



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“Evaluación de la actividad citotóxica de extractos orgánicos de *Juniperus monticola* forma *monticola* Martínez sobre líneas tumorales humanas”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. DALIA BARRIOS PALACIOS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA

INSTITUTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRÁN, SS

DRA. CLAUDIA TZASNA HERNÁNDEZ DELGADO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

IZTACALA, UNAM

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE DE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“Evaluación de la actividad citotóxica de extractos orgánicos de *Juniperus monticola* forma *monticola* Martínez sobre líneas tumorales humanas”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. DALIA BARRIOS PALACIOS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA
INSTITUTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN, SS
DRA. CLAUDIA TZASNA HERNÁNDEZ DELGADO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA, UNAM

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE DE 2015



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/417/15

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de mayo de 2015** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno (a) **BARRIOS PALACIOS DALIA** con número de cuenta **407074765** con la tesis titulada "**Evaluación de la actividad citotóxica de extractos orgánicos de *Juniperus monticola* forma *monticola* Martínez sobre líneas tumorales humanas**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA**:

Presidente: DR. RICARDO REYES CHILPA
Vocal: DRA. MARÍA MARGARITA CANALES MARTÍNEZ
Secretario: DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA
Suplente: DRA. GABRIELA FIGUEROA GONZÁLEZ
Suplente: DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de junio de 2015

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

MCAA/MJFM/ASR/grf*



AGRADECIMIENTOS

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM** por permitirme realizar este logro.

Al CONACyT, por la beca número **288734**, la cual recibí durante la maestría.

Mi profundo agradecimiento al Dr. Manuel Jiménez Estrada, por el desarrollo del presente proyecto bajo su tutoría, así como sus enseñanzas, apoyo incondicional, siempre excelente disposición, por aceptarme en su laboratorio y ser un ejemplo de grandeza y sencillez. Muchas gracias!!!

A la Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera agradezco sus enseñanzas, el apoyo que siempre me ha brindado, su paciencia, por formar parte de mi formación académica y personal y ser parte fundamental de este logro.

A la Dra. Claudia Tzasná Hernández Delgado doy gracias por su apoyo, paciencia, dirección, sugerencias en el desarrollo del presente proyecto y por formar un pilar importante en mi formación académica.

A los miembros del jurado les agradezco su disponibilidad en la revisión de la Tesis, así como sus observaciones y valiosas recomendaciones.

Al Dr. Carlos Pérez Plasencia, del Laboratorio de Genómica Funcional, de la Unidad de Investigación en Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por el apoyo que me brindó durante mi estancia en el laboratorio de Genómica Funcional de la Unidad de Investigación en Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por permitirme realizar los ensayos actividad biológica en el departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Al M. en C. José Luis Ventura Gallegos agradezco el valioso conocimiento que me brindó durante mi estancia en el departamento de Bioquímica, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, así como por su disponibilidad en ayudarme y su amistad. Muchas gracias.

DEDICATORIAS

A Dios, por la gracia de la vida y por mi familia.

A mi mamá Maura, por ser el mejor ejemplo de lucha y amor.

A mi papá Santiago, por su apoyo absoluto en mi crecimiento personal y profesional, por formar siempre parte importante de mis logros.

A mis hermanos Adriana, Luis Marcial y Jacqueline, a mis sobrinas Karla y Lupita por su apoyo y ayudarme a ser una mejor persona.

A Alejandro por su amor y apoyo incondicional.

A mis amigos Rafa, Rosario, Armando, Ara, Elia, Alfredo, Paty, Miritoz, Diego, Bere, Luz, Natita, Ana Delia, Rosi y Alejandra por formar parte de mi vida y de este proyecto. Gracias.

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABLAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1. Cáncer.....	6
2.2. Cáncer de mama.....	6
2.3. Diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama.....	9
2.4. Líneas celulares de cáncer de mama.....	10
2.5. Las plantas: fuente de metabolitos secundarios.....	14
2.6. Clasificación taxonómica de <i>Juniperus monticola</i> forma <i>monticola</i> Martínez.....	18
2.7. Descripción botánica de <i>J. monticola</i> f. <i>monticola</i>	19
2.8. Hábitat y distribución de <i>J. monticola</i> f. <i>monticola</i> en el Parque Nacional El Chico: Estado de Hidalgo.....	20
2.9. Uso de especies del género <i>Juniperus</i> en la medicina tradicional.....	21
2.10. Actividad citotóxica de extractos orgánicos.....	23
2.11. Compuestos citotóxicos identificados en el género <i>Juniperus</i>	25
2.11.1. Esteroles.....	25
2.11.2. Flavonoides.....	26
2.11.3. Lignanós.....	27
2.11.4. Terpenos.....	28
3. JUSTIFICACIÓN.....	32
4. HIPÓTESIS.....	32
5. OBJETIVO GENERAL.....	33
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
7. METODOLOGÍA.....	34
7.1. Colecta e identificación taxonómica de <i>J. monticola</i> f. <i>monticola</i>	34
7.2. Obtención de extractos.....	35
7.3. Líneas celulares.....	36
7.4. Ensayo de citotoxicidad.....	37
7.5. Análisis estadístico.....	38
7.6. Análisis cromatográfico.....	39
7.7. Identificación de los compuestos citotóxicos.....	40
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
8.1. Ensayo de citotoxicidad: Método de la Sulforodamina B.....	41
8.1.1. CI_{50} de la doxorubicina en las líneas celulares.....	41

8.1.2. Evaluación de los extractos orgánicos.....	42
8.1.2.1. Extracto etanólico (80%).....	42
8.1.2.1.1. Rendimiento.....	42
8.1.2.1.2. Evaluación de la actividad citotóxica	43
8.1.2.1.3. Fraccionamiento por CC abierta del extracto de fase orgánica de <i>J.</i> <i>monticola</i>	45
8.1.2.1.4. Evaluación de la actividad citotóxica de las fracciones del extracto de fase orgánica de <i>J. monticola</i>	47
8.1.2.1.5. CCF con reveladores específicos.....	49
8.1.2.1.6. Compuesto en la fracción 12.....	49
8.1.2.1.7. Compuesto mayoritario en la fracción 18.....	50
8.1.2.2. Extracto de acetona.....	54
8.1.2.2.1. Rendimiento.....	54
8.1.2.2.2. Evaluación de la actividad citotóxica.....	55
8.1.2.2.3. Fraccionamiento por CC abierta del extracto de acetona de <i>J. monticola</i>	56
8.1.2.3. Extracto de hexano.....	61
8.1.2.3.1. Rendimiento.....	61
8.1.2.3.2. Evaluación de la actividad citotóxica.....	61
8.1.2.4. Extracto de acetato de etilo.....	63
8.1.2.4.1. Rendimiento.....	63
8.1.2.4.2. Evaluación de la actividad citotóxica	63
8.1.2.5. Evaluación de la actividad citotóxica de las fracciones y extractos activos de <i>J. monticola</i> sobre la línea no tumorigénica MCF-10A.....	65
9. DISCUSIÓN.....	67
10. PERSPECTIVAS.....	76
11. CONCLUSIONES.....	77
12. LITERATURA CITADA.....	78
13. ANEXOS.....	86

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Carcinoma ductal in situ (CDIS).....	7
Figura 2. Carcinoma lobulillar in situ (CLIS).....	8
Figura 3. Células T47D en baja confluencia (izquierda) y alta confluencia (derecha).....	12
Figura 4. Células MDA-MB-231 en baja confluencia (izquierda) y alta confluencia (derecha).....	12
Figura 5. Células MCF-10A en baja confluencia.....	13
Figura 6. <i>J. monticola</i> f. <i>monticola</i> en el paraje Valle de los Enamorados, Parque Nacional El Chico, Hidalgo.....	20
Figura 7. Perfil de la vegetación correspondiente al paraje Valle de los enamorados, en el Parque Nacional El Chico, Hidalgo; donde se localiza <i>J. monticola</i> f. <i>monticola</i>	34
Figura 8. Ejemplar de <i>J. monticola</i> f. <i>monticola</i> Martínez.....	35
Figura 9. Porcentaje del crecimiento celular de las líneas celulares T47D, MDA-MB-231 y MCF-10A después del tratamiento con doxorubicina.....	41
Figura 10. Porcentaje de crecimiento celular de la línea tumoral T47D después de ser tratada con los extractos hidroetanólico, fase acuosa y fase orgánica de <i>J. monticola</i>	44
Figura 11. Porcentaje de crecimiento celular de la línea tumoral MDA-MB-231 después de ser tratada con los extractos hidroetanólico, fase acuosa y fase orgánica de <i>J. monticola</i>	44
Figura 12. CCF de las fracciones obtenidas de la fase orgánica de <i>J. monticola</i> por CC.....	45
Figura 13. Porcentaje de crecimiento celular de la línea tumoral T47D después de ser tratada con seis fracciones obtenidas por cromatografía en columna de la fase orgánica de <i>J. monticola</i>	48
Figura 14. Porcentaje de crecimiento celular de la línea tumoral MDA-MB-231 después de ser tratada con seis fracciones obtenidas por cromatografía en columna de la fase orgánica de <i>J. monticola</i>	48
Figura 15. CCF de las fracciones con mayor actividad citotóxica utilizando reveladores específicos.....	49
Figura 16. Estructura del compuesto 1 . A) anillo C en estructura plana, B) anillo C en estructura en silla.....	50
Figura 17. Correlaciones HMBC y HSQC en el compuesto 1	51
Figura 18. Fragmentación del compuesto 1 por EM (Impacto electrónico y DAP).....	53

Figura 19. Estructuras del Luteoforol y Epiluteoforol.....	54
Figura 20. Porcentaje de crecimiento celular de las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231 después de ser tratadas con el extracto de acetona de <i>J. monticola</i>	55
Figura 21. CCF del fraccionamiento del extracto de acetona de <i>J. monticola</i>	56
Figura 22. Porcentaje de crecimiento celular de la línea tumoral T47D después de ser tratada con las fracciones del extracto de acetona y el sólido 5 (II) de <i>J. monticola</i>	60
Figura 23. Porcentaje de crecimiento celular de la línea tumoral MDA-MB-231 después de ser tratada con las fracciones del extracto de acetona y el sólido 5 (II) de <i>J. monticola</i>	61
Figura 24. Porcentaje de crecimiento celular de las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231 después de ser tratadas con el extracto de hexano de <i>J. monticola</i>	62
Figura 25. Porcentaje de crecimiento celular de las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231 después de ser tratadas con el extracto de acetato de etilo de <i>J. monticola</i>	64
Figura 26. Porcentaje de crecimiento celular de la línea no tumorigénica MCF-10A después de ser tratada con extractos y fracciones con actividad citotóxica de <i>J. monticola</i>	65

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación molecular de carcinoma de mama.....	10
Tabla 2. Compuestos obtenidos/derivados de las plantas utilizados en el tratamiento de cáncer.....	15
Tabla 3. Claves de identificación de las formas taxonómicas de <i>J. monticola</i>	18
Tabla 4. Especies del género <i>Juniperus</i> utilizadas en la medicina tradicional.....	21
Tabla 5. Especies del género <i>Juniperus</i> en que se han evaluado extractos orgánicos contra líneas tumorales y no tumorales.....	23
Tabla 6. Esterol citotóxico identificado en el género <i>Juniperus</i>	25
Tabla 7. Flavonoides con actividad citotóxica presentes en el género <i>Juniperus</i>	26
Tabla 8. Lignanós con actividad citotóxica presentes en el género <i>Juniperus</i>	28
Tabla 9. Terpenos con actividad citotóxica identificados en el género <i>Juniperus</i>	29
Tabla 10. CI ₅₀ de la Doxorubicina en las líneas celulares T47D, MDA-MB-231 y MCF-10A.....	41
Tabla 11. Rendimiento de 600 g de material vegetal de <i>J. monticola</i>	42
Tabla 12. CI ₅₀ del extracto hidroetanólico, fase orgánica y fase acuosa de <i>J. monticola</i> sobre las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231.....	43
Tabla 13. Rendimiento de las fracciones del extracto de fase orgánica de <i>J. monticola</i>	46
Tabla 14. CI ₅₀ de las fracciones seleccionadas en la CC de la fase orgánica de <i>J. monticola</i> sobre las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231.....	47
Tabla 15. Datos de RMN, EM e IR de la elucidación del compuesto 1.....	52
Tabla 16. Rendimiento de 600 g de material vegetal de <i>J. monticola</i>	54
Tabla 17. CI ₅₀ del extracto de acetona de <i>J. monticola</i> en las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231.....	55
Tabla 18. Rendimiento de la CC del extracto de acetona.....	58
Tabla 19. CI ₅₀ de las fracciones obtenidas CC del extracto de acetona de <i>J. monticola</i> . en las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231.....	59
Tabla 20. Rendimiento de 300 g de material vegetal de <i>J. monticola</i>	61
Tabla 21. CI ₅₀ del extracto de hexano de <i>J. monticola</i> en las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231.....	62
Tabla 22. Rendimiento de 10g de material vegetal de <i>J. monticola</i>	63

Tabla 23. CI_{50} del extracto de acetato de etilo de <i>J. monticola</i> en las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231.....	63
Tabla 24. CI_{50} de extractos y fracciones activas de <i>J. monticola</i> sobre la línea no-tumorigénica MCF-10A.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt: Acetato de etilo

ANOVA: Análisis de Varianza (Analysis Of Variance)

BCRP: Proteína de resistencia de cáncer de mama (Breast Cancer Resistance Protein)

CC: Cromatografía en columna

CCF: Cromatografía en capa fina

CG-EM: Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas

CI₅₀: Concentración inhibitoria 50

COSY: Espectroscopía de correlación (Correlation spectroscopy)

DE: Desviación estándar

DEPT: Aumento sin distorsión por transferencia de polarización (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)

EM: Espectrometría de masas

¹H RMN: Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno

¹³C RMN: Resonancia Magnética Nuclear de Carbono

HSQC: Correlación heteronuclear a simple cuanto (Heteronuclear single Quantum correlation)

HMBC: Correlación heteronuclear de múltiples enlaces (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

IR: Infrarrojo

MeOH: Metanol

RPN: Revelador de Productos Naturales

R_f: Factor de retención

RESUMEN

El presente trabajo es un estudio biodirigido con el objetivo de evaluar la actividad citotóxica de los extractos orgánicos de *Juniperus monticola* forma *monticola* Martínez sobre líneas tumorales humanas, para posteriormente fraccionar los extractos activos y aislar e identificar a los compuestos con actividad citotóxica. Los extractos hidroetanólico (del que se obtuvo un extracto de fase orgánica y de fase acuosa), acetónico y hexánico de las ramas de *J. monticola* f. *monticola* fueron evaluados sobre las líneas tumorales de cáncer de mama T47D y MDA-MB-231, utilizando el método de la Sulforodamina B (SRB).

Los resultados muestran que los extractos con actividad citotóxica fueron los de *fase orgánica* y *acetona*. El extracto de fase orgánica tuvo una concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de 20 μ g/mL en la línea T47D y de 12.89 μ g/mL en la MDA-MB-231. Mientras que la CI_{50} del extracto de acetona fue de 19.26 y de 9.53 μ g/mL en las líneas T47D y MDA-MB-231, respectivamente. Debido a su actividad citotóxica, los dos extractos fueron fraccionados por cromatografía en columna abierta. De las fracciones que se obtuvieron, aquellas que fueron representativas de cada zona del fraccionamiento cromatográfico fueron seleccionadas para el ensayo de citotoxicidad. Del extracto de fase orgánica, las fracciones 9, 12 y 15 resultaron citotóxicas en las líneas tumorales. La fracción 12 fue la más citotóxica, con una CI_{50} de 4.1 y 0.92 μ g/mL en las líneas T47D y MDA-MB-231, en la que se identifica un éster hidrocarbonado. En la fracción 18 del extracto de fase orgánica se identificó a un nuevo esteroisómero configuracional del Luteoforol, que si bien es el componente mayoritario en esta fracción, no presentó citotoxicidad. Respecto de las fracciones del extracto acetónico, la fracción 6 tuvo una actividad citotóxica sobre la línea T47D (CI_{50} de 25.2 μ g/mL), más no en la línea MDA-MB-231 (CI_{50} de 54.9 μ g/mL). El extracto de fase orgánica, sus fracciones activas (9,12 y 15) y el extracto acetónico fueron evaluados sobre la línea celular de mama no tumorigénica MCF-10A. En esta línea celular, los extractos de fase orgánica y de acetona presentaron una CI_{50} de 26.2 y >100 μ g/mL, respectivamente. Mientras, ninguna de las fracciones evaluadas presentó

actividad citotóxica importante.

Como conclusiones, este es el primer estudio en que se reporta la actividad citotóxica de la especie *J. monticola* f. *monticola* sobre dos líneas distintas de cáncer de mama. El rendimiento obtenido en las fracciones activas de la fase orgánica fue muy bajo, por lo que se requiere mayor investigación para el aislamiento e identificación del (los) compuesto(s) activo(s), mientras que se reporta la identificación de un nuevo esteroisómero configuracional del Luteoforol. El extracto de acetona resultó el más prometedor en la búsqueda de nuevos compuestos antineoplásicos, ya que su CI_{50} en las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231 es $\leq 30\mu\text{g/mL}$ y requiere $>100\mu\text{g/mL}$ para el mismo efecto en la línea no tumorigénica MCF-10A.

ABSTRACT

This work was a bioassay-guided study with the aim to evaluate the cytotoxic activity of five organic extracts obtained from *Juniperus monticola* form *monticola* Martinez on cancer cell lines, to further fractionate the active extracts and then isolate and identify compounds with cytotoxic activity.

Terminal branches of *J. monticola* f. *monticola* were used to obtain the hydroethanolic (and its organic and aqueous phases), acetone and hexane extracts. The five extracts were evaluated by the sulforhodamine B assay to determine their anti-proliferative effect on T47D and MDA-MB-231.

Our results showed that the organic phase and acetone extracts were cytotoxic ($IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$). The organic phase extract had an IC_{50} of 20 and $12.89 \mu\text{g/mL}$ on T47D and MDA-MB-231 cell lines, respectively. Meanwhile, acetone extract had an IC_{50} of $19.26 \mu\text{g/mL}$ and $9.53 \mu\text{g/mL}$ on T47D and MDA-MB-231 cell lines. Because of their cytotoxic activity, these extracts were fractionated by open column chromatography, and their representative fractions were tested in the cytotoxicity assay. Fractions 9, 12 and 15 (from organic phase) were cytotoxic. Fraction 12 had the highest cytotoxic activity, with an IC_{50} of 4.1 and $0.92 \mu\text{g/mL}$ on T47D and MDA-MB-231 cell lines, respectively. From this fraction, a hydrocarbon ester was identified as the major component. In fraction 18 we found a novel stereoisomer of luteoforol as the principal component, though not cytotoxic. Regarding fractions of the acetone extract, fraction 6 was the most active, with an IC_{50} of 25.2 and $54.9 \mu\text{g/mL}$ on T47D and MDA-MB-231 cell lines, respectively.

The organic phase extract and its fractions (9, 12 and 15) and the acetone extract were evaluated on MCF-10A non-tumorigenic cell line. In this cell line, the organic phase and acetone extracts had an IC_{50} of 26.2 and $>100 \mu\text{g/mL}$, respectively. Meanwhile, none of the evaluated fractions presented significant cytotoxic activity. In summary, this is the first time that the species *J. monticola* f. *monticola* is reported as an antiproliferative and cytotoxic plant in two different breast cancer cell lines. However, cytotoxic compounds were found in very small amounts, so its isolation requires further investigation. Moreover, we found a new stereoisomer of luteoforol from the organic phase extract. Our findings suggest that the acetone

extract could be a very promising material in the searching for new anti-neoplastic compounds, as its IC₅₀ on T47D and MDA-MB-231 tumor lines were $\leq 30\mu\text{g/mL}$ and requires $> 100\mu\text{g/mL}$ for the same effect on MCF-10A non-tumorigenic cell line.

1. INTRODUCCIÓN

En México, el cáncer de mama es la primera causa de muerte en mujeres por neoplasia maligna y por cada 100 fallecimientos por tumores malignos, 15 son por cáncer de mama (INEGI, 2014).

La quimioterapia es uno de los tratamientos principales contra el cáncer, sin embargo, ocasiona graves efectos secundarios, además de que muchos de los medicamentos tienen actividad limitada frente a los distintos tipos de cáncer y a pesar de la diversidad de fármacos utilizados, la mortalidad continúa incrementando debido a la formación de células resistentes al tratamiento utilizado y al proceso de metástasis, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevos fármacos (Mans y cols., 2000; Alonso-Castro y cols., 2011).

Más del 60% de los fármacos utilizados en la quimioterapia han sido obtenidos a partir de productos naturales (Alonso-Castro y cols., 2011) y las plantas son una de los recursos principales.

En la búsqueda de nuevos compuestos, las especies del género *Juniperus* representan un buen prospecto de estudio, ya que algunas han sido reportadas con actividad citotóxica significativa contra las líneas tumorales HeLa, KB, MDA-MB-468 y Hep-2 (Jafarian-Dehkordi y cols., 2004; Moujir y cols., 2008; Villavicencio y cols., 2008; Sadeghi-aliabadi y cols., 2009a, b). En México, la especie *Juniperus monticola* f. *monticola* Martínez aún no ha sido estudiada respecto de su citotoxicidad, por lo que el objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad citotóxica de los extractos orgánicos de esta especie sobre líneas de tumores humanos y fraccionar a los extractos activos para aislar e identificar a los compuestos con actividad citotóxica.

Debido al problema de salud pública que representa el cáncer de mama en México y en el mundo, en el presente trabajo se utilizaron las líneas celulares de cáncer de mama T47D y MDA-MB-231.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cáncer

El término cáncer se utiliza para designar un grupo de enfermedades que se caracterizan por el crecimiento incontrolado de células, las cuales pueden afectar cualquier parte del cuerpo (OMS, 2015a).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la transformación de una célula normal en tumoral resulta es un proceso multifásico y suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno (OMS, 2015b).

El cáncer se desarrolla a partir de la acumulación y selección sucesiva de alteraciones genéticas (mutaciones) y epigenéticas (cambios en metilación del ADN, modificación de histonas asociadas al ADN y ARN no codificante) (Meza-Junco et al., 2006). Además de los factores de riesgo genéticos del paciente, existen tres categorías de agentes carcinogénicos externos (OMS, 2015b):

- Físicos: radiación ionizante y UV
- Químicos: asbesto, tabaco, aflatoxinas, etc.
- Biológicos: virus, bacterias y parásitos

Otro factor importante en la aparición del cáncer es el envejecimiento, probablemente por la acumulación de factores de riesgo de determinados tipos de cáncer, aunado a la pérdida de eficacia de los mecanismos de reparación celular (OMS, 2015b).

2.2. Cáncer de mama

Es el cáncer que se origina en los tejidos de la mama. Se divide en dos tipos principales: carcinomas *in situ* y carcinomas invasivos (también llamados infiltrantes). Los carcinomas *in situ* pueden originarse del epitelio ductal (tubos delgados que llevan la leche desde los lóbulos de la mama hasta el pezón) (Figura 1) o lobular (glándulas mamarias) (Figura 2), pero permanecen confinados ahí, sin invasión a la membrana basal subyacente. Sin embargo, cuando hay una

extensión de la malignidad ductal o lobular hacia la membrana basal que constituye el borde epitelial, entonces la malignidad se considera un carcinoma ductal o lobular invasivo. En cáncer de mama invasivo, el carcinoma ductal infiltrante representa el 75-80% de los casos, mientras que es el carcinoma lobular infiltrante del 5-10%. Otros tipos de cáncer de mama se originan en otros tejidos.

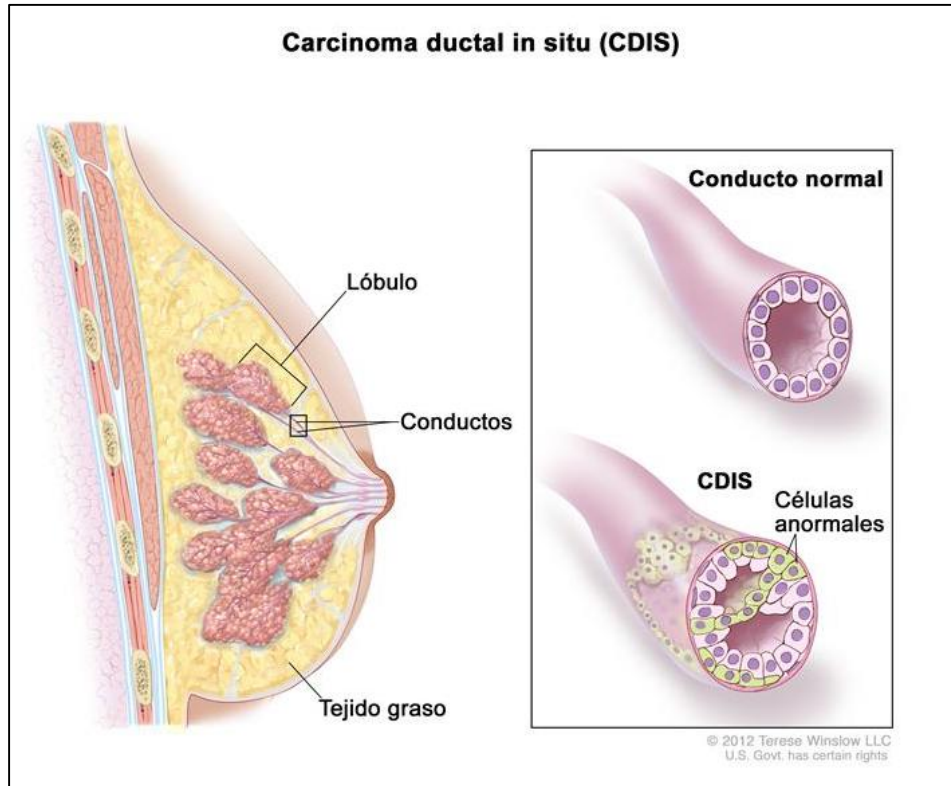


Figura 1. Carcinoma ductal in situ (CDIS). Tomado de http://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/paciente/tratamiento-seno-pdq#section/_24

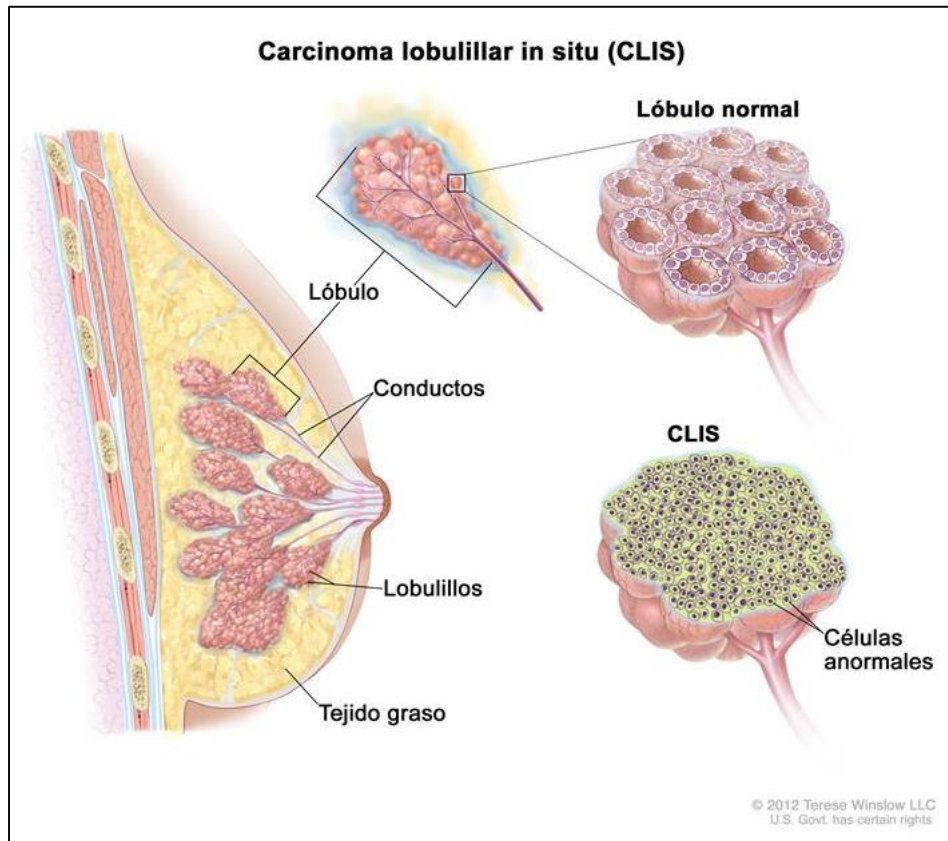


Figura 2. Carcinoma lobulillar in situ (CLIS). Tomado de http://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/paciente/tratamiento-seno-pdq#section/_24

El cáncer de mama es un problema de salud pública en México y en el mundo. Es el cáncer más frecuente en las mujeres, tanto en número de casos nuevos como en número de muertes, con un estimado de 1,67 millones de casos diagnosticados (25% de todos los cánceres) y 522 000 muertes en 2012 (IARC, 2015).

En México, a partir de 2006, el cáncer de mama es la primera causa de muerte por tumores malignos en las mujeres, desplazando al cáncer cervicouterino (Knaul et al., 2009). Es la principal neoplasia (30.9 por ciento) que presenta la población mexicana de más de 20 años, afectando frecuentemente a mujeres y por cada 100 fallecimientos por tumores malignos, 15 son por cáncer de mama (INEGI, 2014).

2.3. Diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama

En el diagnóstico de cáncer de mama se utilizan las siguientes pruebas (Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos, 2015):

- Mamograma: Mediante rayos-X y utilizando dos placas, se toman imágenes del tejido de la mama.
- Ultrasonido de mama: Se utilizan ondas de sonido en los tejidos para producir ecos, los cuales forman una imagen en la computadora.
- IRM (imágenes por resonancia magnética): Se utiliza un imán, ondas de radio y una computadora para crear imágenes detalladas de áreas internas del cuerpo. Este procedimiento también se llama imágenes por resonancia magnética nuclear (IRMN).
- Biopsia: extracción de células o tejidos en las que un patólogo las observa al microscopio y verifica si hay células cancerosas.

Una vez confirmado el diagnóstico de cáncer y la fase en la que se encuentra, es preciso elegir el tratamiento adecuado, que tiene como objetivo curar el cáncer o controlar el tumor (prolongar la vida) y aminorar los síntomas, mejorando la calidad de vida del paciente (Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos, 2015). El tratamiento depende del estadio en que se encuentra el cáncer, generalmente es multidisciplinario y consiste en: cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal y terapia dirigida.

En los medicamentos utilizados en la quimioterapia, la doxorubicina (Adriamicina®) es uno de los agentes más efectivos contra el cáncer de mama (Smith et al., 2006), pertenece a las antraciclinas y su mecanismo de acción es mediante: a) Intercalación en el ADN y interrupción de la reparación del ADN mediada por Topoisomerasa II α , y b) generación de radicales libres y daño a membranas celulares, ADN y proteínas (Thorn et al., 2011).

2.4. Líneas celulares de cáncer de mama

Perou y cols. (2000) clasificaron el cáncer de mama en distintos subtipos moleculares, de acuerdo al perfil de expresión de genes y a la expresión inmunohistoquímica de ER α , el receptor de progesterona (PR) y HER2/neu. De esta manera se identificaron al menos cinco subtipos: luminal A, luminal B, HER2, tipo Basal y Normal. Recientemente se ha añadido el subtipo bajo en Claudina. Esta clasificación permite explicar diferencias en el comportamiento de los tumores y su respuesta al tratamiento a pesar de su similitud morfológica. En la siguiente tabla se muestran las características de los subtipos de cáncer de mama.

Tabla 1. Clasificación molecular de carcinoma de mama (Modificado de Holliday y Speirs, 2011).

Clasificación	Inmunoperfil	Otras características	Ejemplo de línea celular
Luminal A	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁻	Ki67 bajo, respuesta endócrina, frecuentemente responde a quimioterapia	MCF-7, T47D, SUM185
Luminal B	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁺	Ki67 alto, usualmente con respuesta endócrina, variable respuesta a quimioterapia HER2 ⁺ responde a trastuzumab	BT474, ZR-75
Basal	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	EGFR ⁺ y/o citoqueratina 5/6, Ki67 alto, sin respuesta endócrina, frecuentemente responde a quimioterapia	MDA-MB-468, SUM190
Bajo en Claudina	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	Ki67, E-caderina, bajo en Claudina-3, Claudina-4 y Claudina-7. Respuesta intermedia a quimioterapia	BT549, MDA-MB-231, SUM1315
HER2	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺	Ki67 alto, responde a trastuzumab, responde a quimioterapia	SKBR3, MDA-MB-453

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico; ER: Receptor de estrógeno; HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano; PR: Receptor de progesterona.

De las distintas líneas celulares, en el presente trabajo se utilizaron las líneas T47D y MDA-MB-231.

La línea T47D (ATCC® HTB-133™) se clasifica en el subtipo Luminal A, es rica en el Receptor de Progesterona (PR), Receptor de Estrógeno (ER), receptores a 17β -estradiol y calcitonina. Presenta morfología epitelial y forma monocapa en cultivo celular (figura 3). Esta línea celular permite un modelo de estudio para comprender los mecanismos y regulación del cáncer de mama dependiente de hormonas, que constituye 65-75% del cáncer de mama (Miller et al., 2014).

Por otro lado, la línea MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) pertenece al subtipo bajo en Claudina, caracterizado por la baja expresión de proteínas de unión estrecha Claudina 3, 4 y 7, y E-caderina. Este subtipo carece de las características de células epiteliales comunes, muestra bajos niveles de marcadores de diferenciación luminal y está enriquecido de células iniciadoras de tumores (TIC, por sus siglas en inglés). Los tumores triple negativo subtipo bajo en Claudina tienen activación de vías involucradas en la transición epitelio-mesenquimal, respuesta al sistema inmune y procesos biológicos asociados a células progenitoras (Prat et al., 2010). Esta línea celular también pertenece a un subgrupo de tumores denominado Cáncer de mama triple negativo (TNBC, por sus siglas en inglés), los cuales no tienen expresión del receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PgR), ni amplificación de HER-2/Neu, por lo que ni la terapia hormonal y ni la HER2/neu dirigida son de utilidad. Aproximadamente 10-24% del cáncer de mama invasivo pertenece a esta categoría (TNBC), que son una entidad heterogénea. Generalmente, estos tumores son tratados con quimioterapia, tanto en etapas temprana y avanzada, debido al pobre pronóstico de los pacientes y la tendencia a metástasis (Carey et al., 2010). La morfología es tipo epitelial, las células son largas y delgadas en baja confluencia, aunque algunas permanecen en forma redonda. Forman monocapa en cultivo celular (figura 4). Esta línea celular nos permite estudiar un modelo celular con potencial invasivo y hormono-independiente de cáncer de mama.

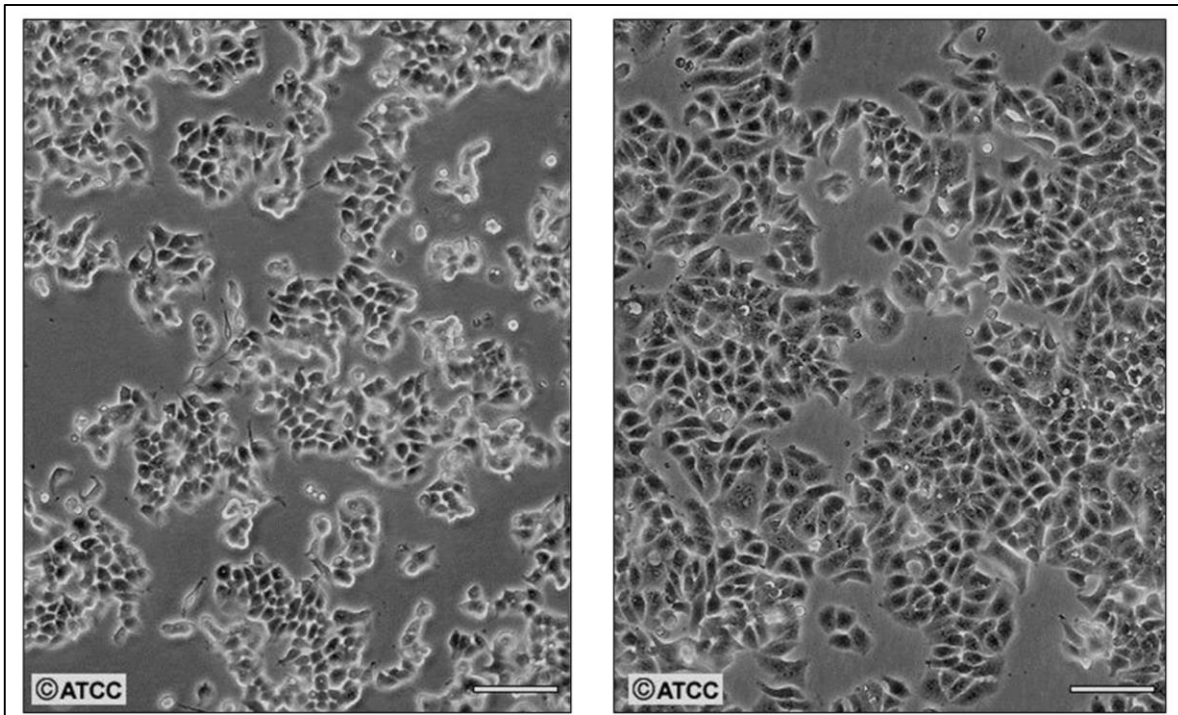


Figura 3. Células T47D en baja confluencia (izquierda) y alta confluencia (derecha). Escala de la barra: 100 μm . Tomado de ATCC: <http://www.atcc.org/~media/Attachments/B/D/D/8/1975.ashx>

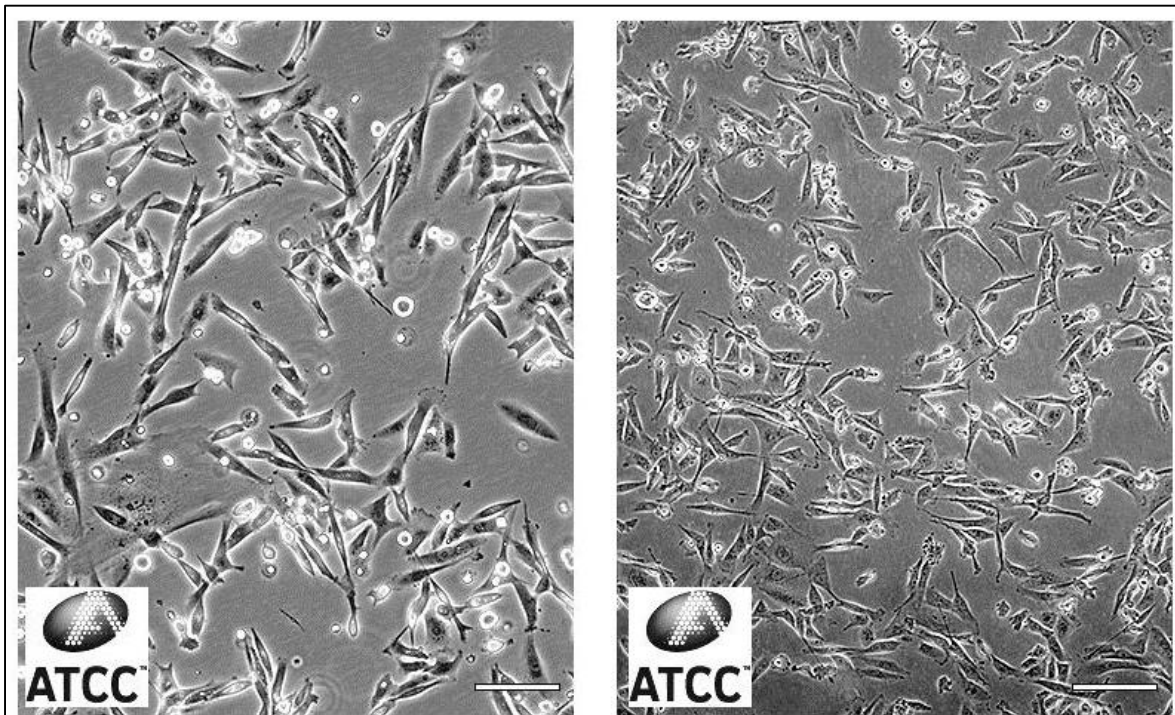


Figura 4. Células MDA-MB-231 en baja confluencia (izquierda) y alta confluencia (derecha). Escala de la barra: 100 μm . Tomado de ATCC: <http://www.atcc.org/~media/Attachments/B/D/D/8/1975.ashx>

Además de utilizar dos líneas tumorales, se incluyó a la línea celular no tumorigénica MCF-10A (ATCC® CRL-10317™), para conocer su respuesta frente al tratamiento de los extractos y fracciones de *J. monticola* f. *monticola* que hayan presentado actividad citotóxica ($CI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$) sobre las líneas tumorales. Esta línea celular deriva de tejido epitelial de mama y presenta las siguientes características: a) carencia de tumorigenicidad en ratones desnudos; b) crecimiento tridimensional en colágeno; c) crecimiento en cultivo controlado por hormonas y factores de crecimiento; d) carencia de crecimiento independiente de anclaje; y e) formación de domo en cultivos confluentes (Soule et al., 1990) (figura 5).



Figura 5. Células MCF-10A en baja confluencia. Escala de la barra: 50 μm . Foto: Biól. Dalia Barrios Palacios. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

2.5. Las plantas: fuente de metabolitos secundarios

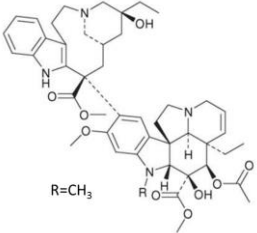
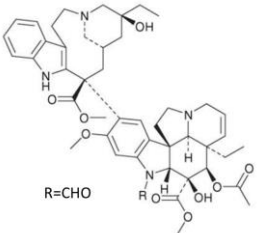
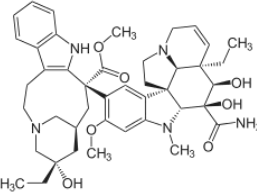
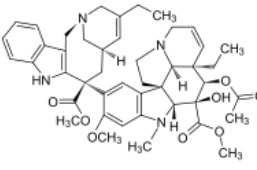
Las plantas contienen una enorme diversidad de compuestos químicos, que se clasifican en metabolitos primarios y secundarios. Los primeros están involucrados en los procesos de supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas, como son los aminoácidos, nucleótidos, azúcares, entre otros. Mientras, los metabolitos secundarios, cuyo nombre se atribuye como opuestos a los primarios, son de menor abundancia, presentan distribución restringida a ciertas familias o especies y tienen un papel importante en la interacción ecológica de las plantas con el medio ambiente, con funciones de defensa (antibacterianas, antifúngicas, antivirales), atracción de polinizadores, repelente de fitófagos, toxicidad contra otras plantas (alelopatía) y protección a la luz UV, por mencionar algunos ejemplos. Estos metabolitos se han clasificado por su origen biosintético en terpenos, fenilpropanoides y alcaloides (Bourgaud et al., 2001; Iriti y Faoro, 2009). Alrededor de 50 000 metabolitos secundarios han sido descritos, pero este número puede ser de cientos de miles, donde la gran mayoría de las estructuras son desconocidas (Pichersky y Gang, 2000).

Debido a su actividad terapéutica, las plantas medicinales han sido utilizadas durante miles de años (Balunas y Kinghorn, 2005) y se han reportado más de 3000 especies utilizadas en el tratamiento del cáncer (Graham et al., 2000). Además del uso en la medicina tradicional, aproximadamente el 67% de los fármacos anticáncer tienen un origen natural, ya que son medicamentos clasificados como: productos de origen natural, productos semisintéticos derivados de un producto natural o productos sintéticos que han empleado como modelo un producto de origen natural. Para ello, se consideran como productos naturales a los producidos por bacterias, organismos marinos y plantas (Vega-Ávila et al., 2004; Cragg y Newman, 2005).

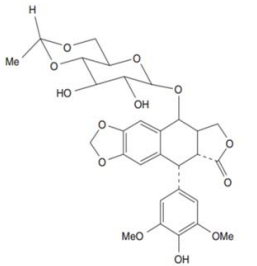
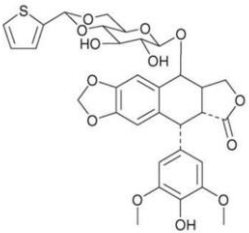
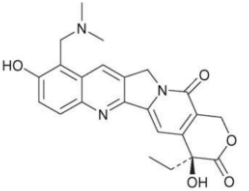
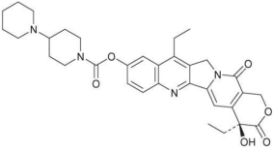
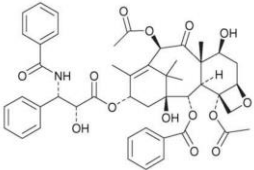
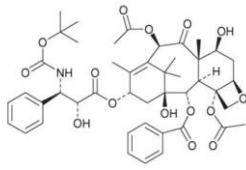
Desde 1958, con el descubrimiento de la vinblastina y vincristina en *Catharanthus roseus* G.Don., el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos inició un programa de colecta de plantas en la búsqueda de nuevos agentes anticáncer, lo que derivó en el descubrimiento de la podofilotoxina, taxanos y camptotecinas, principalmente (Vega-Ávila et al., 2004; Cragg y Newman, 2005) (Tabla 2).

Actualmente, muchos de estos compuestos se utilizan en diversos tipos de cáncer e incluso son el tratamiento de primera línea.

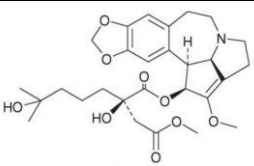
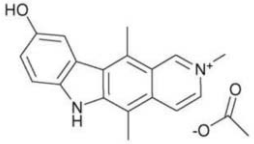
Tabla 2. Compuestos obtenidos/derivados de las plantas utilizados en el tratamiento del cáncer (Vega-Ávila et al., 2004; Cragg y Newman, 2005).

Estructura química	Compuesto	Especie de la que se aisló	Tipo de cáncer	Mecanismo de acción
	vinblastina (Velban®)	<i>Catharanthus roseus</i> G. Don.	Linfomas, leucemias, cáncer testicular, pulmonar, Sarcoma de Kaposi, de ovario y carioepitelioma.	Mediante su unión a la tubulina, impide la polimerización de los dímeros de tubulina e interrupción de la formación de los microtúbulos. La vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina tienen el mismo mecanismo de acción.
	vincristina (Oncovin®)	<i>Catharanthus roseus</i> G. Don.	Leucemia linfocítica aguda, cáncer de colon, cervicouterino y de mama.	
	vindesina (eldisine®)	Semisintético de la vinblastina	Cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas.	
	vinorelbina (navelbine®)	Semisintético de la vincristina	Cáncer de ovario.	

Continuación de la tabla 2.....

Estructura química	Compuesto	Especie de la que se aisló	Tipo de cáncer	Mecanismo de acción
	Etopósido (Toposar®)	Semisintético derivado de la epipodofilotoxina, aislada de <i>Podophyllum peltatum</i> L.	Cáncer pulmonar de células pequeñas, cáncer testicular y linfomas malignos.	Inhibición de la enzima topoisomerasa, al formar un complejo con esta enzima. Etopósido y tenipósido tienen mismo mecanismo de acción.
	Tenipósido (Vulmon®)	Semisintético derivado de la epipodofilotoxina, aislada de <i>Podophyllum peltatum</i> L.	Cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer testicular y linfomas malignos.	
	Topotecan (Hycamtin®)	Derivado de la camptotecina, aislada de <i>Camptotheca acuminata</i> Decne	Cáncer de ovario y cáncer de pulmón de células pequeñas.	Unión al aducto ADN-topoisomerasa I, estabilizando este complejo. Topotecan e Irinotecan comparten mismo mecanismo de acción.
	Irinotecan (Camptosar®)	Derivado de la camptotecina, aislada de <i>Camptotheca acuminata</i> Decne	Cáncer colorrectal, ovario y pulmón.	
	Paclitaxel (Taxol®)	<i>Taxus brevifolia</i> Nutt.	Cáncer de ovario, cáncer pulmonar de células no pequeñas, sarcoma de Kaposi, mama y colon.	Unión a los microtúbulos, estabilizándolos. Paclitaxel y Docetaxel presentan mismo mecanismo de acción.
	Docetaxel (Taxotere®)	Conversión semisintética de las bacatinas de <i>Taxus brevifolia</i> Nutt.	Cáncer de mama y pulmón.	

Continuación de la tabla 2....

Estructura química	Compuesto	Especie de la que se aisló	Tipo de cáncer	Mecanismo de acción
	Homoharringtonina (HHT)	<i>Cephalotaxus harringtonia</i> var. <i>drupacea</i> (Sieb y Zucc.)	Leucemia aguda no linfoblástica y leucemia mieloide crónica.	Inhibición competitiva de la enzima peptidil transferasa.
	Eliptinum (Celiptium®)	Derivado de la elipticina, aislada de <i>Bleekeria vitensis</i> A.C.Sm.	Cáncer de mama.	Intercalación en el ADN, inhibición de la topoisomerasa II, introducción de grupos alquilo en las macromoléculas y generación de radicales libres.

Los productos naturales y en particular las plantas, son una fuente importante en la búsqueda y desarrollo de medicamentos altamente efectivos en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, al proveer estructuras novedosas que permiten el desarrollo de agentes potenciales, ya sea directamente como medicamentos o mediante su optimización por química sintética, química combinatoria y modelado molecular. Las características comunes en los productos naturales (centros quirales, anillos aromáticos, sistemas complejos de anillos, grado de saturación de las moléculas y número y radio de heteroátomos) son de relevancia en el descubrimiento de nuevos fármacos (Balunas y Kinghorn, 2005).

Por lo anterior, la búsqueda de compuestos antineoplásicos en las plantas continúa siendo un área importante de estudio.

2.6. Clasificación taxonómica de *Juniperus monticola* forma *monticola* Martínez (Cronquist, 1977):

Reino: Plantae

División: Pinophyta

Subdivisión: Angiosperma

Clase: Dicotiledónea

Orden: Pinales

Familia: Cupressaceae

Género: *Juniperus*

Especie: *Juniperus monticola*

J. monticola presenta tres formas taxonómicas:

- 1) *J. monticola* f. *monticola*
- 2) *J. monticola* f. *compacta*
- 3) *J. monticola* f. *orizabensis*

Tabla 3. Claves de identificación de las formas taxonómicas de *J. monticola* (Modificado de Adams, 2004):

Forma	Claves de identificación taxonómica
f. <i>monticola</i>	Ramas maduras de 10-15 (-20) mm de largo; ángulo de ramificación de última rama de 40-50 grados; follaje no muy compacto; tallo difuso y tortuoso, árbol-arbusto de 2-4 m de altura, sin embargo, puede alcanzar hasta 10 m.
f. <i>compacta</i>	Ramas maduras de 5-10 mm. El ángulo de ramificación de última rama de 50-60 grados, follaje muy denso y compacto, arbustos postrados de menos de 1 m de altura, de hábitat alpino.
f. <i>orizabensis</i>	Ramas maduras de 20-40 mm de longitud, ángulo de ramificación de última rama de 55-60 grados, follaje no muy compacto, arbustos de hasta 1.5 m de altura.

2.7. Descripción botánica de *J. monticola* f. *monticola* (Martínez, 1963)

Esta especie es un arbusto bajo de 2-4 m de altura (pero puede alcanzar los 10m). El fuste de esta especie frecuentemente es tortuoso y ramificado desde cerca de la base, con copa amplia y achatada hasta ampliamente cónica. La corteza mide de 5-8 mm de espesor, es fibrosa y rasgada en tiras longitudinales, de color cenizo por fuera y rojizo-violáceo por dentro. Las hojas son opuestas, frecuentemente cubiertas por una capa de cera, donde las hojas de las extremidades son aovadas, aovadas-rómbicas, gruesas de 1-1.5mm de largo por 1 mm de ancho, con el dorso convexo y ligeramente aquillado, sin glándula o con glándula redonda situada en la base y con el ápice abultado, corto, obtuso y redondeado y en el borde finamente dentado con denticillos pequeños y desiguales. Las ramas primarias son brillantes, casi lisas de color moreno-rojizo, con tinte violáceo. Las últimas ramillas desiguales de 10-15mm de largo por 1.5mm de grueso, tetrágonas y a veces dísticas o subdísticas, de color verde oscuro, con tinte azulado. Las ramas secundarias de esta especie son extendidas y tortuosas, formando una copa irregular. Los microstróbilos son verdosos al principio y moreno amarillento después, ligeramente tetrágonos, de 1 a 4mm de largo, ovals, obtusos, con 12 brácteas suborbiculares, fijas por su parte media y llevan 4 saquitos con granos de polen. Por otro lado, el megastróbilo es generalmente liso, de 5-10mm de diámetro, suave y carnoso, color azul oscuro hasta azul violáceo. Las inflorescencias femeninas están formadas por 8 escamas aovadas, agudas y extendidas. El número de semillas son 3-4, a veces hasta 6 u 8 por megastróbilo, que son angulosas y acuminadas o trígonoas, con algunas canaladuras longitudinales irregulares que dan a la superficie un aspecto estriado, de color castaño oscuro. Miden de 4-5mm de largo por 1.5-3mm de ancho. Los frutos o gálbulas de *J. monticola* f. *monticola* son globulosos, a veces un poco gibosos, con las puntas de las brácteas visibles, generalmente colocadas en las extremidades de las ramillas, apareciendo largamente pedunculadas, de color azul oscuro, algo violáceos, de 7-9mm de diámetro, con pericarpio blando y mesocarpio verdoso, pulposo, aromático y resinoso. La madera es dura, ligera, no resinosa, con fragancia ligera, de textura fina y color blanco levemente morena.



Figura 6. *J. monticola* f. *monticola* en el paraje Valle de los Enamorados, Parque Nacional El Chico, Hidalgo.

2.8. Hábitat y distribución de *J. monticola* f. *monticola* en el Parque Nacional El Chico: Estado de Hidalgo

J. monticola f. *monticola* se localiza comúnmente en regiones elevadas del país, en lugares descubiertos, bien soleados y sobre terrenos de 2000 a 4270 metros sobre el nivel del mar (Martínez, 1963).

En el Parque Nacional El Chico, el bosque de *J. monticola* (bosque de tascate o tlaxcal) es un bosque muy abierto y bajo (3 a 5 m). Cubre una superficie de 127.9 ha (4.67%), distribuyéndose en diferentes zonas, fragmentándose en manchones adyacentes a los valles y en el interior de los bosques de *Abies*. El conjunto de manchones se desarrolla en terrenos casi planos o de suave pendiente, con suelos profundos y buen drenaje. Este bosque tiene un área limitada de ocupación (CONANP, 2006). *J. monticola* f. *monticola* se utiliza para la fabricación de artesanías y como planta de ornato.

2.9. Uso de especies del género *Juniperus* en la medicina tradicional

El género *Juniperus* el segundo más diverso de coníferas, comprendiendo aproximadamente 67 especies arbustivas o arbóreas (Sadeghi-aliabadi y cols., 2009a, b) que se encuentran ampliamente distribuidas en el hemisferio norte, con excepción de *Juniperus procera* Hochst. ex Endl., que crece en el hemisferio sur (Adams, 2000).

Algunas especies son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional de diversos países alrededor del mundo. Se ha reportado el uso de las ramas, hojas, gálbulas o madera de diversas especies, como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Especies del género *Juniperus* utilizadas en la medicina tradicional.

Especie	País	Parte utilizada	Extracto	Padecimiento	Autor, año
<i>J. thurifera</i> L. <i>var. africana</i> (Maire) Romo & Boratynski <i>stat. nov.</i>	Marruecos	Madera	aceite esencial	Abortivo y regulador menstrual	Barrero et al, 2004
<i>J. communis</i> L.	Alemania	Gálbulas	Decocción	Auxiliar digestivo	El-Sawi et al., 2007
<i>J. communis</i> L.	Alemania	Gálbulas	Aceite esencial	Diuresis, antiséptico, antiinflamatorio, hipoglucémico y antimicrobiano	El-Sawi et al., 2007; Innocenti et al., 2007
<i>J. deppeana</i> Steud.	México	Ramas	Decocción	Cáncer de matriz	Villavicencio et al., 2008
<i>J. communis</i> L. <i>subsp. nana</i> Syme.	Turquía	Gálbulas y hojas	Decocción e infusión	Tos, infecciones uretrales e indigestión. Odorante y apetecedor.	Öztürk et al., 2011

Continuación tabla 4.....

Especie	País	Parte utilizada	Extracto	Padecimiento	Autor, año
<i>J. communis</i> L. subsp. <i>nana</i> Syme.	Turquía	Gálbulas y hojas	Aceite esencial	Reumatismo y hemorroides	Öztürk et al., 2011
<i>J. foetidissima</i> Willd	Turquía	Gálbulas y hojas	Infusión	Tos y resfriado	Öztürk et al., 2011
<i>J. sabina</i> L.	Turquía	Gálbulas	Consumo directo	Diarrea	Öztürk et al., 2011
<i>J. excelsa</i> M. Bieb	Turquía	Gálbulas y hojas	Decocción	Asma, dismenorrea, tos, bronquitis, resfriado, ictericia y tuberculosis	Öztürk et al., 2011; Weli et al., 2014

En México se conocen 16 especies del género *Juniperus* y solo se tiene la referencia del uso de la infusión acuosa de las ramas *Juniperus deppeana* Steud. (Cupressaceae) tomada por separado con la infusión de *Bidens odorata* Cav. (Asteraceae) en Omitlán, Hidalgo, para tratar el cáncer de matriz (Villavicencio et al., 2008). El estudio de los extractos orgánicos de *J. monticola* f. *monticola* contribuye al conocimiento del género, que presenta especies en las que se han aislado e identificado moléculas con actividad citotóxica.

2.10. Actividad citotóxica de extractos orgánicos

Los extractos orgánicos de algunas especies del género *Juniperus* presentan actividad citotóxica significativa contra líneas tumorales humanas, como se observa en la siguiente tabla.

Tabla 5. Especies del género *Juniperus* en que se han evaluado extractos orgánicos contra líneas tumorales y no tumorales.

Especie	Extracto	Parte de la planta	Línea celular	CI ₅₀ (µg)	Tiempo de exposición	Autor, Año		
<i>J. sabina</i> L.	Etanólico	Gálbulas	KB	>20	72h	Jafarian-Dehkordi y cols., 2004		
	Etanólico	Ramas	HeLa	10	72h			
	Etanólico	Gálbulas	HeLa	10	72h			
	Etanólico	Ramas	MDA-MB-468	<10	72h			
	Etanólico	Gálbulas	MDA-MB-468	<10	72h			
<i>J. phoenicea</i> L.	Aceite	Hojas	MCF7	1	48h	El-Sawi et al., 2007		
	Esencial							
	Aceite	Hojas	HeLa	5	48h			
	Esencial							
	Aceite esencial	Hojas	U251	0.6	48h			
	Aceite esencial	Hojas	H460	0.7	48h			
	Aceite esencial	Hojas	Hepg2	0.9	48h			
	Aceite esencial	Gálbulas	MCF7	0.8	48h			
	Aceite esencial	Gálbulas	HeLa	5	48h			
	Aceite esencial	Gálbulas	U251	0.6	48h			
	Aceite esencial	Gálbulas	H460	0.6	48h			
	Aceite esencial	Gálbulas	Hepg2	0.7	48h			
	<i>J. phoenicea</i> L.	Éter de Petróleo	Gálbulas	U251	4.72		48h	El-Sawi y Montawe, 2008
		Éter de Petróleo	Gálbulas	HeLa	>10		48h	
		Éter de Petróleo	Gálbulas	Hepg2	0.4		48h	
Éter de Petróleo		Gálbulas	H460	0.54	48h			
Éter de Petróleo		Gálbulas						

Continuación tabla 5....

Especie	Extracto	Parte de la planta	Línea celular	CI ₅₀ (µg)	Tiempo de exposición	Autor, Año
<i>J. brevifolia</i> (Seub.) Antoine	Fase clorofórmica (extracto de Acetona)	Hojas	HeLa	3.8±0.6	48h	Moujir y cols. 2008
	Diclorometano	Hojas	HeLa	6.3 ± 1.0	48h	
	Hexano	Corteza	HeLa	16.4 ± 1.0	48h	
	Diclorometano	Hojas	Hep-2	19.2 ±1.5	48h	
	Diclorometano	Hojas	Vero	20.3±2.8	48h	
	Hexano	Hojas	Vero	2.5±0.1	48h	
	Hexano	Corteza	Vero	18.5±1.0	48h	
<i>J. deppeana</i> Steud.	Etanólico	Ramas	HeLa	4.63	24 y 48h	Villavicencio y cols., 2008
<i>J. foetidissima</i> Willd.	Etanólico	Ramas	KB	<5	72h	Sadegui-aliabadi y cols., 2009a.
	Etanólico	Gálbulas	KB	<5	72h	
<i>J. excelsa</i> M. Bieb	Etanólico	Ramas	HeLa	>20	72h	Sadegui-aliabadi y cols., 2009b.
<i>subsp.</i>	Etanólico	Gálbulas	HeLa	>20	72h	
	Etanólico	Ramas	KB	<5	72h	
<i>Polycarpus</i> (K. Koch)	Etanólico	Gálbulas	KB	<5	72h	
	Etanólico	Ramas	MDA-MB-468	20	72h	
	Etanólico	Gálbulas	MDA-MB-468	10	72h	
<i>J. excelsa</i> M. Bieb	Etanólico	Ramas	KB	20	72h	Sadeghi-aliabadi y cols., 2009b.
<i>subsp.</i>	Etanólico	Gálbulas	KB	<5	72h	
	Etanólico	Gálbulas	HeLa	20	72h	
<i>Excelsa</i>	Etanólico	Gálbulas	MDA-MB-468	20	72h	
<i>J. phoenicea</i> L.	Metanólico	Hojas	Hep-2	29.79	72h	Latif et al., 2014

CI₅₀: Concentración inhibitoria 50. KB: Carcinoma humano epidermal caucásico; HeLa: Carcinoma humano de cérvix; MDA-MB-468: Adenocarcinoma de mama humano; MCF7: Carcinoma de mama humano; U251: Glioblastoma humano; H460: Carcinoma pulmonar de células no pequeñas; Hepg2: Carcinoma de hígado; Hep2: Carcinoma humano de laringe; Vero: células de riñón de mono verde africano.

2.11. Compuestos citotóxicos identificados en el género *Juniperus*

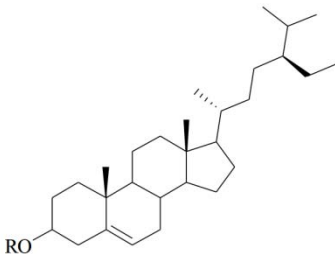
En este género se han identificados compuestos citotóxicos, con los siguientes esqueletos químicos:

1. Esteroles
2. Flavonoides
3. Lignanos
4. Terpenos

2.11.1. Esteroles

Los esteroides son componentes estructurales de la membrana celular, determinando su viscosidad y estabilidad (Pérez-Urria y Ávalos, 2009). Los esteroides más abundantes son el estigmasterol, campesterol y el sitosterol. Se ha observado que el β -sitosterol presenta citotoxicidad en células cancerosas humanas dependientes e independientes de estrógeno, así como la inhibición en la glicoproteína P (gp-P) (Rubis et al., 2010). En la tabla 6 se muestra el β -sitosterol.

Tabla 6. Esterol citotóxico identificado en el género *Juniperus*.

Estructura	Sustituyentes	Nombre	Especies y referencias
	R=H	β -sitosterol	<i>J. sabina</i> L. (Guerra-Hernández et al., 1988)

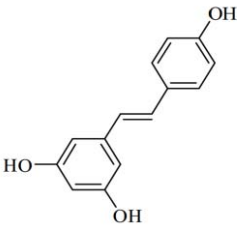
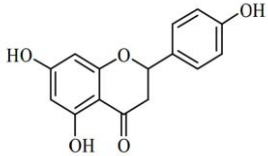
2.11.2. Flavonoides

El esqueleto de los flavonoides está formado por 15 átomos de carbono, ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. En las plantas tienen funciones de defensa, pigmentación y son importantes en la polinización y dispersión de semillas (Pérez-Urria y Ávalos, 2009).

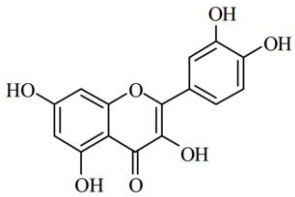
Algunos flavonoides (y sus derivados sintéticos) como la (-) Epigallocatequina-3-galato, 8-prenilnaringenina, icaritina, baicaleína, silimarina, biochanina-A, genisteína, quercetina, chalcona, morina, naringenina, resveratrol, procianidina, miricetina y kaempferol han mostrado actividad moduladora de transportadores ABC responsables de la multiresistencia a los fármacos en las células tumorales, incluyendo a la Glicoproteína P (gp-P) y proteína resistente de cáncer de mama (BCRP, por sus siglas en inglés) (Abdallah et al., 2015).

En la tabla 7 se muestran los flavonoides con actividad moduladora de la gp-P y BCRP que han sido identificados en otras especies vegetales, pero presentes en especies del género *Juniperus*.

Tabla 7. Flavonoides con actividad citotóxica presentes en el género *Juniperus* (Modificado de Sethi et al., 1980; Lim et al., 2002).

Estructura	Sustituyentes	Nombre	Especies y referencias
		Resveratrol	<i>J. macropoda</i> Boiss. (Sethi et al., 1980)
		Naringenina	<i>J. chinensis</i> L. (Lim et al., 2002)

Continuación tabla 7....

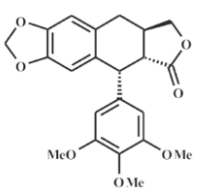
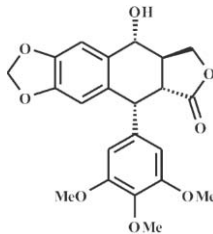
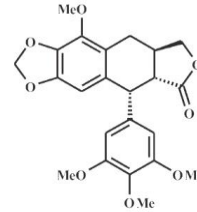
Estructura	Sustituyentes	Nombre	Especies referencias	y
		Quercetina	<i>J. chinensis</i> L. (Lim et al., 2002)	

2.11.3. Lignanos

Los lignanos son compuestos polifenólicos, relacionados con el metabolismo de la fenilalanina a través de la dimerización de alcoholes cinámicos sustituidos a un esqueleto de dibencilbutano. En las plantas, presentan funciones como fitoestrógenos y antioxidantes.

En el género *Juniperus* se han identificado 62 lignanos, entre los que se ha reportado a la Deoxipodofilotoxina (Tabla 8) en las partes aéreas y gálbulas de *J. communis* L., *J. bermudiana* L., *J. phoenicea* L., *J. chinensis* L. var. *kaizuka* Hort ex Endl., *J. procumbens* Siebold ex Endl. Miquel, *J. recurva* Buch.-Ham. ex D. Don, *J. sabina* L., *J. squamata* Buch.-Ham. ex D. Don in Lambert, *J. taxifolia* Hook. & Arn. y *J. virginiana* L. Mientras, la Podofilotoxina (Tabla 8) se ha reportado en las hojas de *J. chinensis* L., *J. bermudiana* L., *J. communis* L., *J. phoenicea* L., *J. scopolorum* Sargent, *J. squamata* Buch.-Ham. Ex D. Don in Lambert, *J. recurva* Buch.-Ham. Ex D. Don, *J. sabina* L., *J. virginiana* L., *J. lucayana* Britton y *J. scopolorum* Sargent (Hartwell et al., 1953; Renouard et.al., 2011). Este metabolito secundario es conocido por sus propiedades citotóxicas, ya que se une a la tubulina e inhibe la polimerización de los microtúbulos en las células. Actualmente, la podofilotoxina no se utiliza en la clínica debido a sus efectos adversos. Sin embargo, esta ha servido en la hemisíntesis de drogas anticáncer, tal como el etopósido, tenipósido, GL331 y NK611, que son de utilidad en el tratamiento de distintos tipos de cáncer, como el de pulmón, testicular, de páncreas, cáncer de estómago y leucemias mieloides (Vega-Ávila et al., 2006). Por otro lado, el lignano metil éter- β -peltatina A también presentó citotoxicidad (Cairnes y cols. 1980).

Tabla 8. Lignanos con actividad citotóxica presentes en el género *Juniperus* (Modificado de Hartwell et al., 1953; Cairnes et al., 1980; Renouard et al., 2011).

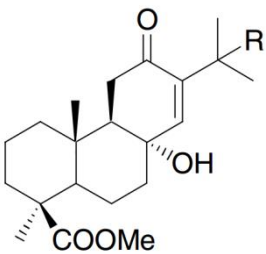
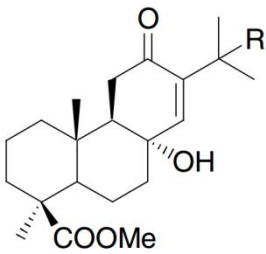
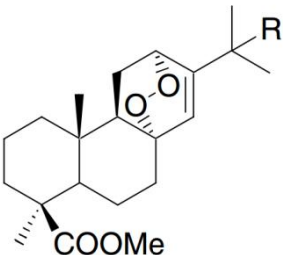
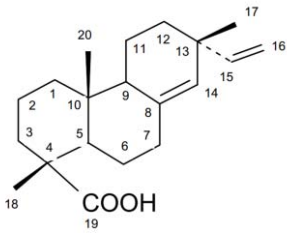
Estructura	Nombre	Especies y referencias
	Deoxipodofilotoxina	<i>J. communis</i> , <i>J. bermudiana</i> , <i>J. phoeniceae</i> , <i>J. chinensis</i> , <i>J. procumbens</i> , <i>J. recurva</i> , <i>J. sabina</i> , <i>J. squamata</i> , <i>J. taxifolia</i> y <i>J. virginiana</i> (Hartwell, 1953; Renouard et.al., 2011)
	Podofilotoxina	<i>J. chinensis</i> , <i>J. bermudiana</i> , <i>J. communis</i> , <i>J. phoeniceae</i> , <i>J. scopolorum</i> , <i>J. squamata</i> , <i>J. recurva</i> , <i>J. sabina</i> y <i>J. virginiana</i> , <i>J. lucayana</i> , <i>J. scopolorum</i> (Hartwell, 1953; Renouard et.al., 2011)
	Metil éter-β-peltatina A	<i>J. phoenicea</i> (Cairnes et al., 1980)

2.11.4. Terpenos

Los terpenos están formados por unidades de isopreno. En las plantas, algunos presentan funciones como antioxidantes, antimicrobianos, hormonas, alelopatía, entre otros (Pérez-Urria y Ávalos, 2009; Ormeño y Fernández, 2012).

En la tabla 9 se muestra el sesquiterpeno widdrol, tres diterpenoides abietanos y tres diterpenos aislados e identificados en algunas especies de Juníperos, con actividad citotóxica significativa en líneas de cáncer humano.

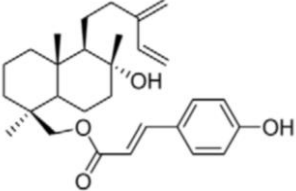
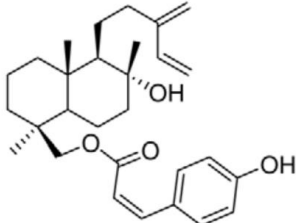
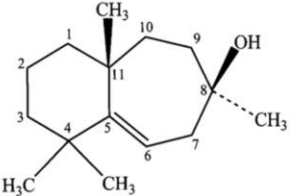
Tabla 9. Terpenos con actividad citotóxica identificados en el género *Juniperus* (Modificado de Barrero et al., 2004; El-Sawi y Montawe, 2008; Moujir et al., 2008, Kwon et al., 2010).

Estructura	Sustituyentes	Nombre	Línea celular: Cl ₅₀	Especies y referencias
	R=OH	Metil 12-oxo-8α,15-dihidroabiet-13-en-19-oate	H-116: 2.5µg/mL PSN1: 5µg/mL T98G: 5µg/mL	<i>J. phoenicea</i> L. (Barrero et al., 2004)
	R=O	Metil 12-oxo-8α-hidroabiet-13-en-19-oate	H-116: 2.5µg/mL	<i>J. phoenicea</i> L. (Barrero et al., 2004)
	R=OOH	Metil abietano	A-549: 5µg/mL H-116: 2.5µg/mL PSN1: 5µg/mL	<i>J. thurifera</i> L. var. <i>africana</i> Maire (Barrero et al., 2004)
		Ácido sandaracopimárico	Hepg2: 7.39µg/mL	<i>J. phoenicea</i> L. (El-Sawi y Montawe, 2008)

Continuación tabla 9....

Estructura	Sustituyentes	Nombre	Línea celular: Cl ₅₀	Especies y referencias
		Ácido Juniperexcésico	Hepg2: 7.49µg/mL	<i>J. phoenicea</i> L. (El-Sawi y Montawe, 2008)
		Ácido 4-epi- abiético	Hepg2: 5.72µg/mL	<i>J. phoenicea</i> L. (El-Sawi y Montawe, 2008)
		4-epi-abietol	Hepg2: 5.52µg/mL	<i>J. phoenicea</i> L. (El-Sawi y Montawe, 2008)
		7α-hidroxitotarol	HeLa: 23.1µg/mL	<i>J. brevifolia</i> (Seub.) Antonine (Moujir et al., 2008)

Continuación tabla 9....

Estructura	Sustituyentes	Nombre	Línea celular: CI ₅₀	Especies y referencias
		E-isómero del 8α-hidroxilabda-13(16),14-dien-19-il cumarato	HeLa: 20.4µg/mL	<i>J. brevifolia</i> (Seub.) Antonine (Moujir et al., 2008)
		Z-isómero del 8α-hidroxilabda-13(16),14-dien-19-il cumarato	HeLa: 6.9µg/mL	<i>J. brevifolia</i> (Seub.) Antonine (Moujir et al., 2008)
		Widdrol	HT29: 14.05.5µg/mL	<i>J. chinensis</i> L. (Kwon et al., 2010)

HT29: Adenocarcinoma de colon humano; HeLa: Carcinoma humano de cérvix; H-116: Carcinoma colorectal humano; PSN1: carcinoma pancreático humano; A549: carcinoma pulmonar humano.

3. JUSTIFICACIÓN

En México y en el mundo se ha incrementado la incidencia de cáncer, dentro de los cuales, el cáncer de mama es la primera causa de muerte en mujeres por neoplasia maligna. La quimioterapia constituye uno de los tratamientos principales, sin embargo, la mortalidad por esta enfermedad continúa incrementando, principalmente por la formación de células resistentes al tratamiento utilizado y al proceso de metástasis, por lo que es importante continuar la búsqueda de nuevos compuestos con propiedades antitumorales.

Diversas especies del género *Juniperus* presentan actividad citotóxica significativa sobre líneas tumorales humanas y en algunas especies se han aislado los compuestos activos. La especie *J. monticola* f. *monticola* Martínez aún no ha sido estudiada. Por ello, el estudio biodirigido en la actividad citotóxica de sus extractos orgánicos sobre líneas de cáncer humano, es una interesante propuesta para la búsqueda de compuestos con actividad citotóxica.

4. HIPÓTESIS

Los extractos orgánicos de *J. monticola* f. *monticola* Martínez presentan actividad citotóxica sobre líneas tumorales humanas y los compuestos responsables de la actividad biológica pueden ser aislados e identificados.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar mediante ensayos *in vitro* la actividad citotóxica de los extractos orgánicos de *J. monticola* f. *monticola* Martínez sobre líneas tumorales humanas, fraccionar los extractos activos y aislar e identificar los compuestos responsables de la actividad citotóxica.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la actividad citotóxica del extracto etanólico, de acetona y de hexano de *J. monticola* sobre líneas tumorales humanas.
- Fraccionar los extractos con actividad citotóxica mediante cromatografía en columna y evaluar la actividad citotóxica de las fracciones obtenidas.
- Aislar a los compuestos citotóxicos o mayoritarios en las fracciones con actividad citotóxica.
- Identificar a los compuestos obtenidos mediante espectroscopía infrarroja, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

7. METODOLOGÍA

7.1. Colecta e identificación taxonómica de *J. monticola f. monticola*

Para obtener la especie vegetal se realizó la revisión de los sitios en que ha sido colectada, para lo cual fue preciso acudir al Herbario Nacional, localizado en el Instituto de Biología, de la Universidad Nacional Autónoma de México. La colecta se realizó como a continuación se describe. Las ramas con hojas y gálbulas de *J. monticola* se colectaron en Febrero de 2014 en el paraje “Valle de los Enamorados” en el Parque Nacional El Chico, en el Estado de Hidalgo, para lo cual se solicitó el permiso de las autoridades correspondientes. Un ejemplar de la especie fué identificado taxonómicamente por el Dr. David S. Gernandt, en el Herbario Nacional de México (MEXU), al cual se le asignó el número de voucher 1340284 y se depositó en esta institución para futuras referencias. En la Figura 7 se muestra el perfil de la vegetación del Valle de los Enamorados, que también fue de utilidad para determinar el sitio de colecta. En la figura 8 se muestra el ejemplar de *J. monticola f. monticola* identificado taxonómicamente.

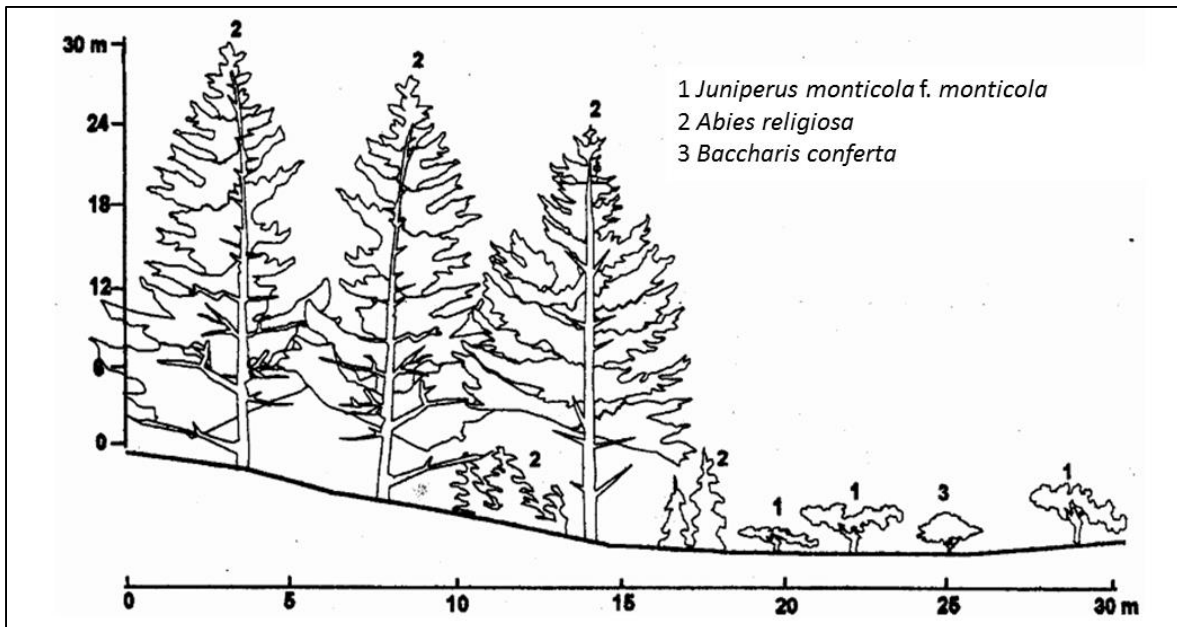


Figura 7. Perfil de la vegetación correspondiente al paraje Valle de los enamorados, en el parque Nacional El Chico, Hidalgo; donde se localiza *J. monticola f. monticola*. Tomado de http://www.chapingo.mx/dicifo/tesislic/2003/Herminio%20Reyes%20Fabian%202003_



Figura 8. Ejemplar de *J. monticola* f. *monticola* Martínez.

7.2. Obtención de extractos

Las ramas de *J. monticola* f. *monticola* fueron limpiadas y secadas bajo sombra durante 21 días. Posteriormente, las gálbulas fueron retiradas. Las ramas con hojas se cortaron en partes pequeñas y 600 g fueron macerados en etanol al 80% por 24 horas. El disolvente y el agua se eliminaron bajo presión reducida en un rotavapor Buchi 210. En este proceso, el etanol se eliminó primero, quedando finalmente el agua. Una pequeña parte de este primer extracto, denominado *extracto hidroetanólico*, se resguardó hasta su uso. Mientras, el resto del extracto se particionó con acetato de etilo (AcOEt), dando como resultado un extracto de la *fase orgánica* y otro de la *fase acuosa*, que se concentraron por separado

mediante destilación al vacío en un rotavapor. De esta manera se obtuvieron tres extractos: el *extracto hidroetanólico*, extracto de *fase orgánica* y extracto de *fase acuosa*.

Posteriormente, 600, 300 y 10g de ramas con hojas de *J. monticola* f. *monticola* se utilizaron para obtener los extractos de *acetona*, *hexano* y *AcOEt* respectivamente. El material vegetal se maceró durante 24 h en cada disolvente, que se eliminó por destilación al vacío en un rotavapor Buchi 210, obteniendo los extractos correspondientes. El rendimiento de los extractos se calculó como (g del extracto/g ramas secas) X 100.

Por separado, 1 mg de cada extracto se disolvió en 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%, acetona al 10% o acetato de etilo al 10%, según la solubilidad de cada extracto. A partir del stock de cada extracto (1mg/mL) se realizaron diluciones seriales hasta obtener las concentraciones finales de: 20, 10, 4 y 2µg/mL. Estas concentraciones se utilizaron en los ensayos de citotoxicidad (SRB) sobre las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231 y en su caso, en la línea no tumorigénica MCF-10A. El porcentaje de crecimiento de cada línea celular posterior al tratamiento con los extractos se muestra en el anexo A.

7.3. Líneas celulares

Las líneas celulares de cáncer de mama humano T47D y MDA-MB-231 fueron generosamente donadas por el Dr. Carlos Pérez Plasencia, del Laboratorio de Genómica Funcional de la Unidad de Investigación en Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. La línea no tumorigénica MCF-10A fue generosamente proporcionada por el Dr. Alejandro Zentella Dehesa, del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Todos los ensayos de actividad biológica se realizaron en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

7.4. Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad de los extractos en las líneas tumorales se realizó de acuerdo al método de la Sulforodamina B (Vichai y Kirtikara, 2006).

Previo a la utilización de los extractos orgánicos de *J. monticola*, se realizó una curva de Concentración-Respuesta utilizando Doxorrubicina (Adriamicina) en concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 μM , con la finalidad de establecer un control positivo utilizándolo en su concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) sobre las líneas celulares T47D, MDA-MB-231 y MCF-10A. El control positivo se utilizó en todos los experimentos realizados.

Como control negativo se utilizaron 10 μL del disolvente en que cada extracto o fracción se disolvió, siendo entonces DMSO al 10% (en el extracto hidroetanólico y los extractos de fase orgánica y la fase acuosa), acetona al 10% (en el extracto de acetona y AcOEt) y acetato de etilo al 10% (en el extracto de hexano), por lo que la concentración final de cada disolvente fue de 0.5%.

Las líneas celulares T47D y MDA-MB-231 se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino previamente inactivado, adicionado con 100 UI/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sulfato de estreptomicina. Se mantuvieron a una temperatura de 37°C , en una atmósfera de CO_2 al 5%. En una placa de 96 pozos se colocaron 190 μL de cada línea celular a una densidad celular de 5×10^3 células/pozo en las dos líneas tumorales. La línea celular MCF-10A se cultivó en medio DMEM-F12 suplementado con 5% de suero fetal bovino previamente inactivado, hidrocortisona, insulina, factor de crecimiento epidérmico, 100 UI/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sulfato de estreptomicina. Las células se mantuvieron a una temperatura de 37°C , en una atmósfera de CO_2 al 5%. En una placa de 96 pozos se colocaron 190 μL de la línea celular MCF-10A a una densidad celular de 6×10^3 células/pozo. La placa se incubó durante 24 horas a 37°C , CO_2 al 5%, después de lo cual se adicionaron 10 μL de los extractos o fracciones y se incubaron por 24 horas en las mismas condiciones. Posteriormente, sin remover el sobrenadante, las células se fijaron con una dilución acuosa de ácido tricloroacético al 10% p/v (100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$) durante 60 min a 4°C . Los sobrenadantes se desecharon, la placa se lavó 4 veces con agua

corriente y se dejó secar. Después, las células fueron tratados con 100 μ L de sulforodamina B al 0.4% durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente fueron lavadas con ácido acético al 1%. El colorante se extrajo con una dilución 10 mM de Tris base pH 10.5 y las absorbancias se determinaron en un lector de placas a una λ de 510 nm. La citotoxicidad se calculó conforme con la ecuación siguiente:

% crecimiento celular :

$$\frac{\text{Media DO}_{\text{muestra}} - \text{Media DO}_{\text{día 0}}}{\text{Media DO}_{\text{control neg}} - \text{Media DO}_{\text{día 0}}} \times 100$$

% inhibición del crecimiento celular :

$$100 - \% \text{ de crecimiento celular}$$

A partir de los valores de % crecimiento celular a diferentes concentraciones, se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀), es decir, aquella que inhibe el 50% del crecimiento celular *in vitro*.

7.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con el Software Prisma 6 (Graph Pad Software, Inc., USA). Los resultados obtenidos son expresados como la media \pm DE de tres experimentos independientes. El valor p fue analizado por ANOVA, para medir la significancia estadística ($p < 0.05$).

7.6. Análisis cromatográfico

Los extractos orgánicos de fase orgánica y acetona se fraccionaron por CC abierta. Se utilizaron columnas de vidrio empacadas con Sílica gel (Sigma-Aldrich) de 70-230 mesh, en una proporción 10:1 con respecto al peso del extracto a fraccionar. Para la adsorción del extracto en la Sílica gel se utilizó una proporción 1:1.

En la CC del extracto de fase orgánica se utilizaron fracciones de 50 mL. En la elución con hexano se colectaron 620 fracciones, posteriormente se incrementó la polaridad utilizando Hex:AcOEt 9:1, colectando 84 fracciones, Hex:AcOEt 8:2 con 150 fracciones, Hex:AcOEt 7:3 con 16 fracciones, Hex:AcOEt 1:1 con 132 fracciones, AcOEt con 511 fracciones y AcOEt:MeOH 9:1 con 102 fracciones, respectivamente.

En la CC del extracto de acetona se utilizaron fracciones de 50 mL. En la elución con hexano se obtuvieron 267 fracciones, se incrementó la polaridad utilizando Hex:AcOEt 8:2 colectando 55 fracciones, Hex:AcOEt 7.5: 2.5 con 47 fracciones, Hex:AcOEt 4:6 con 10 fracciones, Hex:AcOEt 2:8 con 63 fracciones, AcOEt con 14 fracciones, AcOEt:MeOH 6:4 con 20 fracciones y MeOH con 30 fracciones, respectivamente.

Se monitoreó el fraccionamiento en columna por CCF. Se utilizaron placas de aluminio recubiertas de sílica gel (silica gel 60/UV254 Alugram), con indicador de fluorescencia de 5-17 μm . Como revelador se utilizó una dilución de sulfato cérico (Ce_2SO_4) al 1% en ácido sulfúrico (H_2SO_4) y una lámpara de luz UV de 254 y 365 nm (Spectroline, CM-10). Las fracciones con un patrón cromatográfico similar en la CCF fueron reunidas.

7.7. Identificación de los compuestos citotóxicos

En las fracciones 12 y 18 (del extracto de fase orgánica) y en el sólido 5(II) (del extracto acetónico), se procedió a elucidar la estructura del compuesto (citotóxico o en su defecto, el mayoritario). Para ello, se utilizaron las técnicas siguientes:

- Espectroscopía Infrarroja:

Los espectros de Infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro IR Brucker Tensor 27, en pastilla de bromuro de potasio (KBr). Las absorbancias se presentan en cm^{-1} .

- Resonancia magnética nuclear (RMN):

Para los espectros de Resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN) y de Carbono 13 (^{13}C RMN) se utilizó el espectrofotómetro Bruker Avance (300 MHz). Se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm). Las señales protónicas se indican con las siguientes abreviaturas: (s) singulete, (d) doblete, (t) triplete, (q) cuádruple y (m) multiplete. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertz. Experimentos de RMN adicionales incluyen DEPT, COSY, HMBC y HSQC.

- Espectrometría de masas (EM):

Los espectros de masas se obtuvieron mediante la técnica de impacto electrónico, con el equipo JeolAX505HA. Los resultados se presentan como relación de masa respecto de la carga (m/z).

8. RESULTADOS

8.1. Ensayo de citotoxicidad: Método de la Sulforodamina B

8.1.1. CI_{50} de la doxorrubicina en las líneas celulares

Tabla 10. CI_{50} de la Doxorrubicina en las líneas celulares T47D, MDA-MB-231 y MCF-10A.

Línea celular	CI_{50} (μM)	CI_{50} ($\mu g/mL$)
T47D	1.18	0.68
MDA-MB-231	0.79	0.46
MCF-10A	4.5	2.61

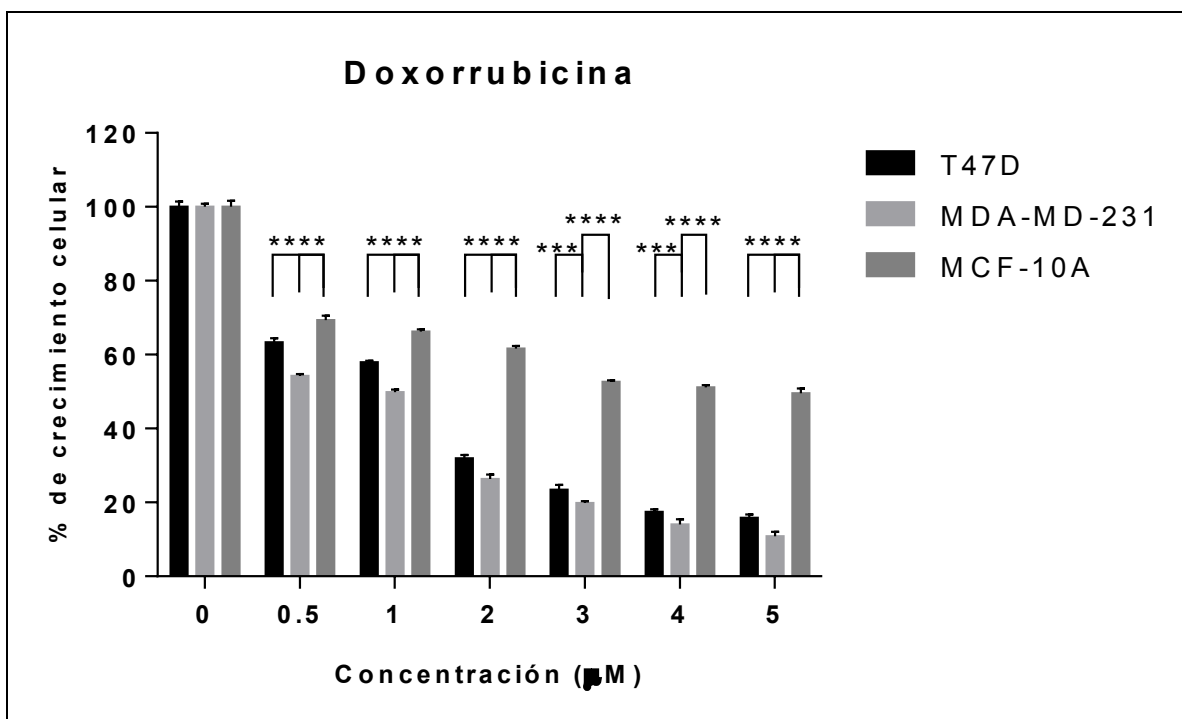


Figura 9. Porcentaje del crecimiento celular de las líneas celulares T47D, MDA-MB-231 y MCF-10A después del tratamiento con doxorrubicina.

En el tratamiento de las líneas celulares con la doxorubicina (figura 9) se observan diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento de las tres líneas celulares. El crecimiento de las líneas celulares es dosis dependiente (anexo A), ya que a medida que se incrementa la concentración de doxorubicina, el crecimiento celular disminuye. Esto concuerda con Chuang et al., (2013) y Eatemadi et al. (2015). En todas las concentraciones de doxorubicina, la línea celular MDA-MB-231 es la más sensible, posteriormente la T47D y luego la MCF-10A.

8.1.2. Evaluación de los extractos orgánicos

8.1.2.1. Extracto etanólico (80%)

8.1.2.1.1. Rendimiento

El rendimiento de los extractos hidroetanólico, fase acuosa y fase orgánica de *J. monticola* f. *monticola* se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 11. Rendimiento de 600 g de material vegetal de *J. monticola*.

Especie vegetal	Extracto	Peso (g)	Rendimiento (%)
	Extracto hidroetanólico	0.27	0.045
<i>J. monticola</i>	Fase acuosa	20.29	3.38
	Fase orgánica	6.35	1.05

El rendimiento obtenido del extracto etanólico (80%), que es la suma del extracto hidroetanólico, la fase orgánica y la fase acuosa fue de 4.47%. Por su parte, Orhan y colaboradores (2011) encontraron que los rendimientos de los extractos etanólicos de hojas de *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *J. communis* subsp. *nana*,

J. sabina, *J. foetidissima* y *J. excelsa* fueron de 35.2%, 29.1%, 27.6%, 32.5% y 33.6%, respectivamente.

8.1.2.1.2. Evaluación de la actividad citotóxica

Tabla 12. CI_{50} del extracto hidroetanólico, fase orgánica y fase acuosa de *J. monticola* en las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231.

Especie vegetal	Extracto/ Fase	CI_{50}	
		T47D	MDA-MB-231
<i>J. monticola</i>	Extracto hidroetanólico	>100 $\mu\text{g/mL}$	>100 $\mu\text{g/mL}$
	Fase acuosa	>100 $\mu\text{g/mL}$	>100 $\mu\text{g/mL}$
	Fase orgánica	20 $\mu\text{g/mL}$	12.89 $\mu\text{g/mL}$

En negritas se muestra las CI_{50} de las fracciones consideradas activas.

En la tabla 12 se muestra la CI_{50} del extracto hidroetanólico, la fase acuosa y la fase orgánica en las dos líneas tumorales humanas. La CI_{50} del extracto de fase orgánica es de 20 y 12.89 $\mu\text{g/mL}$ en las líneas celulares T47D y MDA-MB-231, respectivamente. De acuerdo a los protocolos establecidos por el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos en la bioprospección de plantas con actividad citotóxica, un extracto se considera activo cuando presentan una $CI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ (Alonso-Castro et al., 2011), por lo que el extracto de fase orgánica es activo y los extractos hidroetanólico y de la fase acuosa no se consideran activos.

En las figuras 10 y 11 se muestra el porcentaje de crecimiento de cada línea tumoral después de 24h del tratamiento con cada extracto. El extracto de fase orgánica resulta el de mayor citotoxicidad, desde la concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$, a diferencia del extracto hidroetanólico y del extracto de la fase acuosa. Por lo anterior, se procedió a fraccionar el extracto de fase orgánica mediante

cromatografía en columna abierta, para posteriormente aislar en las fracciones a los compuestos con actividad citotóxica.

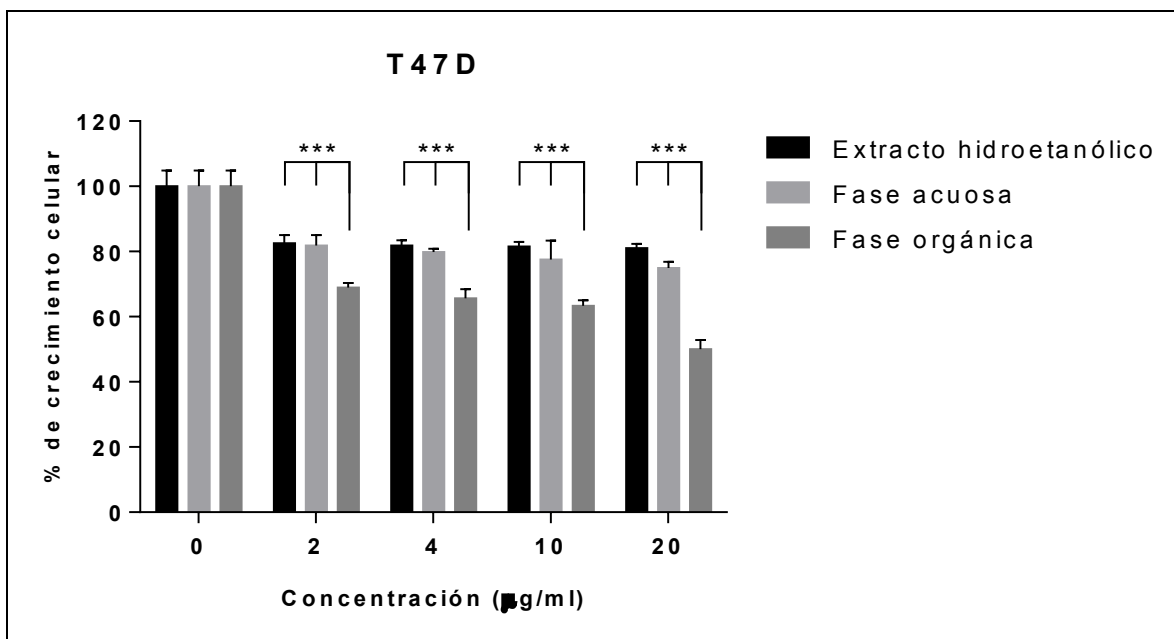


Figura 10. Porcentaje de crecimiento celular de la línea tumoral T47D después de ser tratada con los extractos hidroetanólico, fase acuosa y fase orgánica de *J. monticola*.

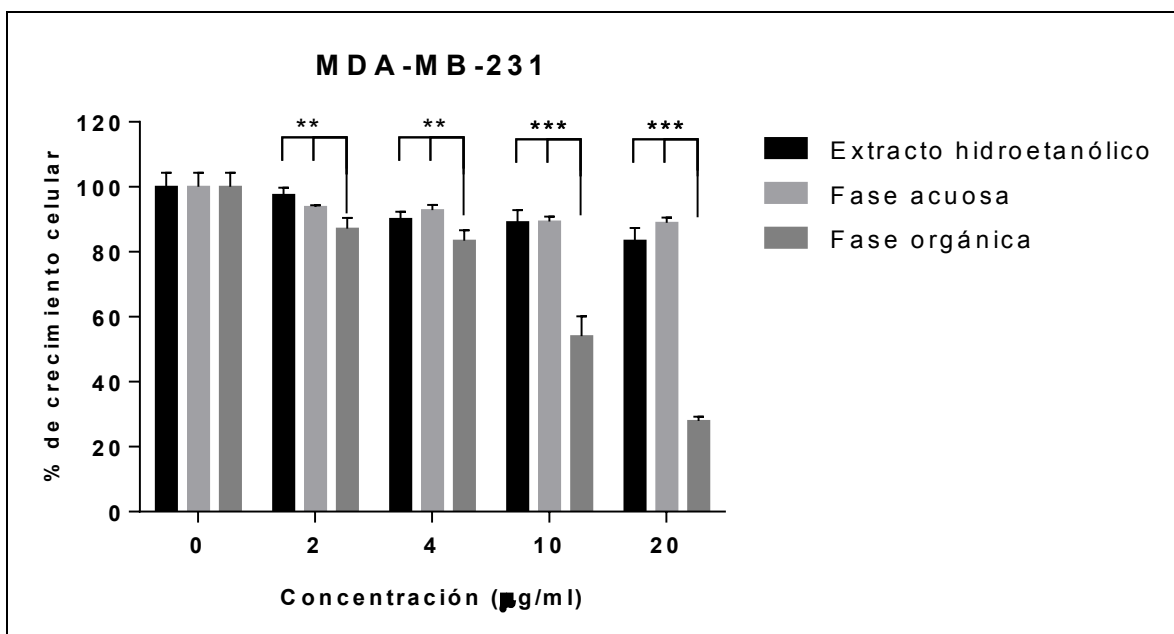


Figura 11. Porcentaje de crecimiento celular de la línea tumoral MDA-MB-231 después de ser tratada con los extractos hidroetanólico, fase acuosa y fase orgánica de *J. monticola*.

8.1.2.1.3. Fraccionamiento por CC abierta del extracto de fase orgánica de *J. monticola*

Para el fraccionamiento de fase orgánica de *J. monticola* f. *monticola* se utilizaron 3.7g de extracto.

Las fracciones obtenidas en la cromatografía en columna abierta fueron monitoreadas mediante CCF (figura 12).

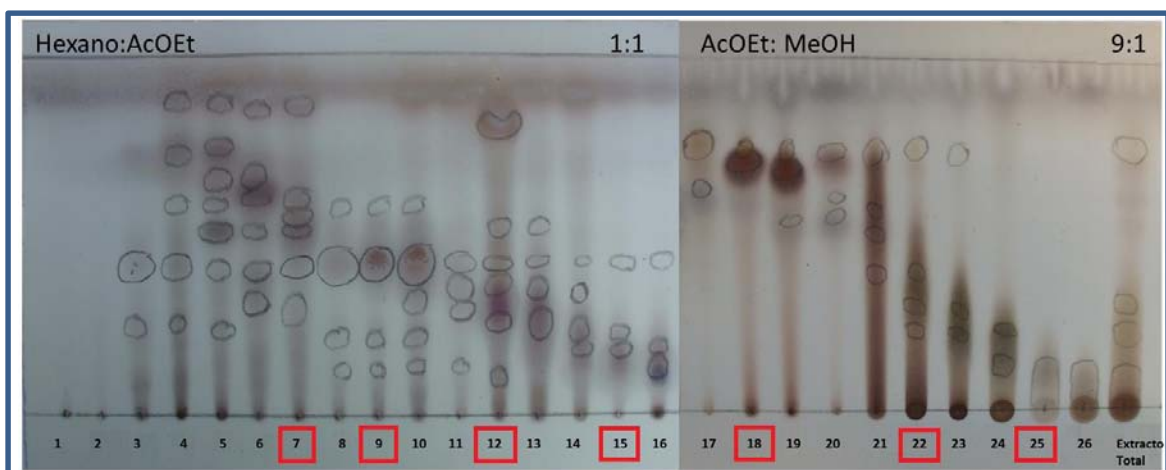


Figura 12. CCF de las fracciones obtenidas de la fase orgánica de *J. monticola* por CC. Extracto total: fase orgánica total. Los recuadros en rojo señalan a las fracciones seleccionadas para la evaluación de la actividad citotóxica. Los círculos marcados son componentes observados bajo la luz UV. El sistema de elución se muestra en la parte superior de la placa.

En la figura 12 se observan diversos componentes en cada una de las fracciones obtenidas de la fase orgánica, por lo que son mezclas complejas. A continuación se muestra el rendimiento obtenido de la cromatografía en columna:

Tabla 13. Rendimiento de las fracciones del extracto de fase orgánica de *J. monticola*.

Sistema de elución con que se obtuvo cada fracción	Fracción	Peso (g)
Hexano	1	0.0028
Hexano	2	0.0017
Hexano	3	0.0035
Hexano	4	0.0093
Hexano	5	0.0199
Hexano	6	0.0328
Hexano	7	0.0301
Hexano	8	0.0063
Hexano	9	0.0104
Hexano	10	0.0303
Hexano:AcOEt 9:1	11	0.0421
Hexano:AcOEt 8:2	12	0.0563
Hexano:AcOEt 8:2	13	0.0474
Hexano:AcOEt 7:3	14	0.0101
Hexano:AcOEt 1:1	15	0.0365
Hexano:AcOEt 1:1	16	0.069
Hexano:AcOEt 1:1	17	0.0146
Hexano:AcOEt 1:1	18	0.0907
Hexano:AcOEt 1:1	19	0.1066
Hexano:AcOEt 1:1	20	0.0216
AcOEt	21	0.4688
AcOEt	22	0.462
AcOEt	23	0.5475
AcOEt	24	0.1663
AcOEt	25	0.0436
AcOEt:MeOH 9:1 y MeOH	26	0.1274
	Peso (g)	2.4576
	Rendimiento	66.42%

En negritas se muestra el rendimiento de las fracciones representativas, que fueron utilizadas para evaluar su actividad citotóxica.

El rendimiento obtenido de la columna cromatográfica fue de 66.42% (tabla 13). Es normal no recuperar el 100% de la cantidad de extracto que se introduce en la columna cromatográfica, ya que parte de este queda retenido en la sílica. La retención de los compuestos bajo las condiciones de cromatografía en fase normal

se debe a las interacciones entre los grupos funcionales polares del analito y los grupos polares de la sílica (siloxanos y silanoles), por lo que las moléculas de polaridad alta son adsorbidas en este material. Las interacciones que ocurren pueden ser: puentes de H, interacciones dipolo-dipolo e interacciones dipolo-dipolo inducido (Buszewsky y Noga, 2012).

Para finalizar la elución de la columna cromatográfica se utilizó metanol (100%) y aún así se tuvo una pérdida mayor al 30%.

8.1.2.1.4. Evaluación de la actividad citotoxicidad de las fracciones del extracto de fase orgánica de *J. monticola*

A continuación se muestran la CI_{50} de las fracciones evaluadas sobre las líneas tumorales humanas (tabla 14).

Tabla 14. CI_{50} de las fracciones seleccionadas en la CC de la fase orgánica de *J. monticola* sobre las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231.

Especie vegetal	Fracción Evaluada	CI_{50}	
		T47D	MDA-MB-231
<i>J. monticola</i>	7	>100 $\mu\text{g/mL}$	>100 $\mu\text{g/mL}$
	9	21.3 $\mu\text{g/mL}$	>100 $\mu\text{g/mL}$
	12	4.1 $\mu\text{g/mL}$	0.92 $\mu\text{g/mL}$
	15	12.58 $\mu\text{g/mL}$	1.55 $\mu\text{g/mL}$
	18	>100 $\mu\text{g/mL}$	>100 $\mu\text{g/mL}$
	22	>100 $\mu\text{g/mL}$	>100 $\mu\text{g/mL}$
	25	>100 $\mu\text{g/mL}$	>100 $\mu\text{g/mL}$

En negritas se muestra las CI_{50} de las fracciones consideradas activas.

En la tabla 14 se observa que las fracciones 12 y 15 son las de mayor actividad citotóxica (con una CI_{50} menor a $30\mu\text{g/mL}$) en las dos líneas tumorales. Por otro lado, la fracción 9 solo tuvo actividad en la línea T47D, con una CI_{50} de $21.3\mu\text{g/mL}$, pero necesita más de $100\mu\text{g/mL}$ para la CI_{50} en la línea MDA-MB-231. Mientras que las fracciones 7, 18, 22 y 25 no presentan una actividad citotóxica significativa.

En las figuras 13 y 14 se muestra el porcentaje de crecimiento de cada línea tumoral después de 24h del tratamiento con cada fracción seleccionada.

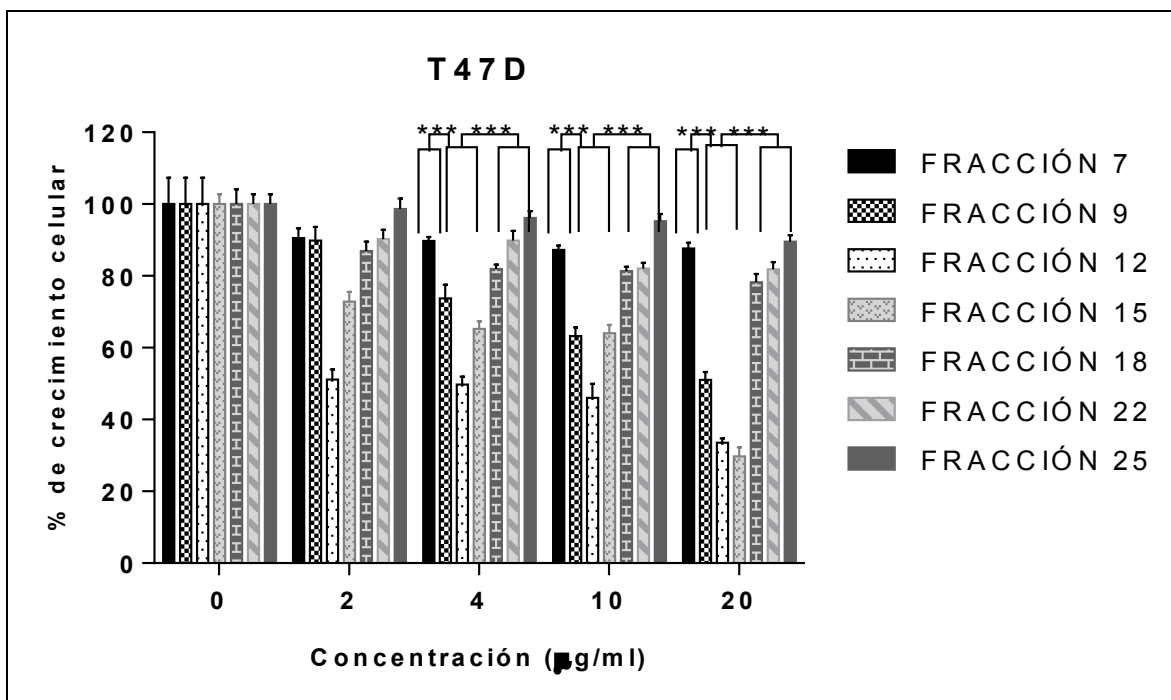


Figura 13. Porcentaje de crecimiento celular de la línea tumoral T47D después de ser tratadas con seis fracciones obtenidas por cromatografía en columna de la fase orgánica de *J. monticola*.

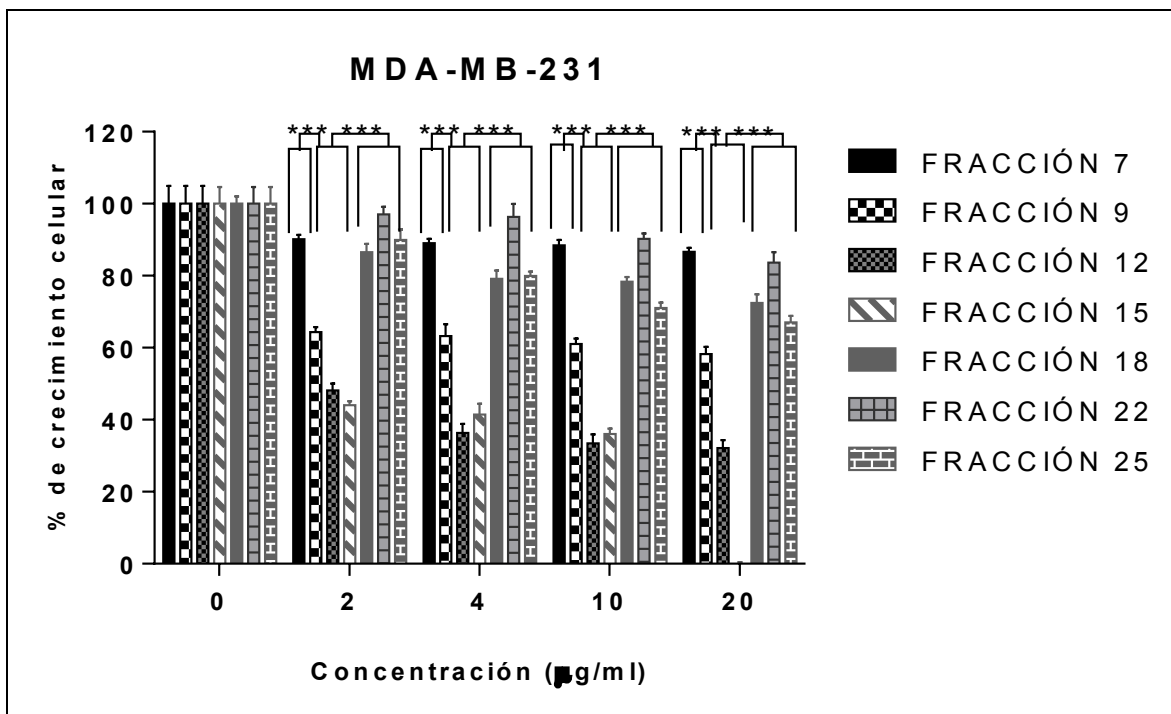


Figura 14. Porcentaje de crecimiento celular de la línea tumoral MDA-MB-231 después de ser tratadas con seis fracciones obtenidas por cromatografía en columna de la fase orgánica de *J. monticola*.

8.1.2.1.5. CCF con reveladores específicos

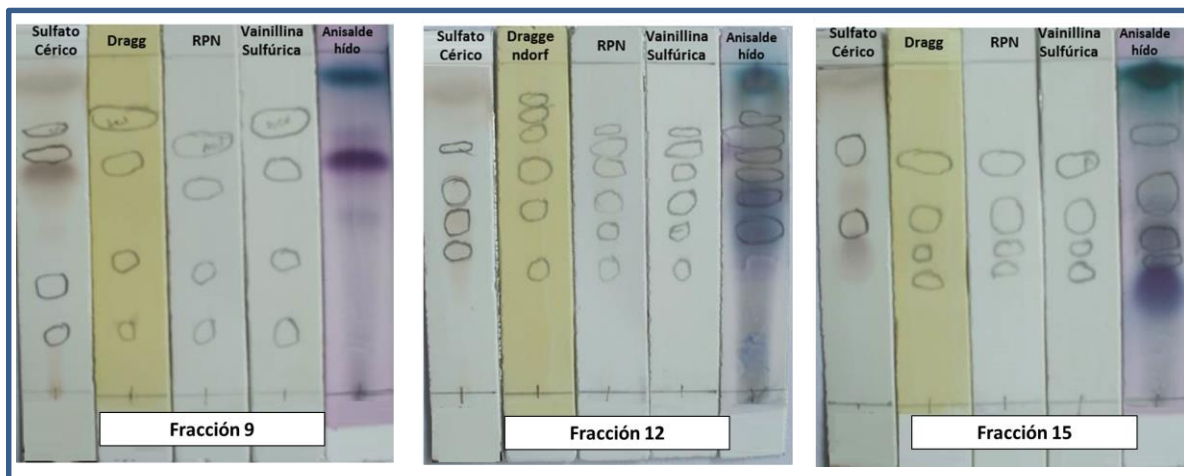


Figura 15. CCF de las fracciones con mayor actividad citotóxica utilizando reveladores específicos. Sulfato cérico; Dragg: Reactivo de Draggendorf; RPN: Revelador de Productos Naturales; Vainillina sulfúrica y p-anisaldehído. Los círculos muestran componentes observados en la luz UV. El sistema de elución en las tres fracciones fue Hex:AcOEt 3:6.

Las fracciones 9, 12 y 15 tuvieron una actividad citotóxica significativa (tabla 14), pero el rendimiento obtenido fue muy bajo. Con el propósito de conocer los tipos de compuestos químicos presentes en estas, se procedió a revelar las placas utilizando reveladores generales y específicos, por lo que se utilizó Sulfato cérico (revelador general), reactivo de Draggendorf (alcaloides), revelador de Productos Naturales (RPN) (flavonoides), Vainillina Sulfúrica (fenoles, triterpenos, esteroides, alcoholes) y p-anisaldehído (terpenos, esteroides) (figura 15).

8.1.2.1.6. Compuesto en la fracción 12

Debido a que la fracción 12 presentó actividad citotóxica, se realizaron los espectros de IR, ^1H RMN, ^{13}C RMN y EM. De acuerdo al análisis y estudio de los espectros obtenidos (anexo C), podemos indicar que presenta un éster hidrocarbonado de cadena larga.

8.1.2.1.7. Compuesto mayoritario en la fracción 18

Se realizaron tres cromatografías en columna del extracto de la fase orgánica de *J. monticola* f. *monticola* (Figura 12 y anexo B) y en las tres se observó la presencia de un mismo compuesto, por lo que surgió el interés en identificarlo. En la figura 12, dicho compuesto se encuentra en la fracción 18 y se observa como una mancha color rojo al revelar la placa fina con sulfato cérico, con un $R_f=0.875$ en un sistema de elución AcOEt:MeOH 9:1.

En la tabla 15 se describen los datos de IR, ^1H RMN, ^{13}C RMN y EM de la fracción 18. Con base al análisis de los espectros de IR, ^1H RMN, ^{13}C RMN, DEPT, COSY, HSQC, HMBC y EM (anexo D). En la figura 16 y 17 se propone la estructura química de este compuesto (**1**).

En la figura 18 se representan los fragmentos prioritarios del espectro de masas y que apoyan a la estructura propuesta para el compuesto **1**.

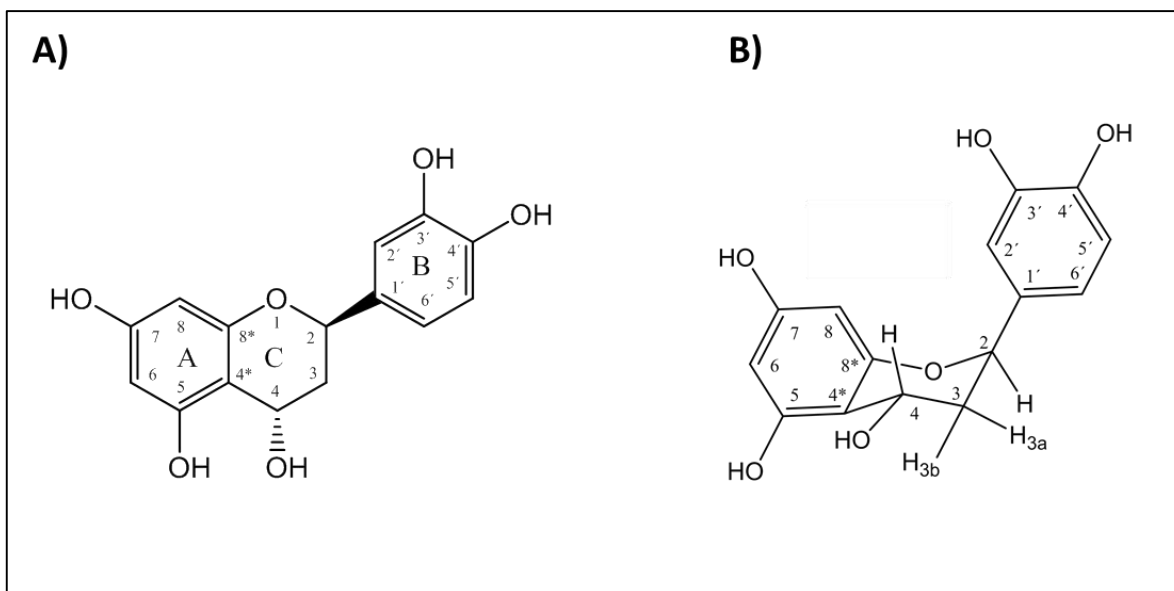


Figura 16. Estructura del compuesto **1**. A) anillo C en estructura plana, B) anillo C en estructura en silla.

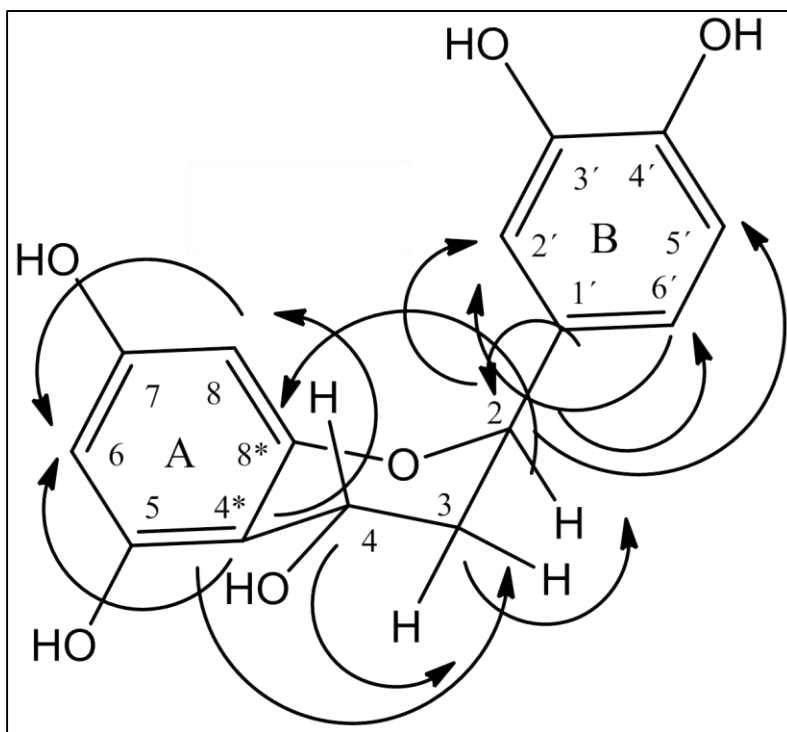


Figura 17. Correlaciones HMBC y HSQC en el compuesto 1.

Tabla 15. Datos de RMN, EM e IR del la elucidación del compuesto 1.

RMN (300 MHz) MeOD			IRMJE/DBP-Jm-2
No.	¹ H	¹³ C	ν máx, (KBr, Pastilla)
2	4.56,1H,d, J=7.5	82.83 (CH)	3231, 2929, 1605, 1518cm ⁻¹
3	2.84,2H,td,J=5.4,J=16,J=8.0	28.49 (CH ₂)	
4	3.96,1H,td,J=5.4,J=16	68.80 (CH)	
5		157.55 (C)	EM, EI⁺
6	5.92,1H,d,J=2.1	96.31 (CH)	C ₁₅ H ₁₄ O ₆ , M ⁺ =290
7		157.88 (C)	m/z 272 (M ⁺ -18) (30)
8	5.84,1H,d,J=2.1	95.52 (CH)	m/z 152 (60)
4*		100.84*(C)	m/z 139 (100)
8*		156.90*(C)	m/z 123 (62)
1'		132.22 (C)	
2'	6.82,d,1H,J=1.8	115.26 (CH)	EM DAP
3'		146.23 (C)	M+ 291 (M+1)
4'		146.20 (C)	m/z 139
5'	6.76,1H,d,J=6.9	116.09 (CH)	
6'	6.70,1H,dd,J=1.8J=6.9	120.04 (CH)	

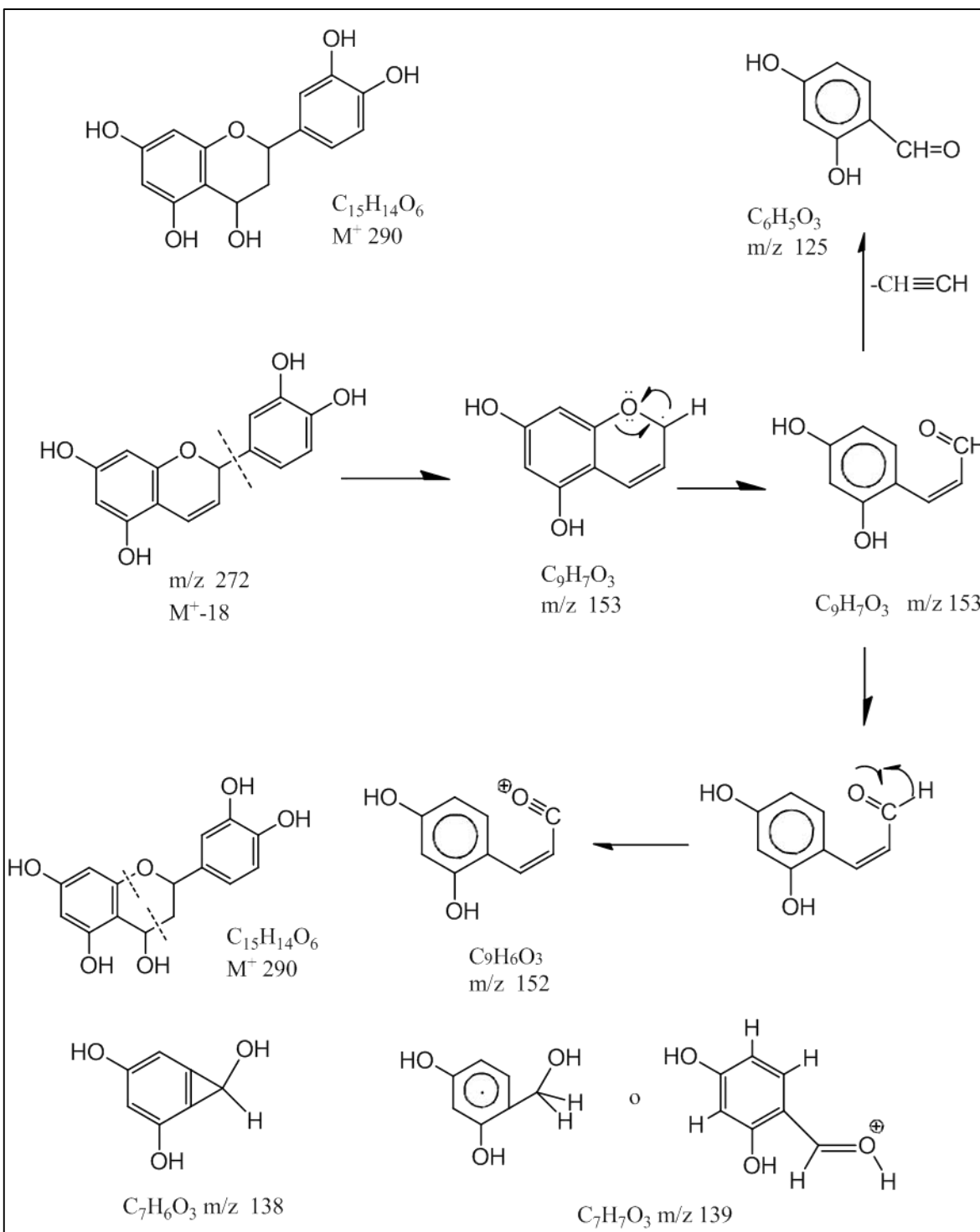


Figura 18. Fragmentación del compuesto 1 por EM (Impacto electrónico y DAP).

Con base a los espectros espectroscópicos y espectrométrico analizados, el compuesto **1** es un esteroisómero configuracional del Luteoforol y del epiluteoforol (Figura 19), ya que comparten la misma fórmula molecular y misma secuencia de átomos, pero difieren de la orientación tridimensional de sus átomos en el espacio, principalmente en el C-2 del anillo C.

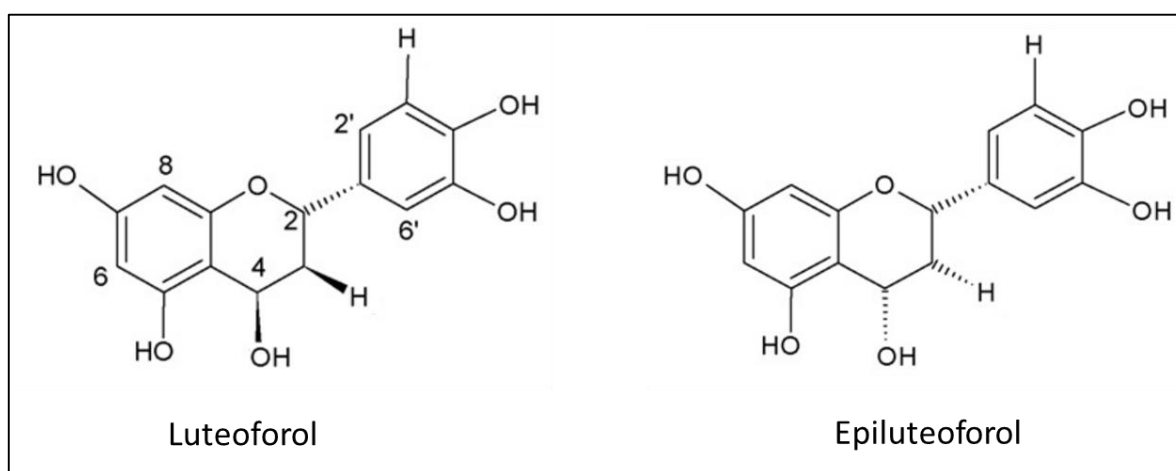


Figura 19. Estructuras del Luteoforol y Epiluteoforol (modificado de De Souza et al., 2008).

8.1.2.2. Extracto de acetona

8.1.2.2.1. Rendimiento

En la tabla 16 se muestra el rendimiento obtenido del extracto de acetona.

Tabla 16. Rendimiento de 600g de material vegetal de *J. monticola*

Especie vegetal	Extracto	Peso (g)	Rendimiento (%)
<i>J. monticola</i>	Acetona	42.6	7.1

8.1.2.2. Evaluación de la actividad citotóxica

A continuación se muestra la CI_{50} del extracto de acetona sobre las líneas tumorales humanas.

Tabla 17. CI_{50} del extracto de acetona de *J. monticola* en las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231.

CI_{50}			
Especie vegetal	Extracto	T47D	MDA-MB-231
<i>J. monticola</i>	Acetona	19.26 $\mu\text{g/mL}$	9.53 $\mu\text{g/mL}$

En negritas se muestra las CI_{50} de las fracciones consideradas activas.

En la figura 20 se muestra el porcentaje de crecimiento de las líneas tumorales después de 24h del tratamiento con el extracto de acetona.

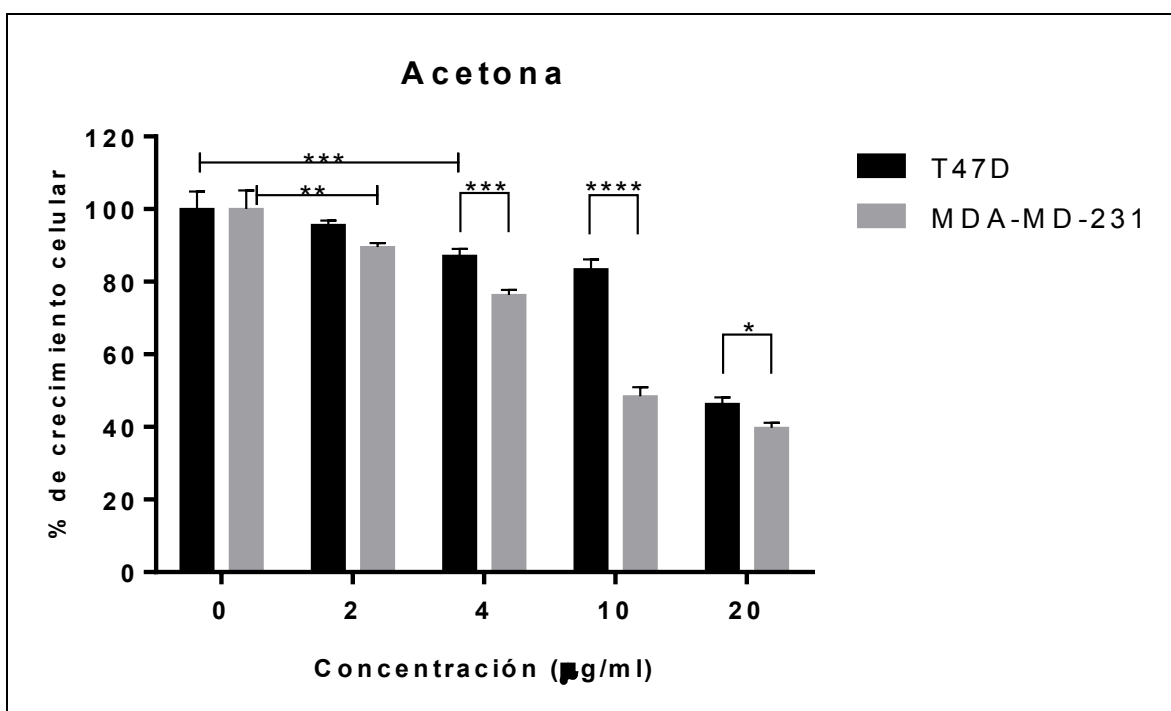


Figura 20. Porcentaje de crecimiento celular de las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231 después de ser tratadas con el extracto de acetona de *J. monticola*.

Como se observa en la tabla 17, el extracto de acetona presenta actividad citotóxica en las líneas T47D y MDA-MB-231, con una CI_{50} de 19.26 y 9.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Mientras, en la figura 20 se observan diferencias significativas en el crecimiento de la línea celular T47D (desde 4 hasta la de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y en la línea MDA-MB-231 (desde 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) respecto del control negativo (concentración 0). Se observa que la línea tumoral MDA-MB-231 es más sensible al extracto de acetona, que la línea tumoral T47D, lo cual también ocurrió con el extracto de fase orgánica.

8.1.2.2.3. Fraccionamiento por CC abierta del extracto de acetona de *J. monticola*

Debido a la actividad citotóxica significativa del extracto de acetona en las líneas tumorales, se procedió a realizar la separación de 10g este extracto por cromatografía en columna, obteniéndose las fracciones siguientes:

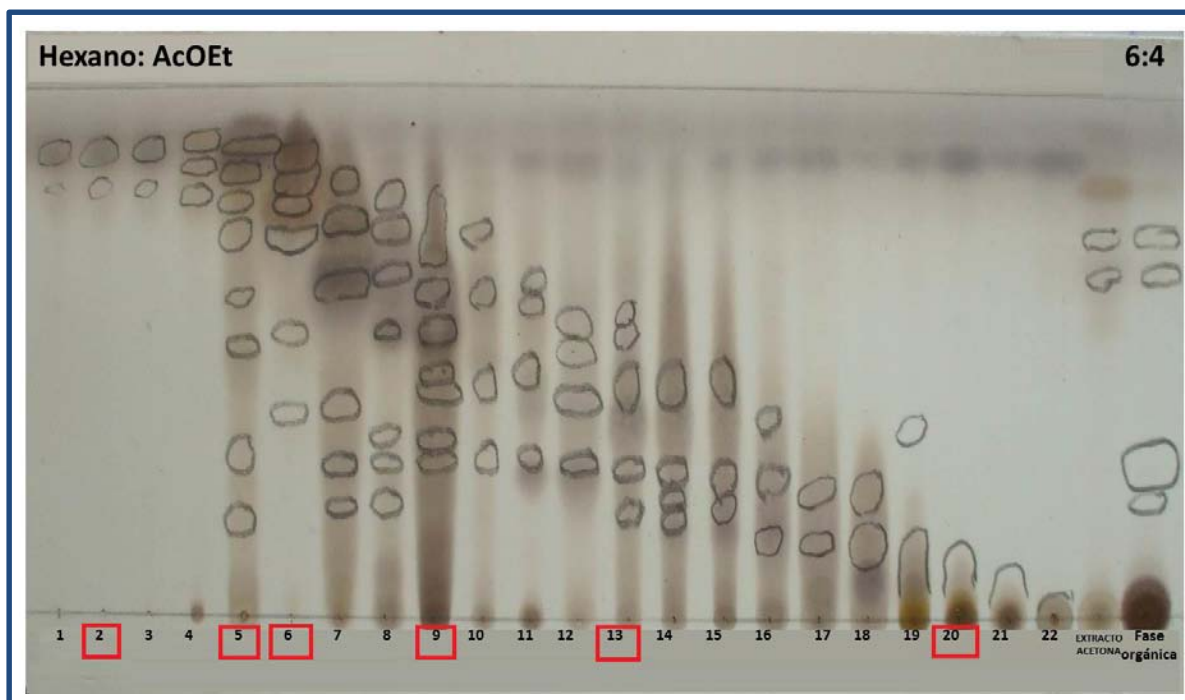


Figura 21. CCF del fraccionamiento del extracto de acetona de *J. monticola* por CC. A la derecha se incluye el extracto total de acetona y el extracto de la fase orgánica. Las fracciones en recuadro rojo fueron seleccionadas para el ensayo de citotoxicidad. Los círculos marcados muestran componentes observados en la luz UV.

En la figura 21, al igual que con lo observado en la CC de la fase orgánica, se observa una gran cantidad de componentes en cada una de las fracciones obtenidas. Además, con el sistema hex:AcOEt 6:4 eluyen la mayoría de los compuestos del extracto de acetona, mientras que aproximadamente solo 6 componentes del extracto de fase orgánica eluyen con esta polaridad y la mayoría de los componentes se encuentran en el punto de aplicación. En la tabla 18 se muestra el rendimiento de las fracciones obtenidas por CC del extracto de acetona.

Tabla 18. Rendimiento de la CC del extracto de acetona.

Sistema de elución con que se obtuvieron	Fracciones		No. de sólidos obtenidos	Sólidos homogéneos obtenidos			Solubilidad
	Fracción	Peso (g)		Características	Punto de fusión	Peso (g)	
Hexano	1	0.0047	I	Blanco, granulado	45-47°C	0.0047	Diclorometano/ Hexano
Hexano	2	0.0553	I	Película blanca	63-64°C	0.0028	Diclorometano/ Hexano
			II	Película blanca/amarilla	48°C	0.008	Diclorometano/ Hexano
Hexano	3	0.0173	S/ Sólidos obtenidos				
Hexano	4	0.0244	I	blanco, poroso	70-72°C	0.0095	Diclorometano/ Hexano
Hexano	5	0.0708	I	Blanco	45-47°C	0.0348	Diclorometano/ Hexano
			II	Blanco, poroso	45°C	0.1561	Diclorometano y Hexano
Hexano	6	1.0997	I	Blanco	71-72°C	0.0075	Diclorometano/ Hexano
			II	blanco, granulado	74-75°C	0.0432	poco en Diclorometano
Hexano	7	0.7174	I	blanco, poroso	60°C	0.0145	Diclorometano
Hexano	8	0.0369	I	blanco/amarillo	45-48°C	0.0068	Diclorometano
Hexano	9	0.1354	S/ Sólidos obtenidos				
Hexano	10	0.3151	S/ Sólidos obtenidos				
Hexano	11	0.3832	S/ Sólidos obtenidos				
Hexano	12	0.0861	I	Blanco/amarillo	62-63°C	0.0024	Hexano
Hex:AcOEt 8:2	13	0.1573	I	Blanco/amarillo	54-55°C	0.003	Diclorometano
Hex: AcOEt 8:2	14	0.1189	I	Blanco/amarillo	72-76°C	0.0082	Diclorometano
Hex: AcOEt 7.5:2.5	15	0.2256	Sin Sólidos obtenidos				
Hex: AcOEt 7.5:2.5	16	0.0864	Sin Sólidos obtenidos				
Hex: AcOEt 7.5:2.5	17	0.1186	Sin Sólidos obtenidos				
Hex: AcOEt 4:6	18	0.2455	Sin Sólidos obtenidos				
Hex: AcOEt 4:6 y 2:8	19	0.4341	Sin Sólidos obtenidos				
Hex: AcOEt 2:8 y AcOEt	20	0.2253	Sin Sólidos obtenidos				
AcOEt y AcOEt:MeOH 8:2	21	0.9121	Sin Sólidos obtenidos				
AcOEt:MeOH 6:4 y MeOH	22	0.1526	Sin Sólidos obtenidos				
	g obtenidos fracciones	6.2544	g obtenidos sólidos homogéneos				0.3015

RENDIMIENTO TOTAL=65.55 %

A todas las fracciones del extracto de acetona se les realizó la técnica de cristalización y en algunas de estas se formaron sólidos homogéneos. En el caso de las fracciones 2,5 y 6, los sólidos que se formaron fueron separados por filtración, y al nuevamente evaporarse el disolvente se formó otro sólido, por lo cual en estas fracciones se mencionan a los sólidos I y II. En la tabla 18 se muestran el número de sólidos obtenidos en cada fracción, sus características, punto de fusión y solubilidad en disolventes.

De los 16 sólidos obtenidos, debido a su naturaleza apolar, solo el sólido 5(II) fue evaluado en el ensayo de citotoxicidad. La estructura química del sólido 5(II) se elucidó por Resonancia Magnética Nuclear, Espectrometría de Masas e Infrarrojo (anexo E), cuyo análisis de espectros muestran que es un éster hidrocarbonado de cadena larga (aproximadamente 33 carbonos). En la literatura no se han reportado compuestos de este tipo con actividad citotóxica.

El sólido 5 (II) junto con las fracciones 2, 5, 6, 9, 13 y 20 fueron evaluados en el ensayo de citotoxicidad (tabla 19).

Tabla 19. CI_{50} de las fracciones obtenidas por CC del extracto de acetona de *J. monticola* en las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231.

Especie vegetal	Fracción	CI_{50}	
		T47D	MDA-MB-231
<i>J. monticola</i>	2	37.5 $\mu\text{g/mL}$	47 $\mu\text{g/mL}$
	5	78 $\mu\text{g/mL}$	49.6 $\mu\text{g/mL}$
	Sólido 5(II)	>100 $\mu\text{g/mL}$	>100 $\mu\text{g/mL}$
	6	25.2 $\mu\text{g/mL}$	54.9 $\mu\text{g/mL}$
	9	89 $\mu\text{g/mL}$	>100 $\mu\text{g/mL}$
	13	39.45 $\mu\text{g/mL}$	>100 $\mu\text{g/mL}$
	20	>100 $\mu\text{g/mL}$	68.4 $\mu\text{g/mL}$

En negritas se muestra la CI_{50} de la fracción considerada activa.

Sólo la fracción 6 presentó actividad citotóxica (CI_{50} de $25.2\mu\text{g/mL}$) en la línea celular T47D, pero la misma fracción no tuvo efecto en la línea MDA-MB-231. Por otra parte, el sólido 5(II) no presentó actividad citotóxica en las líneas tumorales, ya que requiere más de $100\mu\text{g/mL}$ para la CI_{50} .

En la figura 22 y 23 se muestra el crecimiento celular de las líneas T47D y MDA-MB-231 frente al tratamiento con las fracciones y el sólido 5(II) del extracto de acetona. Se observa que sólo la fracción 6 tuvo actividad citotóxica (solo en la línea T47D), mientras que las fracciones restantes no, a pesar de que fueron seleccionadas por ser representativas y constituyen casi la tercera parte del total de fracciones.

Puesto que la fracción 6 tuvo actividad citotóxica en la línea T47D y un rendimiento de 1.0997g , se propone que esta fracción sea separada mediante HPLC, que sería la técnica más apropiada.

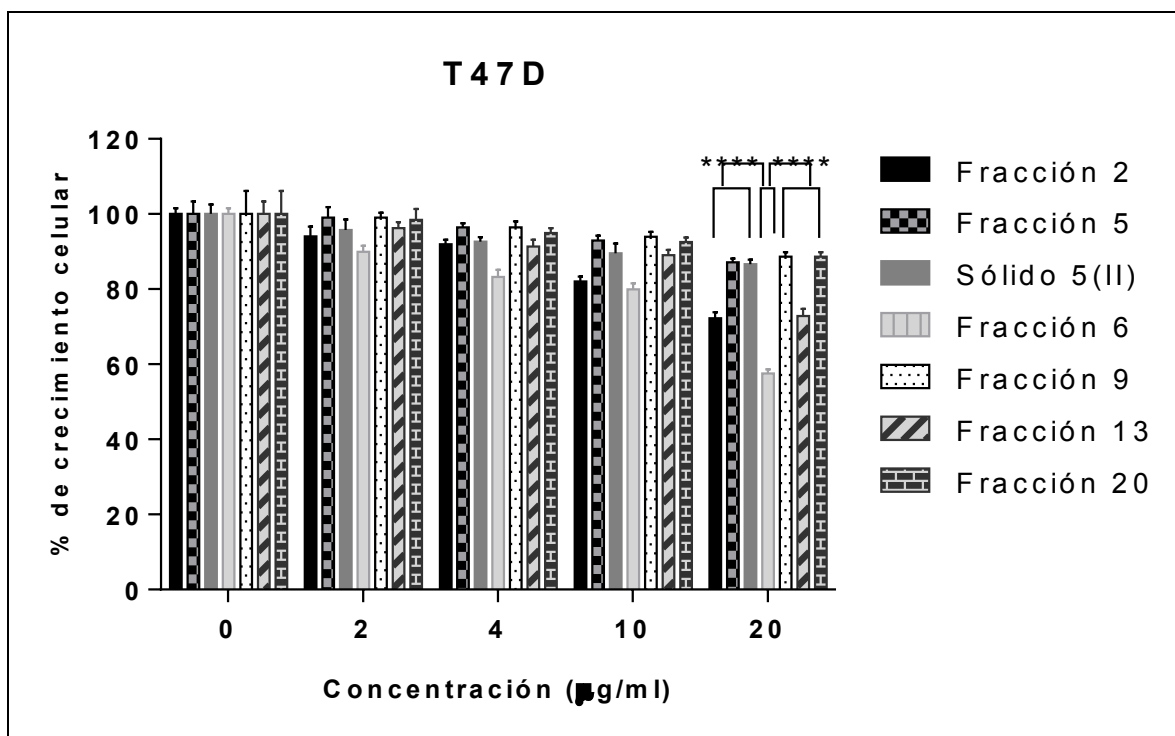


Figura 22. Porcentaje de crecimiento celular de la línea tumoral T47D después de ser tratada con las fracciones del extracto de acetona y el sólido 5 (II) de *J. monticola*.

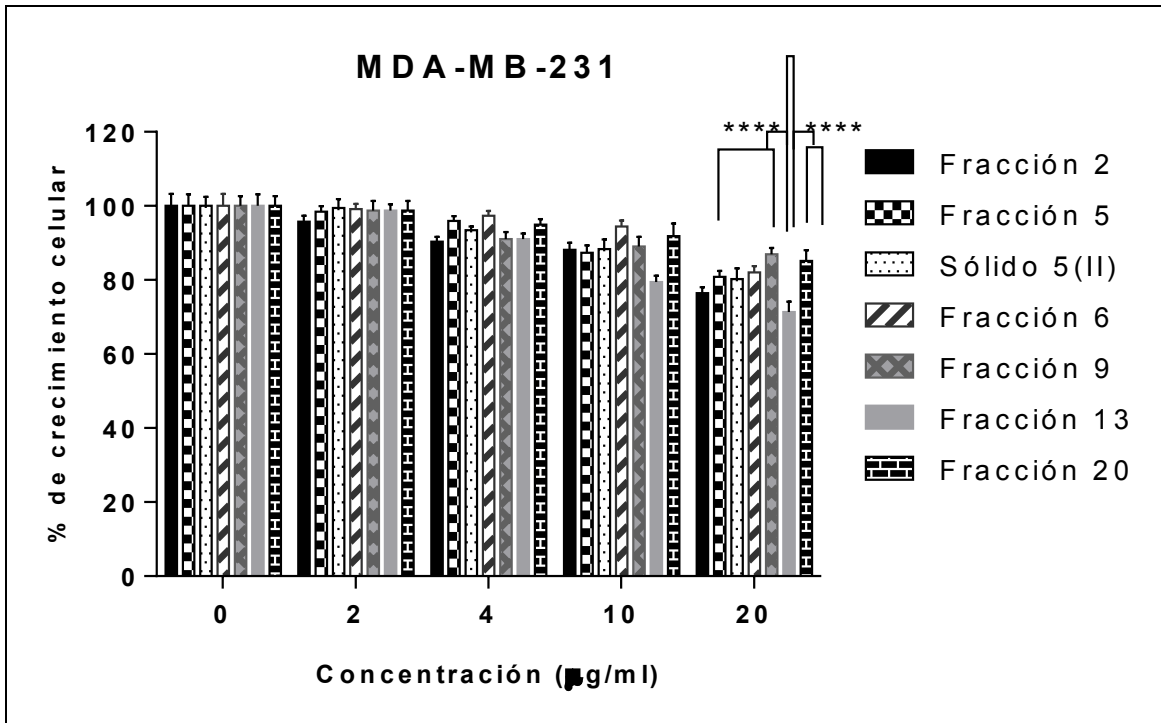


Figura 23. Porcentaje de crecimiento celular de la línea tumoral MDA-MB-231 después de ser tratada con las fracciones del extracto de acetona y el sólido 5 (II) de *J. monticola*.

8.1.2.3. Extracto de hexano

8.1.2.3.1. Rendimiento

El rendimiento obtenido en el extracto de hexano se muestra en la tabla 20.

Tabla 20. Rendimiento de 300 g de material vegetal de *J. monticola*.

Especie vegetal	Extracto	Peso (g)	Rendimiento (%)
<i>J. monticola</i>	Extracto hexano	5.96	1.99

8.1.2.3.2. Evaluación de la actividad citotóxica

A continuación se muestran los valores de la CI_{50} del extracto de hexano en las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231.

Tabla 21. CI_{50} del extracto de hexano de *J. monticola* en las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231.

Especie vegetal	Extracto	CI_{50}	
		T47D	MDA-MB-231
<i>J. monticola</i>	Hexano	40.5 $\mu\text{g/mL}$	>100 $\mu\text{g/mL}$

El extracto de hexano no presentó actividad citotóxica importante contra las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231, ya que la CI_{50} es mayor a 30 $\mu\text{g/mL}$ (tabla 21). Como se observa en la figura 24, existen diferencias significativas de la actividad citotóxica del extracto de hexano entre la línea T47D y MDA-MB-231, siendo esta última la más susceptible a este extracto.

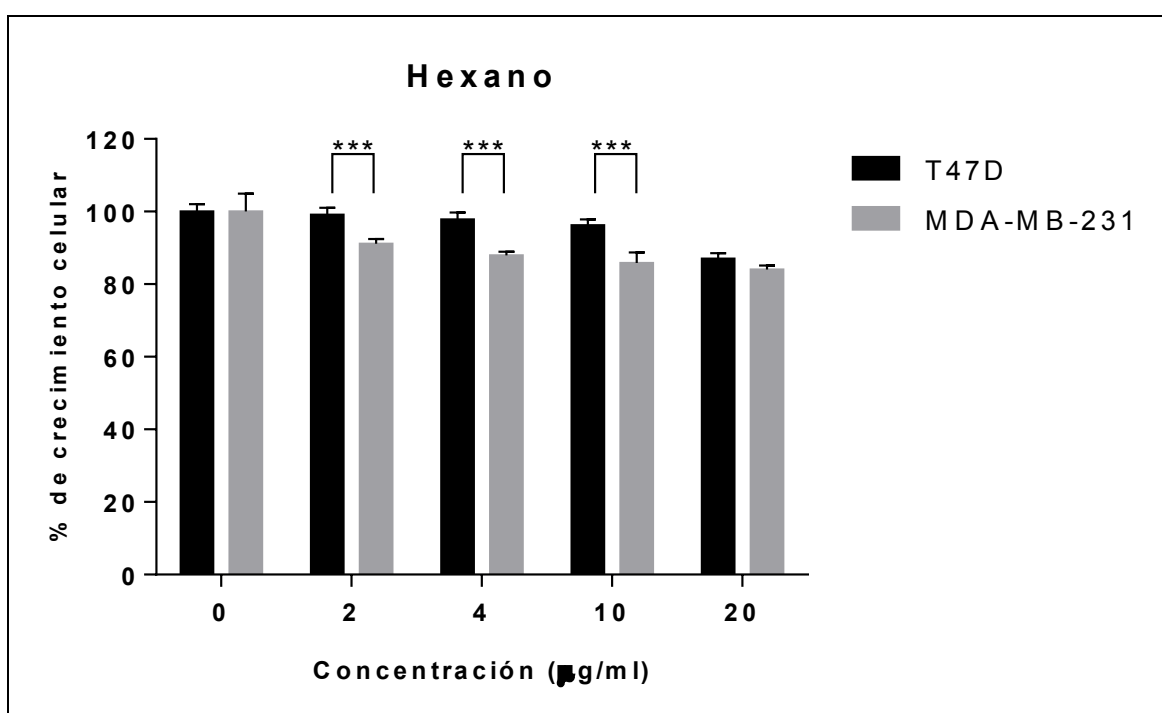


Figura 24. Porcentaje de crecimiento celular de las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231 después de ser tratadas con el extracto de hexano de *J. monticola*.

8.1.2.4. Extracto de acetato de etilo

Debido a la actividad citotóxica de extractos orgánicos de polaridad media de *J. monticola*, se procedió a evaluar el extracto de AcOEt. En la siguiente tabla se muestra el rendimiento obtenido.

8.1.2.4.1. Rendimiento

Tabla 22. Rendimiento de 10g de material vegetal de *J. monticola*

Especie vegetal	Extracto	Peso (g)	Rendimiento (%)
<i>J. monticola</i>	Acetato de etilo	0.093	0.93

8.1.2.4.2. Evaluación de la actividad citotóxica

Tabla 23. CI_{50} del extracto de acetato de etilo de *J. monticola* f. *monticola* en las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231.

Especie vegetal	Extracto	CI_{50}	
		T47D	MDA-MB-231
<i>J. monticola</i>	AcOEt	4.5 $\mu\text{g/mL}$	7 $\mu\text{g/mL}$

En negritas se muestra las CI_{50} de las fracciones consideradas activas.

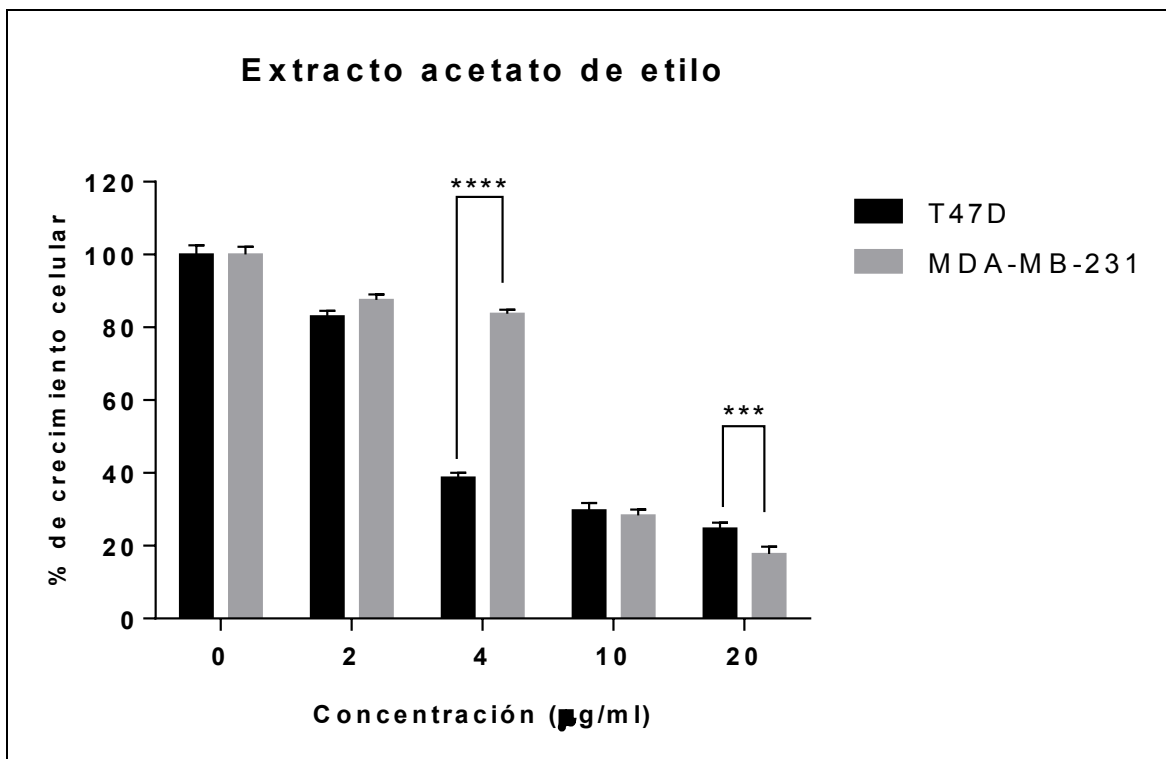


Figura 25. Porcentaje de crecimiento celular de las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231 después de ser tratadas con el extracto de acetato de etilo de *J. monticola*.

En la tabla 23 y figura 25 se muestra que el extracto de acetato de etilo presenta actividad citotóxica en las líneas T47D y MDA-MB-231, con una CI_{50} de 4.5 y 7 µg/mL, respectivamente. Por ello, este extracto resulta el de mayor actividad citotóxica sobre las células de cáncer.

8.1.2.5. Evaluación de la actividad citotóxica de las fracciones y extractos activos de *J. monticola* sobre la línea no-tumorigénica MCF-10A

Los extractos de fase orgánica, acetona y AcOEt, junto con las fracciones citotóxicas (9,12 y 15 de la fase orgánica) de *J. monticola* f. *monticola* fueron evaluados sobre la línea MCF-10A, como se muestra a continuación.

Tabla 24. CI_{50} de extractos y fracciones activas de *J. monticola* sobre la línea no-tumorigénica MCF-10A.

Especie vegetal	Extracto/ Fracción	CI_{50} MCF-10A
<i>J. monticola</i>	Fase orgánica	26.2 $\mu\text{g/mL}$
	Extracto AcOEt	23.6 $\mu\text{g/mL}$
	Extracto de acetona	>100 $\mu\text{g/mL}$
	Fracción 9	>100 $\mu\text{g/mL}$
	Fracción 12	>100 $\mu\text{g/mL}$
	Fracción 15	57 $\mu\text{g/mL}$

En negritas se muestra la CI_{50} de la fracción considerada activa.

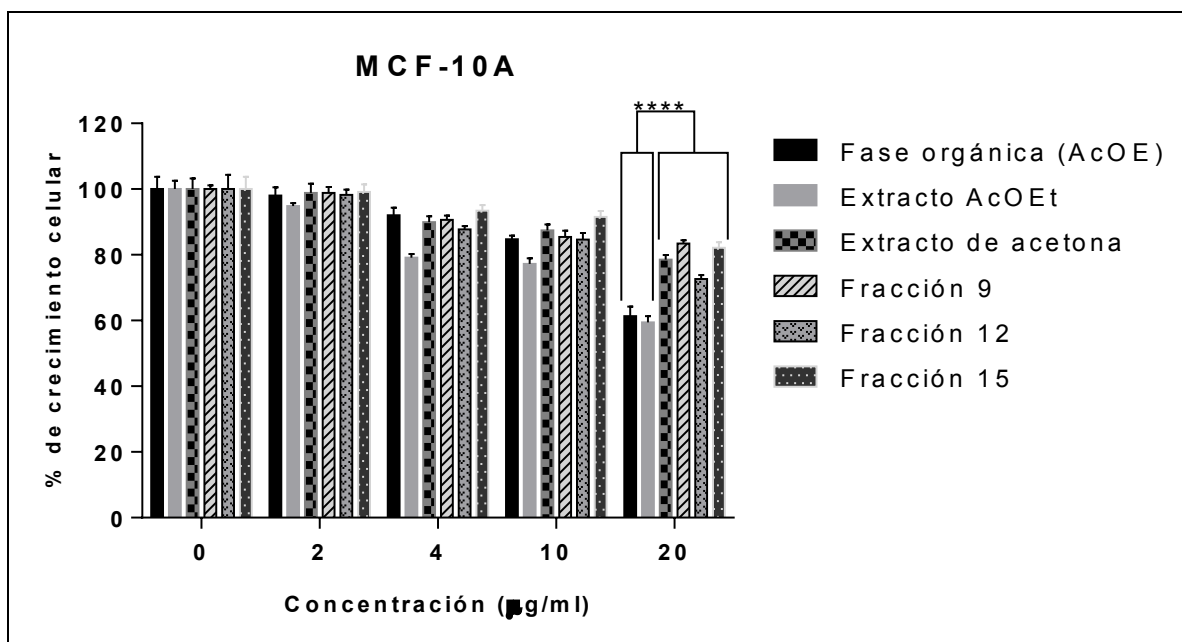


Figura 26. Porcentaje de crecimiento celular de la línea no tumorigénica MCF-10A después de ser tratada con extractos y fracciones con actividad citotóxica de *J. monticola*.

En la línea MCF-10A, el extracto de fase orgánica y el extracto de AcOEt tuvieron una actividad citotóxica importante, con una CI_{50} de 26.2 y 23.6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (tabla 24). Además, entre estos dos extractos no hay diferencias

estadísticamente significativas. La fracción 9, 12 y 15 no se consideran citotóxicas, al requerir más de 30µg/mL para su CI₅₀.

Por otro lado, el extracto de acetona requiere >100µg/mL para la CI₅₀ de esta línea no tumorigénica.

Los resultados de la evaluación de los extractos y fracciones citotóxicas sobre la línea celular MCF-10A muestran que esta línea celular resulta menos afectada al efecto citotóxico de estos, en comparación a las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231 (figura 26).

9. DISCUSIÓN

La CI_{50} de la doxorubicina en un tiempo de exposición a 24 h en la línea T47D ha sido reportada de 250 nM (Bazargan et al., 2008), 15 nM (Nurzijah et al., 2012), por lo que resultan menores a la aquí utilizada, mientras que Eatemadi y cols, (2015) la reportan de 3.001 μ M, que es más del doble a la que aquí se utilizó.

Por otro lado, en la línea tumoral MDA-MB-231, Costantini y cols. (2010) reportaron la CI_{50} de la doxorubicina a 24 h de 1.26 μ M, por lo que la concentración aquí utilizada es menor.

Como se ha observado en la literatura y en el presente trabajo, la CI_{50} de la doxorubicina sobre las líneas celulares varía en los diversos estudios, incluso tratándose de la misma línea celular.

Respecto de las fases acuosa y orgánica obtenidas del extracto hidroetanólico, la fase acuosa tuvo un rendimiento de 3.37% y la fase orgánica 1.05%, por lo que presentan una proporción cercana a 3:1. La mayor parte de los componentes de esta fase orgánica contiene compuestos de baja y mediana polaridad, ya que en la cromatografía en columna del extracto de fase orgánica, algunos componentes eluyen con hexano, pero el mayor rendimiento se obtuvo cuando se utilizó AcOEt (tabla 13). En la fase de AcOEt obtenida del extracto etanólico de las hojas de *J. excelsa*, Moein y Moein (2010) reportaron la presencia de fenoles y flavonoides, mientras que Mujwah y cols. (2010) identificaron el flavonoide 3',4',3,7-tetrahidroxiflavona en la fase orgánica (AcOEt) del extracto metanólico de hojas de *J. procera* Hochst. Ex Edl. La presencia de flavonoides concuerda con nuestros resultados, ya que en la fracción 18 del extracto de fase orgánica se identificó un flavonol (figura 16).

Por otro lado, en los extractos de alta polaridad de especies de juníferos se han reportado diversos compuestos químicos, como los lignanos desoxipodofilotoxina y Metil éter β - peltatina A, identificados en el extracto etanólico de las hojas de *J. phoenicea* (Cairnes et al., 1980). En el 2011, Orhan y cols. reportaron la presencia de fenoles y flavonoides en los extractos etanólicos y acuosos de las ramas de *J. communis* subsp. *nana*, *J. excelsa*, *J. foetidissima*, *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus*

y *J. sabina*. Mientras que en los extractos etanólicos (50%) de las hojas de las especies *J. navicularis* Gand., *J. oxycedrus* L. var. *badia* H. Gay, *J. phoenicea* y *J. turbinata* Guss, analizados por HPLC-EM, Tavares y cols. (2012) identificaron catequinas, procianidinas, derivados flavonoles (quercetina rutinósida y quercetina ramnósida), flavonas (isoscuteleína y glicósidos luteolína), biflavonas (como amentoflavona, cupresuflavona e hinokiflavona), psidrina y el trímero procianidina. Por otro lado, en los extractos metanólicos y acuosos de las ramas de *J. communis* L. var. *communis*, *J. communis* L. var. *saxatilis* Pall., *J. drupacea* Labill, *J. oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* y *J. oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball, Taviano y cols. (2011) reportan un alto contenido de fenoles, flavonoides y taninos condensados, lo que coincide con los trabajos de los extractos metanólicos de las hojas de *J. sibirica* Burgsdorf, *J. oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* y *J. phoenicea* (Lesjak et al., 2011; Chaouche et al., 2013; Keskes et al., 2014). En el extracto metanólico de las ramas de *J. macrocarpa* Sibth. et Sm., Lesjak y cols. (2014) encontraron ácidos fenólicos (ácido protocatecuico, ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico, entre otros), flavonoides (rutina, catequina, quercitrina y epicatequina, entre otros), cumarinas (umbelliferona y asculatina) y lignanos (matairesinol y secoisolariciresinol).

Al revelar las fracciones 9, 12 y 15 (del extracto de fase orgánica) con sulfato cérico y calentado de la placa, se produce la oxidación de las moléculas presentes en las fracciones como zonas de color café claro.

Para detectar la presencia de alcaloides y flavonoides, se utilizaron el reactivo de Dragendorff y el RPN, respectivamente, pero no se logró detectar la presencia de este tipo de compuestos, mientras que con la vainillina sulfúrica, sólo se observaron algunas manchas más en la fracción 12 y 15, respecto de las manchas observadas cuando se revela con sulfato cérico.

También se utilizó el p-anisaldehído para detectar la presencia de un amplio rango de productos naturales. En las tres fracciones se observa coloración en la CCF utilizando este revelador, lo que indica la presencia de diversos compuestos, que dependiendo de la naturaleza de sus núcleos químicos, adquieren diversos colores al oxidarse.

El revelador p-anisaldehído permite detectar e identificar un amplio rango de productos naturales, como prenoles, dolicoles, compuestos ribo y deoxi-ribonucleósidos, antioxidantes, esteroides, carbohidratos, fenoles, glicósidos, saponinas, componentes de aceites esenciales y terpenos, entre otros (Ubatuba, 1978).

En la fracción 9 las manchas coloridas más prominentes son de color rosado y azul intenso, por lo que de acuerdo a los tipos de compuestos que se pueden identificar con este reactivo, podría tratarse de saponinas triterpénicas y esteroides. En la fracción 12 aparece una zona color azul intenso y una color violeta, por lo que podrían ser esteroides y saponinas esteroidales. Finalmente, en la fracción 15 también aparece una zona color azul intenso y otra de color violeta, por lo que podrían ser esteroides.

La CCF utilizando reveladores específicos permite dar una idea de los grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos y en las fracciones, como se ha visto en este caso. Con el uso de reveladores específicos se observó que los compuestos mayoritarios en las fracciones 9, 12 y 15 son del tipo de los esteroides y terpenos.

Debido al bajo rendimiento de las fracciones 9, 12 y 15, se procedió a realizar otra CC del extracto de fase orgánica (anexo B, figura 2) ahora utilizando 10 g de extracto. Todas las fracciones obtenidas se intentaron cristalizar mediante mezclas de disolventes. Sin embargo, no se logró obtener ningún sólido cristalino.

En el fraccionamiento por CC de tres extractos (obtenidos por separado) de la fase orgánica de *J. monticola* f. *monticola* se obtuvo el compuesto **1**, cuyo espectro de ¹H RMN muestra señales a 6.82 (d) que integra para 1H de J=1.8 Hz, que corresponden a un protón aromático y que se asignó al protón en C-2', del anillo B de un flavonoide, el cual tiene una interacción meta con H-6' (dd) a 6.70, 1H, J=1.8, J=6.9 y este último tiene otra en posición orto con H-5' un d (1H) a 6.76 (J=6.9).

Con respecto al anillo C del compuesto **1**, es un anillo de seis miembros de tipo oxirano insaturado, el H-2 produce la señal doble (J=7.5) desplazada a 4.56 (1H),

que corresponde a un protón unido a un carbón unido al oxígeno del éter, la constante de acoplamiento de este protón indica que tiene orientación ecuatorial, con relación a los H-3a y H-3b. El H-4 es el causante de la señal a 3.96 (td) (1H) que presenta constantes de acoplamiento del orden de $J=5.4$ y $J=16$. Esta última permite establecer que tiene orientación axial-axial con el H-3b, como se representa en la fórmula del compuesto **1** (figura 16). Los hidrógenos del carbón-3 corresponden a un metileno, es una señal (td) centrada a 2.84 (2H) con constantes de acoplamiento de $J=5.4$, $J=16$, $J=8.0$. Al anillo C corresponden dos señales dobles centradas a 5.92 y a 5.84, $J=2.1$ que integran respectivamente para 1H, la constante de acoplamiento es de $J=2.1$ lo que confirma la posición meta uno del otro.

En lo que corresponde al espectro de ^{13}C RMN, apoyados en los experimentos de HMBC, HSQC y DEPT, todos los carbonos de la molécula en estudio fueron asignados como se encuentran en la tabla 15.

La asignación de los carbonos de anillo C se debe a su desplazamiento químico, el C-2 está en 82.83 ppm, C-3 en 28.49 ppm (metileno) y a 68.80 ppm, los cuales fueron confirmados por los experimentos en 2D (anexo D).

En el análisis de rotación óptica, este compuesto presentó $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -11^{\circ}$.

En la figura 18 se muestra la fragmentación del compuesto **1**, por Espectrometría de Masas y DAP.

Los datos obtenidos en el presente estudio muestran que el compuesto **1** es un esteroisómero configuracional del Luteoforol y el Epiluteoforol (Figura 19), ya que tienen la misma fórmula molecular ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$) y la misma secuencia de átomos, pero difieren en la orientación tridimensional de sus átomos en el espacio. Debido a las señales obtenidas por el H-2, la constante de acoplamiento de este protón indica que tiene orientación ecuatorial, con relación a los H-3a y H-3b, lo que indica que entonces el C-2 se une al C-1' del anillo B mediante un enlace β axial (compuesto **1**).

En la revisión en la literatura, se confirmó que el compuesto **1** aún no ha sido descrito en el género *Juniperus* ni en otras especies vegetales. Además, los datos de RMN del Luteoforol tampoco han sido descritos.

En los resultados de la evaluación de la actividad citotóxica del extracto de fase orgánica y de sus fracciones, se observa que la línea celular MDA-MB-231 es más susceptible al efecto citotóxico, en comparación con la línea celular T47D. Este resultado es importante, ya que la línea celular MDA-MB-231 pertenece al cáncer de mama triple negativo, que presenta una elevada tasa de metástasis y menos del 30% de las mujeres que lo presentan sobreviven a los 5 años y la mayoría muere, a pesar de la quimioterapia (Lehmann et al., 2011).

Una de las principales dificultades en el aislamiento e identificación de los compuestos citotóxicos en las fracciones activas del extracto de fase orgánica, fueron los bajos rendimientos obtenidos, de 10.4 mg para la fracción 9, 56.3 mg para la fracción 12 y 36.5 mg para la fracción 15. Debido a esta problemática, no fue posible aislar algún compuesto homogéneo en estas fracciones.

En los extractos acetónicos de especies de este género los diterpenos son los constituyentes más identificados. Además, la mayoría de los compuestos citotóxicos de los juníperos son diterpenos (tabla 9), por lo que trabajar con el extracto de acetona resulta importante, ya que este extracto muestra una actividad citotóxica significativa contra líneas tumorales humanas T47D y MDA-MB-231.

Hartwell y cols. (1953) identificaron a la podofilotoxina en el extracto acetónico de las hojas de *J. virginiana*, *J. lucayana*, *J. scopolorum* y *J. sabina*. Además, algunos juniperoprenoles (C₇₀-C₁₀₅), se obtuvieron en las hojas de *J. communis* (Sasak et al., 1976). Por otro lado, Fang y cols. (1993) aislaron 18 diterpenos de un extracto acetónico con una posterior partición con AcOEt, de la corteza de *J. chinensis* Linn. var *kaizuka* Hort. Los diterpenos identificados fueron: ácido sandaracopimárico, ferruginol, dehidroabietanona, sugiol, 6 α -hidroxi-7-oxoferruginol, 6,7-secoferruginol-6,7-dial, totarol, totarolona, ácido comúnico, ácido isocuprésico, ácido agático, los isómeros E y Z del ácido 12,15-dihidroxilabda-8(17),13-dien-19-oico, ácido 2 α -hidroxi-trans-comúnico, ácido 2 α -hidroxi-cis-comúnico, ácido 15,16-bisnor-8,17-epoxi-13-oxolabd-11E-en-19-oico, ácido 12,13-epoxilabda-8(17),14-dien-19-oico y el ácido 12,13-dihidroxilabda-8(17),14-dien-

19-oico.

En 1996, este mismo grupo de investigación identificó otros 12 sesquiterpenos, 14 diterpenos y un bisnorditerpeno, aislados de un extracto acetónico del duramen de *J. chinensis* Linn. var *kaizuka* Hort. Los sesquiterpenos identificados fueron: β -cuparenol, α -acorenol, tujopsen-12-ol, isoleptografiol, óxido cariofileno, 6,7-epoxicariofil-3(15)-en-14-ol, cedr-3-en-15-ol, cedrol, cedran-3 α -ol, cedrano-3 β ,12-diol, 2,2,6,9-tetrametiltriciclo undecan-9-ol y α -longipinen-12-ol. Los diterpenos fueron: ferruginol, hinokiol, dehidroabietinol, abieta-8,11,13-trien-7-ona, sugiol, totarol, ácido sandaracopimárico, ácido transcomúnico, ácido cis-comúnico, ácido agático, ácido isocuprésico, ácido acetilisocuprésico, ácido 15-hidroxiabda-8(17)-en-19-oico y el ácido 15-hidroxiabda-8(17)-11E,13E-trien-19-oico. El bisnoditerpeno identificado fue el ácido 15,16-bisnor-13-oxolabda-8(17), 11E-dien-19-oico.

En la CCF del extracto de acetona respecto del extracto de fase orgánica (figura 21), se observa que este último presenta componentes de mayor polaridad, respecto del primero. Como se ha mencionado, los extractos de acetona contienen principalmente sesquiterpenos y diterpenos, mientras, el extracto de fase orgánica presenta compuestos fenólicos. A pesar de esto, ambos extractos presentan componentes citotóxicos, ya que su Cl_{50} es menor a 30 μ g/mL sobre las líneas tumorales humanas en este trabajo.

La actividad citotóxica observada en el extracto de acetona sobre las líneas celulares T47D y MDA-MB-231 puede deberse a la sinergia de dos o más compuestos, ya que en las fracciones obtenidas, ninguna presenta la actividad citotóxica del extracto total de acetona. Por otro lado, también es probable que durante el fraccionamiento del extracto de acetona, algunos compuestos activos se desnaturalicen, por lo que pierden sus propiedades y la actividad citotóxica.

Respecto del extracto hexánico, Damjanovic (2003) describe que los constituyentes principales de estos son aceites, ceras y resinas. Sin embargo, en el extracto hexánico de las hojas de *J. sabina*, De Pascual y cols. (1981) obtuvieron cumarinas (siderina, cumarsabina y 8-metoxi-cumarsabina), mientras

que Owens y cols (1998) identificaron los monoterpenos α -pineno, bornil acetato, alcanfor, citronelol, limoneno, linalol, mirceno, sabineno y tricicleno como los principales monoterpenos del extracto hexánico de las hojas de *J. Ashei* Buchholz. En 2005, Seca y Silva estudiaron la composición química del extracto hexánico de la corteza de *J. brevifolia*, cuyos resultados muestran que los principales componentes son sesquiterpenos (junipeno, cedre-8-eno y cedrol), ácidos diterperpénicos, abietanos fenólicos (totalol y 6,7-dehidroferruginol), totaranos, ceto diterpenos (sugiol, 6-oxoferruginol, totalol-3-ona y totalol-1,3-diona), ácidos grasos (ácidos octadecanoico, oleico, palmítico, docosanoico y tetracosanoico), alcoholes alifáticos de cadena larga (eicosanol), esteroides (sitosterol, estigmasterol y campesterol) y ésteres. Mientras que en el extracto hexánico de las ramas de *J. lucayana*, Ortiz y cols. (2010) identificaron el ácido sandaracopimárico, el ácido 4-epi-dehidroabiético, la oplopanona, el oplodiol, el neftediol, el ácido 7 α -hidroxycallitrisico y el ácido 7-oxocallitrisico, y en el extracto hexánico de hojas de *J. phoenicea* se ha detectado la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides (Keskes et al., 2014). En los extractos hexánicos de especies de juníferos, la presencia de diterpenos y abietanos fenólicos es importante, ya que este tipo de compuestos tienen actividad citotóxica contra líneas tumorales humanas (tabla 9). Sin embargo, en el presente trabajo, el extracto hexánico de *J. monticola* f. *monticola* no resultó citotóxico al evaluarlo en un tiempo de exposición de 24h sobre las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231.

El extracto de AcOEt de *J. monticola* fue evaluado debido a la citotoxicidad observada en los extractos de mediana polaridad. Este extracto resultó ser el de mayor actividad citotóxica sobre las tres líneas celulares. Debido a la carencia del material vegetal nuevo ya no se obtuvo más cantidad, ya que el material vegetal con el que se disponía había sido utilizado para obtener el extracto de acetona, al cual se le realizó la extracción consecutiva con AcOEt y el extracto resultante ya no presentó efecto citotóxico, por lo que parte de la actividad citotóxica ya había sido extraída en el extracto de acetona. Ambos disolventes permiten extraer componentes citotóxicos de *J. monticola* f. *monticola*, pero de acuerdo con el disolvente utilizado se extraen componentes diferentes y en cantidades distintas,

como se observa por la actividad citotóxica de cada extracto (tablas 17 y 23). A diferencia del extracto de AcOEt, el de acetona resultó citotóxico en las líneas tumorales, pero no en la línea MCF-10A. El resultado del extracto de acetona resulta muy interesante, puesto que en la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos es importante enfocarnos en aquellos que afecten en mayor medida a las células malignas, ya que muchos fármacos generan efectos secundarios en los pacientes, como la estomatitis, mielosupresión, tromboembolismo, mialgias, neuropatía, trombosis, disfunción cardíaca, disfunción cognitiva, síndrome mielodisplásico y leucemia, entre otras (Partridge et al., 2001), lo que afecta su calidad de vida. Si bien en los extractos de acetona se han identificado sesquiterpenos y diterpenos, en el extracto de AcOEt de las hojas de *J. phoenicea*, se ha reportado la presencia de compuestos fenólicos y de flavonoides (Keskes et al., 2014).

En la comparación del control positivo con los extractos orgánicos de *J. monticola* f. *monticola*, se observó que la doxorubicina requiere para su CI_{50} de $0.68\mu\text{g/mL}$ ($1.18\ \mu\text{M}$) en la línea T47D y de $0.46\mu\text{g/mL}$ ($0.79\ \mu\text{M}$) en la MDA-MB-231. Mientras, el extracto de AcOEt presentó la mayor actividad citotóxica y requiere de 4.5 y $7\mu\text{g/mL}$ para la CI_{50} en las líneas T47D y MDA-MB-231.

En el presente estudio se demuestra que los extractos orgánicos de fase orgánica, acetona y AcOEt de *J. monticola* f. *monticola* presentan actividad citotóxica sobre las líneas tumorales de cáncer de mama T47D y MDA-MB-231. La continuidad al presente trabajo es muy conveniente de hacerlo, ya que los compuestos citotóxicos podrían ser aislados e identificados, siendo el extracto de acetona el más prometedor para continuar su estudio.

Los rendimientos de los extractos orgánicos, así como los compuestos fitoquímicos encontrados en los juníperos (y en las plantas, en general) es variable en los diferentes estudios, lo cual refleja la influencia de variables genéticas y ambientales tales como origen geográfico, clima, condiciones de suelo, estación

del año, edad de la planta, entre otros (Shanjani et al., 2010; Georgieva et al., 2014).

Las especies del género *Juniperus* presentan potencial en la búsqueda de nuevos compuestos con propiedades anticáncer y en el presente trabajo se destaca la importancia una especie de México, *J. monticola* f. *monticola* como una importante fuente en la búsqueda de estructuras químicas con actividad citotóxica evaluada sobre líneas de cáncer humano, con especial atención en el extracto de acetona para continuar trabajando en la búsqueda de compuestos con potencial antitumoral.

10. PERSPECTIVAS

Se propone continuar la investigación en el extracto de acetona de *J. monticola* f. *monticola*, ya que es el extracto más prometedor para la continuidad en la búsqueda de agentes terapéuticos contra el cáncer. Una vez purificado el (los) compuesto(s) con actividad citotóxica, se pueden realizar experimentos en las células tumorales para identificar los mecanismos de muerte celular, vías de señalización involucradas, procesos de desregulación de proteínas que participan en el ciclo celular, entre otros.

En especies de este género, algunos diterpenos han presentado actividad citotóxica en líneas tumorales, por lo que su obtención mediante una metodología precisa será de gran utilidad para conocer si involucrados en la actividad citotóxica de los extractos orgánicos de *J. monticola* f. *monticola*.

11. CONCLUSIONES

Los extractos de la fase orgánica, de AcOEt y acetónico de *J. monticola f. monticola* presentan actividad citotóxica significativa sobre las líneas celulares de cáncer de mama T47D y MDA-MB-231.

La línea celular MDA-MB-231 es la más sensible a los extractos orgánicos de *J. monticola f. monticola*.

El extracto de acetona es el de más prometedor en la búsqueda de compuestos antineoplásicos, con una $CI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ sobre las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231, mientras que requiere $\geq 100 \mu\text{g/mL}$ para el mismo efecto en la línea no tumorigénica MCF-10A.

La fracción 12, obtenida del fraccionamiento del extracto de fase orgánica de *J. monticola f. monticola*, presenta un éster hidrocarbonado de cadena larga.

En la fracción 18, obtenida del fraccionamiento de la fase orgánica de *J. monticola f. monticola*, se identificó un esteroisómero configuracional del Luteoforol como componente mayoritario.

El sólido 5(II), identificado en el fraccionamiento del extracto acetónico de *J. monticola f. monticola* es un éster hidrocarbonado de cadena larga.

Este trabajo es el primer estudio en que se demuestra la actividad citotóxica de la especie *J. monticola f. monticola* en dos líneas distintas de cáncer de mama.

12. LITERATURA CITADA:

- Abdallah HM, Al-Abd AM, El-Dine RS y El-Halawany 2015. **P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review.** *Journal of Advanced Research* 6: 45-62
- Adams RP 2000. **Systematics of *Juniperus* section *Juniperus* base on leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs).** *Biochemical Systematics and Ecology* 28: 515-528
- Adams RP 2004. **The junipers of the world: The genus *Juniperus*.** Trafford Publishing, Victoria, Canadá. 422 pp.
- Alonso-Castro AJ, Villarreal ML, Salazar-Olivo LA, Gómez-Sánchez M, Domínguez F, García-Carranca A 2011. **Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies.** *Journal of Ethnopharmacology* 16: 945-72.
- Balunas MJ y Kinghorn AD 2005. **Drug discovery from medicinal plants.** *Life Sciences* 78: 431 – 441
- Barrero A, Quílez del Moral JF, Mar M, Akssira M, Bennamara A, Akkad A y Aitigre M 2004. **Oxygenated diterpenes and other constituents from Moroccan *Juniperus phoenicea* and *Juniperus thurifera* var. *africana*.** *Phytochemistry* 65: 2507–2515
- Bazargan L, Fouladdel S, Shafiee A, Amini M, Ghaffari SM, Azizi E 2008. **Evaluation of anticancer effects of newly synthesized dihydropyridine derivatives in comparison to verapamil and doxorubicin on T47D parental and resistant cell lines *in vitro*.** *Cell biology and toxicology* 24: 165
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S y Gontier E 2001. **Production of plant secondary metabolites: a historical perspective.** *Plant Science* 161: 839–851
- Buszewski B y Noga S 2012. **Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402:231–247
- Cairnes DA, Ekundayo O y Kingston DGI 1980. **Plant anticancer agents. X. Lignans from *Juniperus phoenicea*.** *Journal of Natural Products* 43: 495-497
- Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D y Giani L 2010. **Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience?** *Nature Reviews Clinical Oncology* 7: 683-692
- Chaouche TM, Haddouchi F, Ksouri R, Medini F y Atik-Bekara F 2013. **In vitro evaluation of antioxidant activity of the hydro-methanolic extracts of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*.** *Phytothérapie* 11: 244-149

Chuang P, Huang C y Huang H 2013. **The use of a combination of tamoxifen and doxorubicin synergistically to induce cell cycle arrest in BT483 cells by down-regulating CDK1, CDK2 and cyclin D expression.** *Journal of Pharmaceutical Technology & Drug Research* 2: 1-7

Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) 2006 [Documento en línea]. Recuperado el 11 de Junio de 2015 de: <http://www.conanp.gob.mx/anp/consulta/PCyM-Chico.pdf>

Constantini DL, Villani D, Vallis K y Reilly R 2010. **Methotrexate, Paclitaxel, and Doxorubicin Radiosensitize HER2-amplified Human Breast Cancer Cells to the Auger Electron-Emitting Radiotherapeutic Agent ¹¹¹In-NLS-Trastuzumab.** *The Journal of Nuclear Medicine* 51: 477-483

Cragg GM y Newman DJ 2005. **Plants as a source of anti-cancer agents.** *Journal of Ethnopharmacology* 100: 72–79

Cronquist A 1977. **Introducción a la botánica.** Editorial continental. D.F., México. 848 pp.

Damjanovic B, Skala D, Petrovic-Djakov D y Baras J 2003. **A comparison between the oil, hexane extract and supercritical carbón dioxide extract of *Juniperus communis* L.** *Journal of essential oil Research* 15: 90-92

De Pascual J, San Feliciano A, Del Corral JMM, Barrero AF, Rubio M y Muriel L 1981. **2,5-dimethylcoumarins from leaves of *Juniperus sabina*.** *Phytochemistry* 20: 2778-2779

De Souza ML, Cipriani TR, Iacomini M, Gorin PAJ y Sasaki GL 2008. **HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47: 59–67

Eatemadi A, Darabi M, Afraidooni L, Zarghami N, Daraee H, Eskandari L, Mellatyar H y Abolfalz A 2015. **Comparison, synthesis and evaluation of anticancer drug-loaded polymeric nanoparticles on breast cancer cell lines.** *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 1: 1–10

El-Sawi SA, Motawe HM y Ali AM 2007. **Chemical composition, cytotoxic activity and antimicrobial activity of essential oils of leaves and berries of *Juniperus phoenicea* I. Grown in Egypt.** *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 4: 417 – 426

El-Sawi SA y Motawe HM 2008. **Labdane, pimarane and abietane diterpenes from the fruits of *Juniperus phoenicea* L. grown in Egypt and their activities against human liver carcinoma.** *Canadian Journal of pure and applied sciences* 2:115-122

Fang J, Sou Y, Chiu Y y Cheng Y 1993. **Diterpenes from the bark of *Juniperus chinensis*.** *Phytochemistry* 34: 1581-1584

- Fang J, Chen Y, Wang B y Cheng Y 1996. **Terpenes from heartwood of *Juniperus Chinensis***. *Phytochemistry* 41: 1361-1365
- Georgieva S, Hadjieva P, Chanev C y Arpadjan S 2014. **Comparison of composition and antimicrobial activity of hydrodistilled and ethanol extracted essential oil of *Juniperus communis* L.** *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences* 67: 635-640
- Graham JG, Quinn ML, Fabricant DS y Farnsworth NR 2000. **Plants used against cancer- an extension of the work of Jonathan Hartwell.** *Journal of Ethnopharmacology* 73: 347-377
- Guerra-Hernández EJ, López-Martínez MC y García-Villanova R 1988. **Determination by gas chromatography of fatty acids, sterols and terpenes in the berries of the species *Juniperus oxycedrus* L. *J. thurifera* L. and *J. sabina* L.** *Afinidad* 45: 529-534
- Hartwell JL, Jonhson JM, Fitzgerald D y Belein M 1953. **Podophyllotoxin from *Juniperus* Species: Savinin.** *This Journal* 74: 235-236
- Holliday DL y Speirs V 2011. **Choosing the right cell line for breast cancer research.** *Breast Cancer Research* 13: 215-221
- Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos [Documento en línea]. Recuperado el 20 de junio de 2015 de: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/paciente/tratamiento-seno-pdq>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) 2014. **Estadísticas a propósito del día internacional contra el cáncer de mama (19 de octubre)** [Documento en línea]. Recuperado el 2 de Mayo de 2015 de: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/mama0.pdf>
- Innocenti M, Michelozzi M, Giaccherini C, Ieri F, Vincieri FF y Mulinacci N 2007. **Flavonoids and Biflavonoids in Tuscan Berries of *Juniperus communis* L: Detection and quantitation by HPLC/DAD/ESI/MS.** *Journal of Agricultural and food chemistry* 55: 6596-6602
- International Agency for Research on Cancer [Documento en línea]. Recuperado el 6 de Febrero de 2015 de: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>
- Iriti M y Faoro F 2009. **Chemical Diversity and Defence Metabolism: How Plants Cope with Pathogens and Ozone Pollution.** *International Journal of Molecular Sciences* 10: 3371-3399

Jafarian-Dehkorki A, Emami SA, Saeidi M y Sadeghi H 2004. **Cytotoxicologic Studies of the Extracts of Iranian *Juniperus Sabina* and *Platycladus Orientalis* on Cancer Cells.** *Journal of Research in Medical Sciences* 5: 205-209

Keskes H, Mnafigui K, Hamden K, Damak M, El Feki A y Allouche N 2014. **In vitro anti-diabetic, anti-obesity and antioxidant proprieties of *Juniperus phoenicea* L. leaves from Tunisia.** *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4: S649-S655

Knaul FM, López-Carillo L, Aguilar de García B, Althaus E, Arreola H, Barreiro N, Chaudhuri I, Díaz JV, Durstine A, Flores M, Fuentes A, Galindo de Mares M, Guijón R, López L, Maza ME, Nigenda G, Ortega SX, Rosado J, Schiavon R, Suárez M, Vega A, Vera E y Villaseñor Y. 2009. **México Reporte Rosa 2009-2010: Cáncer de mama a conciencia.** México, D.F. Fundación Mexicana para la Salud. 67 pp.

Kwon H, Lee E, Hong Y, Yun H y Kim B 2010. **Widdrol from *Juniperus chinensis* Induces Apoptosis in Human Colon Adenocarcinoma HT29 Cells.** *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 15: 167-172

Latif A, Mohamed AH, Elead HM, Rahaman AS y Nasser AF 2014. **Medicinal plants from Saudi Arabia and Indonesia: *In vitro* cytotoxicity evaluation on Vero and Hep-2 cells.** *Journal of Medicinal Plant Research* 8: 1065-1073

Lehmann BD, Bauer JA, Chn X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y y Pietenpol JA 2011. **Identificacion of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies.** *Journal of clinical investigation* 121: 2750-67

Lesjak MM, Beara IN, Orcic DZ, Anackov GT, Balog KJ, Franciskovic MM y Mimica-Dukic NM 2011. ***Juniperus sibirica* Burgsdorf. As a novel source of antioxidant and anti-inflammatory agents.** *Food Chemistry* 124: 850-856

Lesjak MM, Beara IN, Orcic DZ, Petar KN, Simin ND, Emilija SD y Mimica-Dukic NM 2014. **Phytochemical composition and antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities of *Juniperus macrocarpa* Sibth. et Sm.** *Journal of Funcional Foods* 7: 257-268

Lim JP, Song YC, Kim JW, Ku CH, Eun JS, Leem KH y Kim DK 2002. **Free radical scavengers from the heartwood of *Juniperus chinensis*.** *Archives of Pharmacal Research.* 25: 449-452

Mans DR, da Rocha AB y Schwartzmann G 2000. **Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to adquire candidate anti-cancer compounds.** *Oncologist* 5: 185-198

- Martínez M 1963. **Las Pináceas mexicanas**. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F., México. 400 pp.
- Meza-Junco J, Montaño-Loza A y Aguayo-González A 2006. **Bases moleculares del cáncer**. *Revista de Investigación Clínica* 58: 56-70
- Miller E, Lee HJ, Lulla A, Hernandez L, Gokare P y Lim B 2014. **Current treatment of early breast cancer: adjuvant and neoadjuvant therapy**. *F1000 Research* 3:198-211
- Moein S y Moein M 2010. **Antioxidant Activities and Phenolic Content of *Juniperus excelsa* Extract**. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences* 6: 133-140
- Moujir L, Seca AM, Silva AM y Barreto MC 2008. **Cytotoxic activity of diterpenes and extracts of *Juniperus brevifolia***. *Planta Medica* 74 :751-753
- Mujwah AA, Mohammed MA y Ahmed MH 2010. **First isolation of a flavonoid from *Juniperus procera* using ethyl acetate extract**. *Arabian Journal of Chemistry* 3: 85-88
- Nurzijah I, Pruti DD, Rivanti E y Meiyanto E 2012. **Secant (*Caesalpinia sappan* L.) Heartwood Ethanolic Extract Shows Activity as Doxorubicin Co-chemotherapeutic Agent by Apoptosis Induction on T47D Breast Cancer Cells**. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention* 3: 377-384
- Organización Mundial de la Salud (OMS) 2015a [Documento en línea]. Recuperado el 7 de Enero de 2015 de: <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
- Orhan N, Orhan IE y Ergun F 2011. **Insights into cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of five *Juniperus* species**. *Food and Chemical Toxicology* 49: 2305-2312
- Ormeño E y Fernández C 2012. **Los terpenos de las plantas**. *Investigación y Ciencia No. 428*: 62-69
- Ortiz NY, Spengler SI, Collado IG y Hernández GR 2010. **Antifungal Activity of Extracts and Terpen Constituents of Aerial parts of *Juniperus Lucayana***. *Revista Latinoamericana de Química* 38: 145-152
- Owens MK, Straka EJ, Carroll CJ y Taylor CA 1998. **A comparison of techniques for extracting monoterpenoids from *Juniperus* (Cupressaceae) species**. *Journal of range management* 51: 540-544

Öztürk M, Tümen I, Uğur A, Aydogmus- Öztürk F y Topçu G 2011. **Evaluation of fruit extracts of six Turkish *Juniperus* species for their antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activities.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91:867-876

Partridge AH, Burstein HJ, Winer EP 2001. **Side Effects of Chemotherapy and Combined Chemohormonal Therapy in Women With Early-Stage Breast Cancer.** *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 30: 135-142

Pérez Urria CE y Avalos García A 2009. **Metabolismo secundario de plantas.** *Reduca* 2: 119-145

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams CF, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO y Botstein D 2000. **Molecular portraits of human breast tumor.** *Nature* 406: 747-752

Pichersky E y Gang DR 2000. **Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective.** *Trends in plant Science* 5: 439-445

Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM 2010. **Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer.** *Breast Cancer Research* 12: 68-85

Renouard S, Lopez T, Hendrawati O, Dupre P, Doussot J, Falguieres A, Ferroud C, Hagege D, Lamblin F, Laine E y Hano C 2011. **Podophyllotoxin and Deoxypodophyllotoxin in *Juniperus bermudiana* and 12 Other *Juniperus* Species: Optimization of Extraction, Method Validation, and Quantification.** *Journal of agricultural and food chemistry* 59: 8101-8107

Rubis B, Polrolniczak A, Knula H, Potapinska O, Kaczmarek M, Rybczynska M 2010. **Phytosterols in physiological concentrations target multidrug resistant cancer cells.** *Medicinal Chemistry* 6: 184-190

Sadeghi-aliabadi H, Emami A, Saidi M, Sadeghi B y Jafarian A 2009a. **Evaluation of In Vitro Cytotoxic Effects of *Juniperus foetidissima* and *Juniperus sabina* Extracts Against a Panel of Cancer Cells.** *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 8: 281-286

Sadeghi-aliabadi H, Emami A, Saidi M, Sadeghi B y Jafarian A 2009b. **In Vitro Cytotoxicity of Two Subspecies of *Juniperus excelsa* on Cancer Cells.** *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 11: 250-253

Sasak W, Mankowsky T, Chojnacki T y Daniewski WM 1976. **Polyprenols in *Juniperus communis* needles.** *FEBS letters* 64: 55-58

Seca AML y Silva AMS 2005. **The chemical composition of hexane extract from bark of *Juniperus brevifolia***. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* 22: 975-983

Sethi ML, Taneja SC, Agarwal SG, Dhar KL y Atal CK 1980. **Isoflavones and stilbenes from *Juniperus macropoda***. *Phytochemistry* 19: 1831-1832

Shanjani PS, Mizra M, Calagari M y Adams RP 2010. **Effects drying and harvest season on the essential oil composition from foliage and berries of *Juniperus excelsa***. *Industrial Crops and Products* 32: 83-87

Smith L, Watson M, O'Kane S, Drew P, Lind MJ y Cawkwell L 2006. **The analysis of doxorubicin resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays**. *Molecular Cancer Therapeutics* 5: 2115-2120

Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD Jr, Brenz R, McGrath CM, Russo J, Pauley RJ, Jones RF y Brooks SC 1990. **Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10**. *Cancer Research* 50: 6075-6086

Tavares L, McDougall G, Fortalezas S, Stewart D, Ferreira R y Santos C 2012. **The neuroprotective potential of phenolic-enriched fractions from four *Juniperus* species found in Portugal**. *Food Chemistry* 135: 562-570

Taviano MF, Marino A, Trovato A, Bellinghieri V, La Barbera TM, Guvenc A, Hürkul MM, De Pasquale R y Miceli N 2011. **Antioxidant and antimicrobial activities of branches extracts of five *Juniperus* species from Turkey**. *Pharmaceutical Biology* 49: 1014-1022

Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE y Altman RB 2011. **Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects**. *Pharmacogenet Genomics* 21: 440-446

Ubatuba FB 1978. **Use of a novel colour reaction in the chromatography of 6-oxo-prostaglandin F_{1a} and related prostaglandins**. *Journal of Chromatography* 161: 165-177

Vega-Ávila E, Velasco-Lezama R y Jiménez-Estrada M 2006. **Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. Revisión**. *Bioquímica* 31: 97-111

Vichai V y Kirtikara K 2006. **Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening**. *Nature protocols* 1: 1112-1116

Villavicencio-Nieto MA, Pérez-Escandón BE, Mendoza-Pérez E y Maldonado-Lagunas V 2008. **Citotoxicidad en células Hela de extractos de tres especies de plantas medicinales de Hidalgo, México**. *Polibotánica* 26: 137-147

Weli AM, AL-Hinai JR, Al-Mjrafi JM, Alnaaimi JR, Hossain MA, Saeed S y Aktar MS 2014. **Effect of different polarities leaves crude extracts of Omani *Juniperus excelsa* on antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities and their biochemical screening.** *Asian Pacific Journal of Reproduction* 3:218-223

ANEXOS

ANEXO A

Tablas del porcentaje de crecimiento de las líneas celulares T47D, MDA-MB-231 y MCF-10A frente al tratamiento con la doxorrubicina y con los extractos orgánicos de *J. monticola* f. *monticola* y sus fracciones.

Doxorrubicina

Tabla 1. Porcentaje del crecimiento de las líneas celulares T47D, MDA-MB-231 y MCF-10A después del tratamiento con doxorrubicina.

Línea celular	% de crecimiento celular					
	0.5 μ M (0.00029 mg/mL)	1 μ M (0.00058 mg/mL)	2 μ M (0.00116 mg/mL)	3 μ M (0.00174 mg/mL)	4 μ M (0.00232 mg/mL)	5 μ M (0.0029 mg/mL)
T47D	63.34 \pm 1.14	57.93 \pm 0.42	31.95 \pm 0.9	23.41 \pm 1.34	17.41 \pm 0.74	15.87 \pm 0.84
MDA-MB-231	54.28 \pm 0.45	49.86 \pm 0.65	26.33 \pm 1.23	19.81 \pm 0.58	14.06 \pm 1.39	10.89 \pm 1.12
MCF-10A	69.31 \pm 1.25	66.25 \pm 0.64	61.67 \pm 0.65	52.64 \pm 0.42	51.11 \pm 0.64	49.58 \pm 1.27

Extracto hidroetanólico, fase acuosa y fase orgánica de *J. monticola* f. *monticola*

Tabla 2. Porcentaje del crecimiento de la línea tumoral T47D después del tratamiento con el extracto hidroetanólico, la fase acuosa y la fase orgánica de *J. monticola* f. *monticola*.

Especie vegetal	Extracto/ Fase	% de crecimiento línea celular T47D			
		2 μ g/mL	4 μ g/mL	10 μ g/mL	20 μ g/mL
<i>J. monticola</i>	Extracto hidroetanólico	82.52 \pm 0.48	81.87 \pm 1.56	81.50 \pm 1.49	81.04 \pm 1.26
	Fase acuosa	81.84 \pm 3.21	79.83 \pm 1.06	77.51 \pm 5.84	74.96 \pm 1.87
	Fase orgánica	68.97 \pm 1.41	65.67 \pm 2.79	63.39 \pm 1.62	50.03 \pm 2.81

Tabla 3. Porcentaje del crecimiento de la línea tumoral MDA-MB-231 después de ser tratada con el extracto hidroetanólico, la fase orgánica y la fase acuosa de *J. monticola*.

Especie vegetal	Extracto/ Fase	% de crecimiento línea celular MDA-MB-231			
		2 µg/mL	4 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
<i>J. monticola</i>	Extracto hidroetanólico	97.60 ± 2.15	90.16 ± 2.22	89.17 ± 3.68	83.42 ± 3.91
	Fase acuosa	93.83 ± 0.46	92.89 ± 1.51	89.38 ± 1.50	88.94 ± 1.61
	Fase orgánica	87.15 ± 3.32	83.44 ± 3.25	54.05 ± 6.05	27.97 ± 1.29

Fracciones de la fase orgánica de *J. monticola* f. *monticola*

Tabla 4. Porcentaje del crecimiento de la línea tumoral T47D después de ser tratada con seis fracciones obtenidas por cromatografía en columna de la fase orgánica de *J. monticola*:

Especie vegetal	Fracción	% de crecimiento línea celular T47D			
		2 µg/mL	4 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
<i>J. monticola</i>	7	90.59 ± 2.66	89.77 ± 1.08	87.24 ± 1.15	87.69 ± 1.54
	9	89.81 ± 3.84	73.75 ± 3.83	63.28 ± 2.35	51.10 ± 2.10
	12	51.18 ± 2.77	49.72 ± 2.26	46.02 ± 3.92	33.56 ± 1.22
	15	72.84 ± 2.67	65.24 ± 2.07	64.31 ± 2.3	29.77 ± 2.44
	18	86.96 ± 2.60	81.98 ± 1.13	81.37 ± 1.13	78.23 ± 2.26
	22	90.28 ± 2.53	89.89 ± 2.61	82.04 ± 1.69	81.89 ± 2
	25	98.62 ± 2.90	96.19 ± 1.90	95.28 ± 1.92	89.57 ± 0.78

Tabla 5. Porcentaje del crecimiento de la línea tumoral MDA-MB-231 después de ser tratada con seis fracciones obtenidas por cromatografía en columna de la fase orgánica de *J. monticola*.

Especie vegetal	Fracción	% de crecimiento línea celular MDA-MB-231			
		2 µg/mL	4 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
<i>J. monticola</i>	7	90.15±1.17	88.99±1.24	88.39±1.50	86.69±1.02
	9	64.36±1.36	63.20±3.37	61.08±1.46	58.29±2.55
	12	48.12±1.88	36.39±2.43	33.45±2.50	32.16±2.21
	15	44.05±1.11	41.44±3.02	36.05±1.54	0.03±0.4
	18	86.59±2.30	79.16±2.26	78.31±1.38	72.45±2.40
	22	97.03±2.70	96.37±3.62	90.21±1.48	83.70±2.86
	25	89.90±2.97	79.92±1.22	70.99±1.59	67.06±1.77

Extracto de acetona

Tabla 6. Porcentaje del crecimiento de las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231 después de ser tratadas con el extracto de acetona de *J. monticola*:

Especie vegetal	Línea celular	% de crecimiento celular			
		2 µg/mL	4 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
<i>J. monticola</i>	T47D	90.70±1.15	87.18±1.86	83.45±2.67	46.30±1.82
	MDA-MB-231	89.55±1.08	76.38±1.33	48.45±2.47	39.79±1.33

Fracciones del extracto de acetona

Tabla 7. Porcentaje del crecimiento de la línea tumoral T47D después de ser tratada con seis fracciones del extracto de acetona y el sólido 5 (II) de *J. monticola*.

Especie vegetal	Fracción	% de crecimiento línea celular T47D			
		2 µg/mL	4 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
<i>J. monticola</i>	2	94.10±2.59	91.93±1.23	82.10±1.23	72.27±1.56
	5	99.09±2.75	96.48±1.11	92.90±1.30	87.13±1.04
	Sólido 5(II)	95.72±2.81	92.63±1.16	89.59±2.55	86.67±1.12
	6	89.97±1.59	83.28±1.90	79.94±1.56	57.52±1.12
	9	99.02±1.33	96.48±1.55	93.93±1.33	88.66±1.22
	13	96.27±1.60	91.33±1.86	89.10±1.35	72.82±1.95
	20	98.43±2.89	94.91±1.33	92.57±1.22	88.66±1.22

Tabla 8. Porcentaje del crecimiento de la línea tumoral MDA-MB-231 después de ser tratada con seis fracciones del extracto de acetona y el sólido 5 (II) de *J. monticola*:

Especie vegetal	Fracción	% de crecimiento línea celular MDA-MB-231			
		2 µg/mL	4 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
<i>J. monticola</i>	2	95.70±1.61	90.38±1.28	88.13±1.94	76.48±1.54
	5	98.44±1.50	95.90±1.38	87.37±1.99	80.84±1.57
	Sólido 5(II)	99.47±2.39	93.41±1.07	88.31±2.67	80.28±2.84
	6	99.18±1.35	97.34±1.27	94.47±1.61	82.00±1.70
	9	98.78±2.60	91.05±1.86	89.02±2.60	86.99±1.70
	13	98.8±1.69	91.02±1.52	79.40±1.75	71.31±2.83
	20	98.8±2.61	94.91±1.53	91.86±3.35	85.16±2.93

Extracto de hexano

Tabla 9. Porcentaje del crecimiento de las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231 después de ser tratadas con el extracto de hexano de *J. monticola*.

Especie vegetal	Línea celular	% de crecimiento celular			
		2 µg/mL	4 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
<i>J. monticola</i>	T47D	99.10±1.93	97.79±1.91	96.24±1.62	87.02±1.53
	MDA-MB-231	91.11±1.36	87.91±1.05	85.86±2.85	84.08±1.03

Extracto de AcOEt

Tabla 10. Porcentaje del crecimiento de las líneas tumorales T47D y MDA-MB-231 después de ser tratadas con el extracto de acetato de etilo de *J. monticola*.

Especie vegetal	Línea celular	% de crecimiento celular			
		2 µg/MI	4 µg/mL	10 µg/MI	20 µg/MI
<i>J. monticola</i>	T47D	83.04±1.51	38.78±1.22	29.8±1.94	24.71±1.64
	MDA-MB-231	87.52±1.49	83.71±1.1	28.35±1.56	17.73±1.98

Extractos y fracciones evaluados en la línea MCF-10A

Tabla 11. Porcentaje del crecimiento de la línea no-tumorigénica MCF-10A después de ser tratada con extractos y fracciones de *J. monticola* que presentaron actividad contra líneas tumorales humanas.

Especie vegetal	Extracto/ Fracción	% de crecimiento línea celular MCF-10A			
		2 µg/mL	4 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
<i>J. monticola</i>	Fase orgánica (AcOEt)	98.06±2.52	92.22±2.38	84.71±1.14	61.39±2.81
	Extracto de AcOEt	94.85±0.91	79.20±1.05	77.29±1.66	59.46±1.92
	Extracto de acetona	98.82±2.81	89.98±1.77	87.42±1.85	78.6±1.34
	Fracción 9	98.81±1.86	90.69±1.23	85.40±1.91	83.42±1.91
	Fracción 12	98.28±1.53	87.74±1.007	84.65±1.99	72.67±1.15
	Fracción 15	99.13±2.28	93.42±1.77	91.56±1.83	82.18±1.65

ANEXO B

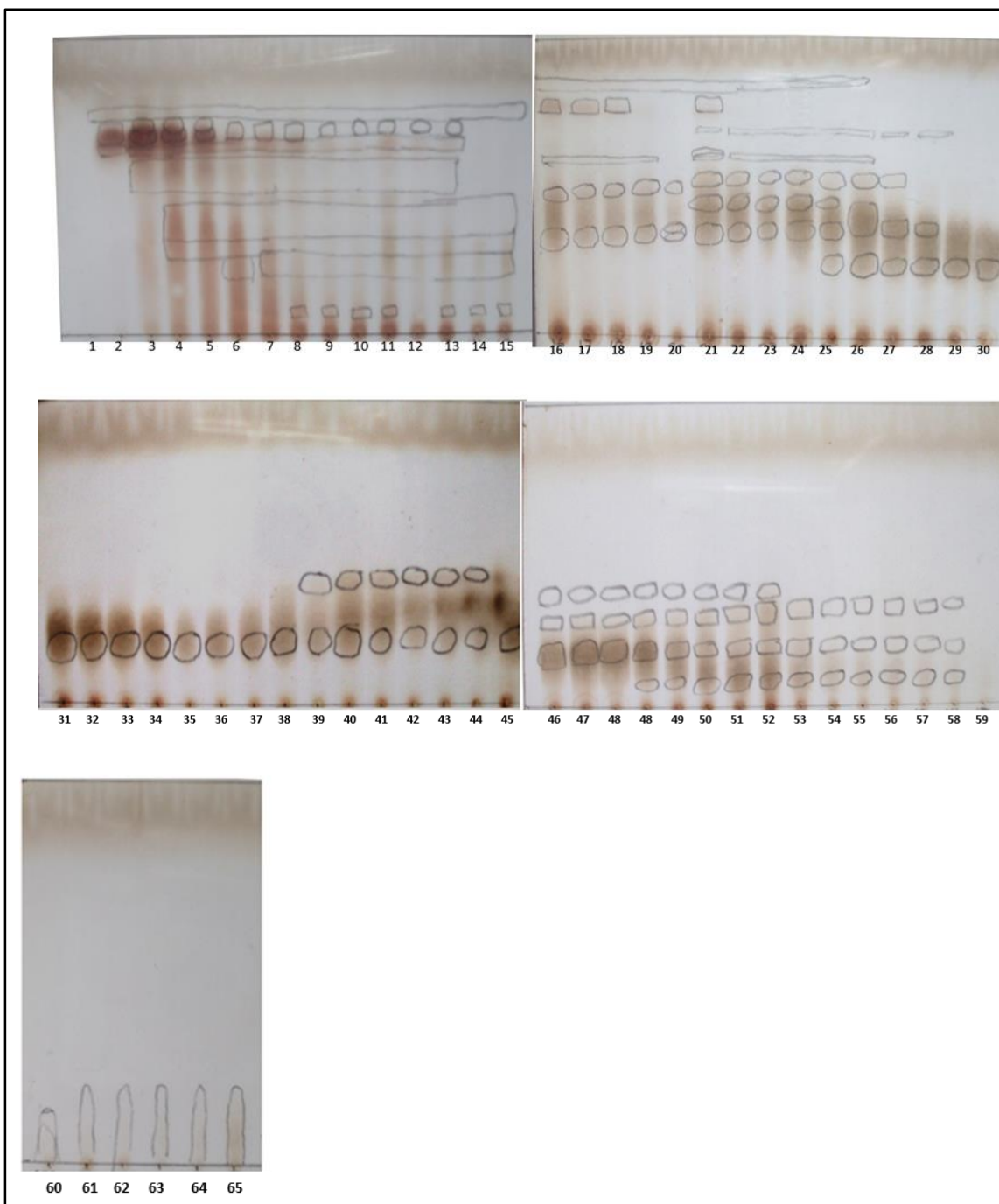


Figura 1. CCF del fraccionamiento de 2 g de la fase orgánica de *J. monticola*. La fracción 2 presenta al compuesto 1. Sistema de elución en las fracciones: acoet:MeOH 9:1

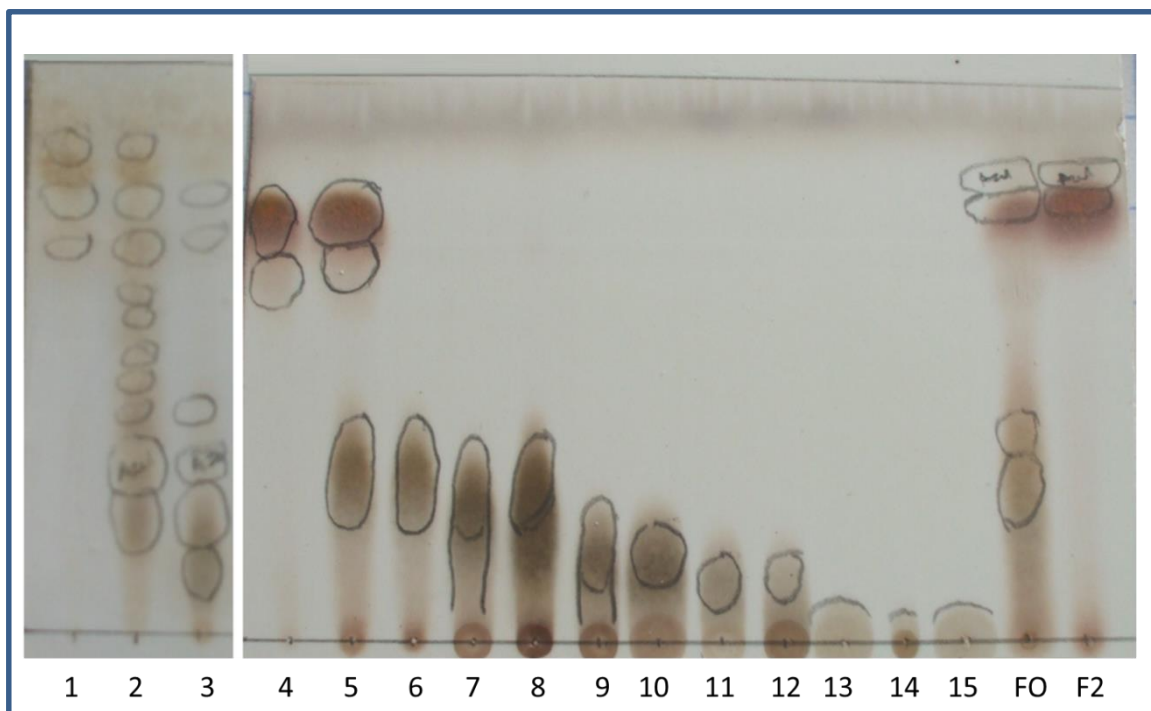
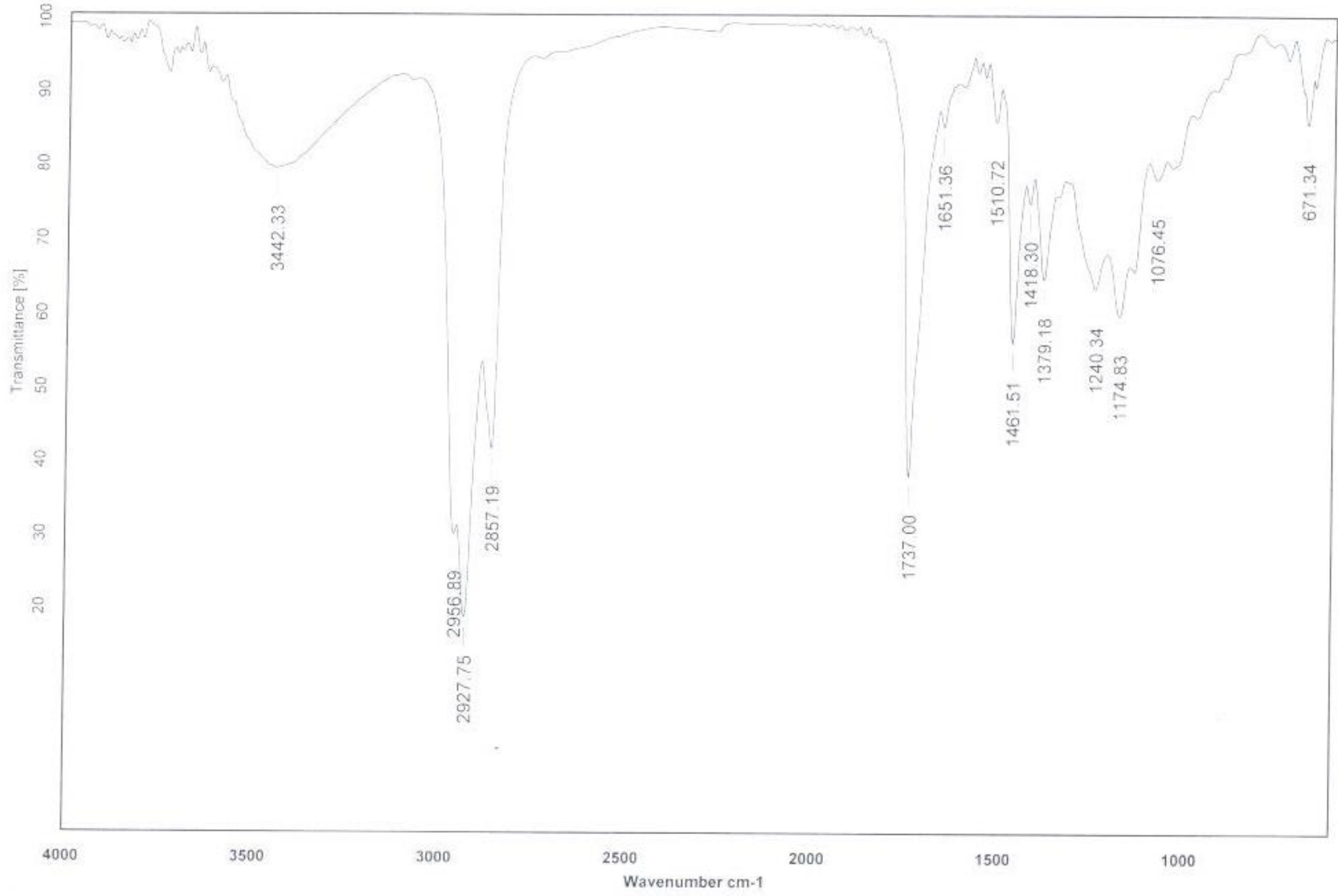


Figura 2. CCF del fraccionamiento de 10 g de la fase orgánica de *J. monticola*. En la fracción 4 se encuentra el compuesto 1. FO: Fase orgánica total; F2: Fracción 2 de la cromatografía en columna de la figura 1. Sistema de elución: fracciones 1-3 hex:acoet 6:4, fracciones 4-15 acoet:MeOH.

ANEXO C1
 IR de la Fracción 12
 Película

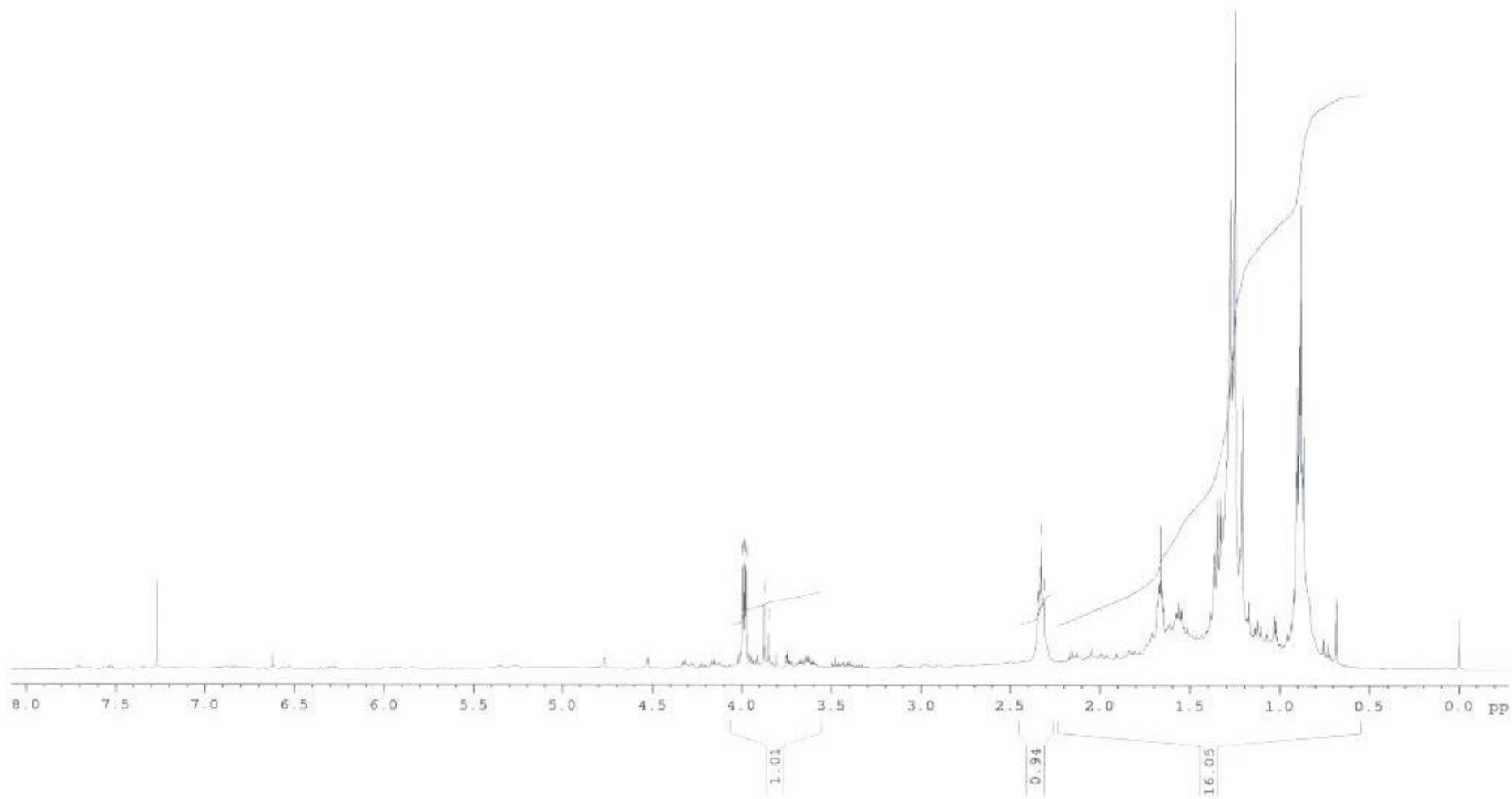


ANEXO C2
 ^1H RMN de la Fracción 12
Disolvente: CDCl_3
Bruker Avance 400 MHz

3.995
3.989
3.981
3.975
3.874
3.848

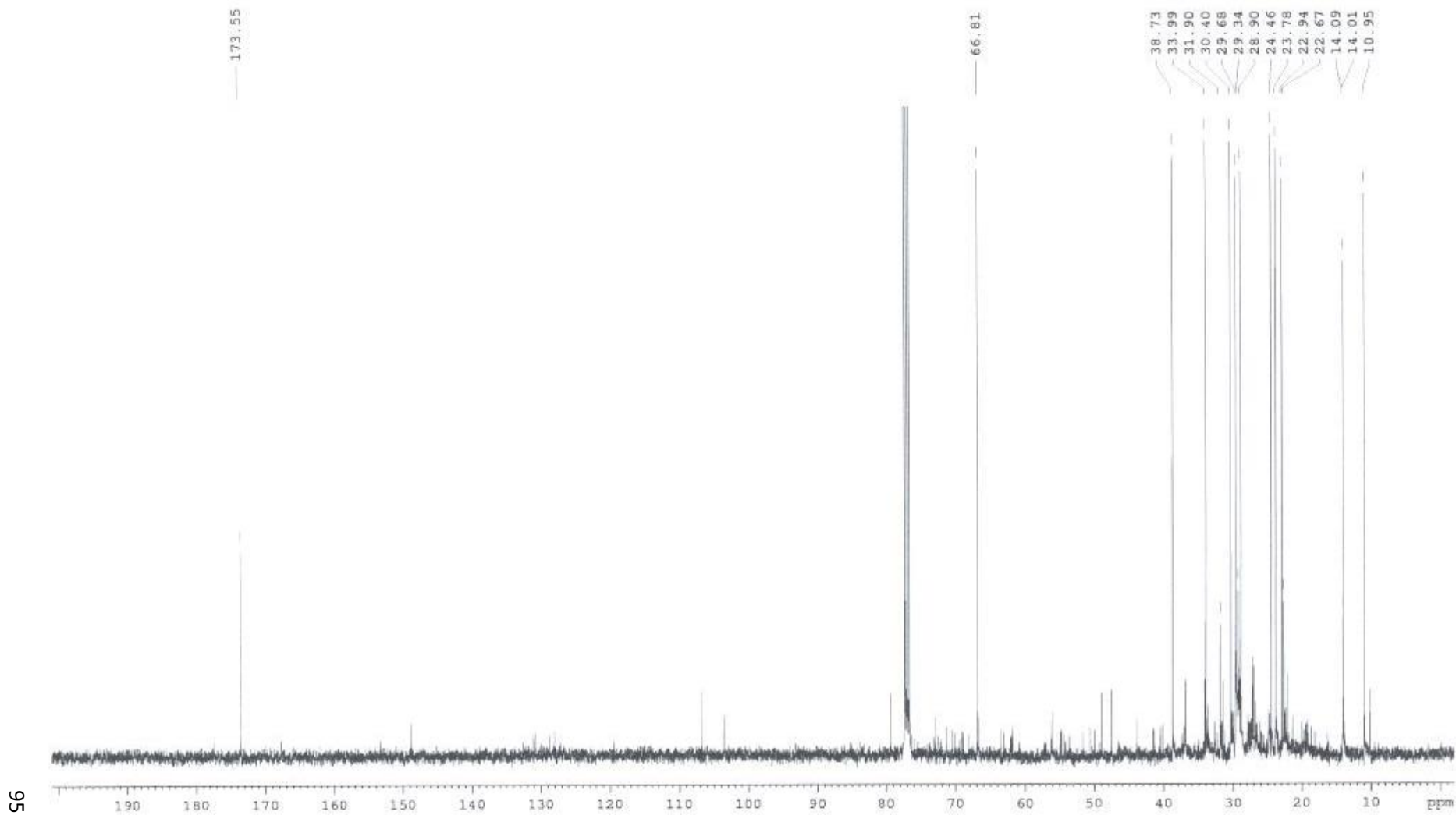
2.346
2.336
2.329
2.311

94



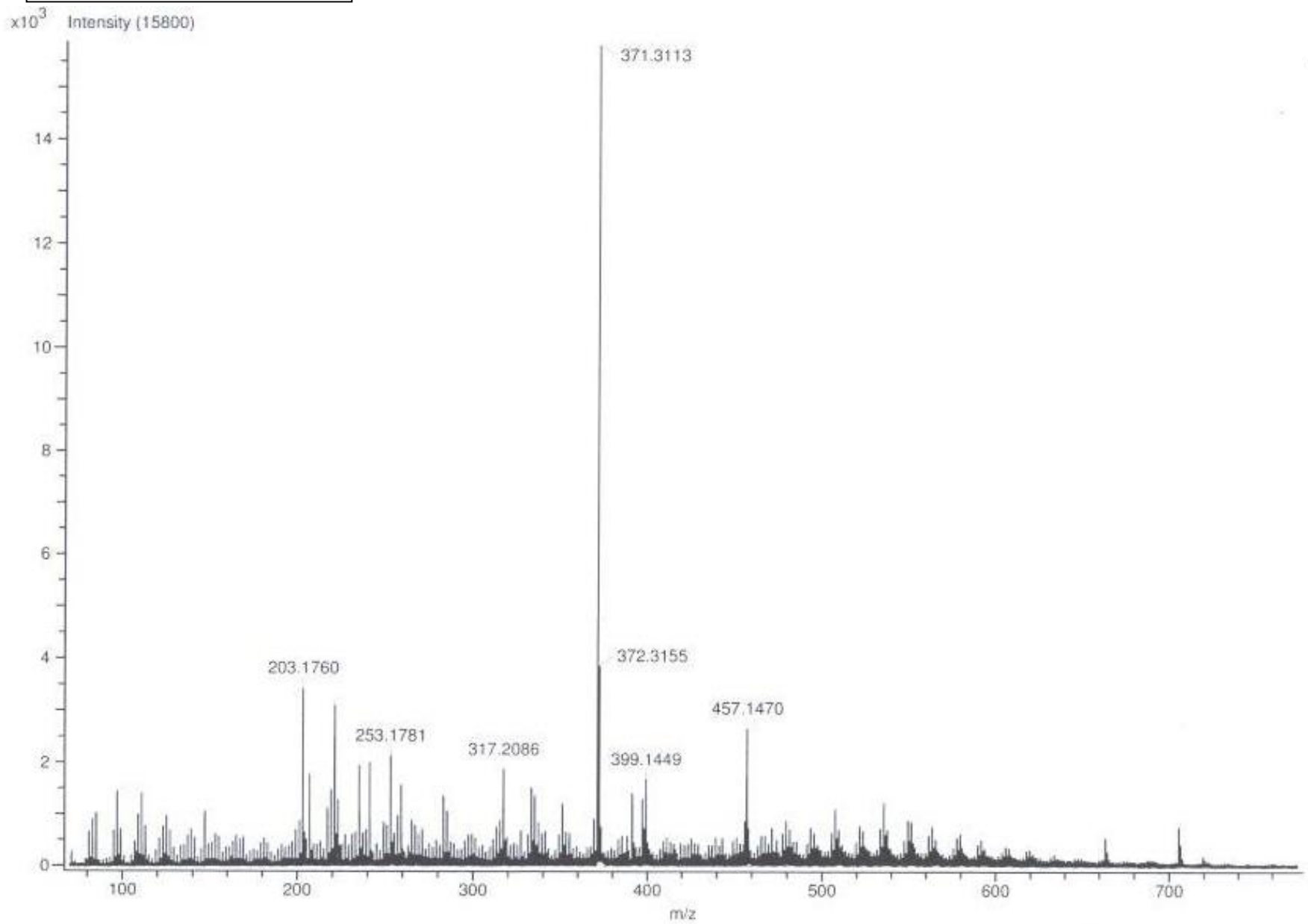
ANEXO C3

^{13}C RMN de la Fracción 12
Disolvente: CDCl_3
Bruker Avance 300 MHz (J)



ANEXO C4

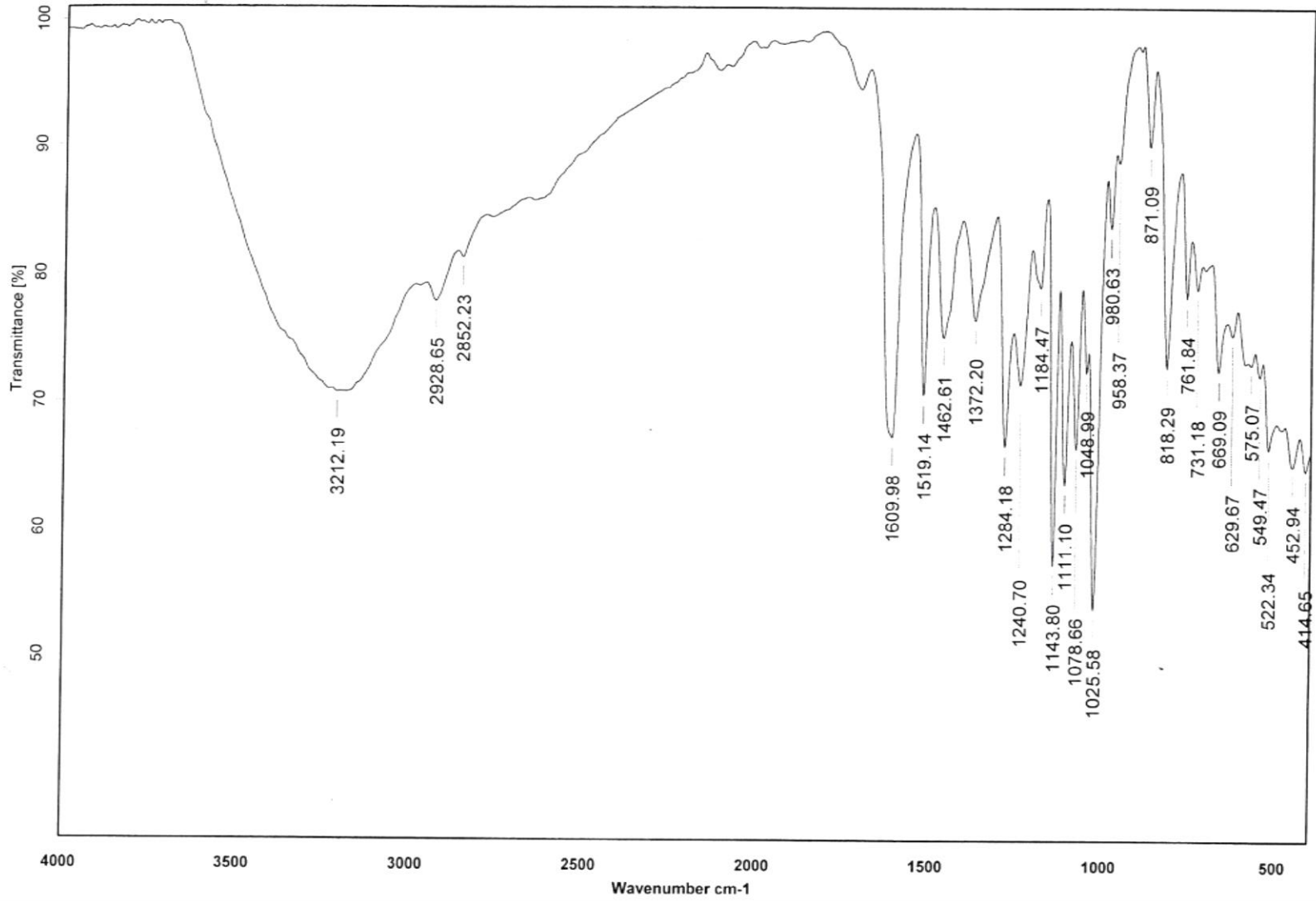
EM de la fracción 12



ANEXO D1

IR de la Fracción 18

KBr/pastilla

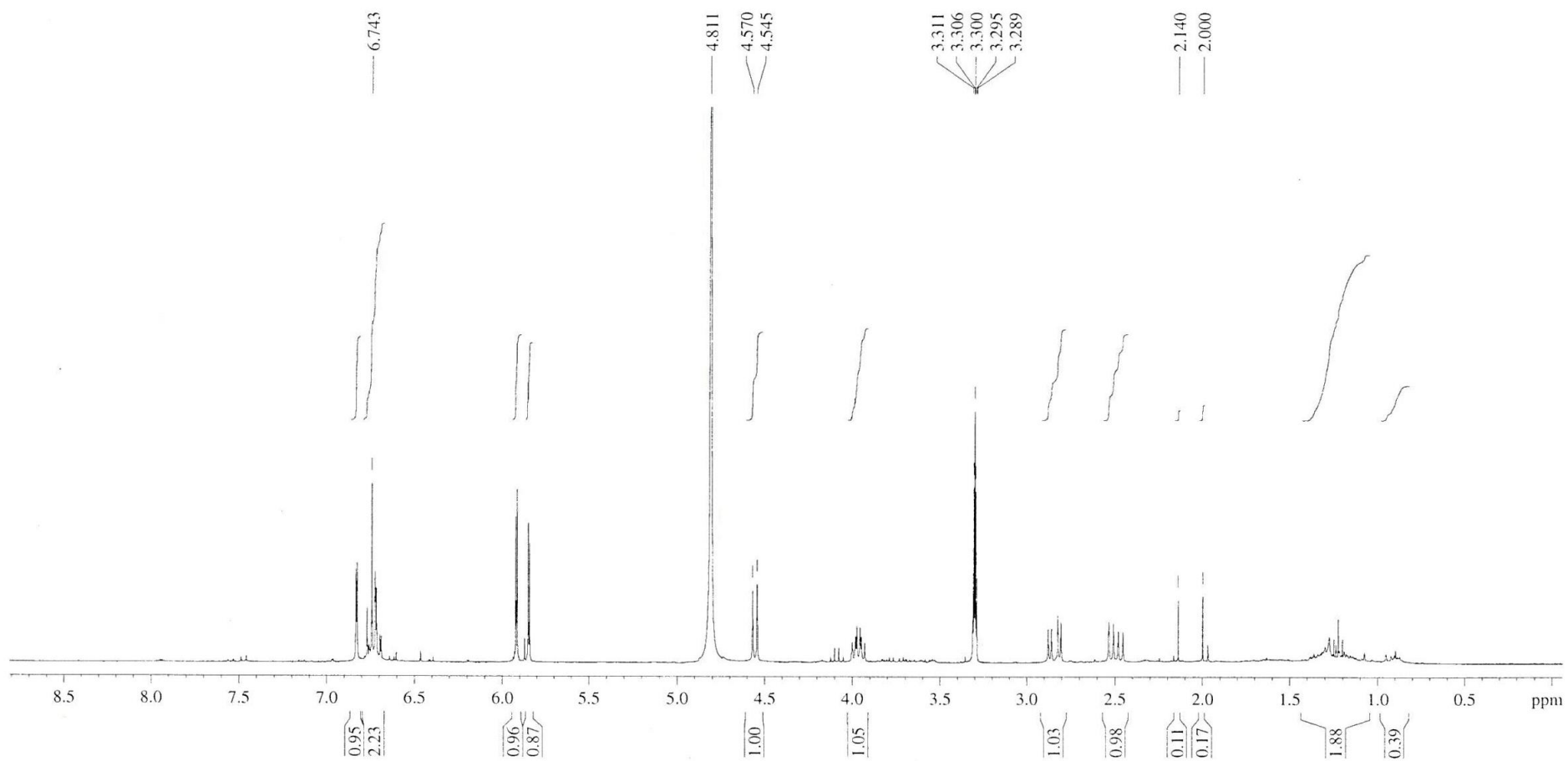


ANEXO D2

^1H RMN de la Fracción 18

Disolvente: C_3OD

Bruker Avance 300 MHz (J)

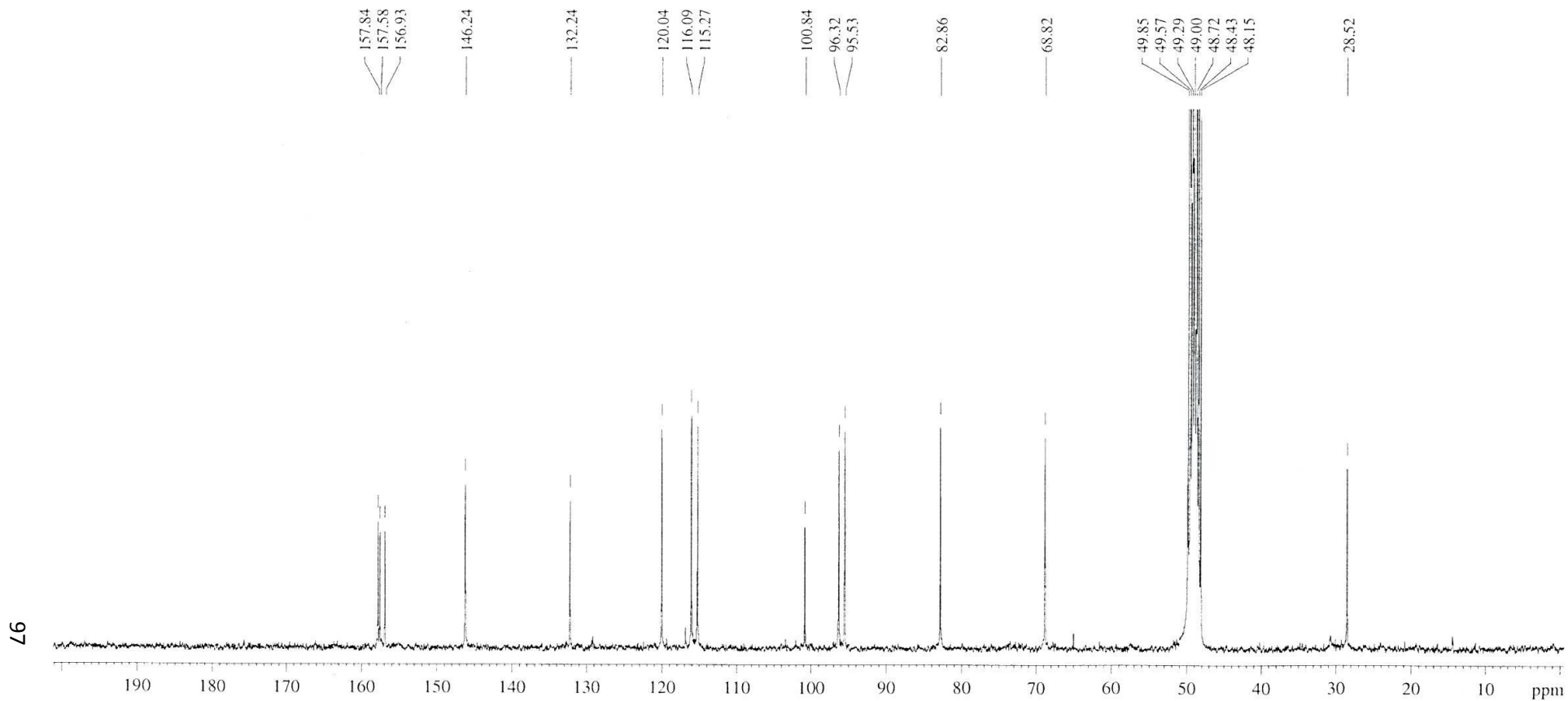


ANEXO D3

^{13}C RMN de la Fracción 18

Disolvente: CD_3CD

Bruker Avance 300 MHz (J)

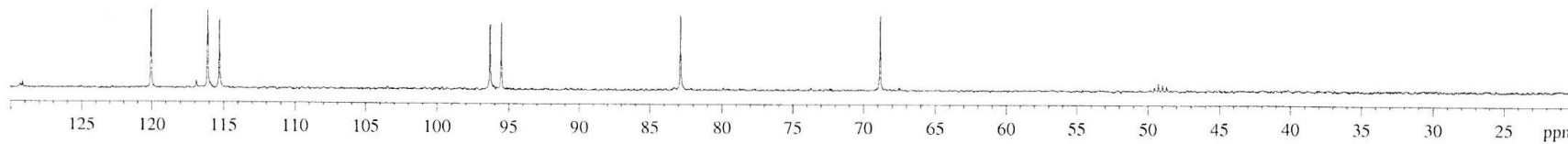
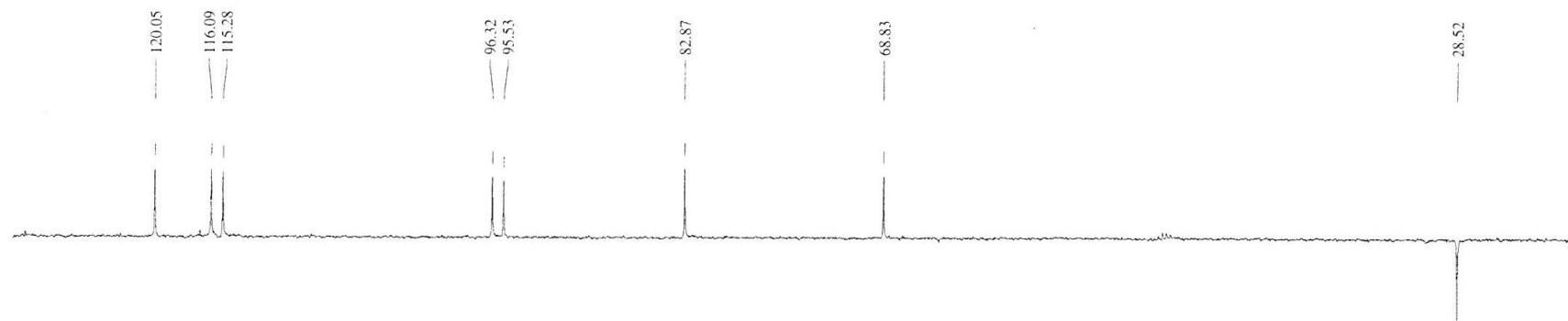


ANEXO D4

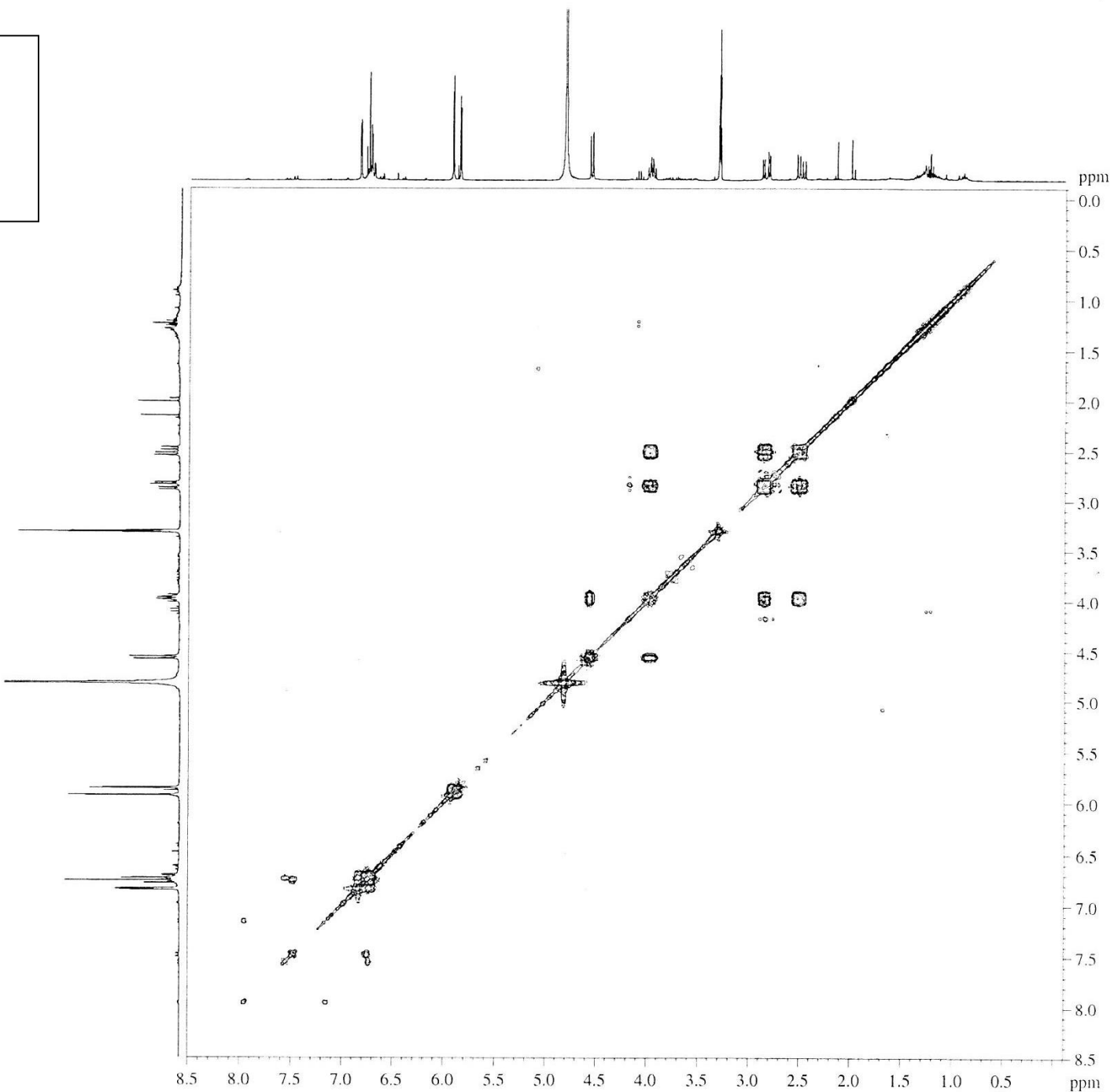
DEPT de la Fracción 18

Disolvente: CD₃OD

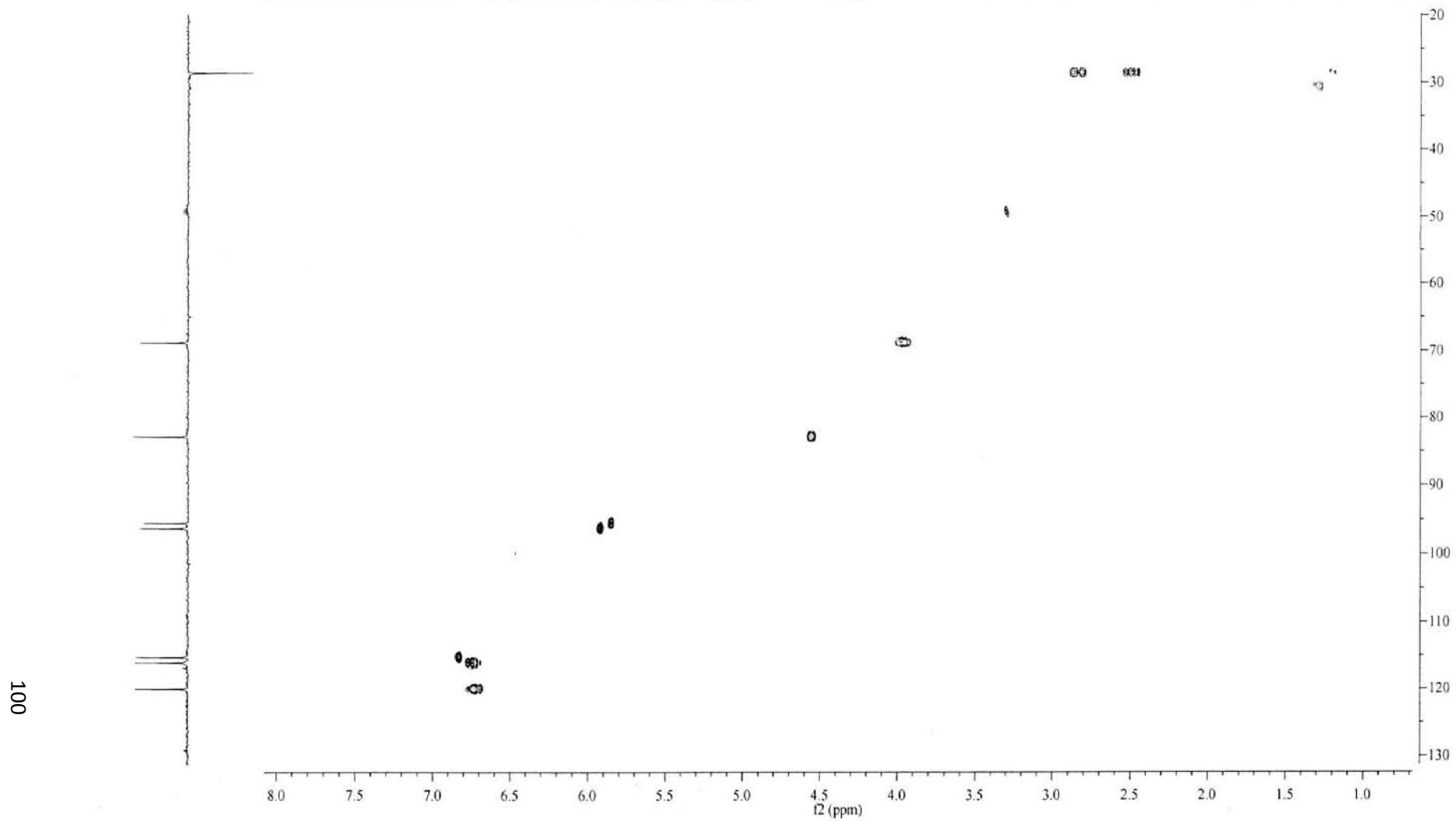
Bruker Avance 300 MHz (J)



ANEXO D5
COSY de la Fracción 18
Disolvente: CD₃OD
Bruker Avance 300 MHz (J)



ANEXO D6
HSQC de la Fracción 18
Disolvente: CD₃OD
Bruker Avance 300 MHz (J)

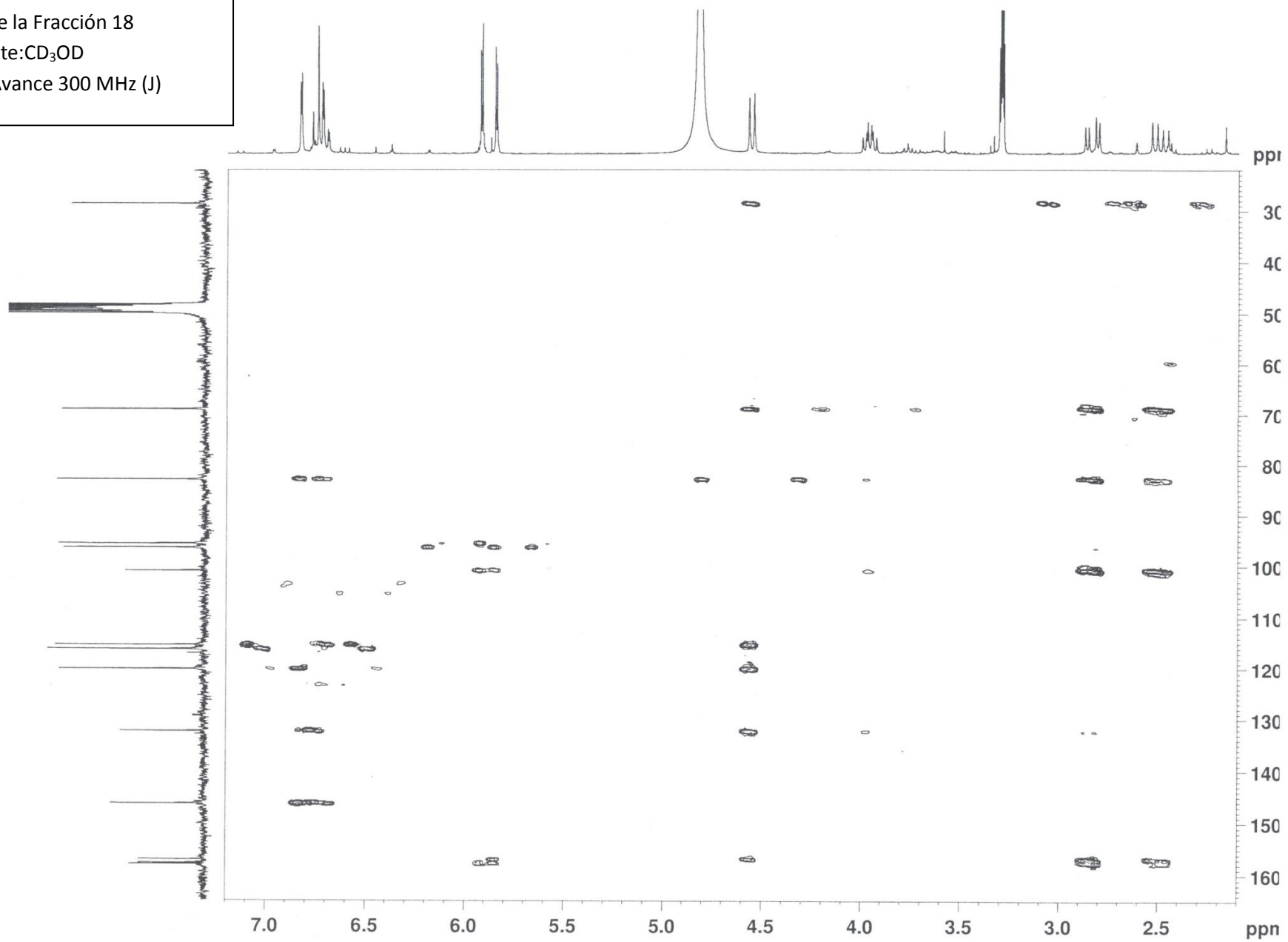


ANEXO D7

HMBC de la Fracción 18

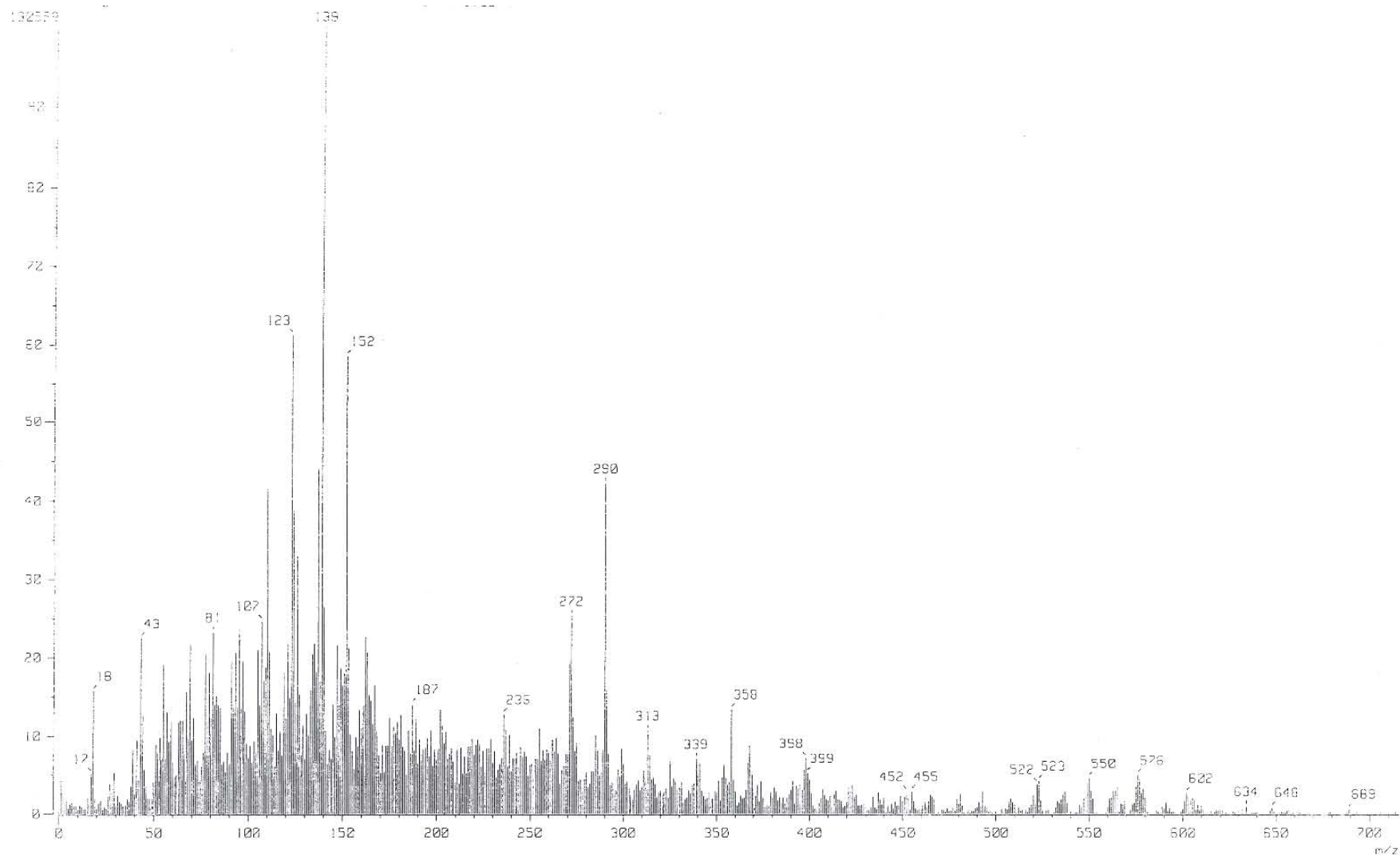
Disolvente: CD₃OD

Bruker Avance 300 MHz (J)



ANEXO D8

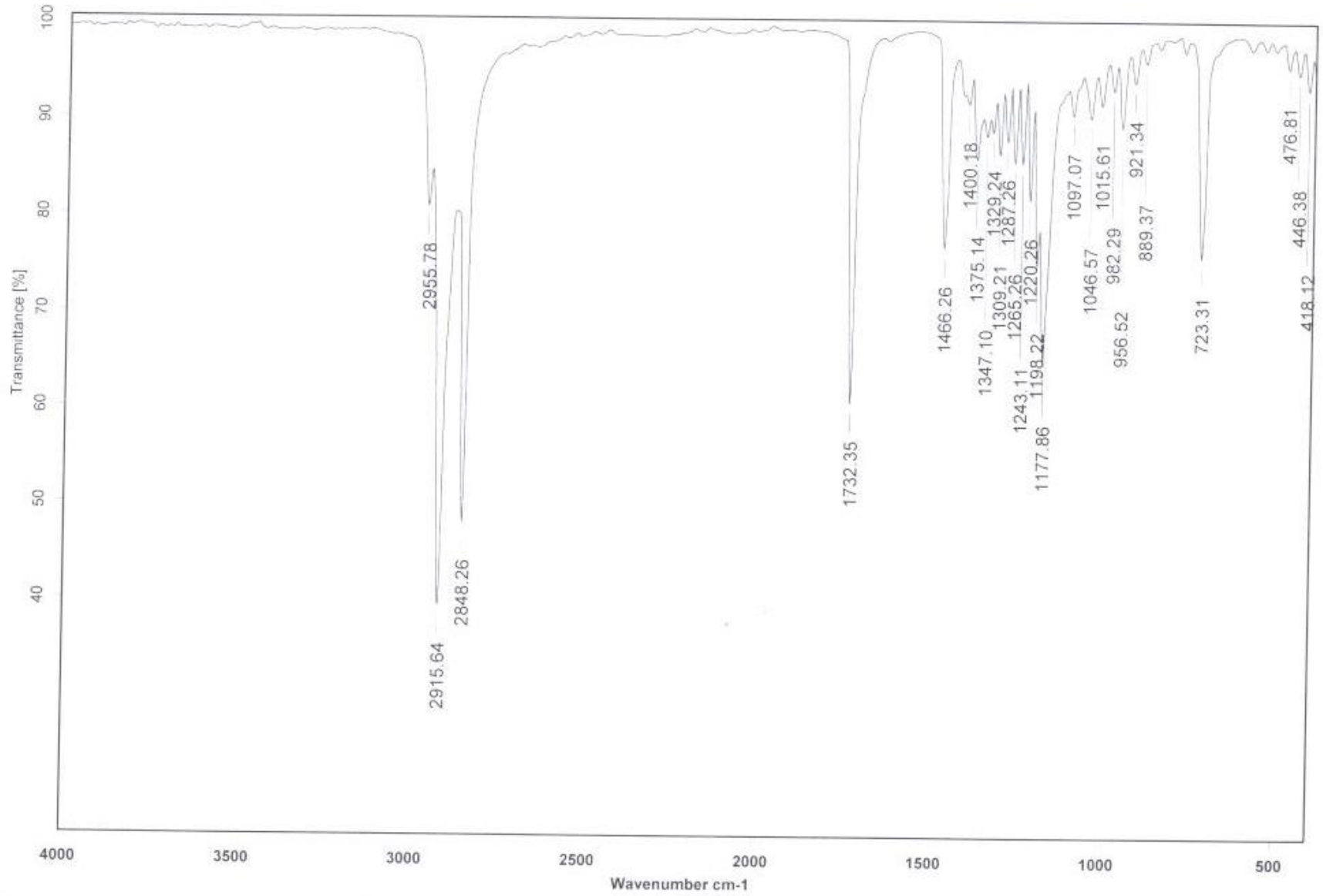
EM de la fracción 18



ANEXO E1

IR del sólido 5(II)

KBr/pastilla

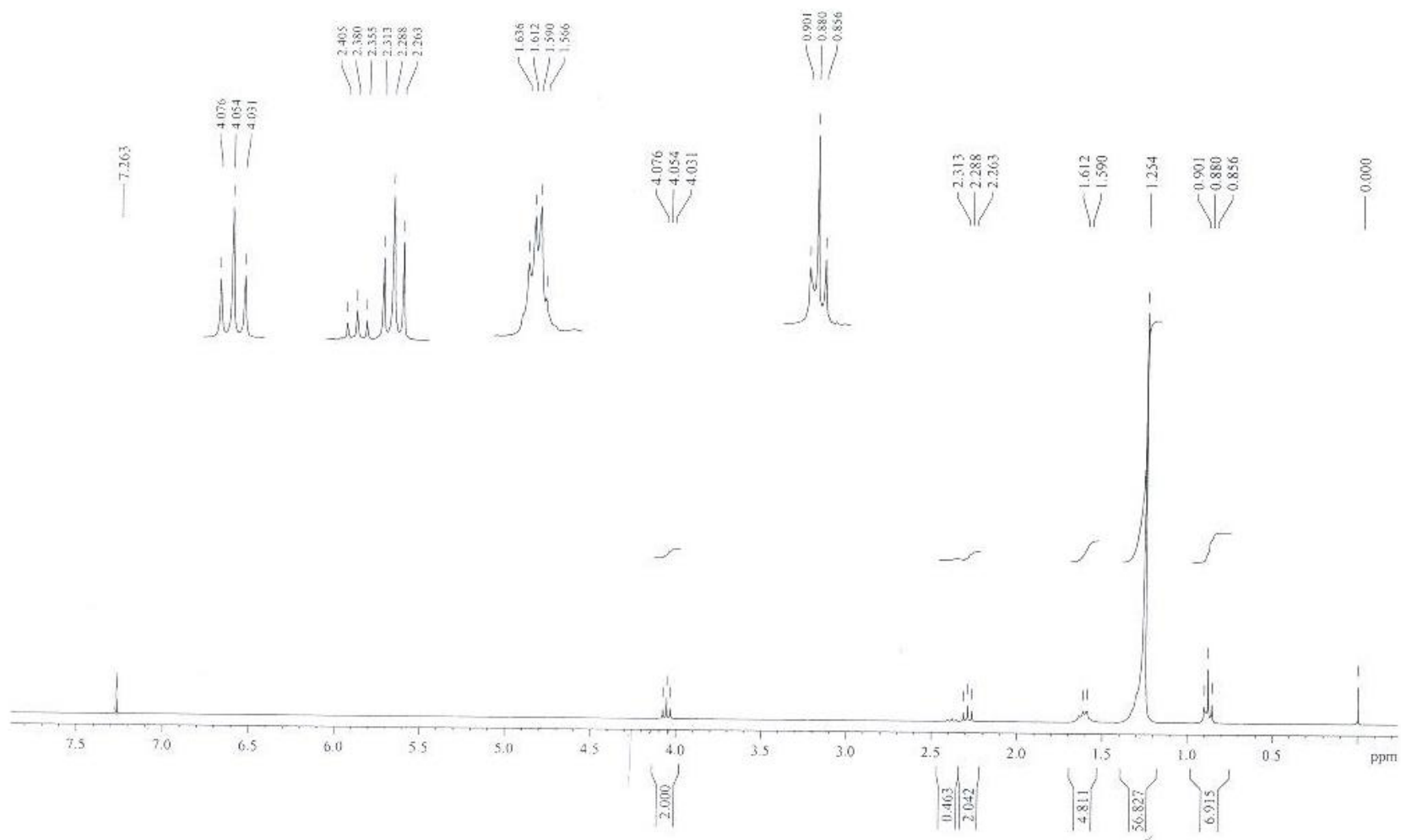


ANEXO E2

^1H RMN del sólido 5(II)

Disolvente: CDCl_3

Bruker Avance 300 MHz (F)

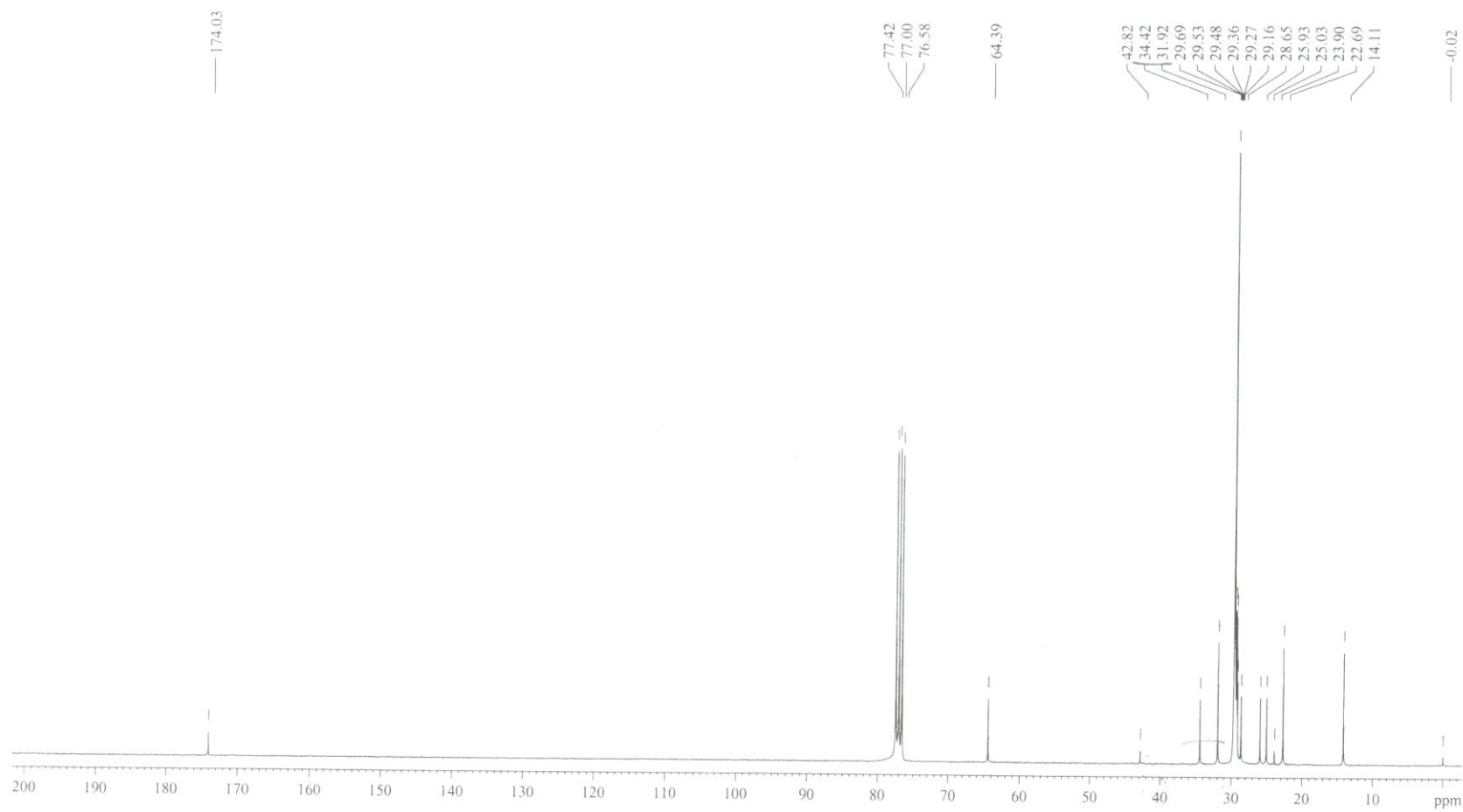


ANEXO E3

^{13}C RMN del sólido 5(II)

Disolvente: CDCl_3

Bruker Avance 300 MHz (F)



ANEXO E4

EM del sólido 5(II)

