hauck P.R. and Rahman, S. K. 1989. Why are secondary metabolites (natural products) Biosynthesized?. *Journal of Natural Products* 5: 1189-1208
- Williams, C. A and Grayer, R, J. 2004. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* 21: 539-573
- Rangswamy, S. R, 1961 *Proc, V. Indian Acad. Sci.* 54A. 51.

Páginas de Internet consultadas

- American Cancer Society: <http://www.cancer.org> (Fecha de consulta: 08/04/2008)
- Secretaria de salud: <http://www.salud.gob.mx> (Fecha de consulta: 14/04/2008)
- CONABIO: <http://conabioweb.conabio.gob.mx> (Fecha de consulta: 01/09/2008)