



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOMEDICINA

“Actividad antiproliferativa y antiinflamatoria del derivado 7-O- β -D-tetraacetilglucopiranosil de acetina”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

María del Carmen Juárez Vázquez

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DR. LUIS HERRERA MONTALVO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. MARZO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOMEDICINA

“Actividad antiproliferativa y antiinflamatoria del derivado 7-O- β -D-tetraacetilglucopiranosil de acetina”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

María del Carmen Juárez Vázquez

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DR. LUIS HERRERA MONTALVO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. MARZO, 2016



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

OFICIO FCIE/DEP/029/16

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 **19 de octubre de 2015** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del (la) alumno (a) **JUÁREZ VÁZQUEZ MARÍA DEL CARMEN** con número de cuenta **407060874** con la tesis titulada "**Actividad antiproliferativa y antiinflamatoria del derivado 7-O-β-D-tetraacetilglucopiranosil de acetina**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ**:

Presidente: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA
Vocal: DR. ÁNGEL JOSABAD ALONSO CASTRO
Secretario: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Suplente: DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA
Suplente: DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de enero de 2016

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



MCAA/MJFM/ASR/ipp

Agradecimientos

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM** porque me ha permitido formarme académicamente.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca que me fue asignada para realizar mis estudios.

A mi tutor principal el **Dr. Mariano Martínez Vázquez**, por sus consejos, la confianza y el apoyo incondicional recibido durante la realización de este trabajo de investigación ¡Gracias!

A los integrantes del comité tutor el **Dr. Alejandro Zentella Dehesa** y el **Dr. Luis Herrera Montalvo**, por contribuir con sus observaciones al mejoramiento del trabajo.

Agradecimientos académicos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**

Al **Instituto de Química, UNAM** por permitirme formar parte de un grupo de profesionistas.

A la **M. en C. Teresa Ramírez Apan** y al **M. en C. Antonio Nieto Camacho**, les agradezco su contribución y apoyo técnico en este trabajo.

Al **Dr. Alejandro García Carrancá**, por su confianza y permitirme integrarme a su grupo de trabajo del laboratorio de “Virus y Cáncer” del **Instituto Nacional de Cancerología (INCan)**.

Al **Dr. Ángel Josabad Alonso Castro** por su consejo académico y el apoyo recibido, gracias por su valiosa amistad.

Al **M. en C. Heriberto A. Valencia González**, por compartir conocimiento, consejo y amistad incondicional.

A la **M. en C. Graciela Ruíz R.** y **M. en C. Alejandra García**, agradezco sus observaciones objetivas, el apoyo y su invaluable amistad.

A los **miembros del Jurado** el Dr. Alejandro García Carrancá, Dr. Ángel Josabad Alonso Castro, Dr. Alejandro Zentella Dehesa, Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera, Dr. Manuel Jiménez Estrada, gracias por sus observaciones.

Agradezco también:

A mis estimados amigos del Instituto de Química, INCan y a todos aquellos con los que he compartido grandes aventuras y risas.

A mis queridos padres **Isabel Vázquez**, **Mateo Juárez** y hermano **Israel Juárez** con amor y respeto por su esfuerzo y dedicación, gracias por las oportunidades.

A mis padres y hermano

Esta Tesis fue realizada en el **Instituto de Química, UNAM** el Laboratorio 1-4 del Departamento de Productos Naturales

El trabajo realizado en esta tesis ha contribuido con los siguientes trabajos:

-Participación modalidad cartel, en el Simposio Interno en Homenaje al Dr. Alfonso Romo de Vivar con el tema “Actividad antiproliferativa *in vitro* de la 7-O- β -(2'',3'',4'',6'',5-pentoacetil) glucopiranosil acacetina, llevado a cabo el 29 de Enero de 2014 en el Instituto de Química, UNAM.

-Participación en el modalidad cartel, I Congreso Centroamericano de Productos Naturales Medicinales con el tema “Actividad citotóxica y antiinflamatoria de los derivados acetilados del glucosido tilianina”, llevado a cabo el 21-22 de Abril de 2015 en la Universidad Galileo, Guatemala.

-Participación modalidad cartel, en el Simposio Interno del Instituto de Química con el tema “Actividad citotóxica y antiinflamatoria de los derivados Penta-acetil y Tetra-acetil tilianina”, llevado a cabo el 8-10 de Junio de 2015 en el Instituto de Química, UNAM.

Índice General

Índice de figuras	III
Abreviaturas	IV
Resumen.....	VI
Abstract	VII
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Inflamación	3
2.1.1. Inflamación crónica y cáncer	3
2.1.2. Tratamiento farmacológico en la inflamación	6
2.2. Características químicas de los flavonoides y glicósidos de flavona	8
2.2.1. Glicósidos de Flavona: Actividad en sistema inmune y cáncer.....	9
2.3. Estudios etnobotánicos de <i>Agastache mexicana</i>	11
2.3.1. Constitución química de <i>A. mexicana</i> subsp. <i>mexicana</i>	12
2.3.2. Actividad Biológica de 7-O-β-D-glucopiranosil acetina (tilianina).....	13
2.4. Estrategias para evaluar la actividad antiinflamatoria	14
2.4.1. 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA)	14
2.4.2. Mieloperoxidasa	15
2.5. Estrategia para evaluar la actividad antiproliferativa.....	15
2.5.1. Sulforodamina B (SRB)	15
3. Hipótesis.....	16
4. Objetivo general	16
5. Justificación	17
6. Materiales y Métodos	18
6.1. Colecta e identificación del material vegetal	18
6.2. Obtención de la tilianina a partir del extracto de metanol de <i>Agastache mexicana</i> subsp. <i>mexicana</i>	18
6.3. Derivados acetilados de la tilianina	19
6.3.1. Purificación de los derivados acetilados del glucósido de flavona tilianina	19
6.4. Análisis espectroscópicos y espectrométricos	20
6.5. Pruebas biológicas	21
6.5.1. Ensayo de sulforodamina B (SRB) para la evaluación de la actividad antiproliferativa	21

6.5.2. Evaluación del efecto antiinflamatorio TPA. Modelo edema auricular en ratón.....	22
6.5.3. Ensayo de inhibición de actividad de la mieloperoxidasa (MPO).....	23
7. Resultados	24
7.1. Identificación de la tilianina (7-O-β-D-glucopiranosil de acetina)	24
7.2. Identificación de 7-O-β-D-pentoacetil glucopiranosil de acetina (2).....	24
7.3. Identificación de 7-O-β-D-tetraacetilglucopiranosil de acetina (1)	25
7.4. Resultados de Pruebas Biológicas	26
7.4.1. Ensayo de sulforodamina B (SRB) para la evaluación de la actividad antiproliferativa	26
7.4.2. Efecto antiinflamatorio del derivado 1 en el modelo auricular de ratón inducido por TPA a 4 h.	26
7.4.3. Inhibición de la Actividad enzimática de la MPO en la inflamación inducida por TPA a 4 h.	27
8. Discusión.....	30
9. Conclusión	32
10. Referencias	33
11. ANEXOS.....	42

Índice de figuras

Figura 1. Estructura básica de los flavonoides..	8
Figura 2. Glicosidos de flavona aislados de plantas medicinales	10
Figura 3. <i>Agastache mexicana subsp. mexicana</i> “Toronjil morado” y <i>Agastache mexicana subsp. xolocotziana</i> “Toronjil Blanco.....	12
Figura 4. Tilianina (7-O-β-D-glucopiranosil de acetina)	13
Figura 5. Proceso de obtención de tilianina a partir del extracto MeOH	18
Figura 6. Obtención de los derivados acetilados del glucósido de flavona tilianina.....	20
Figura 7. Efecto antiinflamatorio en el modelo auricular inducido por TPA a 4 h.....	28
Figura 8. Inhibición de la Actividad enzimática de la MPO en la inflamación inducida por TPA a 4 h..	29
.....	
Figura 9. Estructura química del derivado acetilado 7-O-β-D tetraacetilglucopiranosil de acetina (1)	31

Abreviaturas

- **AcOEt:** Acetato de Etilo
- **AINEs:** Antinflamatorios no esteroideos
- **Bcl-2:** Gen del linfoma de células B, (del inglés, B-cell lymphoma 2)
- **CDCl₃:** Cloroformo deuterado
- **CDDP:** Cisplatino
- **Cdk1:** Quinasa dependiente de ciclina 1 (del inglés, Cyclin-dependent kinase 1)
- **COX-2:** Ciclooxygenasa 2
- **D.E:** Desviación estándar
- **DMSO-d₆:** dimetilsulfóxido deuterado
- **DO:** Densidad Óptica
- **GMPc:** Guanosín monofosfato cíclico, (del inglés, guanosine monophosphate cyclique)
- **H₂O₂:** Peróxido de hidrógeno
- **HOCL:** Ácido hipocloroso
- **Hz:** Hertz
- **ICAM-1:** molécula de adhesión (del inglés, Intercellular Adhesion Molecule 1)
- **IFN-γ:** Interferón gamma
- **IL:** Interleucina
- **iNOS:** Óxido nítrico sintasa (del inglés, Nitric oxide synthase)
- **LDL:** lipoproteína de baja densidad, (del inglés Low-density lipoprotein)
- **LPS:** Lipopolisacáridos
- **MeOH:** Metanol
- **MIP-2:** proteína inflamatoria de macrófagos (del inglés, Macrophage inflammatory protein 2)
- **MPO:** Mieloperoxidasa
- **NF-κB:** Factor nuclear kappa B (del inglés, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
- **ON:** Óxido Nítrico
- **PGs:** Prostaglandinas

- **PKC**: proteína quinasa C (del inglés, protein kinase C)
- **PMN**: Linfocito polimorfonuclear (del inglés, polymorphonuclear leukocytes)
- **RMN**: Resonancia Magnética Nuclear
- **ROS**: Especies reactivas de oxígeno (del inglés, reactive oxygen species)
- **SRB**: Sulforodamina B
- **TNF- α** : Factor de Necrosis Tumoral Alfa (del inglés, Tumor necrosis factor alpha)
- **TPA**: 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato
- **VCAM-1**: Molécula de adhesión vascular (del inglés, vascular cell adhesion molecule 1)

Resumen

En México la planta medicinal *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* (Lamiaceae) conocida como "toronjil morado", es utilizada empíricamente para tratar algunos padecimientos como son los gastrointestinales, hipertensión, ansiedad, insomnio y fiebre. Nuestros estudios previos demostraron que los glicósidos: 7-O- β -glucopiranosil de acetina (tilianina) y (2-O-acetil)-7-O- β -glucopiranosil de acetina, son los metabolitos secundarios mayoritarios en los extractos polares del toronjil morado.

Como parte de nuestra búsqueda sistemática de nuevas moléculas de origen vegetal como probables agentes antiproliferativos y antiinflamatorios decidimos realizar una reacción de acetilación de tilianina. De ésta reacción se obtuvieron la 7-O- β -D-tetraacetilglucopiranosil de acetina (**1**) y la 7-O- β -D-pentoacetil glucopiranosil de acetina (**2**).

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la inhibición de proliferación del derivado **1** en líneas celulares de cáncer humano por el método de sulforrodamina B (SRB) a 48 h. Así como determinar la actividad antiinflamatoria de **1** en el modelo de edema inducido por 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA) en la oreja de ratón a 4 h y evaluar la inhibición de la actividad de la mieloperoxidasa (MPO).

Nuestros resultados mostraron que **1** posee selectividad en la actividad antiproliferativa para la línea celular PC-3 con una CI_{50} de $8.15 \pm 1.5 \mu M$ y para HCT-15 con una CI_{50} de $36.93 \pm 0.6 \mu M$.

También nuestros hallazgos mostraron que **1** posee actividad antiinflamatoria con un CI_{50} de $0.31 \mu M$, evaluado en el modelo de edema inducido por TPA e induce una reducción en la actividad enzimática de MPO.

Tomando en cuenta que la tilianina mostró actividades antiproliferativas y antiinflamatorias muy pobres entonces es factible suponer que el cambio de polaridad en el derivado **1** sea la responsable de las potentes actividades de éste derivado acetilado.

Abstract

In Mexico the herb *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* (Lamiaceae) known as "toronjil morado" is used empirically to treat some diseases such as gastrointestinal, hypertension, anxiety, insomnia and fever. Our previous studies showed that the glycosides: 7-O- β -glucopyranosyl of acetina (tilianina) and (2'-O-acetyl) -7-O- β -glucopyranosyl of acetin are the major secondary metabolites in polar extracts of toronjil morado.

As part of our systematic search for new molecules of plant origin as probable antiproliferative agents and anti-inflammatory products, we decided to make a tilianin acetylation reaction. This reaction was obtained the products: 7-O- β -D-tetraacetylglucopiranosil of acetina (**1**) and the 7-O- β -D-glucopyranosyl pentoacetyl of acetina (**2**).

The objectives of this study were to evaluate the inhibition of proliferation of **1** in human cancer cell lines using the method of sulforhodamine B (SRB) in 48 h, as well as analyzing the antiinflammatory activity of **1** using the model of edema induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) in mouse ear 4 h assess inhibition of myeloperoxidase activity (MPO).

Our results showed that **1** is selectivity in antiproliferative activity for the PC-3 cell line with an IC_{50} of $8.15 \pm 1.5 \mu\text{M}$ and HCT-15 with an IC_{50} of $36.93 \pm 0.6 \mu\text{M}$.

Our findings also showed that **1** possesses antiinflammatory activity with an IC_{50} $0.31 \mu\text{M}$, evaluated in the model of edema induced by TPA and induces a reduction in the enzymatic activity of MPO.

Considering that the tilianina showed very poor antiproliferative and anti-inflammatory activities then it is feasible to assume that the change of polarity in **1** is responsible for the powerful activities there of acetylated derivative.

1. Introducción

Actualmente existe evidencia que indica la relación entre los procesos de inflamación y el cáncer. La participación de células y moléculas implicadas en la inflamación crónica como las ciclooxigenasas pueden contribuir al desarrollo del tumor, angiogénesis, metástasis y evasión de mecanismos de apoptosis (Grivennikov *et al.*, 2010). Así mismo, se ha informado que en la enfermedad inflamatoria intestinal aumenta el riesgo de cáncer colorrectal y la infección persistente por la bacteria *Helicobacter pylori* es un factor asociado con el cáncer de estómago (Waldner y Neurath, 2009). Se conoce que fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) a través de la inhibición de moléculas que participan en el proceso inflamatorio pueden reducir el riesgo de cáncer (Sahin *et al.*, 2014). En un estudio en ratones con lesiones precursoras y adenocarcinoma de páncreas se observó que el uso del fármaco aspirina (desarrollado a partir de salicina, un compuesto aislado de la corteza de *Salix alba* L.), posee actividad antitumoral al disminuir la expresión de ciclooxigenasas (Rao *et al.*, 2012).

Por lo tanto, el descubrimiento de fármacos a partir de compuestos de origen natural (mineral, vegetal, animal) o sus derivados sintéticos que posean una actividad antiinflamatoria, puede permitir el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer. Las flavonas glicosiladas presentes en algunas plantas medicinales han demostrado en líneas celulares de cáncer humano, capacidad para inducir apoptosis, arresto en el ciclo celular y actividades antiinflamatorias. Por ejemplo, el glicósido 7-O- β -D-glucosido de kaempferol obtenido de *Smilax china* L. (Smilacaceae) inhibe el crecimiento de la línea celular HeLa (cáncer cervicouterino) a través del arresto del ciclo celular en la fase G2/M, además induce la expresión del gen Bax (proapoptótico) y se inhibe Bcl-2 (antiapoptótico) (Xu *et al.*, 2008). Otro ejemplo lo constituye la 7-O- β -D-glucopiranosido-apigenina obtenida de *Chrozophora tinctoria*, la cual inhibió la producción de interleucinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α y prostanglandinas PGE2, los cuales son marcadores pro-cancerígenos (Abdallah *et al.*, 2015)

Por otro lado, en nuestro país se ha utilizado empíricamente la especie *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*, conocida como "toronjil morado" (Bye *et al.*, 1987), para el

tratamiento de la hipertensión, ansiedad, reumatismo, fiebre y enfermedades gastrointestinales, entre otros padecimientos (Argueta *et al*, 1994, Linares *et al.*, 1988). Nuestros estudios han demostrado que *A. mexicana* subsp. *mexicana* sintetiza el glicósido 7-O- β -D-glucopiranosil acetina (tilianina) (Estrada-Reyes *et al*, 2004). Éste glicósido tiene propiedades vaso relajantes a través de la vía del óxido nítrico (ON) y apertura de los canales de calcio (Hernández-Abreu *et al.*, 2009). Hallazgos previos en nuestro grupo de trabajo mostraron que tilianina posee una leve actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer humano pero su acción no fue tan significativa para considerarse una molécula antineoplásica. Sin embargo modificaciones estructurales a la tilianina a través de reacciones de acetilación permitieron la obtención de 7-O- β -D-pentoacetyl glucopiranosil de acetina (**2**) con efectos antiproliferativos en la línea celular MCF-7 (cáncer de mama) con un IC₅₀ de 4.42 μ M y PC-3 (cáncer de próstata) con un CI₅₀ de 19.80 μ M (resultados no publicados). Así mismo, el derivado **2** posee propiedades antiinflamatorias. En el modelo de edema de oreja de ratón inducido con TPA, administrado por vía tópica a una concentración de 0.31 mg/oreja inhibe el edema con un 49.38%. Tomando en cuenta lo anterior, es posible que el nuevo derivado 7-O- β -D-tetraacetylglucopiranosil de acetina (**1**) posea propiedades antiinflamatorias y antiproliferativas.

2. Antecedentes

2.1. Inflamación

La inflamación, es una respuesta que involucra el reclutamiento de células del sistema inmune (neutrófilos, monocitos, células dendríticas) y la liberación de mediadores inflamatorios (interleucinas, quimiocinas) a lugares de infección, daño por agentes patógenos y lesión tisular (Vidal-Vanaclocha, 2009).

Se caracteriza por:

- Migración de neutrófilos circundantes en la sangre y monocitos a zonas infectadas, las cuales se unen a las células vasculares endoteliales que recubren las vénulas, por medio de las moléculas ICAM-1 (adhesión intercelular-1), VCAM-1 (molécula de citoadhesión vascular-1) y de integrinas (Mellado García *et al.*, 2005).
- Producción local de quimiocinas CC y CXC, por leucocitos y células endoteliales inducidas por el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina IL-1. Las quimiocinas estimulan y regulan el movimiento de linfocitos.
- Liberación de citosinas proinflamatorias como TNF, IL-1 y IL-6 que inducen la producción de neutrófilos en la medula ósea.
- Dilatación de las venas, aumento de la permeabilidad de los capilares.
- Activación de macrófagos que reconocen agentes patógenos y los destruyen por medio de liberación de moléculas como el óxido nítrico (ON) y fagocitosis.
- Activación y migración de linfocitos T vírgenes a las zonas de inflamación.

2.1.1. Inflamación crónica y cáncer

Una vez que se ha presentado la infección o daño al tejido se inicia la respuesta inflamatoria, la cual puede ser de corta duración (horas a días) denominándose inflamación aguda. Si el proceso inflamatorio se mantiene durante mayor tiempo la inflamación se cataloga como crónica (Vidal-Vanaclocha, 2009). Esta condición se caracteriza por el continuo reclutamiento de células al lugar de la infección. Los fagocitos ubicados en el tejido pueden dañar a otras células, generar estrés oxidante y daño al ADN

por la liberación de especies reactivas como el ON. Así, la inflamación crónica puede asociarse con enfermedades cardiovasculares, autoinmunes, diabetes, arteriosclerosis, artritis y cáncer (Aggarwal *et al.*, 2006).

En el cáncer, la inflamación crónica se ha considerado como un factor de riesgo. La participación de células y moléculas características de los procesos inflamatorios como los macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células dendríticas y de moléculas como interleucinas, óxido nítrico (ON) y ciclooxigenasas en el microambiente del tumor pueden favorecer la proliferación, supervivencia, angiogénesis, metástasis y evasión de mecanismos de apoptosis (Grivennikov *et al.*, 2010; Maiorov *et al.*, 2013). La inflamación crónica puede predisponer al cáncer como por ejemplo, la enfermedad inflamatoria intestinal aumenta el riesgo al desarrollo del cáncer colorrectal (Vidal-Vanaclocha, 2009). En algunos cánceres se ha observado el incremento de moléculas implicadas en la inflamación como:

-Ciclooxigenasa COX-2

La isoforma COX-2 es una enzima que oxida al ácido araquidónico para la síntesis de prostaglandinas (PGs) como PGE₂, las cuales participan en el proceso inflamatorio como mediadores de la vasodilatación, fiebre y cicatrización de heridas. La COX-2 puede ser inducida por citosinas y TNF, se encuentra poco expresada en tejidos y aumenta en los procesos inflamatorios. La acumulación de COX-2 en el microambiente del tumor promueve la angiogénesis, adhesión celular y migración (Menter y DuBois, 2012). En el cáncer colorrectal la PGE₂ promueve el crecimiento celular. En el cáncer gastrointestinal, epitelial y cáncer de mama existe un incremento de los niveles de COX-2 (Aggarwal *et al.*, 2006).

-Óxido nítrico sintasa (iNOS)

Los macrófagos en la defensa antimicrobial sintetizan el ON, un microbicida y vasodilatador, esta molécula es producida por la acción de la enzima inducible iNOS la cual

se expresa en condiciones de inflamación o infección. El ON en altas cantidades pueda dañar las células al contribuir a la oxidación del ADN y daño a proteínas. Se ha relacionado la expresión de iNOS en los cánceres de mama, colon y próstata (Yu *et al.*, 2013).

-Quimiocinas

Las quimiocinas son proteínas cuya principal actividad es estimular el movimiento y regular la migración de leucocitos en el proceso inflamatorio, su liberación es inducida por estímulos que actúan en macrófagos, linfocitos T o fibroblastos. Las quimiocinas se dividen en cuatro familias: CXC, CC, CX3C y XC, ejerciendo su función por unión a receptores transmembrana acoplados a proteínas G (GPCR) (Monteagudo *et al.*, 2011). Se informa que en células de melanoma y cáncer de mama se expresa el receptor CXCR4 de la familia de quimiocinas CXC, el cual está asociado a la diseminación neoplásica (Ueda *et al.* 2010, Monteagudo *et al.*, 2011).

-Citocinas proinflamatorias

Las citosinas proinflamatorias (IL-1, TNF- α) son proteínas secretadas por células del sistema inmune en respuestas inflamatorias, pueden tener una acción local o sistémica. Estimulan el crecimiento y la diferenciación de monocitos y linfocitos a células efectoras (Toche, 2012).

-El Factor de necrosis tumoral (TNF- α) es producida por macrófagos y células dendríticas, está involucrada en el reclutamiento de linfocitos en el lugar de infección e induce el aumento de moléculas de adhesión endotelial VCAM-1 e ICAM-1 y la quimiocina CCL2, esta última relacionada con la acumulación de macrófagos en el cáncer de próstata (Solís-Martínez *et al.*, 2015). La TNF- α puede actuar en la progresión y desarrollo de metástasis del cáncer de próstata (Aggarwal *et al.*, 2006; Rodríguez-Berriguete *et al.*, 2013).

-La IL-1 participa en la respuesta inflamatoria aguda y podría estar relacionada con la proliferación celular en el cáncer de próstata (Rodríguez-Berriguete *et al.*, 2013).

2.1.2. Tratamiento farmacológico en la inflamación

2.1.2.1. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), son utilizados como analgésicos, antipiréticos y agentes anti-inflamatorios, tienen una estructura conformada por un núcleo aromático hidrófobo unido a un grupo ácido, su actividad está dirigida a inhibir la actividad de las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2, encargadas de convertir el ácido araquidónico, para la producción de prostanglandinas (PGs) y tromboxanos (Ricciotti y FitzGerald, 2011). Las AINEs se dividen en dos categorías los no selectivos para COX-1 y COX-2 y los selectivos para COX-2 (Tabla 1).

La COX-1 es una isoforma de expresión constitutiva localizada en el tracto digestivo, endotelio, musculo liso, encargado de dar protección a la mucosa gástrica, participa en las respuestas autoinmunes y diferenciación de macrófagos (Zha *et al.*, 2004). Por otra parte la COX-2 tiene una expresión regulada, se encuentra en el cerebro, ovarios y musculo estriado. Se induce por mediadores de la inflamación como el interferón gamma (IFN- γ), TNF- α , IL-1 y la activación del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B). Se encarga de la producción local de prostanglandinas que están involucradas en la proliferación celular y la inflamación (Zha *et al.*, 2004, Ricciotti y FitzGerald, 2011).

Tabla 1. Clasificación de los AINEs

No selectivos COX-1 y COX-2	Selectivos COX-2
Aspirina, indometacina, ibuprofeno, piroxicam	Diclofenaco, celecoxib, rofecoxib, Ibuprofeno, nimesulida, omeprazol, valdecoxib

2.1.2.2. AINEs y cáncer

El aumento de la actividad de la enzima COX-2 genera el aumento de PGs, lo que puede contribuir al desarrollo del cáncer. Se ha demostrado que los fármacos antiinflamatorios AINEs a través de la inhibición de la COX-2, reducen el riesgo y aumentan la supervivencia de cáncer gastrointestinal, pancreático, colorectal y adenocarcinoma de esófago (Sahin *et al.*, 2014). El fármaco indometacina reduce y previene la formación de tumores en un modelo experimental de ratones con tumor de esófago inducido con dietilnitrosamina (Rubio, 1984). En un trabajo con pacientes con úlceras pépticas que utilizaron AINEs, resultaron ser menos susceptibles al cáncer gástrico que aquellos pacientes que no utilizan AINEs (Akre *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2010). En un estudio en ratones con lesiones precursoras y adenocarcinomas de páncreas se observó que la aspirina tiene actividad antitumoral al disminuir la expresión de ciclooxigenasas y Bcl-2 (Rao *et al.*, 2012). También se ha visto que la aspirina tiene una actividad quimiopreventiva en hámster con cáncer de páncreas (Ouyang *et al.*, 2006).

2.2. Características químicas de los flavonoides y glicósidos de flavona

Los flavonoides constituyen un grupo de compuestos polifenólicos, con un esqueleto de dos anillos bencénicos (ciclo A y ciclo B) unidos por tres átomos de carbonos (C6-C3-C6) (Fig.1A). Se clasifican de acuerdo a su estructura: en flavona, flavonol, flavanol, isoflavona, flavanona (Fig.1B) (Kumar y Pandey, 2013).

Los flavonoides se encuentran en la naturaleza como agliconas o unidos a uno o más azúcares como la glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa y rutinosa. En función al enlace se encuentran los O-, C-, β -, α -glicosidos. Las posiciones glicosiladas son el C5, C6, C8, C4', siendo preferentes los C7 y C3 (Veitch y Grayer, 2011; Xiao *et al.*, 2014).

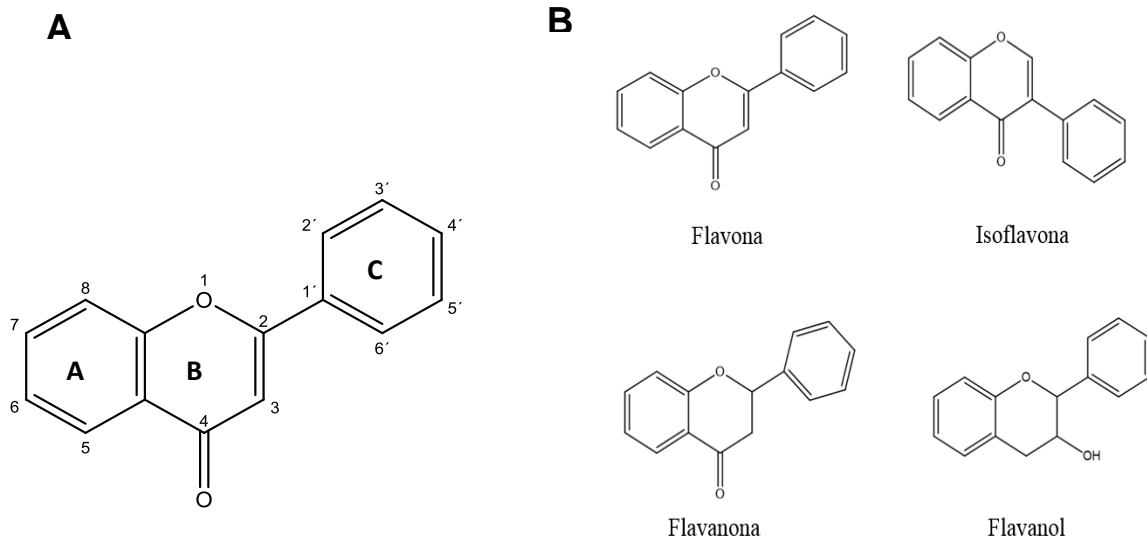


Figura 1. A) Estructura básica de los flavonoides. **B)** Tipos de Flavonoides.

2.2.1. Glicósidos de Flavona: Actividad en sistema inmune y cáncer

Algunas investigaciones han revelado que compuestos del tipo de glicósidos de flavona aislados de plantas medicinales son bioactivos. Por ejemplo, se ha demostrado en modelos *in vitro* que éste tipo de metabolitos secundarios tienen actividad sobre el ciclo celular e inducen apoptosis en diferentes líneas celulares de cáncer humano (Xu *et al.*, 2008, Alonso-Castro *et al.*, 2013).

En particular, se ha demostrado que el 7-O- β -D-glicosido-kaempferol aislado de *Smilax china* L. (Smilacaceae) (Fig.2A) inhibe el crecimiento de las células en forma selectiva para la línea celular HeLa (cáncer cervicouterino). El mecanismo por el cual actúa es a través del arresto en la fase G2/M del ciclo celular, así como la disminución tanto de la ciclina B1 como Cdk1 (quinasa dependiente de ciclina 1). Éstos eventos inducen un aumento de la apoptosis por un incremento en la expresión de Bax y una disminución de Bcl-2 (Xu *et al.*, 2008). Por otro lado, las flavonas glicosiladas: luteolin 6-C-(4"-metil-6"-O-trans-cafeoilglicosido), luteolina 6-C-(6"-O-trans-cafeoilglicosido) y luteolina 6-C-(2"-O-trans-cafeoilglicosido) obtenidas de la corteza de *Vites agnus-castus* L. (Verbenaceae) (Hirobe *et al.*, 1997) inhiben el crecimiento de la línea celular P388 (leucemia linfocítica). El extracto metanólico de las hojas de *Swietenia mahagoni* (L.) Jacq. (Meliaceae) contiene el glicosido quercetin-3-O-glicosido (Fig.2B), responsable de la inhibición del crecimiento de las líneas celulares de leucemia K562 (eritroleucemia humana) y U937 (leucemia monocítica), por medio del arresto en la fase G2/M del ciclo celular y la activación de las caspasa 3 y 9 (Roy *et al.*, 2014).

Adicionalmente compuestos con actividad antitumoral también pueden poseer una acción sobre células del sistema inmunológico (linfocitos polimorfonucleares, esplenocitos, macrófagos, natural killer). El kaempferol-3, 7-bis-ramnosido (Kaempferitrina) (Fig.2C) obtenido de *Justicia spicigera* inhibe el crecimiento *in vitro* de células HeLa. El mecanismo que se ha propuesto es mediante la detención del ciclo celular en la fase G1 e inducción de apoptosis dependiente de caspasas (Alonso-Castro *et al.*, 2013). En modelos *in vivo* éste glicósido posee efectos quimiopreventivos y antitumorales en células HeLa, también

posee actividad inmunoestimulante mediada por esplenocitos y macrófagos murinos (Juárez-Vázquez *et al.*, 2013, Alonso-Castro *et al.*, 2013).

Algunos otros glicosidos de flavona presentan efectos antiinflamatorios, como luteolin 5-O-glucosido aislado de *Cirsium maackii* (Compositae), el cual inhibe la producción de óxido nítrico (ON), mediante la inhibición tanto de la óxido nítrico sintasa (iNOS) como COX-2 en la línea celular de macrófagos murinos RAW264.7 estimulados con lipopolisacaridos (LPS) (Jung *et al.*, 2012).

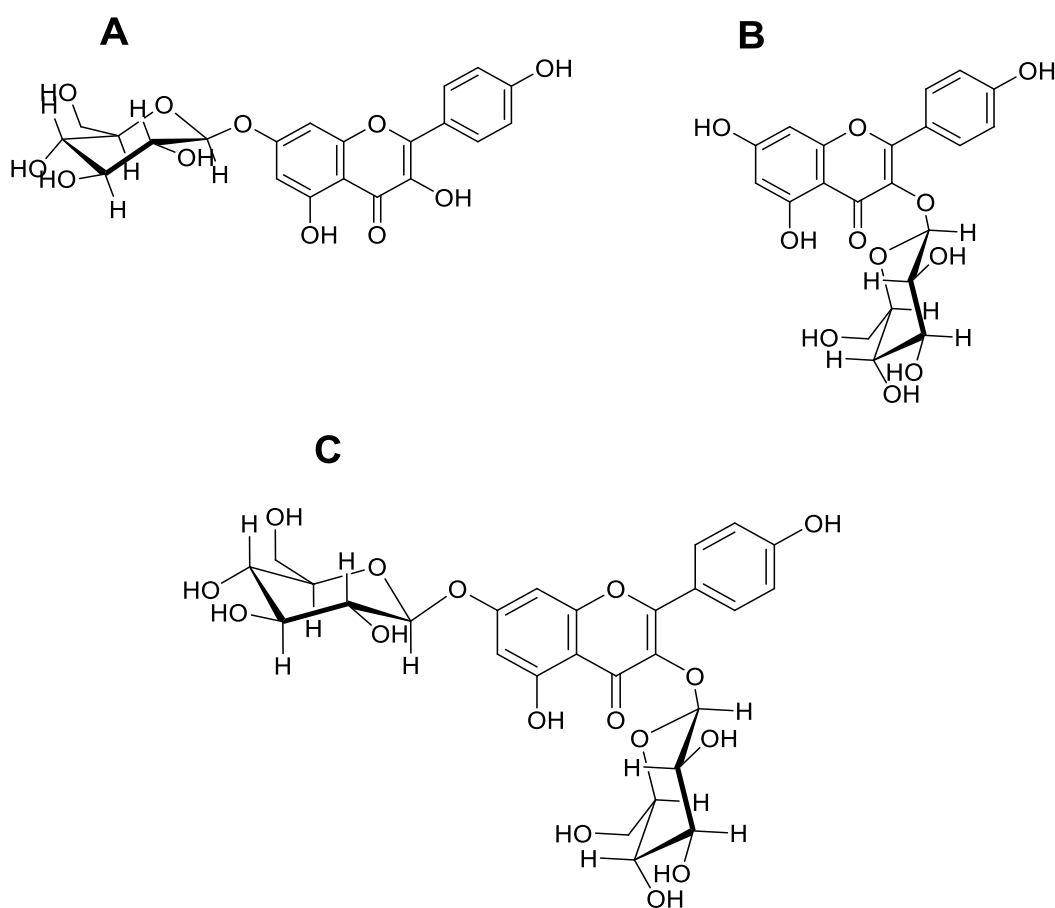


Figura 2. Glicosidos de flavona aislados de plantas medicinales. A) Kaempferol-7-O-β-D-glucosido (*Smilax china* L.). **B)** Quercetin-3-O-glucosido (*Swieteniamahagoni* (L.) Jacq. **C)** Kaempferol-3, 7-bis-ramosido (Kaempferitrina) *Justicia spicigera*.

2.3. Estudios etnobotánicos de *Agastache mexicana*

Agastache mexicana es una especie originaria de México con dos subespecies: *A. mexicana* (H. B. K.) Lint & Epling subsp. *mexicana* Bye, Linares & Ramamoorthy (Fig.3A) y *A. mexicana* (H. B. K.) Lint & Epling subsp. *xolocotziana* Bye, Linares & Ramamoorthy (Fig.3B) (Bye *et al.*, 1987; Santillán-Ramírez *et al.*, 2008).

En la medicina tradicional mexicana *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* se conoce principalmente como toronjil morado, toronjil rojo y tlauaeuetl (ahuehuate de la tierra) (Bye *et al.*, 1987). El toronjil morado se ha utilizado como remedio para el tratamiento de la hipertensión, ansiedad, reumatismo, fiebre y enfermedades gastrointestinales, entre otros padecimientos (Argueta *et al.*, 1994, Linares *et al.*, 1988). Es común el uso de esta especie combinada con otras plantas medicinales, por ejemplo, el remedio de los tres toronjiles se prepara con la mezcla de toronjil morado (*A. mexicana* subsp. *mexicana*), toronjil blanco (*A. mexicana* subsp. *xolocotziana*) y toronjil azul o chino (*Dracocephalum moldavica*). También se utiliza la mezcla con la flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*), tila (*Ternstroemia spp.*) o azahar (*Citrus spp.*). Estas mezclas se recomiendan como remedios para los “nervios” y el insomnio (Linares *et al.*, 1988). Estudios apoyan el uso de las dos subespecies de *A. mexicana* en la medicina tradicional. Los extractos acuosos de *A. mexicana* subsp. *mexicana* y subsp. *xolocotziana*, a bajas dosis poseen una actividad ansiolítica y a altas dosis efectos sedantes (Estrada-Reyes *et al.*, 2014).

En México las personas diferencian *A. mexicana* subsp. *mexicana* de *A. mexicana* subsp. *xolocotziana* por el color de las flores, el tallo y el aroma. En estudios de la anatomía vegetal se revela que *A. mexicana* subsp. *xolocotziana* tiene un tallo con mayor cantidad de tricomas y bandas de esclerénquima más desarrolladas que *A. mexicana* subsp. *mexicana* (Santillán-Ramírez *et al.*, 2008).



Figura 3. A) *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* “Toronjil morado” **B).** *Agastache mexicana* subsp. *xolocotziana* “Toronjil Blanco.”

2.3.1. Constitución química de *A. mexicana* subsp. *mexicana*

De acuerdo con la literatura uno de los principales componentes químicos del género *Agastache* son las flavonas tanto en su forma glicosilada como libre. Las especies *A. urticifolia*, *A. parvifolia*, *A. cusickii*, *A. rugosa*, *A. occidentalis*, *A. foeniculum*, *A. nepetoides* poseen los glicosidos: 7-O- β -D-glucosido de diosmetina, 7-O-glucosido de acetina, 7-O-glucosido de apigenina y 7-O-glucosido de luteolina (Vogelmann *et al.*, 1984).

Estrada-Reyes (2004) reportó que los compuestos más abundantes de *A. mexicana* subsp. *mexicana* son la flavona acetina y los glicosidos de flavona (2-acetil)-7-O-glucosil acetina y la 7-O-(β -D-glucopiranosil) acetina (tilianina). En un análisis de los extractos acuosos de *A. mexicana* subsp. *mexicana* mediante la técnica de HPLC, se identificaron la diosmetina 7-O- β -D-(6''-O-malonil)-glucosido, acetina 7-O- β -D-(6''-O-malonil)-glucosido, acetina-7-O- β -glucosido-D-(2''-acetil-6''malonil) y luteolina 7-O- β -D-(6''-O-malonil)-glucosido (Estrada-Reyes *et al.*, 2014).

Entre otros componentes químicos principales de *A. mexicana subsp. mexicana*, se identificó el triterpeno ácido ursólico, los aceites esenciales: clavicol de metilo, limoneno, linalol y el ácido málico (Estrada-Reyes *et al.*, 2004).

2.3.2. Actividad Biológica de 7-O- β -D-glucopiranosil acetina (tilianina)

Se ha demostrado en modelos *in vitro* e *in vivo* que la tilianina (Fig.4) posee actividad antihipertensiva, vasorelajante y antiinflamatoria (Molina-Hernández *et al.* 2000; Hernández-Abreu *et al.*, 2009; Hernández-Abreu *et al.*, 2011; González-Ramírez *et al.*, 2012).

Así mismo, los extractos polares de *A. mexicana* con un alto contenido de tilianina tienen una actividad vasorelajante en anillos de aorta de rata (Hernández-Abreu *et al.*, 2011). En un modelo de ratas espontáneamente hipertensas (SHRs) se demostró que la tilianina induce un efecto antihipertensivo a dosis por debajo de los efectos tóxicos (Hernández-Abreu *et al.*, 2009, Hernández-Abreu *et al.*, 2013). Se postuló que la actividad antihipertensiva de la tilianina se debía a la liberación de óxido nítrico (ON) por la estimulación de NOS y apertura de canales de calcio (Hernández-Abreu *et al.*, 2009)

La tilianina ha demostrado efectos anti-aterogénicos mediante la inhibición la activación del factor transcripcional NF- κ B, citosinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β que inducen la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 (Hong *et al.*, 2001; Nam *et al.*, 2005).

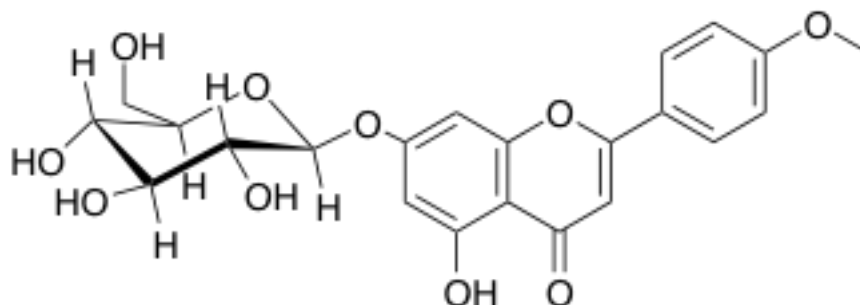


Figura 4. Tilianina (7-O- β -D-glucopiranosil de acetina).

2.4. Estrategias para evaluar la actividad antiinflamatoria

Los agentes antiinflamatorios ejercen su acción a través de diferentes mecanismos, por lo que es necesario un modelo experimental que permita inducir la inflamación y medir el aumento o disminución de la actividad de células y moléculas del sistema inmune (Dhalendra *et al.*, 2013). El modelo de edema auricular de ratón causado por el 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA) constituye un sistema de tamiz, en la inflamación aguda *in vivo* para evaluar la actividad antiinflamatoria de extractos o compuestos de origen vegetal.

2.4.1. 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA)

El éster de forbol 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA), fue aislado de *Croton tiglium L.*, su estructura consiste en un esqueleto de carbono (diterpeno tetracíclico), es conocido como inductor de tumores y puede desencadenar un proceso inflamatorio, induce la infiltración de neutrófilos y la expresión de proteínas como quimiocinas, COX-2, TNF- α dependiente de la activación de NF- κ B (Passos *et al.*, 2013).

El TPA tiene una estructura parecida al dicilglicerol fisiológico, uniéndose de manera análoga para activar la proteína quinasa C (PKC). Esta quinasa regula diversos procesos celulares como proliferación, apoptosis, migración celular y en la epidermis aumenta la expresión de mediadores inflamatorios, incluye la activación de proteínas quinasas (MAPKs), fosfolipasa A2 y proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-2) (Goel *et al.*, 2007; Passos *et al.*, 2013).

El TPA es utilizado en el modelo auricular en ratón para generar un edema localizado en la oreja, lo que conlleva a una vasodilatación y la infiltración de linfocitos polimorfonucleares PMN (neutrófilos), liberación de mieloperoxidasa, hiperplasia y queratinización (Stanley *et al.*, 1991).

2.4.2. Mieloperoxidasa

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) participan en la inmunidad innata como primera defensa del huésped frente a cualquier agresión o estímulo. También se localizan en los sitios donde hay inflamaciones crónicas, tumores, infecciones persistentes e interactúan con los linfocitos T en la inmunidad adaptativa. Los PMN una vez que han sido activados producen la enzima mieloperoxidasa (MPO), la cual se encuentra almacenada en los gránulos azurofilos, es liberada al espacio extracelular y al fagosoma (Loria *et al.*, 2008). La MPO es capaz de generar especies reactivas de oxígeno ROS, al catalizar la conversión del peróxido de hidrógeno H_2O_2 y cloruro a ácido hipocloroso (HOCL), agentes con alta capacidad microbicida (Klebanoff *et al.*, 2013). En situaciones patológicas aumenta la liberación de especies reactivas que pueden ocasionar peroxidación lipídica (lipoproteína de baja densidad LDL), modificaciones postraduccionales a proteínas diana y daño al ADN (Arnhold *et al.*, 2010; Adam *et al.*, 2014). De esta manera, la actividad enzimática de la MPO nos permite conocer de forma indirecta la migración leucocitaria por la infiltración de neutrófilos en el tejido y el estrés oxidante (Klebanoff *et al.*, 2013).

2.5. Estrategia para evaluar la actividad antiproliferativa

2.5.1. Sulforodamina B (SRB)

Una de las medidas para en el descubrimiento de fármacos del cáncer, es la evaluación de una molécula sobre la proliferación de una célula cancerosa. El método colorimétrico de sulforodamina B (SRB) permite determinar la viabilidad celular y medir la inhibición de la proliferación celular de fármacos y compuestos químicos en modelos celulares *in vitro*. Este método se basa en la unión electrostática del colorante (SRB) a los aminoácidos básicos (arginina, histidina y lisina) de células fijadas con ácido tricloroacético. Es útil para el cribado de un gran número de muestras ya que los reactivos no implican un gran costo (Vichai and Kirtikara, 2006).

3. Hipótesis

Si se conoce que el derivado glicósido de flavonona 7-O- β -D-pentoacetil glucopiranosil de acacetina (**2**) posee actividad antiproliferativa y antiinflamatoria, es posible que el nuevo derivado acetilado 7-O- β -D-tetraacetilglucopiranosil de acacetina (**1**) posea efectos citotóxicos *in vitro* y antiinflamatorios *in vivo*.

4. Objetivo general

Evaluar la actividad antiproliferativa y antiinflamatoria del derivado acetilado 7-O- β -D-tetraacetilglucopiranosil de acacetina (**1**).

Objetivos específicos:

- Colectar e identificar la especie *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*.
- Aislar y purificar el glicósido de flavona 7-O-(β -D-glucopiranosil) de acacetina del extracto de metanol, obtenido de las partes aéreas de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*.
- Modificar por reacciones de acetilación la tilianina con piridina y anhídrido acético para obtener la 7-O- β -D-tetraacetilglucopiranosil de acacetina (**1**)
- Calcular la concentración a la que se inhibe el 50% de la proliferación celular (CI₅₀) el derivado acetilado **1** en líneas celulares de cáncer humano, por medio del ensayo de sulforodamina B (SRB).
- Determinar la actividad antiinflamatoria del derivado acetilado **1** en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA en ratones CD-1.
- Determinar la actividad antiinflamatoria del derivado acetilado **1** por medio de la actividad enzimática de la mieloperoxidasa *in vivo*

5. Justificación

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en 2012 hubo unos 8.2 millones de muertes y se prevé que siga en aumento (OMS, 2013). Los cánceres con mayor incidencia son los de pulmón, estómago, hígado, colon y mama, (GLOBOCAN, 2012). Los tratamientos actuales para el cáncer se basan principalmente en la cirugía, radiación y quimioterapia (Papac, *et al.*, 2001). Se conoce que las células y mediadores inflamatorios como los macrófagos, los neutrófilos y moléculas como el TNF- α y ON que participan en la inflamación crónica están implicadas en la promoción de tumores, siendo un factor de riesgo para el cáncer de próstata, mama y páncreas, entre otros. Tomando en cuenta lo anterior es necesaria la búsqueda de nuevas moléculas antiinflamatorias que coadyuven al tratamiento contra el cáncer (Aggarwal *et al.*, 2006; Rodríguez-Berriguete *et al.*, 2013).

Por otro lado, se ha reportado que compuestos del tipo glucósidos de flavona aislados de plantas medicinales inhiben el crecimiento celular de diferentes líneas celulares de cáncer humano y mediadores de la inflamación como interleucinas (Hirobe *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012). Los glucósidos de flavona son moléculas de especial interés para descubrir nuevas entidades farmacológicas con actividad antiproliferativa y antiinflamatoria.

Una nueva forma de obtención de agentes antineoplásicos se basa en la modificación estructural de una molécula con el fin de mejorar su actividad farmacológica (Alvarez-Ibarra *et al.*, 1997). *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* sintetiza el glicosido 7-O-(β -D-glucopiranosil) de acetina (tilianina) con actividades farmacológicas antihipertensivas (Hong *et al.*, 2001; Hernández-Abreu *et al.*, 2013). Modificaciones estructurales a la tilianina a través de reacciones de acetilación permitieron la obtención de 7-O- β -D-pentoacetil glucopiranosil de acetina (**2**) (resultados no publicados) con efectos antiinflamatorios y antiproliferativos en líneas celular MCF-7 y PC-3. Sin embargo, es posible que el nuevo derivado 7-O- β -D-tetraacetilglucopiranosil de acetina (**1**) posea actividad antiproliferativa y antiinflamatoria.

6. Materiales y Métodos

6.1. Colecta e identificación del material vegetal

Las partes aéreas de la especie *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* se recolectaron en el municipio de Ozumba, Edo de México. Una muestra de la especie fue depositada en el herbario de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM con número de colecta (FEZA 15435).

6.2. Obtención de la tilianina a partir del extracto de metanol de *Agastache mexicana* subsp. *mexicana*.

La parte aérea de la planta se secó a temperatura ambiente, después se trituró en un molino y se maceró durante una semana con metanol (MeOH), al término del proceso se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida en un rotavapor, obteniendo el extracto respectivo.

La tilianina se obtuvo a partir de precipitación por reducción del disolvente del extracto metanólico (Hernández-Abreu *et al.*, 2009) (Fig.5). Al precipitado color café/amarillo obtenido se le determinó el punto de fusión por medio del equipo Fisher-Johns sin corrección y se realizaron pruebas espectroscópicas.



Figura 5. Proceso de obtención de tilianina a partir del extracto MeOH

6.3. Derivados acetilados de la tilianina

La tilianina se pesó y se adiciono una relación (1:1) de piridina y anhídrido acético. La mezcla de reacción se sometió a calentamiento (aprox. 58-60° C) durante 20 horas, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente. Al finalizar el proceso se le adicionó la tercera parte del volumen, de agua destilada. Se le realizaron 3 extracciones utilizando acetato de etilo (AcOEt). La fase orgánica se recuperó y se lavó 3 veces con una solución de ácido clorhídrico (HCL 10%) y posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada. A la fase orgánica se le adicionó sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) y se filtró. El filtrado se recuperó y el disolvente se evaporó a sequedad con un rotavapor (Fig.6). El producto de reacción se analizó mediante cromatografía en capa fina CF (cromatofolios de aluminio cubiertos con gel de sílice G-200, UV₂₅₄ MACHEREY-NAGEL) y se revelo utilizando como agente cromogénico sulfato cérico (12.0 g de sulfato cérico y 22.2 mL de ácido sulfúrico concentrado en 350.0 g de hielo) calentando a 110°C por 2 minutos. Se evidencio la presencia de 2 compuestos para la reacción

6.3.1. Purificación de los derivados acetilados del glucósido de flavona tilianina

La separación de los derivados se realizó a partir de fraccionamiento por cromatografía en columna abierta, empacada con gel de sílice (60 M 0,04-0,063 mm MACHEREY-NAGEL). Se utilizó como elusión mezclas de Hexano-AcOEt (10:0, 7:3, 6.5:3.5, 6:4, 5:5, 0:10) finalizando con MeOH. Cada fracción obtenida (30 mL) fue monitoreada mediante CCF, se reunieron las fracciones con un factor de retención (Rf) similar. Por cristalización se obtuvieron un sólido de color amarillo **1** y un sólido de color blanco **2**. A los derivados **1** y **2** se les determinó el punto de fusión por medio del equipo Fisher-Johns sin corrección y se realizaron pruebas espectroscópicas (fig. 6).



Figura 6. Obtención de los derivados acetilados del glucósido de flavona tilianina.

6.4. Análisis espectroscópicos y espectrométricos

La identificación de los compuestos se realizó en los laboratorios del Instituto de Química de la UNAM

Se determinaron los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) a 300 MHz para RMN-¹H y 75 MHz RMN-¹³C. Se utilizó como disolvente CDCl₃ y DMSO-d₆. Los desplazamientos químicos (δ), se expresan en partes por millón (ppm) las constantes de acoplamiento (J) se dan en Hertz (Hz).

Los espectros de masas (EM) se obtuvieron mediante técnicas de impacto electrónico. Los resultados se presentan como relación de masa respecto de la carga (m/z).

6.5. Pruebas biológicas

Líneas celulares y condiciones de cultivo

Se emplearon las líneas celulares humanas: MCF-7 (cáncer de mama), HCT-15 (cáncer de colon), PC-3 (cáncer de próstata) y K-562 (eritroleucemia humana). Las células se cultivaron en RPMI-1640 medio suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 %, glutamina (2.0 μ M) y antibióticos penicilina (100 unidades/ mL) y estreptomina (100 μ g/mL). Las células se mantuvieron en incubación a 37 °C con una atmósfera de 5 % de CO₂. Se realizó el cambio de medio de cultivo a las células cada tercer día.

6.5.1. Ensayo de sulforodamina B (SRB) para la evaluación de la actividad antiproliferativa

Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos con 5000 células por pozo, después de 24 h se trató con el derivado **1**, CDDP (Cisplatino, control positivo) a una única concentración 50 μ M (DMSO, vehículo 0.01%). Después de 48 h las células tratadas, se fijaron con 50 μ L de ácido tricloroacético al 50%, las placas se incubaron a 4 °C por 1 h, luego se lavaron 5 tiempos con agua destilada, se dejaron secar a temperatura ambiente. Las células fijadas se tiñeron con la adición 100 μ L de sulforrodamina B al 0.4%, incubando por 30 min a temperatura ambiente, al finalizar se realizaron lavados con ácido acético al 1 % dejando secar a temperatura ambiente. Las células teñidas se les adicionó 100 μ l de 10 mM Tris base, manteniendo en agitación por 5 min. La absorbancia se midió a 515 nm. Se determinó la CI₅₀ del cisplatino y solo en aquellas líneas celulares donde el derivado **1** mostró una actividad mayor al 70% de inhibición del crecimiento celular. La concentración a la cual se inhibe el 50% de crecimiento celular (CI₅₀) fue calculada por regresión lineal (Passos *et al.*, 2006).

Animales

Se utilizaron ratones hembras CD1, con un peso aproximado entre 25 a 30 g, del Bioterio del Cinvestav-Sede Sur, los cuales se mantuvieron en jaulas de polietileno translúcidas a temperatura y humedad controladas *ad libitum*. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para el cuidado y manejo de animales de laboratorio.

6.5.2. Evaluación del efecto antiinflamatorio TPA. Modelo edema auricular en ratón

El modelo biológico empleado fue el de edema auricular en ratón inducido por 13-acetato-12-O-tetradecanoilfrobol (TPA) (Cornejo-Garrido *et al.*, 2012). Los animales se dividieron al azar en grupos de 3 (n=4-5): control (TPA más vehículo), dosis (recibieron TPA más la sustancia a evaluar) y referencia (TPA más indometacina). Los ratones se anestesiaron con pentobarbital sódico (mg/kg, i.p.). Se administró por vía tópica en la oreja derecha por ambos lados una solución de TPA (2.5 µg/oreja) disuelto en etanol (10 µL). La oreja izquierda se le administro 20 µL de Etanol. Después de 10 min del tratamiento con TPA se administró en la oreja derecha el derivado **1** (0.031, 0.1, 0.31, 1 µL/ oreja) y el fármaco de referencia (10 µL/oreja) y 20 µL de cloroformo como vehículo. Cuatro horas después los animales fueron sacrificados por dislocación cervical para tomar una biopsia de 7 mm de diámetro de ambas orejas. El tamaño del edema se determinó de la diferencia de pesos (en mg) del tejido tratado (oreja derecha), respecto del tejido no tratado (oreja izquierda). Los porcentajes de inhibición del edema (%IE), se calcularon de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{IE} = (C_r - C_t) / (C_r) \times 100$$

Dónde: C_r peso de la muestra de oreja tratada con TPA

C_t peso de la muestra tratada con TPA más el compuesto a evaluar.

6.5.3. Ensayo de inhibición de actividad de la mieloperoxidasa (MPO)

Después de 4 h de la administración de TPA y el tratamiento con **1**, se tomaron biopsias de 7 mm de la oreja de ratón, se homogenizaron en 1mL de solución fría de 0.5% HTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio, 80 mM de Buffer de fosfato de sodio, pH 5.4), por 30 segundos, el homogenizado se sonicó 3 veces por 20 segundos, después se centrifugo 1200 r.p.m. x 10 min. Se adicionaron 10 μ L del sobrenadante a pozos de placas de 96 con 180 μ L de buffer de fosfato de sodio (80 Mm, pH 5.4), al blanco solo se le adiciono HTAB 0.5%, la placa se mantuvo a 37°C. Luego se adiciono 20 μ L de peróxido de hidrogeno 0.017% como substrato y 20 μ L de Tetrametilbenzidina (18.4 mM. 50% dimetilformamida) Se incubó a 37°C por 5 min, la reacción se detuvo con 20 μ L de ácido sulfúrico 2 M. La absorción se midió a 450 nm.

La actividad de la enzima MPO se expresó como DO (Densidad Óptica)/Biopsia (Bradley *et al.*, 1982).

Análisis estadístico

En los modelos *in vitro* los datos son expresados como la media \pm la desviación estándar (D.E) de al menos 3 experimentos independientes.

En los modelos *in vivo* los resultados son expresados como la media (n=4 ó 5) animales \pm E.S. (error estándar). Los resultados se analizaron mediante ANOVA seguido de una prueba de Dunnett, los valores de * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ se consideran como diferencia significativa con respecto al grupo control.

7. Resultados

7.1. Identificación de la tilianina (7-O-β-D-glucopiranosil de acetina)

Se obtuvo un sólido café-amarillo con un punto de fusión de 238-240 °C. En el espectro de resonancia magnética protónica se observa la señal 12.91 ppm que corresponde al hidroxilo unido al C-5, formando un puente de hidrogeno con el carbonilo del C-4 de la flavona (Fig.1, ANEXO), las señales corresponden con lo reportado previamente por Hernández-Abreu *et al.*, 2009 y el grupo de investigación.

pf= 238-240 °C. ^1H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12.91 (1H, s, OH), 8.09 (2H, d, J= 8.9 Hz, H-2' y H-6'), 7.16 (2H, d, J= 9.0 Hz, H-3' y H-5'), 6.98 (1H, s, H-3), 6.88 (1H, d, J= 2.2 Hz, H-8), 6.49 (1H, d, J= 2.1 Hz, H-6), 5.10 (1H, d, J = 7.1 Hz, H-1'') 5.10-3.16 (11H, m, glucosa), 3.90 (3H, s, OCH₃). ESIMS (m/z) 446 [M+H] C₂₂H₂₂O₁₀

^{13}C RMN (75.5 MHz, DMSO) 182.07 (C-4), 163.83 (C-7), 163.02 (C-9), 162.48 (C-5), 161.12 (C-2), 156.99 (C-4'), 128.46 (C-2', C-6'), 122.68 (C-1'), 114.63 (C-3', C-5'), 105.39 (C-10), 103.81 (C-3), 99.88 (C-1''), 99.56 (C-6), 94.92 (C-8), 77.17 (C-5''), 76.43 (C-4''), 73.10 (C-3''), 69.53 (C-2''), 60.59 (C-6''), 55.60 (OCH₃).

7.2. Identificación de 7-O-β-D-pentoacetil glucopiranosil de acetina (2)

Con la reacción de acetilación fueron sustituidos los grupos OH del anillo de la glucosa y el C-5 de la Flavona Tilianina por grupos acetato (CH₃OCO). Se obtuvo un sólido blanco con un punto de fusión de 191°C. El espectro de Resonancia magnética de H ¹ se observa la señal 2.43 ppm que corresponde para tres H del grupo acetato (CH₃OO), el cual se encuentra unido al C-5 y la señal 2.0-2.5 que corresponde cuatro singuletes, que corresponde a tres protones (CH₃OO) que se encuentran unidos al anillo de glucosa. (Fig. 2, ANEXO).

pf=191°C. ^1H RMN (300 MHz, DMSO) δ 7.79 (2H, d, J= 9 Hz, H-6' y H-2'), 7.00 (2H, d, J= 9 Hz, H-5' y H-3'), 6.99 (1H, d, J= 1.5 Hz, H-8), 6.67 (1H, d, J= 2.4 Hz, H-6), 6.53 (1H, s, H-3), 5.34-3.95 (7H, m, glucosa), 3.88 (3H, s, OCH₃), 2.43 (3H, s, CH₃COO), 2.07-2.04 (12H, m, CH₃COO). ESIMS (m/z) 656 [M+H] C₃₂H₃₂O₁₅

^{13}C RMN (75.5 MHz, DMSO) 176.27 (C-4), 170.43 (CH₃C=O, C-6''), 170.08 (CH₃C=O, C-4''), 169.54 (CH₃C=O, C-2''), 169.34 (CH₃C=O, C-3''), 169.17 (CH₃C=O, C-5), 162.52 (C-7), 162.42 (C-9), 159.83 (C-5), 158.31 (C-2), 150.69 (C-4'), 127.88 (C-2', C-6'), 123.35 (C-1'), 114.49 (C-3', C-5'), 112.82 (C-10), 109.17 (C-6), 107.09 (C-3), 102.72 (C-8), 98.16 (C-1''), 72.50 (C-5''), 72.45 (C-2''), 70.95 (C-4''), 68.19 (C-3''), 61.98 (C-6''), 55.52 (OCH₃), 21.10 (CH₃COO, C-5), 20.57 (CH₃COO de glucosa).

7.3. Identificación de 7-O-β-D-tetraacetilglucopiranosil de acetina (1)

Con la reacción de acetilación únicamente fueron sustituidos los grupos OH del anillo de la glucosa. Se obtuvo un sólido amarillo con un punto de fusión de 145-146 °C. El espectro de Resonancia magnética de H¹ se observó las señales 2.0-2.3, que corresponden a cuatro singuletes, cada uno integra para tres protones que se asignan a los cuatro residuos de acetato (CH₃OO) que se encuentran unidos al anillo de glucosa (Fig. 3, ANEXO).

pf=152°C. ^1H RMN (300 MHz, Cloroformo-d) δ 12. (1H, s, OH-5), 7.84 (2H, d, J= 8.9 Hz, H-6' y H-2'), 7.02 (2H, d, J= 9.0 Hz, H-5' y H-3'), 6.60 (1H, s, H-3), 6.59 (1H, d, J= 2.2 Hz, H-8), 6.45 (1H, d, J= 2.2 Hz, H-6), 3.90, 3H, s, OCH₃), 2.11- 2.05(12H, m, CH₃COO), ESIMS (m/z) 615.1348 [M+H] C₃₀H₃₀O₁₄

7.4. Resultados de Pruebas Biológicas

7.4.1. Ensayo de sulforodamina B (SRB) para la evaluación de la actividad antiproliferativa.

Se determinó la inhibición de proliferación de **1** en las líneas celulares MCF-7 (cáncer de mama), HCT-15 (cáncer de colon), PC-3 (cáncer de próstata), K-562 (eritroleucemia humana) a la concentración 50 μ M. Solo en aquellas que mostraron una actividad mayor al 70% de inhibición del crecimiento celular, se determinó la CI_{50} . Los resultados se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Inhibición de proliferación de **1** por el método de sulforodamina (SRB) a 48 h en líneas celulares del cáncer humano. NA=No Activo

Líneas celulares (CI_{50} μ M)				
	MCF-7	HCT-15	PC-3	K562
1	NA	36.93 \pm 0.6	8.15 \pm 1.5	<70
CDDP	7.5 \pm 0.5	10.8 \pm 0.6	8.9 \pm 0.4	6.12 \pm 1.1

7.4.2. Efecto antiinflamatorio del derivado **1** en el modelo auricular de ratón inducido por TPA a 4 h.

Se determinó la actividad antiinflamatoria a partir del modelo de edema auricular en ratón inducido por el TPA. Los resultados muestran que el derivado acetilado **1** inhibió el edema de la oreja de ratón con un efecto dosis respuesta a las concentraciones 0.1 (* $p < 0.05$) y 0.31, 1 μ M/oreja, (** $p < 0.01$) comparado con el control TPA (Fig. 7A) con mayor actividad la concentración 1 μ M (** $p < 0.01$), se observa una actividad similar al fármaco de referencia Indometacina (Fig. 7B), por lo que se determinaron los valores de

Cl₅₀ obteniendo que el derivado **1** presentó una (Cl₅₀ 0.31μM/oreja) con una actividad similar al fármaco de referencia Indometacina (Cl₅₀ 0.24 μM/oreja).

7.4.3. Inhibición de la Actividad enzimática de la MPO en la inflamación inducida por TPA a 4 h.

El TPA en la inflamación conduce a la infiltración de linfocitos polimorfonucleares (neutrófilos) induciendo la actividad enzimática de la mieloperoxidasa (MPO). En este trabajo se evaluó la actividad de MPO en tejido de oreja de ratón después de ser tratada con TPA a las concentraciones (0.031, 0.1, 0.31, 1 μM/oreja) del derivado **1** y el fármaco de referencia. En los resultados se observa que TPA induce un incremento en la actividad de MPO, el derivado **1** disminuye de manera similar la MPO a las concentraciones 0.1 y 1 μM/oreja siendo significativa 0.31 μM/oreja (*p<0.05), a las concentraciones 0.1 (*p<0.05) y 0.31, 1 μM/oreja (**p < 0.01) del fármaco de referencian se observa una actividad dosis respuesta (Fig. 8).

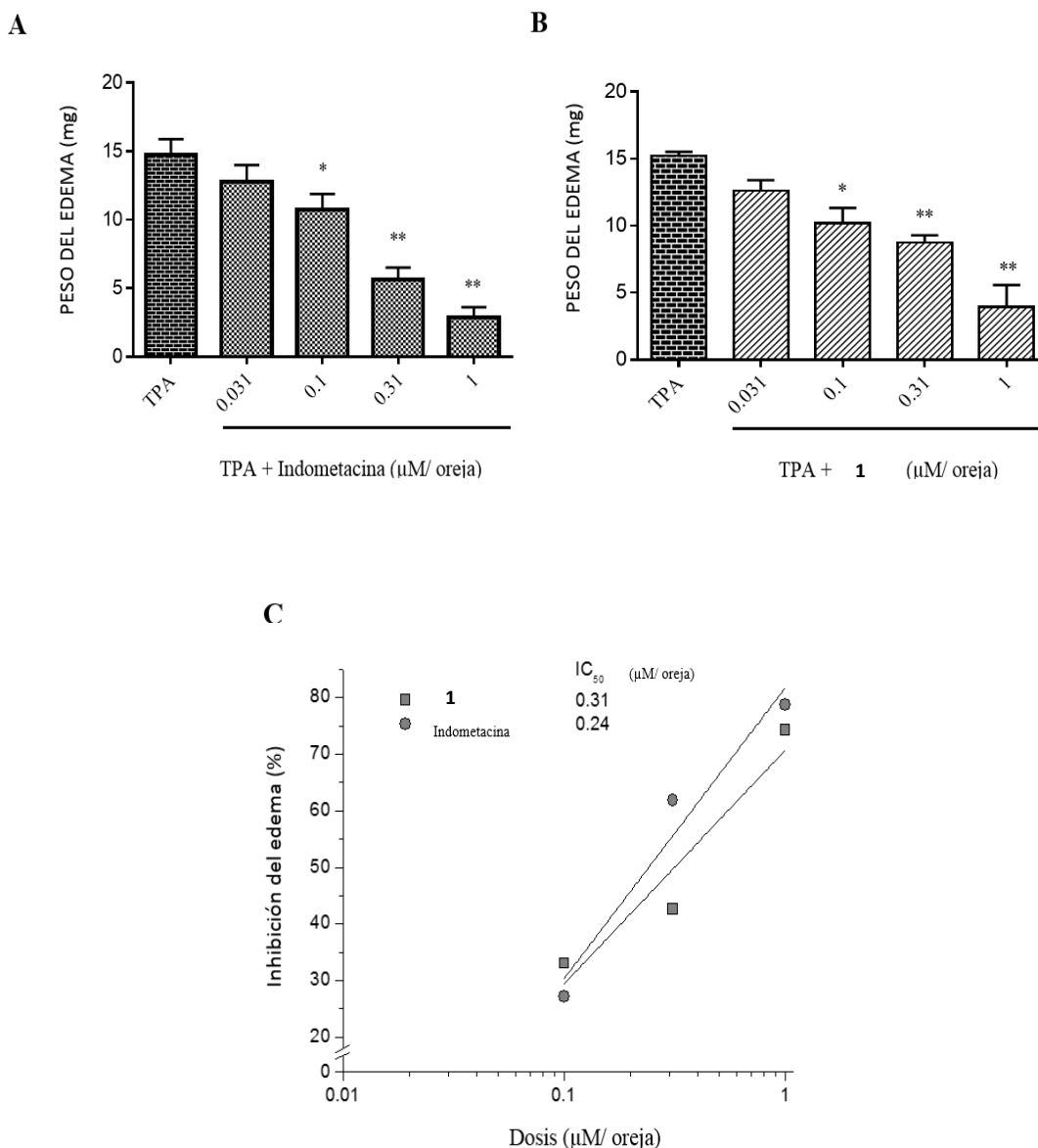


Figura 7. Efecto antiinflamatorio en el modelo auricular inducido por TPA a 4 h. (A, B) Se determinó la actividad antiinflamatoria de **1** y el fármaco de referencia Indometacina a las concentraciones 0.031, 0.1, 0.31, 1 µM. Los resultados son expresados como la media ± ES (error estándar) del peso de la oreja del animal (n=4 ó 5), se analizaron mediante ANOVA seguido de una prueba de Dunnett, los valores *p<0.05, **p < 0.01 se consideran como diferencia significativa con respecto al grupo TPA. **C).** Comparación del IC₅₀ obtenido por regresión lineal, entre el fármaco de referencia y el derivado **1**. Los resultados se expresan como % de inhibición del edema.

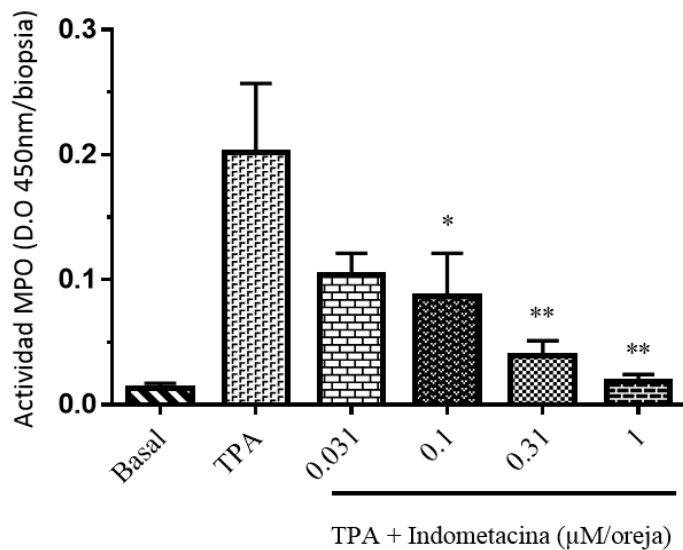
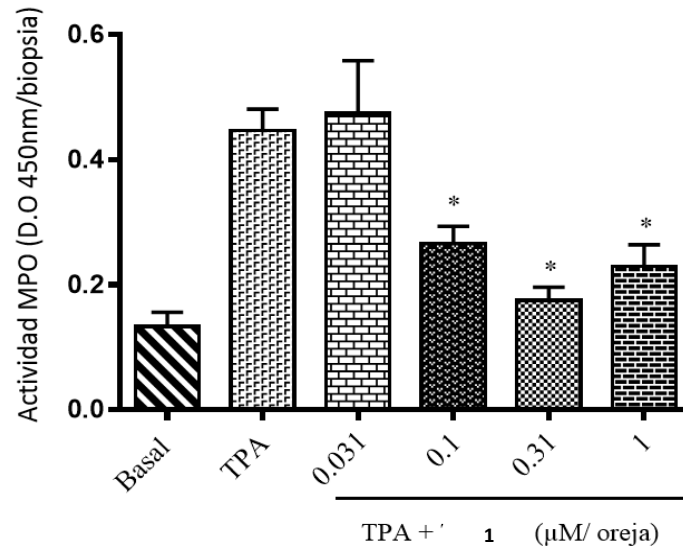


Figura 8. Inhibición de la Actividad enzimática de la MPO en la inflamación inducida por TPA a 4

h. Después de la administración de TPA, las orejas de ratón fueron tratadas con el derivado **1** y el fármaco de referencia Indometacina a las concentraciones 0.031,0.1, 0.31, 1 μ M. Se tomaron biopsias de la oreja de ratón para determinar la actividad de la enzima MPO. Los resultados se representan como DO 450nm /Biopsia. Los valores * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ se consideran como diferencia significativa con respecto al grupo TPA.

8. Discusión

La flavona glicosilada tilianiana, posee efectos farmacológicos como antihipertensiva, antiinflamatoria, (Hernández-Abreu *et al.*, 2009; Hernández-Abreu *et al.*, 2011; González-Ramírez *et al.*, 2012). En investigaciones previas demostramos que éste glucosido tiene actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer humano, sin embargo fue relativamente baja. Tomando en cuenta lo anterior, decidimos realizar la acetilación de la tilianina como un primer acercamiento a las posibles modificaciones químicas de éste glucosido. De la reacción de acetilación se obtuvo la 7-O- β -D-pentoacetil glucopiranosil de acacetina (**2**) y el 7-O- β -D-tetraacetilglucopiranosil de acacetina (**1**). La única diferencia estructural de estas moléculas es que el C-5 del esqueleto principal de **1**, no está sustituido por el grupo acetato (CH₃OO).

El potencial antiproliferativo *in vitro* de **1** se demostró por el método colorimétrico de sulforrodamida B en líneas celulares de cáncer humano. Los resultados indicaron selectividad para inhibir el crecimiento de la línea celular PC-3 con CI₅₀ 8.15 μ M con igual potencia que cisplatino (antineoplásico) con CI₅₀ 8.9 μ M. Para la línea celular HCT-15 la CI₅₀ fue de 36.93 μ M y el cisplatino de una CI₅₀ 10.8 μ M. Estos resultados coinciden con la actividad antiproliferativa del derivado acetilado **2** que inhibe el crecimiento de las líneas celulares MCF-7 (CI₅₀ 4.42) y PC-3 (CI₅₀ 19.80) (resultados no publicados).

Para determinar la actividad antiinflamatoria de **1** se utilizó el éster de forbol TPA, que es capaz de generar un edema localizado en la oreja de ratón, induce un engrosamiento del tejido, vasodilatación y la infiltración de linfocitos polimorfonucleares PMN (neutrófilos) (Stanley *et al.*, 1991). El derivado **1** mostro capacidad para reducir el edema de oreja de ratón con un CI₅₀ de 0.31 μ M, con una actividad parecida al fármaco de referencia Indometacina con un CI₅₀ de 0.24 μ M. El aumento de los niveles de Mieloperoxidasa en los sitios de infección, evidencia incremento de la migración de neutrófilos. El derivado **1** demostró reducir la actividad MPO a las dosis 0.1, 0.31, 1 μ M/oreja. El TPA genera señales que desencadenan un proceso inflamatorio a través de la activación de la PKC, inducción de la COX, aumento de prostanglandinas PGE₂ y TNF- α (Murakawa *et al.*, 2006). El fármaco de referencia indometacina inhibe la actividad de las ciclooxigenasas, que regula

la biosíntesis de prostaglandinas (Frenkian *et al.*, 2001), las cuales pueden promover la progresión de cáncer.

Es posible que la eficacia del derivado **1** (Fig. 9) esté relacionada con su estructura, siendo la glucosa acetilada (CH₃OO) la responsable de una mejor capacidad antiproliferativa en comparación al compuesto original la tilianina la cual presenta efectos citotóxicos bajos en líneas celulares de cáncer humano. Posiblemente los anillos aromáticos de la flavona son responsables de su capacidad antiinflamatoria de **1** y de tilianina (Hong *et al.*, 2001; Nam *et al.*, 2005). Ésta propuesta está apoyada por el hecho la acetina inhibe iNOS y COX-2 en macrófagos inducidos con LPS mediante la inhibición de NF-κB (Pan *et al.*, 2006). Estos resultados concuerdan con la actividad antiinflamatoria de la tilianina que en células endoteliales inhibe a TNF-α e IL-1β que inducen la expresión de la molécula VCAM-1 importante para la adhesión en la migración leucocitaria (Hong *et al.*, 2001; Nam *et al.*, 2005).

Es probable que el mecanismo de acción a través del cual **1** tenga una actividad antiinflamatoria parecida a la acetina y la tilianina es inhibiendo las ciclooxygenasas y a TNF-α, este último un importante mediador de la respuesta inflamatoria aguda y relacionada en la progresión de tumores (Rodríguez-Berriguete *et al.*, 2013). Experimentos posteriores en nuestro laboratorio confirmaran esta hipótesis.

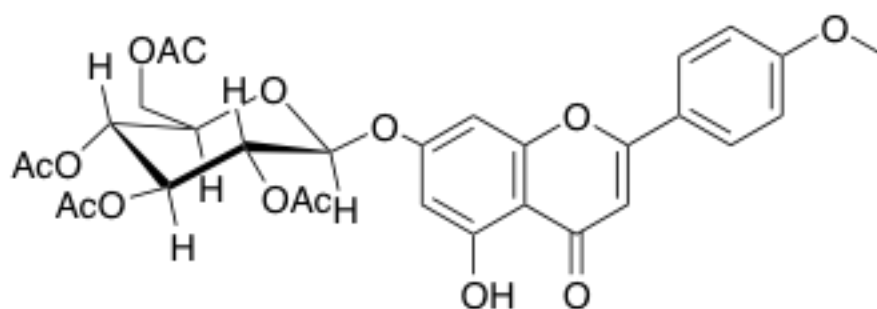


Figura 9. Estructura química del derivado acetilado 7-O-β-D tetraacetilglucopiranosil de acetina (**1**). Ac= (CH₃OO)

9. Conclusión

La modificación estructural de la tilianina al adicionar el grupo acetilo (CH_3OO) mejoro la capacidad antiinflamatoria y antiproliferativa de la molécula. Este estudio permitió informar por primera vez que el derivado acetilado **1** muestra una actividad antiinflamatoria *in vivo*, al reducir el edema de ratón y la actividad de la enzima mieloperoxida. Así como los ensayos de actividad antiproliferativa *in vitro* revelaron que su actividad antiproliferativa es selectiva para las líneas celulares PC-3 y HCT-15. Sin embargo, aún es necesario conocer el mecanismo a través de los cuales esta molécula exhibe sus propiedades antiinflamatorias.

10. Referencias

Abdallah, H. M., Almowallad, F. M., Esmat, A., Shehata, I. A. , Abdel-Sattar, E.A. (2015), Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Chrozophora tinctoria*, *Phytochemistry Letters*, **13**: 74-80

Adam, M., Gajdova, S., Kolarova, H., Kubala, L., Lau, D., Geisler, A., Ravekes, T., Rudolph, V., Tsao, S.P., Blankenberg, S., Baldus, S., Klinke, A., (2014), Red blood cells serve as intravascular carriers of myeloperoxidase, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **74**:353-363

Aggarwal, B.B., Shishodia, S., Sandur, S.K., Pandey, M.K., Sethi, G., (2006) Inflammation and cancer: How hot is the link?, *Biochemical pharmacology*, **72**:1605-1621

Akre, K., Ekström, A.M, Signorello, L.B, Hansson, L-E and Nyrén, O., (2001), Aspirin and risk for gastric cancer: a population-based case–control study in Sweden, *British Journal of Cancer*, **84**:965-968

Alonso-Castro, A.J., Ortiz-Sánchez, E., García-Regalado, A., Ruiz, G,, Núñez-Martínez, J.M., González-Sánchez, I., Quintanar-Jurado, V., Morales-Sánchez, E., Dominguez, F., López-Toledo, G., Cerbón, M.A., García Carrancá, A., (2013) Kaempferitrin induces apoptosis via intrinsic pathway in HeLa cells and exerts antitumor effects, *Journal of Ethnopharmacology*, **145**:476-489

Argueta, V.A., Cano, L., Rodarte, M., (1994), Atlas of Plants from Mexican Traditional Medicine, III, Indigenous National Institute, Mexico City, pp. 1355-1356

Arnhold, J., Flemmig, J., (2010), Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **500**:92-106.

Bradley, P.P, Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., (1982), Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker, *The Journal of investigative dermatology*, **78**:206-209.

Bye, R., Linares, E., Ramamoorthy, T. P., García, F., Collera, O., Palomino, G., Corona, V., (1987), *Agastache mexicana* ssp. *Xolocotziana* (Lamiaceae), A new taxon from mexican medicinal plants, *Phytologia*, **62**:156-163

Cornejo-Garrido, H., Nieto-Camacho, A., Gómez-Vidales, V., Ramírez-Apán, M.T., P. del Angel, Montoya, J.A., Domínguez-López, M., Kibanova, D., Cervini-Silva, J., (2012), The anti-inflammatory properties of halloysite, *Applied Clay Science*, **57**:10–16

Dhalendra, G., Satapathy, T., Roy, A., (2013) Animal Models for Inflammation: A Review, *Pharmaceutical Asian Journal of Research*, **3**: 207-212

Estrada-Reyes, R., Aguirre Hernández, E, García-Argáez A., Soto Hernández, M., Linares, E., Bye, R., Heinze, G., Martínez-Vázquez, M., (2004), Comparative chemical composition of *Agastache mexicana* subsp. *mexicana* and *A. mexicana* subsp. *xolocotziana*, *Biochemical Systematics and Ecology*, **32**:685-694

Estrada-Reyes, R., López-Rubalcava, C., Ferreyra-Cruz, O.A., Dorantes-Barrón, A.M., Heinze, G., Moreno Aguilera, J., Martínez-Vázquez, M., (2014), Central nervous system effects and chemical composition of two subspecies of *Agastache mexicana*; an ethnomedicine of Mexico, *Journal of Ethnopharmacology*, **153**:98-110

Frenkian, M. Segond, N., Pidoux, E., Cohen, R., Jullienne A., (2001), Indomethacin, a cox inhibitor, enhances 15-PGDH and decreases human tumoral C cells proliferation, *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, **65**:11-20

Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. World Health Organization

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M., (2010) Immunity, Inflammation, and Cancer, *Cell*, **140**: 883-899

Goel, G., Makkar, H.P., Francis, G., and Becker, K., (2007). Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and Toxicity in animals, *International Journal of Toxicology*, **26**:279-288

González-Ramírez, A., González-Trujano, M. E., Pellicer F., López-Muñoz, Francisco, J., (2012), Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the *Agastache mexicana* extracts by using several experimental models in rodents, *Journal of Ethnopharmacology* **142**:700-705

Hernández-Abreu, O., Castillo-España, P., León-Rivera, I., Ibarra-Barajas, M., Villalobos-Molina, R., González-Christen, J., Vergara-Galicia, J., Estrada-Soto, S., (2009), Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening, *Biochemical Pharmacology*, **78**:54-61

Hernández-Abreu, O., Durán-Gómez, L., Best-Brown, R., Villalobos-Molina, R., Rivera-Leyva, J., Estrada-Soto, S., (2011), Validated liquid chromatographic method and analysis of content of tilianin on several extracts obtained from *Agastache mexicana* and its correlation with vasorelaxant effect, *Journal of Ethnopharmacology*, **138**: 487-491

Hernández-Abreu, O., Torres-Piedra, M., García-Jiménez, S., Ibarra-Barajas, M., Villalobos-Molina, R., Montes, S., Rembao, D., Estrada-Soto, S., (2013), Dose-dependent antihypertensive determination and toxicological studies of tilianin isolated from *Agastache Mexicana*, *Journal of Ethnopharmacology*, **146**:187-191

Hirobe, C., Qiao, Z. S., Takeya, K., Itokawa, H., (1997) Cytotoxic flavonoids from *Vitex agnus-castus*, *Phytochemistry*, **46**: 521-524

Hong, J.J, Choi, J.H., Oh, S.R., Lee, H.K., Park, J.H, Lee, K.Y., Kim, J.J., Jeong, T.S., Oh, G.T., (2001), Inhibition of cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression; possible mechanism for anti-atherogenic effect of *Agastache rugose*, *FEBS Letters*, **495**: 142-147

Juárez-Vázquez, M. del C., Alonso-Castro, A.J., García Carrancá, A. (2013) Kaempferitrin induces immunostimulatory effects *in vitro*, *Journal of Ethnopharmacology*, **148**: 337–340

Jung, H.A., Jin, S.E., Min, B.S., Kim, B.W., Choi, J.S., (2012), Anti-inflammatory activity of Korean thistle *Cirsium maackii* and its major flavonoid, luteolin 5-O-glucoside, *Food and Chemical Toxicology*, **50**:2171-2179

Klebanoff, S.J., Kettle, A.J., Rosen, H., Winterbourn, C.C. and Nauseef, W.M., (2013), Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms, *Journal of Leukocyte Biology*, **93**: 185–198.

Kumar, S. and Pandey, A. K. (2013), Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview, *The Scientific World Journal*, 2013:1-16

Linares, M.E., Bye, R. y Flores, B., (1988), Selección de plantas medicinales de México. México, D.F., Limusa Noriega

Liu, J., Chen, L., Cai, S., Wang, Q., (2012) Semisynthesis of apigenin and acacetin-7-O- β D-glycosides from naringin and their cytotoxic activities, *Carbohydrate Research*, **357**: 41-46

Loria, V., Dato, I., Graziani, F., and Biasucci, L.M., (2008), Myeloperoxidase: A New Biomarker of Inflammation in Ischemic Heart Disease and Acute Coronary Syndromes, *Mediators of Inflammation*, 2008:1-4

Maierov, E. G., Keskin, O., GURSOY, A., Nussinov, R., (2013), The structural network of inflammation and cancer: Merits and challenges, *Seminars in Cancer Biology*, **3**:243-251

Mellado García M., Fernández Soriano S., y Rodríguez Frade, J.M., (2005), Tráfico leucocitario. Quimiocinas. Moléculas de adhesión. Distribución de las células del sistema immune, *Medicine*, **9**: 2181-2188

Menter, D.G., and DuBois, R.N., (2012), Prostaglandins in Cancer Cell Adhesion, Migration, and Invasion, *International Journal of Cell Biology*, **2012**:1-21

Molina-Hernandez, M., Tellez-Alcantara, P., Martinez, E. (2000), *Agastache mexicana* may produce angiogenic-like actions in the male rat, *Phytomedicine*, **7**:199-203

Monteagudo, C., Pellín-Carcelén, A., Martín, J.M., Ramos D., (2011), Role of Chemokines in Melanoma Progression, *Actas Dermo-Sifiliográficas*, **102**: 498-504

Murakawa, M., Yamaoka, K., Tanaka, Y., Fukuda, Y., (2006), Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice *biochemical pharmacology*,**71**:1331-1336

Nam, K.W., Kim, J., Hong, J.J., Choi, J.H., Mar, W., Cho, M.H., Kim, Y.M., Oh, S.R., Lee, H.K., Nam, K.H., Oh, G.T., (2005), Inhibition of cytokine-induced I κ B kinase activation as a mechanism contributing to the anti-atherogenic activity of tilianin in hyperlipidemic mice, *Atherosclerosis*, **180**:27-35

Ouyang, N., Williams, J.L., Tsioulis, G.J., Gao, J.,Iatropoulos M.J., Kopelovich, L., Kashfi, K., and Rigas, B., (2006), Nitric Oxide-Donating Aspirin Prevents Pancreatic Cancer in a Hamster Tumor Model, *Cancer Research*, **66**:4503-4511

Pan, M.H., Lai, C.S., Wang, Y.J., Ho, C.T., (2006), Acacetin suppressed LPS-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TPA-induced tumor promotion in mice, *Biochemical pharmacology*, **72**: 1293-1303.

Papac, R.J., (2001), Origins of cancer therapy, *Yale Journal of Biology and Medicine*, **74**:391-398.

Parra-Delgado, H., Compadre, C.M., Ramírez-Apan, T., Muñoz-Fambuena, M. J., Compadre, R. L., Ostrosky-Wegman, P. and Martínez-Vázquez, M., (2006), Synthesis and comparative molecular field analysis (CoMFA) of argentatin B derivatives as growth inhibitors of human cancer cell lines, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14**:1889-1901

Passos, G.F., Medeiros, R., Marcon R., Nascimento, A.F., Calixto, J.B, Pianowski, L.F., (2013), The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice, *European Journal of Pharmacology*, **698**:413-420

Rao, C.V, Mohammed, A., Janakiram, N.B., Li, Q., Ritchie R. L., Lightfoot, S., Vibhudutta, A. and Vernon, S.E, (2012), Inhibition of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Progression to Carcinoma by Nitric Oxide-Releasing Aspirin in p48^{Cre/+}-LSL-Kras^{G12D/+}Mice, *Neoplasia*. **14**: 778-787

Ricciotti, E., and FitzGerald, G.A., (2011), Prostaglandins and Inflammation, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **31**: 986-1000

Rodríguez-Berriguete, G., Sánchez-Espiridión, B., Cansino, J.R., Olmedilla, G., Martínez-Onsurbe, P., Sánchez-Chapado, M., Paniagua, R., Fraile, B., Royuela, M., (2013) Clinical significance of both tumor and stromal expression of components of the IL-1 and TNF- α signaling pathways in prostate cancer, *Cytokine*, **64**: 555-563

Roy, S., Banerjee, B., Vedasiromoni, J.R., (2014) Cytotoxic and apoptogenic effect of *Swieteniamahagoni* (L.) Jacq. leaf extract in human leukemic cell lines U937, K562 and HL-60, *Environmental toxicology and pharmacology*, **37**: 234-247

Rubio, C., (1984), Antitumoral activity of indomethacin on experimental esophageal tumors, *Journal of the National Cancer Institute*, 72:705–707

Sahin, I.H., Hassan, M.M., Garrett, C.R., (2014), Impact of non-steroidal anti-inflammatory drugs on gastrointestinal cancers: Current state-of-the science, *Cancer Letters*, **345**:249-257

Santillán-Ramírez, M, A., López-Villafranco, M. E., Aguilar-Rodríguez, S., y Aguilar-Contreras, A., (2008), Estudio etnobotánico, arquitectura foliar y anatomía vegetativa de *Agastache mexicana* ssp.*mexicana* y *A. mexicana* ssp. *xolocotziana*, *Revista Mexicana de Biodiversidad*, **79**: 513-524.

Solís-Martínez, R., Hernández-Flores, G., Ochoa-Carrillo, F.J., Ortiz-Lazareno, P. y Bravo-Cuellar, A., (2015), Macrófagos asociados a tumores contribuyen a la progresión del cáncer de próstata , *Gaceta Mexicana de Oncología*, **14**:97-102

Stanley, P.L., Steiner, S., Havens, M., Tramposch, K.M., (1991) Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, *Skin Pharmacol*, **4**:262-71

- Toche P. P.**, (2012), Visión Panorámica del sistema inmune, *Revista Médica Clínica Las Condes*, **23**: 446-457
- Ueda, M., Shimada, T., Goto, Y., Tei, K., Nakai, S., Hisa, Y., Kannagi, R.**, (2010), Expression of CC-chemokine receptor 7 (CCR7) and CXC-chemokine receptor 4 (CXCR4) in head and neck squamous cell carcinoma, *Auris Nasus Larynx*, **37**:488-495
- Veitch, N.C., and Grayer, R.J.**, (2011), Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins, *Natural Product Reports*, **28**:1626-1695
- Vichai, V., & Kirtikara, K.**, (2006), Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, *Nature Protocols*, **1**:1112-1116
- Vidal-Vanaclocha., F.**, (2009), Inflammation in the molecular pathogenesis of cancer and atherosclerosis, *Reumatología Clínica*, **5**:40-43
- Vogelmann, A. E.**, (1984), Flavonoids of Agastache section Agastache, *Biochemical Systematics and Ecology*, **12**:363-366
- Waldner, M.J., and Neurath, M.F.**, (2009), Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development, *Seminars in Immunopathology*, **31**:249-256
- Wu, C.Y, Wu, M.S, Kuo, K.N, Wang, C.B, Chen, Y.J, Lin, J.T.**, (2010), Effective reduction of gastric cancer risk with regular use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Helicobacter pylori-infected patients, *Journal of Clinical Oncology*, **28**:2952-2957
- Xiao, J., Muzashvil, T.S., Georgiev, M.I.**, (2014), Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids, *Biotechnology Advances*, **32**:1145-1156

Xu, W., Liu, J., Li, C., Wu, H. Z, Liu Y.W., (2008) Kaempferol-7-O- β -D-glucoside (KG) isolated from *Smilax china* L. rhizome induces G₂/M phase arrest and apoptosis on HeLa cells in a p53-independent manner, *Cancer Letters*, **264**: 229-240

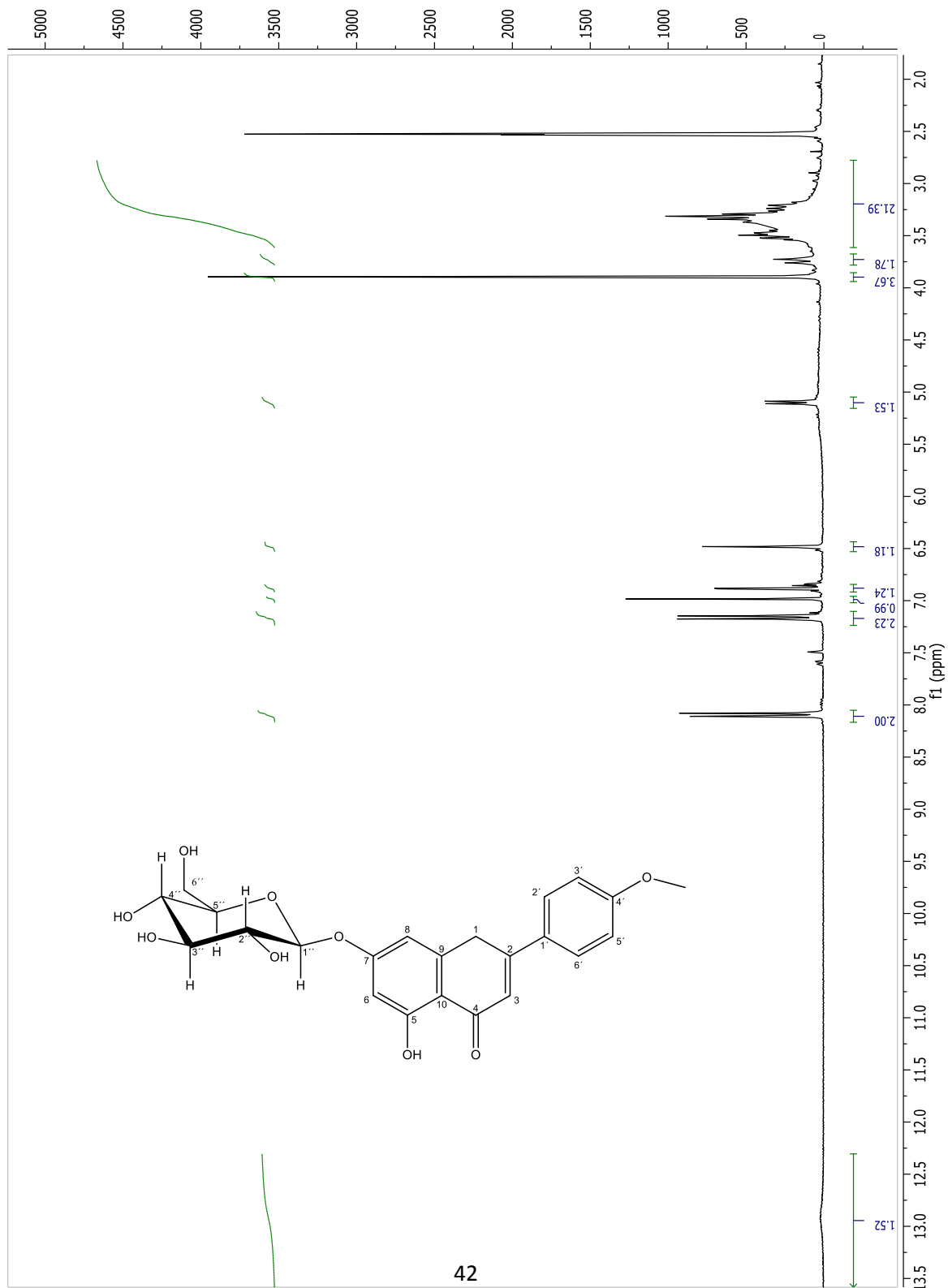
Yu, S., Jia, L., Zhang, Y., Wu, D., Xu, Z., Ng, C-F, To, K.K., Huang, Y., Chan, F.L. (2013), Increased expression of activated endothelial nitric oxide synthase contributes to antiandrogen resistance in prostate cancer cells by suppressing androgen receptor transactivation, *Cancer Letters*, **328**: 83-94

Zha, S., Yegnasubramanian, V., Nelson, W.G., Isaacs, W.B., De Marzo, A.M., (2004), Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective, *Cancer Letters*, **215**:1-207

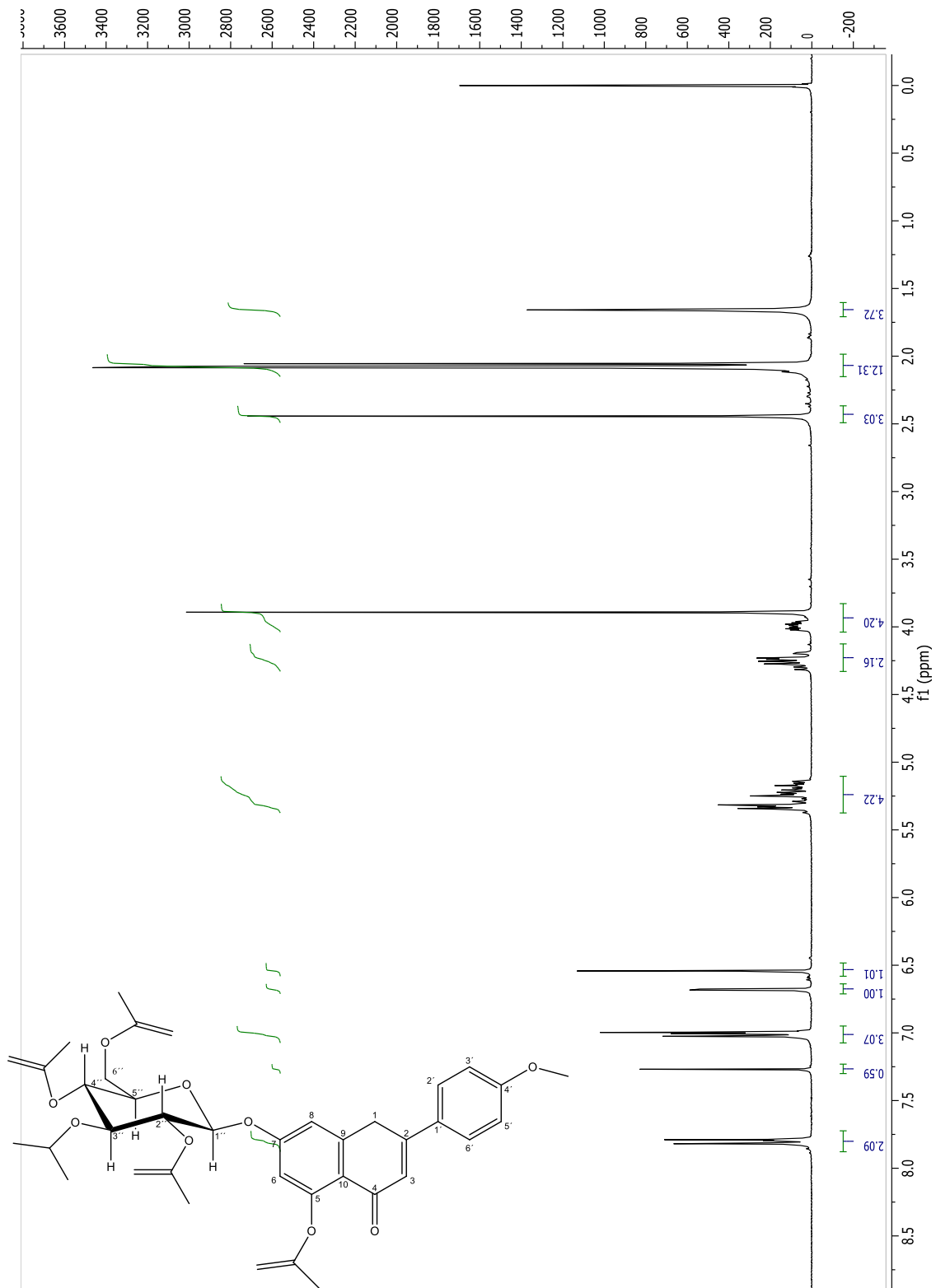
Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Recurso en Línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>. Fecha de consulta 1 de Mayo de 2013

11. ANEXOS

Anexo 1. Espectro RMN-1 H (300 MHz) DMSO-d₆ de 7-O-(β-D-glucopiranosil acetina) (Tilianina)



Anexo2. Espectro RMN-1 H (300 MHz) CDCl₃ de 7-O-β-D-pentoacetil glucopiranosil acetina (2)



Anexo 3. Espectro RMN-1 H (300 MHz) CDCl₃ de acetina-7-O-β-D-acetilglicosido (1)

