T
530

90900

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

Estudio de *Cuphea aequipetala* Cav. sobre la proliferación *in vitro* de células humanas transformadas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

ELISA VEGA AVILA

COMITÉ TUTORAL:

DIRECTORES:

DRA. MA. LUISA VILLARREAL ORTEGA

DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS

ASESOR:

DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA.

MÉXICO, D. F. ENERO, 2005

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

El doctorado en Ciencias Biológicas de la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo consejo, con el convenio PFP-20-93.

El Jurado designado por las

Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud

De las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

ELISA VEGA AVILA

El día de enero del año de 2005

Miembros del Jurado:

Dr. Dr. Rubén Román Ramos. Presidente. _____

Dra. Ma. Luisa Villarreal Ortega. Secretaria. _____

Dr. Manuel Jiménez Estrada. Vocal. _____

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar. Vocal. _____

Dr. Ricardo Reyes Chilpa. Vocal. _____

El trabajo de Tesis se desarrolló en los laboratorios de:

Hematología Experimental (S-254).

Departamento de Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.

Productos Naturales (L-210).

Instituto de Química.

Universidad Nacional Autónoma de México.

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORES DE TESIS

Dra. Ma. Luisa Villarreal Ortega.

Investigador Titular "C". Jefa del Departamento de Productos Naturales.

Centro de Investigación en Biotecnología.

Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Nivel II.

Dr. Rubén Román Ramos.

Profesor Titular "C". Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Nivel II.

ASESORES

Dr. Manuel Jiménez Estrada.

Investigador Titular "C". Jefe del Departamento de Productos Naturales.

Instituto de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores. Nivel III.

AGRADECIMIENTOS

En el Instituto de Química de la UNAM recibí el apoyo de diversas personas y deseo agradecer a la M. en C. Ma. Teresa Ramírez Apán, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Q.F.B. Aída Soto y en especial al Dr. Manuel Jiménez Estrada, asesor de esta tesis, quien de manera desinteresada me recibió en su laboratorio, me proporcionó los medios y compartió sus ideas y conocimientos.

Al Dr. Rubén Román Ramos, quien me ha brindado el apoyo durante mi estancia en el programa de Doctorado de Ciencias Biológicas.

Con la Dra. Ma. Luisa Villarreal Ortega he compartido diversas etapas de mi desarrollo profesional. En la UAM-I, fue la jefa del laboratorio al que he estoy adscrita y desde entonces compartió conmigo sus conocimientos. Cuando realicé la primera investigación bibliográfica acerca de las plantas empleadas contra el cáncer, me lleve una sorpresa agradable al descubrir que la Dra. Villarreal cuenta con el reconocimiento internacional, en el área en la que decidí realizar la presente investigación. Es tenue la línea que divide al compañero del profesor, no es mi deseo romperla al decirte, gracias Ma.Luisa.

Al Dr. Rodolfo Velasco Lezama y Q.B.P. Rafaela Tapia Aguilar, compañeros del laboratorio de Hematología Experimental, por la ayuda y comprensión que me han brindado.

Al Dr. Adolfo Espejo, quien identificó las diversas especies de plantas estudiadas.

A la Dra. Margaret Lee Zoreda, docente del Departamento de Lenguas extranjeras de la UAM-I.

A Xochitl, Carolina, Ma. Isabel, Consuelo, Inés Mercedes, Lupita, Jenny, Mayerlin, Celedonio y José de Jesús. Todos ellos alumnos de la UAM, con los que he compartido

mis conocimientos y quienes con sus inquietudes, respecto a las plantas, me condujeron a continuar estudiando y adquirir nuevos conocimientos. Quizás, muchas veces, aprendimos juntos.

A mi alumno Ricardo, quien me ha enseñado como trabajar los diferentes programas de la computadora. Sin su ayuda, la escritura de esta tesis se habría realizado en un tiempo mayor.

En algunos trimestres no tuve avances en el trabajo experimental y debo confesar que "entre en crisis" por lo que mi hijo Iván, hermanos, mi prima Irma y mis amigas Yola y Estela me "prestaron su hombro para llorar". Gracias porque al escucharme y aconsejarme me dieron elementos para no claudicar.

Finalmente quiero mencionar a tres personas que han sido claves en mi vida. Ellos son Oncólogo Javier Canseco Luna, Bertha Avila (mi mamá) y Enrique Vega (mi papá). Gracias por la confianza, el apoyo, la comprensión y el cariño que me han brindado.

ÍNDICE GENERAL

Índice general. I

Índice de figuras. VI

Índice de tablas. X

Símbolos y abreviaturas. X

Resumen. XIII

Abstract. XV

1. Introducción y antecedentes.

1.1. Generalidades del cáncer. 1

1.1.1. Incidencia del cáncer. 2

1.1.2. Mortalidad mundial masculina y femenina 8

1.2. Origen del cáncer. 10

1.2.1. Características de la célula cancerosa. 15

1.2.2. Factores genéticos y ambientales. 16

1.3. Métodos de control del cáncer.

1.3.1. Cirugía. 18

1.3.2. Radioterapia. 19

1.3.3. Quimioterapia. 21

1.4. La citotoxicidad como modelo para evaluar productos con potencial anticancerígeno. 29

1.5. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. 32

1.6. Asociación de la dieta en la protección contra el cáncer. 48

1.7. Las plantas en el tratamiento del cáncer. 52

1.8. Generalidades de *Cuphea aequipetala*.

1.8.1. Aspectos botánicos y etnomédicos. 54

1.8.2 Aspectos químicos. 56

1.8.3 Aspectos farmacológicos. 56

2. Justificación. 58

3. Hipótesis. 60

4. Objetivos.

4.1 Objetivo general. 61

4.2. Objetivos particulares. 61

5. Material y Métodos.

5.1. Adquisición de *Cuphea aequipetala*. 62

5.2. Obtención de extractos y fracciones. 62

5.3. Determinación de la actividad citotóxica. 68

5.4. Análisis estadístico de datos biológicos. 71

5.5. Pruebas químicas. 73

5.6. Pruebas físicas. 74

5.7. Cromatografía en placa fina. 74

6. Resultados y discusión.

6.1 Rendimiento de los extractos. 77

6.2 Actividad citotóxica. 77

6.3. Características químicas y datos espectroscópicos. 86

6.4. Actividades biológicas de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones con actividad citotóxica. 94

6.4.1. Características químicas y actividades biológicas de los flavonoides. 96

6.4.2. Características químicas y actividades biológicas de los taninos. 99

6.4.3. Características químicas y actividades biológicas del manitol. 102

7.Conclusiones. 106

8. Perspectivas. 107

9. Referencias. 108

Apéndices.

Apéndice 1. Compilación de plantas mexicanas empleadas en enfermedades con sintomatología cancerosa. 126

Apéndice 2. Gráficas de citotóxicidad. 144

Apéndice 3. Espectros de infrarrojo. 155

Apéndice 3B. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^{1}H. 158

Apéndice 3C. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C. 166

Apéndice 3D. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C. DEPT. 169

Apéndice 3E. Espectro HETCOR. 170

Apéndice 3F. Espectro de masas. 172

Apéndice 4. Preparación de reactivos 173

Artículo publicado

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia de nuevos cánceres en el mundo en el 2000. 3

Figura 2. Incidencia mundial porcentual de nuevos cánceres en año 2000. 4

Figura 3. Mortalidad masculina y femenina ocasionada por los diversos tipos de cáncer. 5

Figura 4. Mortalidad de ambos sexos en México como consecuencia del cáncer. 7

Figura 5. Frecuencia de la mortalidad mundial por diversos tipos de cáncer. 8

Figura 6. Características de la célula cancerosa. 15

Figura 7. Compuestos anticancerosos de origen natural y semisintéticos obtenidos de *Catharanthus roseus*. 34

Figura 8. Compuestos anticancerosos semisintéticos derivados de la epipodofilotoxina. 36

Figura 9. Compuestos anticancerosos semisintéticos derivados de la camptotecina, alcaloide aislado de *Camptoteca acuminata* 39

Figura 10. Diterpenos anticancerosos obtenidos de especies del género *Taxus*. 42

Figura 11. Alcaloides anticancerosos aislados de especies del género *Cephalotaxus*. 44

Figura 12. Compuesto anticancerosos semisintéticos derivados de la elipticina, alcaloide aislado de *Ochrosia elliptica* Labil. 47

Figura 13. Fotografía de *Cuphea aequipetala* Cav. 56

Figura 14. Efecto de la colchicina (control positivo) sobre el cultivo celular DU-145. 73

Figura 15. Inhibición del crecimiento de las diferentes preparaciones de *C. aequipetala* en una dosis única de 100 µg/ml. 78

Figura 16. Fraccionamiento y actividad citotóxica del extracto acetona-agua de *C. aequipetala* sobre la línea cancerosa DU-145. 85

Figura 17. Estructuras químicas de cufina D_1, cufina D_2 , woodfordina C y oenoteina B aisladas de *Cuphea hyssopifolia.* 102

Figura 18. Efecto del extracto AcOEt de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular HEp-2. 144

Figura 19. Efecto del extracto acuoso de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular HEp-2. 144

Figura 20. Efecto de la Fracción VIII° de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular HEp-2. 145

Figura 21. Efecto de la fracción VIII-4 de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular HEp-2. 145

Figura 22. Efecto de la fracción VIIl de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular HEp-2. 146

Figura 23. Efecto de la Colchicina sobre el cultivo celular HEp-2. 146

Figura 24. Efecto de la Colchicina sobre el cultivo celular HCT-15. 147

Figura 25. Efecto de la Fracción VIII-4 de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular HCT-15. 147

Figura 26. Efecto de la Fracción VIII de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular HCT-15. 1458

Figura 27. Efecto de la Fracción VIIl° de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular HCT-15. 148

Figura 28. Efecto del extracto de Acetato de etilo de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular HCT-15. 149

Figura 29. Efecto del extracto acuoso de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular HCT-15. 149

Figura 30. Efecto del extracto acetona-agua (CG) de *C. aquipetala* sobre el cultivo DU-145. 150

Figura 31. Efecto de la fracción PB de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular DU-145. 150

Figura 32. Efecto de la fracción PB2 de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular DU-145. 151

Figura 33. Efecto de la fracción PB5 de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular DU-145. 152

Figura 34. Efecto del compuesto SM3 de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular DU-145. 152

Figura 35. Efecto de la fracción PB4 de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular DU-145. 153

Figura 36. Efecto de la fracción CAcOEt de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular DU-145. 153

Figura 37. Efecto de la fracción PB3 de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular DU-145. 154

Figura 38. Espectro infrarrojo de la fracción VIII-2 de *C. aequipetala.* 155

Figura 39. Espectro infrarrojo de la fracción VIII-4 de *C. aequipetala.* 155

Figura 40. Espectro infrarrojo del compuesto SM3 de *C. aequipetala.* 156

Figura 41. Espectro infrarrojo de 165 de *C. aequipetela.* 156

Figura 42. Espectro infrarrojo de la fracción CAcOEt de *C. aequipetala.* 157

Figura 43. Espectro (^{1}H-RMN) de la fracción VIII-4 de *C. aequipetala.* 158

Figura 44. Espectro (^{1}H-RMN) de la fracción VIII-4 de *C. aequipetala.* 159

Figura 45. Espectro (^{1}H-RMN) de la fracción VIII-4 de *C. aequipetala.* 160

Figura 46. Espectro (^{1}H-RMN) de la fracción VIII-VIII^{0} de *C. aequipetala.* 161

Figura 47. Espectro (^{1}H-RMN) del compuesto de 165 de *C. aequipetala.* 162

Figura 48. Espectro (^{1}H-RMN) del compuesto SM3 de *C. aequipetala.* 163

Figura 49. Espectro (^{1}H-RMN) de la fracción CAcOEt 8 de *C. aequipetala.* 164

Figura 50. Espectro (^{1}H-RMN) de la fracción CAcOEt 8 de *C. aequipetala.* 165

Figura 51. Espectro de (^{13}C-RMN) resonancia de la fracción VIII-4 de *C. aequipetala.* 166

Figura 52. Espectro (^{13}C-RMN) del compuesto 165 de *C. aequipetala.* 167

Figura 53. Espectro de resonancia del compuesto SM3 de *C. aequipetala.* 168

Figura 54. Espectro de ^{13}C-RMN (DEPT), del compuesto 165 de *C. aequipetala.* 169

Figura 55. Espectro HETCOR del compuesto 165 de *C. aequipetala.* 170

Figura 56. Espectro HETCOR del compuesto SM3 de *C. aequipetala.* 171

Figura 56. Espectro de masas del compuesto 165 de *C. aequipetala.* 172

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividades de algunos oncogenes y tipos de cáncer que los presenta. 13

Tabla 2. Actividades de algunos genes supresores de tumores y tipos de cáncer que los presenta. 14

Tabla 3. Causas del cáncer. 17

Tabla 4. Clasificación clásica de los fármacos anticancerosos. 22

Tabla 5. Clasificación de los compuestos anticancerosos en base al mecanismo de acción. 23

Tabla 6. Fármacos dirigidos contra el ADN del tumor: quimioterapia. 25

Tabla 7. Fármacos dirigidos contra el ADN del tumor: modificadores de genes específicos. 26

Tabla 8. Medicamentos dirigidos contra el endotelio y la matriz extracelular. 27

Tabla 9. Medicamentos anticancerosos dirigidos contra los receptores de membrana de la célula tumoral. 28

Tabla 10. Características de los ensayos celulares y moleculares. 30

Tabla 11. Densidades celulares empleadas en las diversas líneas celulares. 69

Tabla 12. Rendimiento de los extractos y té de *Cuphea aequipetala.* 77

Tabla 13. Concentración a la que los extractos y fracciones inhibe el 50% del crecimiento (CE_{50} en μg/ml) de los cultivos HCT-15 y HEp-2. 79

Tabla 14. Actividad citotóxica de la porción extraída con acetona (VIII) y algunas de sus fracciones (CE_{50} μg/ml) sobre la línea HCT-15 de *C. aequipetala.* 81

Tabla 15. Inhibición del crecimiento celular de PC-3 y U-251 por las fases acuosas y orgánicas del extracto acetona/agua. 81

Tabla 16. Porcentaje de inhibición del crecimiento de diversas fracciones presentes en la fase acuosa del extracto acetona:agua de *Cuphea aequipetala*, en una concentración de 100µg/ml. 82

Tabla 17. Actividad citotóxica de las fracciones provenientes del extracto acetona-agua. 84

Tabla 18. Resumen de las características químicas y físicas de extractos y Diversas fracciones de *Cuphea aequipetala*. 93

Tabla 19. Porcentaje de productos naturales que presentan actividad en las neoplasias ováricas. 95

Símbolos y abreviaturas

% p/v. Porcentaje peso/volumen.

^{13}C-RMN. Resonacia magnética de carbono.

^{1}H-RMN. Resonacia magnética de hidrógeno.

^{492}A. Absorbancia a 492 nm.

5-FU. 5-fluoruracilo.

A431. Carcinoma epidermal humano.

A549. Carcinoma humano de pulmón

AcOEt. Acetato de etilo.

ADN. Ácido desoxirribonucleíco.

BxPC-3. Carcinoma pancreático humano.

CCF. Cromatografía en placa fina

CDK. Ciclina dependiente de cinasa.

CE_{100}. Concentración a la cual se inhibe 100% del crecimiento celular.

CE_{50}. Concentración a la cual se inhibe el 50 % del crecimiento celular.

CL_{50}. Concentración a la cual se mata el 50 % del crecimiento celular

CL_{70}. Concentración a la cual se mata el 70 % del crecimiento celular

cm. Centímetro.

CD_1. Cufina D_1

DMSO. Dimetil sulfóxido.

DU-145. Carcinoma prostático humano.

EBV. Virus de Epstein –Barr.

EDTA. Ácido etilen diamino tetra acético.

EGFR. Receptor del factor de crecimiento epidermal.

EGFR. Receptor del factor de crecimiento epidermal.

EJ-1. Carcinoma de vesícula humana.

EMIE. Espectro de masas de impacto electrónico.

eV. Electrón-Volt.

$FeCl_3$. Cloruro férrico.

FPTasa. Farnesil protein transferasa.

HCT-15. Carcinoma de colon humano.

HeLa. Carcinoma cérvical humano.

HEp-2. Carcinoma humano de laringe

Hep-3B. Carcinoma humano hepatocelular

Hep-G2. Hepatoma humano.

HL60. Línea celular de leucemia promielocítica.

HPL/PRF/5. Hepatoma humano.

HPV: Virus del papiloma humano

IC_{50}. Índice de citotoxicidad.

IL-1. Interleucina 1.

IR. Infrarrojo.

K-562. Leucemia eritroide humana.

KB. Carcinoma nasofaringeo humano.

KBr. Bromuro de potasio.

KU-1. Carcinoma de vesícula humana.

LET. Energía de transferencia lineal.

LKFL 529L. Carcinoma humano de células grandes de pulmón.

M. Molar.

m/z. Relación masa/carga.

MCF-7. Carcinoma de mama humano

MHZ. Mega Hertz.

NCI. Instituto Nacional del Cáncer.

PC-3. Carcinoma prostático humano

ppm. Partes por millón.

RMN. Resonancia magnética nuclear.

SRD B. sulforodamina B.

TRIS. Tris(hidroximetil) aminometano.

U-251. Cáncer del sistema nervioso central.

μM. Micromolar.

υ max (cm^{-1}). Frecuencia máxima en cm^{-1}.

RESUMEN

El México, al igual que en los países industrializados, el cáncer es la segunda causa de muerte. En el ámbito mundial, los cánceres que presentan mayor incidencia son los de pulmón (12.3%), mama (10.4%) y estómago (8.7%). Con mayor prevalencia están los cánceres de mama (17.2%), colorrectal (10.6%) y próstata (6.9%). Los tipos de cánceres que causan mayor número de muertes son los de pulmón (17.8), estómago (10.4), colorrectal (7.9), mama (6.0), cérvico-uterino (3.8) y próstata (3.3).

El daño genético que se ha reportado en las células cancerosas puede ser dominante o recesivo. El tipo dominante presenta blancos conocidos como proto-oncogenes, mientras que para el tipo recesivo, son los genes supresores los que tienen la función fisiológica de regular el crecimiento celular.

Aunque existen más de 100 tipos diferentes de cánceres y subtipos de tumores que pueden encontrarse en órganos específicos, el genotipo de la célula cancerosa que dicta de manera colectiva el crecimiento maligno, es la manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología de la célula que son: autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a los factores que inhiben el crecimiento, invasión de tejidos y metástasis, potencial replicativo ilimitado, mantenimiento de la angiogénesis y evasión del programa de apoptosis.

Los trabajos de Jonathan Hartwell muestran que las plantas han sido empleadas en el tratamiento de enfermedades malignas desde hace 3500 años. Actualmente, existen en el mercado de Estados Unidos de Norteamérica 141 medicamentos utilizados contra el cáncer, de los cuales aproximadamente el 67 % son de origen natural.

Los agentes antineoplásicos derivados de plantas que han sido empleados en la clínica, son en orden cronológico los siguientes: vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), vinolrebina (Navelbine®), etoposido (VP-16®), teniposido (VM-26®), paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), topotecan (Hycamtin®) e irinotecan (Campostar®). En otros países incluyen a la 10-hidroxicamptotecina y homoharringtonina. En México, diversas especies de la flora medicinal se utilizan popularmente para el tratamiento de enfermedades con sintomatología de cáncer y muy pocas de ellas se han estudiado científicamente. La citotoxicidad constituye un modelo adecuado para evaluar la posible actividad antineoplásica de plantas y compuestos de origen vegetal.

En el presente estudio se evaluó el efecto de extractos orgánicos, acuoso y fracciones de *Cuphea aequipetala* Cav. sobre la proliferación *in vitro* y citotoxicidad utilizando ocho cultivos celulares cancerosos humanos: U-251, cáncer del sistema nervioso central; PC-3, carcinoma prostático; K-562, leucemia eritroide; HCT-15, carcinoma de colon; HEp-2, carcinoma de laringe; MCF-7, carcinoma de mama; HeLa, carcinoma cervical y DU-145, carcinoma prostático. De acuerdo con los lineamientos del Instituto Nacional del Cáncer de EEUU, se consideró activo al extrato acetona:agua. Dentro de las fracciones más activas están las denominadas en el texto AcOEt y PB5, cuyos estudios químicos y espectroscópicos indican que la fracción de AcOEt está formada por flavonoides mientras que PB5 está constituida por taninos.

ABSTRACT

In Mexico as well as in other developing countries, cancer is the second leading cause of death among the human population. The most frequent cancers worldwide are lung (12.3%), breast (10.4%) and stomach (8.7%). In term of the prevalence, the most common cancers are breast (17.2%), colorectal cancers (10.6%) and prostate (6.9 %). The most common causes cancers death are lung, (17.8%), %), stomach (10.4%), colorectal (7.9%), breast (6%), cervix uteri (3.8%) and prostate (3.3%).

Basically, cancer cells have two types of genetic damage: dominant, and recessive. The dominant type has specific targets known as proto-oncogenes, alternatively the recessive one is represented by tumor suppressor genes whose physiological function are growth cellular regulators.

Although there are more than 100 different types and subtypes of cancers that can be found within specific organs, the cancer cells genotype is a manifestation of six essential alterations in cell physiology that collectively dictate malignant growth: self-sufficiency in growth signals, insensitivity to growth-inhibitory (antigrowth signals), evasion of programmed cell death (apoptosis), limitless replicative potential, sustained angiogenesis, tissue invasion and metastasis.

Jonathan Hartwell scientific investigations demonstrate that plants have been used in the treatment of cancer over 3500 years. Presently, there are 141 anticancer drugs commercially available in the United States of America, and approximately 67% have a natural origin.

Plants derived anticancer agents that are used as clinical anticancer drugs in United States

are: vinblastine (Velban®), vincristine (Oncovin®), vinolrebine (Navelbine®), etoposide (VP-16®), teniposide (VM-26®), paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotore®). In addition, topotecan (Hycamtin®), irinotecan (Campostar®), 10-hydroxy-camptothecin and homoharringtonine are used in others countries. In Mexico, different medicinal plants are still used to treat illness with cancer syntomatology and only few of them have scientific studies. Cytotoxicity assays represent adequate models to screen plant extracts and their secondary metabolites with potential antineoplasic activity.

In the present work we studied *Cuphea aequipetala,* a medicinal plant that has been used in Mexico to treat different types of tumors since prehispanic times. Their extracts were obtained and the inhibition percentage and cytotoxic activity were evaluated toward eight human cancer cell lines in culture: U-251, central nervous system; PC-3, prostate cancer; K-562, leukemia; HCT-15, colon carcinoma; HEp-2, larynx carcinoma; MCF-7, breast carcinoma; HeLa, cervical carcinoma and DU-145, prostate cancer. According to the US National Cancer Institute guidelines, only the acetone/water extract was active. This extract produced different fractions with cytotoxic activity. The most active fractions were AcOEt and PB5. Chemical and spectroscopic studies were undertaken, and showed the presence of flavonoids in AcOEt and tannins in PB5.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1. Generalidades del cáncer

El cáncer es una enfermedad muy antigua, ya que se han detectado tumores óseos en los huesos fósiles de dinosaurios y de momias egipcias (2700 a. C.) de la necrópolis de Gizeh (Tannock & Hill, 1998; Cortinas, 1995). Los tumores fueron descritos en pinturas o escritos de algunas civilizaciones antiguas de la India, Egipto y Perú (Tannock & Hill, 1998; Cortinas, 1995) que datan de los años 2000 a 1500 a. C.

El cáncer es un término genérico que acuñaron los médicos griegos al observar que el crecimiento de los tumores de mama adoptan la forma de un cangrejo, como lo explica Galeno (131-203 d. C.) en su tratado Definitiones Medicae (Cortinas, 1995).

El cáncer agrupa a un conjunto de enfermedades de etiología y sintomatología diferente (Kotin, 1970) que tienen como característica común trastornos en los mecanismos que controlan la proliferación y la diferenciación en las células del organismo (Torroela & Villa, 1998).

Se estima que existe por lo menos un centenar de formas diferentes de este padecimiento, y algunas fuentes mencionan hasta 300 tipos de canceres humanos que los clasifican según su origen en tres grupos generales: sarcoma (proceden de tejidos conectivos), carcinomas (proceden de tejidos epiteliales) y leucemia y linfoma que proceden de los tejidos formadores de las células sanguíneas (Cortinas, 1995).

1.1.1. Incidencia del cáncer

A pesar de ser tan antiguo y a diferencia de otras enfermedades, el cáncer tiene una tendencia mundial ascendente, en los países industrializados es la segunda causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares (Gibbs, 2000), y en México esta prevalencia se conserva (Lascano-Ponce & Hernández-Avila, 1997) ya que desde 1990 los tumores malignos constituyeron la segunda causa de mortalidad (Mohar et al, 1997).

1.1.1.1. Incidencia mundial

La incidencia mundial se muestra en las Figura 1 (número de casos), donde se observa que los cánceres más comunes son los de pulmón (1239000), mama (1054000), colon/recto (945,000), estómago (876000), próstata (543000) y cérvico uterino (471,000). En la Figura 2 se observa la incidencia en términos de porcentaje.

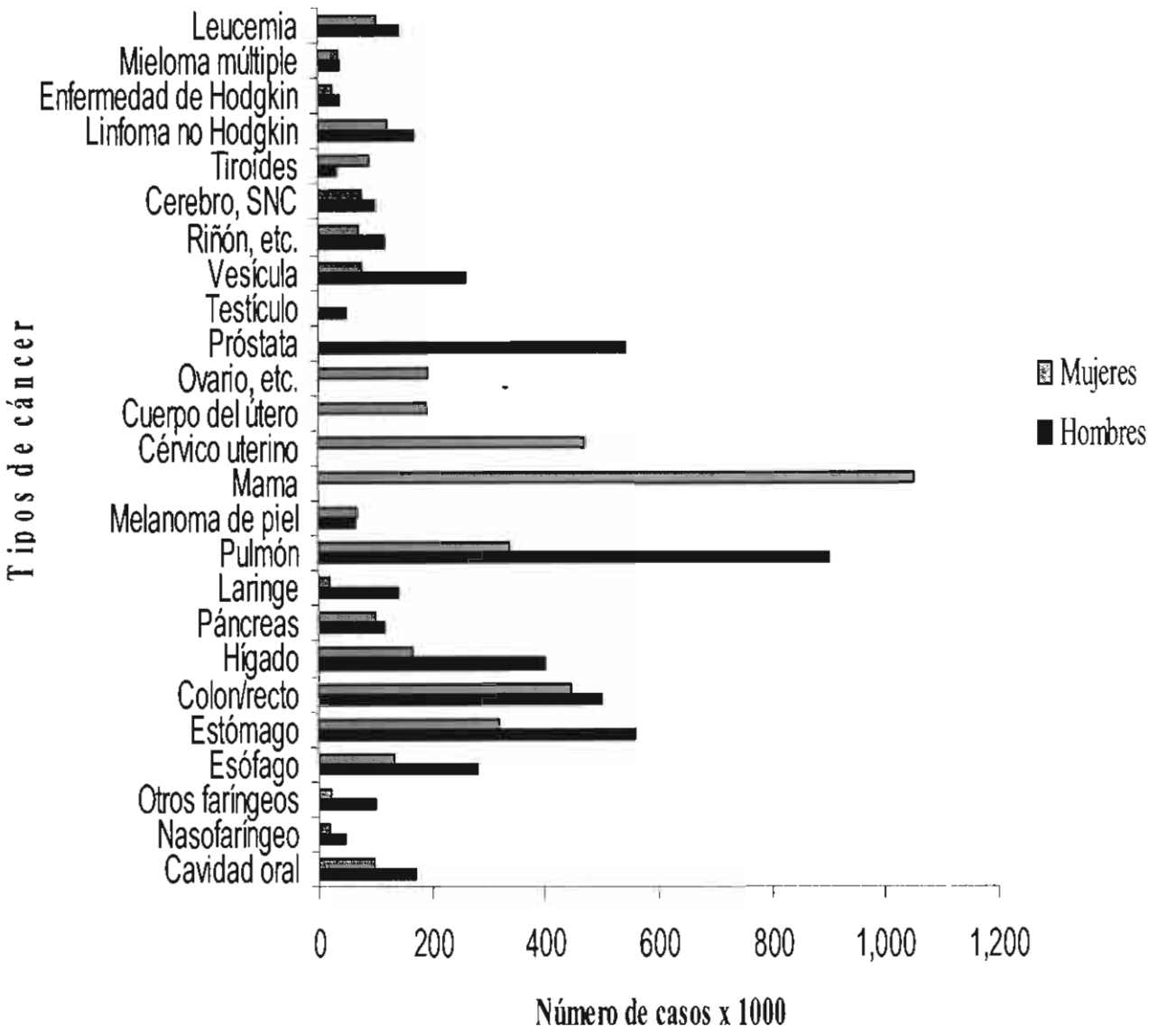


Figura 1. Incidencia de nuevos cánceres en el mundo en el 2000 (Parkin et al, 2001).

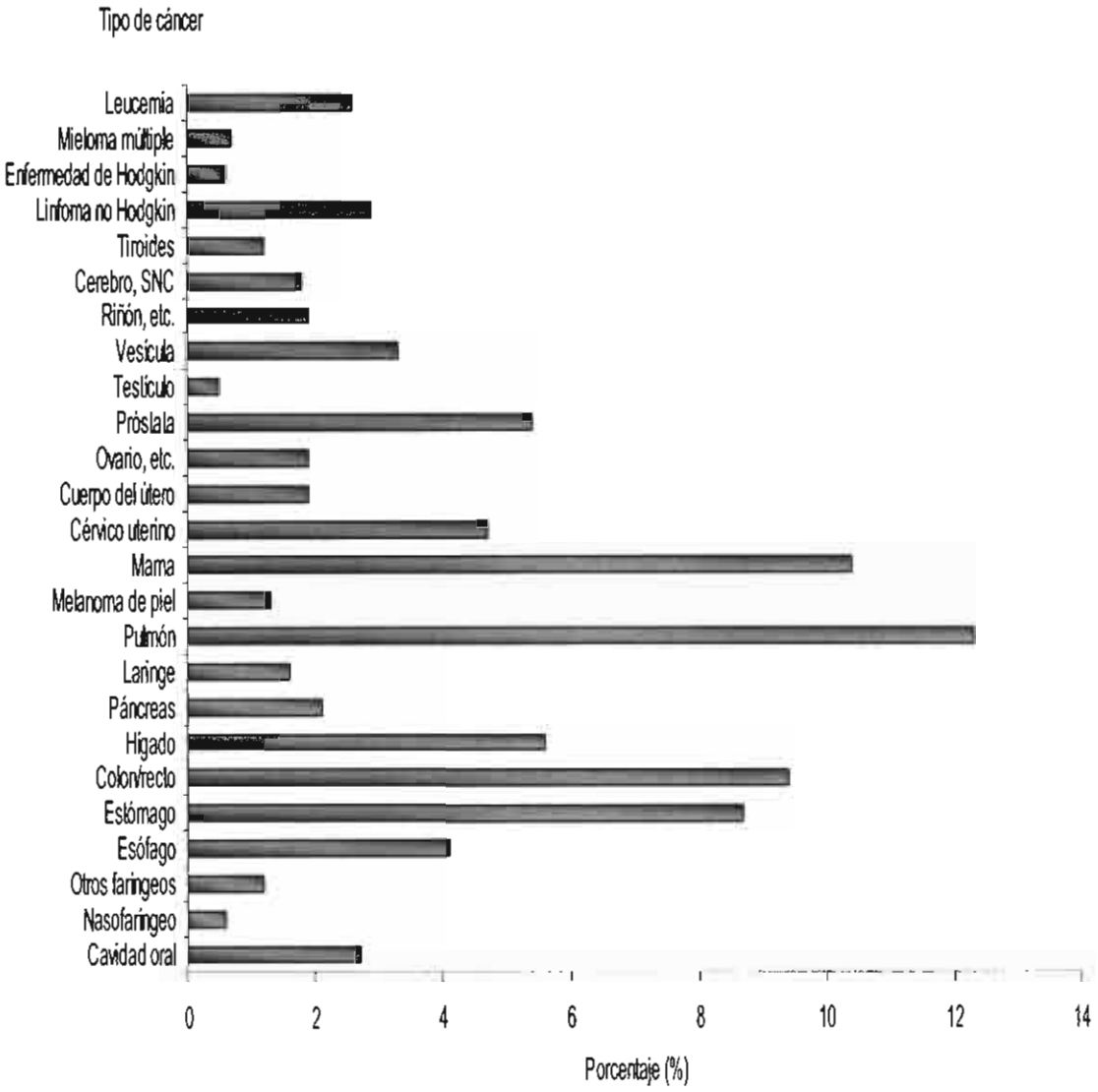


Figura 2. Incidencia mundial porcentual de nuevos cánceres en año 2000 (Parkin et al, 2001).

1.1.1.2. Incidencia en México

En México, en el año 2001 el cáncer ocupó el segundo lugar como causa de muerte contribuyendo con el 12.68 % de los decesos. Por esta causa fallecieron 27,026 hombres

y 29,151 mujeres. La mayor incidencia (Figura 3) la presentaron el cáncer de tráquea, bronquios y pulmón, leucemia, cervicouterino, próstata y mama (Dirección de Estadística, Informática y Evaluación, 2002).

En la Figura 3 se muestra la prevalencia masculina y femenina de los tipos de cánceres más frecuentes en México.

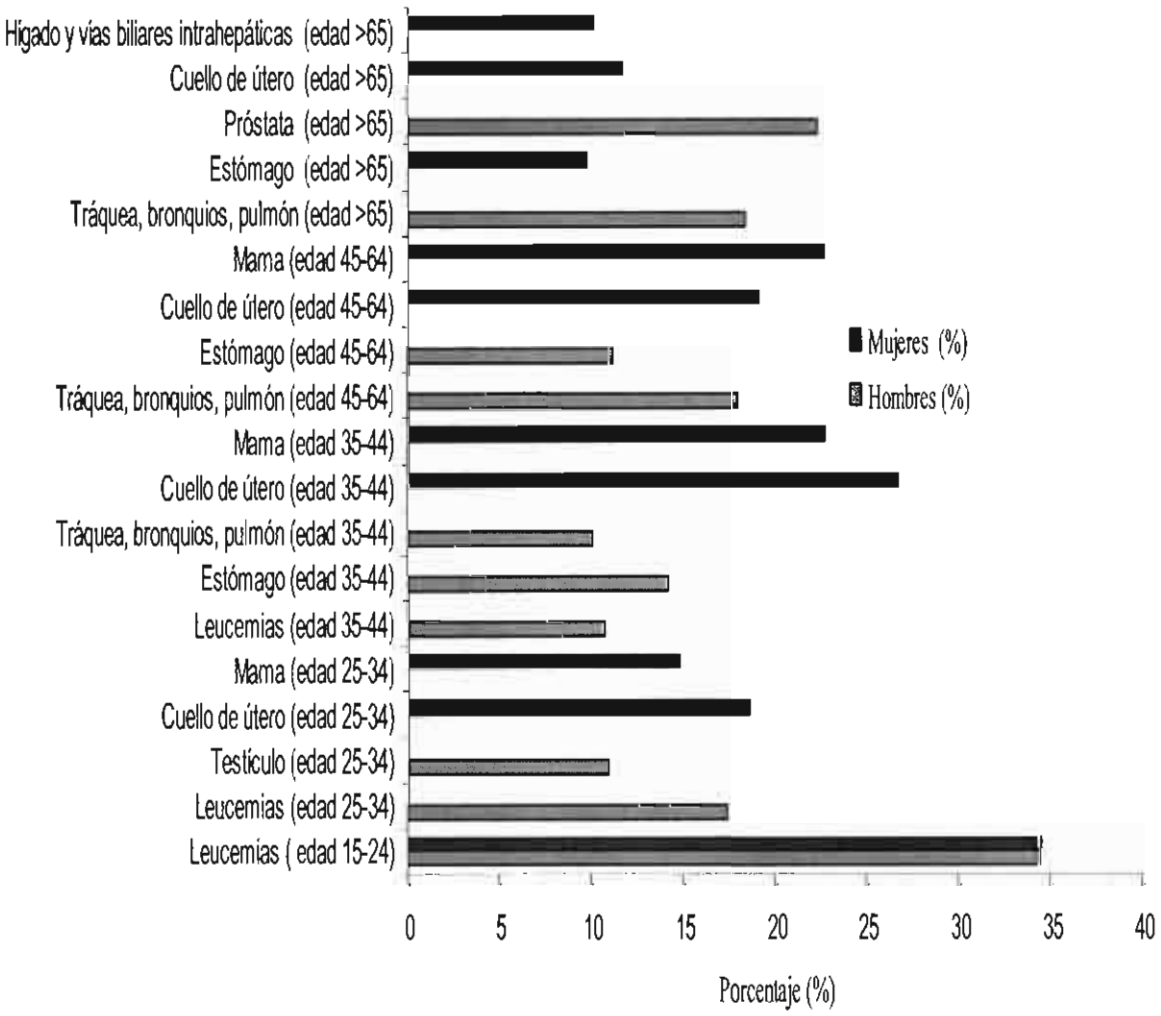


Figura 3. Mortalidad masculina y femenina ocasionada por los diversos tipos de cáncer (Dirección de Estadística, Informática y Evaluación, 2002).

En México, el cáncer del cuello del útero es la primera causa de muerte por neoplasias malignas en mujeres con edades de 25 a los 64 años. Con respecto a este tipo de cáncer se ha identificado como agente causal al Virus del Papiloma Humano (HPV), conocido como el virus de las verrugas, que se trasmite sexualmente. Los HPVs también causan una variedad de lesiones benignas, verrugas, neoplasias intraepitelial y ano-genital, cáncer oral, cáncer de piel no asociado a melanoma y papilomas faríngeos (Peto, 2001; Das et al, 2000).

La secuencia del ADN de más de 100 virus del papiloma humano mostró que los virus HPV16, HPV18 y HPV45 están presentes en el cáncer cervicouterino (Walboomers et al, 1999). El potencial oncogénico del virus se ha atribuido a sus genes E6 y E7.

El producto de estos dos genes estimula la proliferación celular activando las proteínas específicas de ciclo celular e interfiriendo con la función de los genes supresores *p53* y *Rb* (Das et al, 2000).

Con respecto al cáncer de próstata (Figura 3), éste ocasiona el mayor número de muertes (22.31%) en hombres mayores a 65 años. La edad, en la cual ocurre este tipo de cáncer coincide con la estadística que se presenta a nivel mundial (Parkin et al, 2001).

La mortalidad que causa el cáncer entre los diferentes grupos de edad (Figura 4) nos muestra que ésta también se presenta en el grupo menor a los 15 años y que varía entre los diferentes grupos etarios. En el caso de los adolescentes, la incidencia mayor la presentaron la leucemia, linfomas y cáncer del sistema nervioso central (Cuevas-Urióstegui et al, 2003).

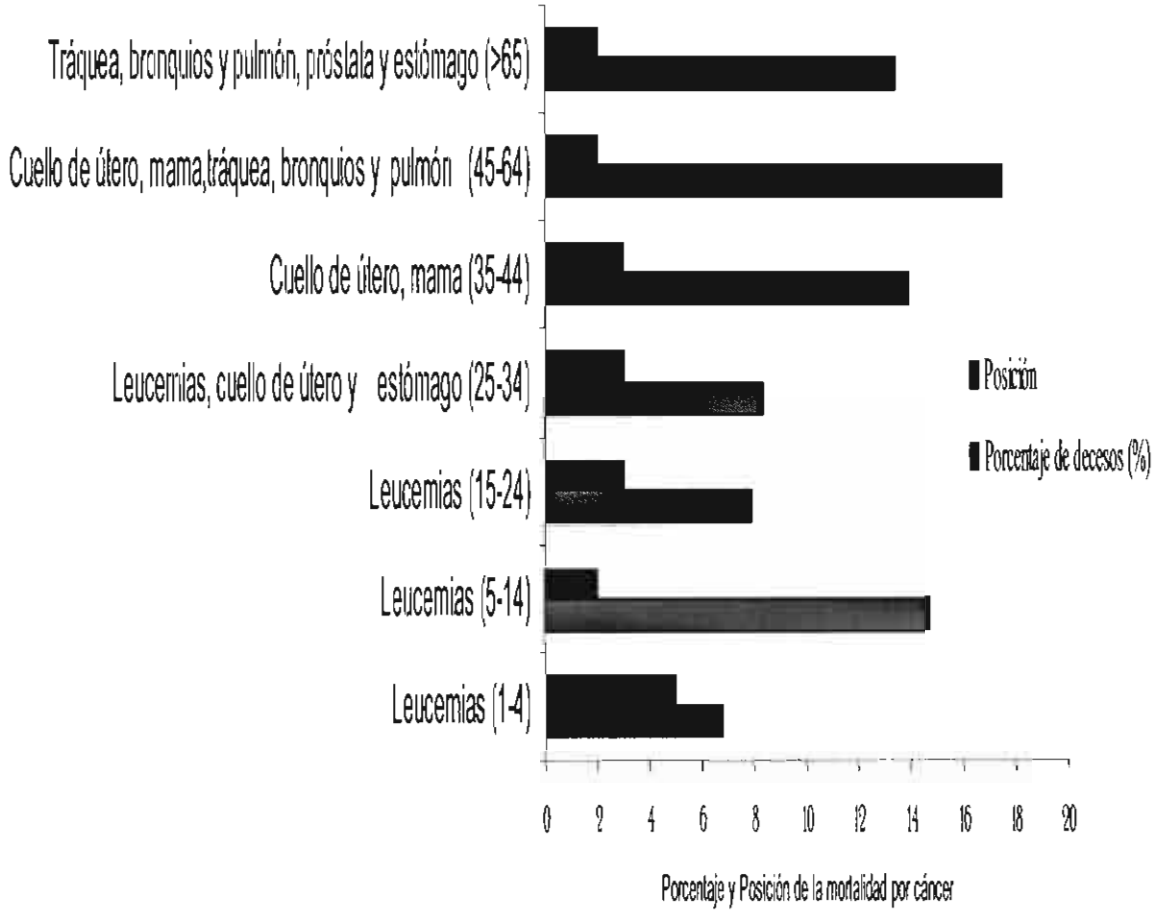


Figura 4. Mortalidad de ambos sexos en México como consecuencia del cáncer (Dirección de Estadística, Informática y Evaluación, 2002).

1.1.2. Mortalidad mundial masculina y femenina

Con respecto a la mortalidad (Figura 5), los cánceres más comunes son el de pulmón (17.8%), estómago (10.4%) e hígado (8.8%).

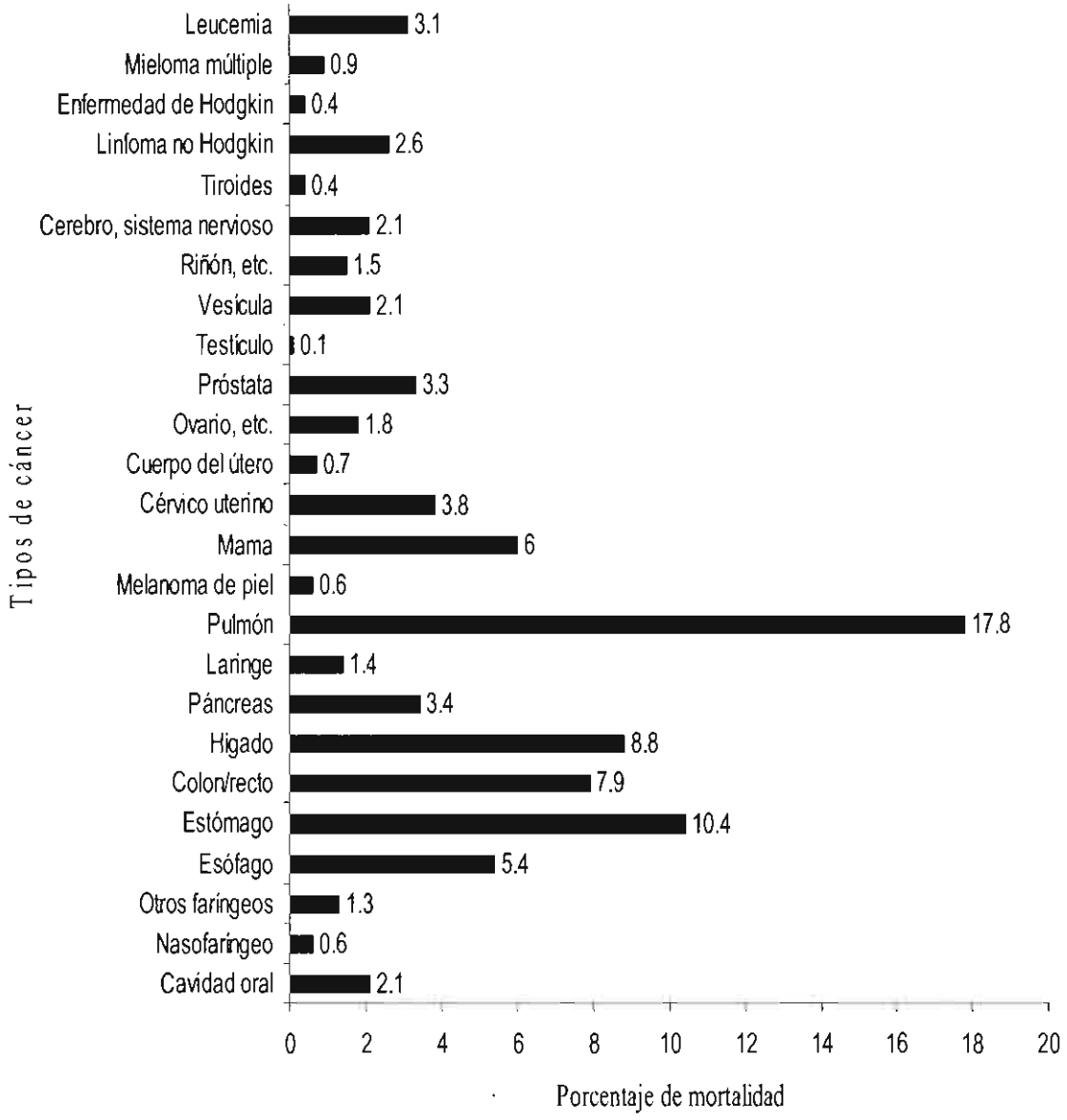


Figura 5. Frecuencia de la mortalidad mundial por diversos tipos de cáncer (Parkin et al, 2001).

En términos de prevalencia los cánceres más comunes son el cáncer de mama (17.2%), el cáncer colorrectal (10.6%) y el cáncer de próstata (6.9%).

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte en el mundo (1. 2 millones de casos y 1.1 millones de muertes) y la relación muerte/incidencia es de 0.90. A pesar de que el cáncer de mama es el segundo en incidencia, el pronóstico es favorable ya que la relación incidencia/mortalidad es de 0.40 y ocupa la quinta posición como causa de muerte.

El cáncer colorrectal es el tercero en importancia (945,000 casos y 492,000 muertes) y el de estómago (876,000 casos y 647,000 muertes) es el cuarto. O sea que la relación muerte/incidencia es de 0.52 y 0.74 respectivamente.

El cáncer cervicouterino es el segundo cáncer más común entre la población femenina mundial y se estimaron 468,000 nuevos casos y 233,000 muertes, para el año 2000. Aproximadamente el 80% de los casos ocurren en los países en vías de desarrollo, donde en algunas regiones es el cáncer más común entre las mujeres. La mayor incidencia se ha observado en Latinoamérica, el Caribe, el Sahara africano y en el sur y sureste asiático (Parkin et al, 2001). La incidencia comienza a elevarse entre los 20 a 29 años y el riesgo se incrementa alrededor de los 45 a 49 años. La relación mundial de mortalidad/ incidencia es de 0.49.

El cáncer de próstata ocupa la sexta posición a nivel mundial y es la tercera en importancia en el hombre. El número anual de casos nuevos es de 513,000 lo que representa el 9.7 % de cáncer en el hombre (15.3 % en países desarrollados y 4.3 % en países en vías de desarrollo). Este tipo de cáncer ocasionó 201,000 muertes (5.6 % del cáncer en hombres y 3.2 % del total de las muertes). La relación mortalidad incidencia es 0.39. Este tipo de cáncer es el que se presenta con mayor frecuencia en la población de

mayor edad. Aproximadamente ¾ partes ocurre en hombres mayores a 65 años (Parkin et al, 2001).

Dentro de los factores carcinogénicos (Peto, 2001) de tipo biológico se encuentran i) *Helicobacter pylori*, bacteria causante de las infecciones gástricas crónicas, que causa úlceras y es un factor importante en el desarrollo del cáncer del estómago, ii) los virus de la hepatitis B y C que pueden causar cáncer en el hígado, iii) el virus de Epstein –Barr (EBV) asociado con cáncer nasofaríngeo y leucemias de células B. En los linfomas de Burkii se ha encontrado a EBV asociado con el parásito de la malaria. El virus del herpes humano 8 se asocia con el virus de la inmunodeficiencia humano (SIDA) en el sarcoma de Kaposi. También se ha encontrado que la esquistosomiasis es el agente causal de cáncer en vesícula y colon.

Aproximadamente el 20 % del cáncer mundial se origina en el estómago (9%), hígado (6%) y cervix (5%) y en el caso de que los agentes infecciosos, anteriormente mencionados se erradicaran, dichos tipos de cáncer se podrían prevenir (Parkin et al, 1999).

1.2. Origen del cáncer

El termino cáncer se refiere a más de 100 formas de enfermedad. Casi todos los tejidos del cuerpo pueden engendrar malignidades, incluso algunos producen varios tipos. Además, cada tipo de cáncer tiene características únicas. A pesar de esto, el proceso básico que produce los diversos tumores parece ser completamente similar. Por esta razón se emplea la palabra cáncer de manera genérica (Weinberg, 1996).

Las células que se encuentran en un cuerpo sano conviven en una especie de condominio interdependiente y complejo donde una célula regula la proliferación de la otra. De esta manera, las células se reproducen sólo cuando la instrucción es dada por otra célula vecina.

En una forma contrastante, las células del cáncer violan este esquema y no respetan los controles usuales de proliferación y dictan sus propias reglas de reproducción (Torroella &Villa, 1998). Las células cancerosas también poseen la propiedad de migrar de un sitio a otro, comienzan a invadir los tejidos circundantes y producen masas en diferentes sitios del organismo (metástasis). La metástasis es la característica más maligna y se considera como la parte final de la progresión del tumor (Tannock & Hill, 1998; Cotran et al, 1999).

Con unas pocas excepciones, todos los cánceres pueden formar metástasis. Dichas excepciones las constituyen los neoplasmas malignos de las células gliales del sistema nervioso central y los carcinomas básales de la piel (Cotran et al, 1999).

Se conoce, hoy en día, que las células tumorales descienden de una célula ancestral común y que en un punto, por lo general años antes de que el tumor sea palpable, iniciaron un programa de reproducción inapropiada (Cotran et al, 1999).

Además la transformación maligna de una célula se da a través de la acumulación de mutaciones en genes específicos de dicha célula (Nowell, 1976). Por esto, los genes proporcionan la clave para entender el proceso y raíz del cáncer humano.

Los genes se encuentran en el núcleo celular, dentro de la molécula de ADN cromosomal. Un gen especifica la secuencia de aminoácidos que deberá unirse para hacer una proteína particular. De esta manera, las proteínas son el trabajo de los genes. Cuando un gen se

prende, la célula responde sintetizando la proteína codificada. Las mutaciones en los genes pueden perturbar a la célula cambiando las cantidades y actividad de la proteína producida.

Los proto-oncogenes y los genes supresores, constituyen sólo una pequeña porción de conjunto total de genes. Cuando estos tipos de genes son normales, orquestan el ciclo de vida de la célula a través de una intrincada secuencia de eventos por la cual una célula se agranda y divide.

Los proto-oncogenes estimulan el crecimiento mientras que los genes supresores lo inhiben. Cuando los proto-oncogenes están mutados se pueden convertir en oncogenes carcinogénicos que guían la célula hacia una multiplicación excesiva (Bishop, 1981). Algunos oncogenes actúan imitando las señales de crecimiento, lo que conlleva a que células tumorales generen algunas de sus propias señales de crecimiento y de esta manera reducen su dependencia a los estímulos del micro ambiente de los tejidos normales (Fedi et al, 1997).

Los genes supresores de tumores codifican para proteínas que inhiben la división celular. Las mutaciones en estos genes causan que las proteínas producidas sean inactivas y de esta manera privan a la célula de los frenos necesarios para restringir la proliferación celular (Bishop, 1991). En las Tablas 1 y 2 se presentan, de manera resumida, los diferentes sitios donde participan los oncogenes y genes supresores (Weinberg, 1996).

Tabla 1. Actividades de algunos oncogenes y tipos de cáncer que los presentan (Weinberg, 1996).

Genes que regulan los factores de crecimiento o sus receptores	
PDGF	Codifica para el factor de crecimiento derivado de plaquetas. Involucrado en gliomas (o cáncer de cerebro).
Erb-B	Codifica para el receptor del factor de crecimiento epidermal. Involucrado en el gliobastoma (cáncer de cerebro) y cáncer de mama.
Erb-B2	También llamado HER-2 o *neu*. Codifica para el receptor del factor de crecimiento. Involucrado en cáncer de mama, cáncer de glándulas salivales y cáncer de ovario.
RET	Codifica par el receptor del factor de crecimiento. Involucrado en cáncer de tiroides.
Genes citoplasmáticos que transmiten las señales de los ciclos estimulantes	
Ki-ras	Involucrado en el cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon y cáncer pancreático.
N-Ras	Involucrado en leucemias.
Genes para factores de trascripción que activan a los genes promotores del crecimiento	
c-myc	Involucrado en leucemias, cáncer de mama, cáncer de estómago y cáncer de pulmón.
N-myc	Involucrado en neuroblastoma (cáncer de la célula nerviosa) y glioblastomas.
L-myc	Involucrado en cáncer de pulmón.
Genes para otras clases de moléculas	
Bcl-2	Codifica para las proteínas que normalmente bloquean el suicidio celular. Involucrado en el linfoma folicular de células B.
Bcl-1	También se conoce como PRAD1. Codifica para la ciclina D1, componente estimulante en el ciclo celular. Involucrado en cáncer de mama, cáncer de cabeza y cáncer de cuello.
MDM2	Codifica para un antagonista para la proteína supresora de tumores, p53. Involucrado en sarcomas (cánceres del tejido conectivo) y otros tipos de cánceres.

Tabla 2. Actividades de algunos genes supresores de tumores y tipos de cáncer que los presentan (Weinberg, 1996).

Genes para proteínas del citoplasma	
APC	Involucrado en cáncer de colon y cáncer de estómago.
Dpc4	Codifica para la molécula que transmite las señales que inhiben la división celular. Involucrado en el cáncer de páncreas.
NF-1	Codifica para una proteína que inhibe a la proteína estimulante (Ras). Está involucrado en el neurofibroma y feocromositoma (cánceres del sistema nervioso periférico) y leucemia mieloide.
NF-2	Involucrado en el meningioma efendimoma (cánceres cerebrales) y schwanoma (afecta la envoltura de los nervios periféricos).
Genes para proteínas nucleares	
TS1	Codifica para la proteína p16, componente que frena el avance del ciclo celular. Está involucrado en una gran variedad de cánceres.
RB	Codifica para la proteína pRB, freno maestro del ciclo celular. Está involucrado en el retinoblastoma, cáncer óseo, cáncer de vesícula, cáncer de células pequeñas de pulmón y cáncer de mama.
P53	Codifica para la proteína p53, la cual puede detener la división celular e inducir la muerte de células anormales. Está involucrado en una gran variedad de cánceres.
WT1	Involucrado en el tumor de Wilms y tumores renales.
Genes para proteínas de quienes no se conoce con exactitud su localización celular	
BRCA1	Involucrado en cáncer de mama y ovario.
BRCA2	Involucrado en cáncer de mama.
VHL	Involucrado en cáncer células renales.

1.2.1. Características de la célula cancerosa

Como se mencionó anteriormente, las células cancerosas se originan en respuesta a mutaciones en los genes. Hanahan & Weinberg sugieren que el gran catálogo de genotipos en la célula del cáncer es una manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología de la célula que dicta de manera colectiva el crecimiento maligno y son: autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a los factores que inhiben el crecimiento, invasión de tejidos y metástasis, potencial replicativo ilimitado, mantenimiento de la angiogénesis y evasión del programa de apoptosis (Hanahan & Weinberg, 2000). En la Figura 6 se incluyen algunos mecanismos asociados con las alteraciones en la célula cancerosa.

Componente	Capacidad adquirida	Ejemplo del mecanismo
	Autosuficiencia en las señales de crecimiento	Activa el oncogen H-Ras
	Insensibilidad a las señales de autocrecimiento	Pérdida del gen supresor Rb
	Evasión de la apóptosis	Produce factores de sobrevivencia, IGF
	Potencial replicativo ilimitado	Activa la telomerasa
	Angiogénesis sostenida	Produce inductores, VEGF
	Invasión de tejidos y metástasis	Inactiva la caderina-E

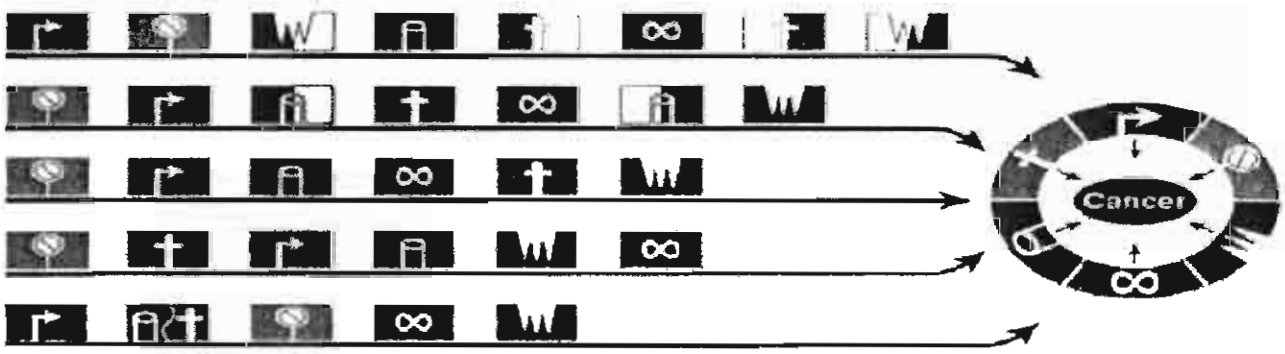


Figura 6. Características de la célula cancerosa (Hanahan & Weinberg, 2000).

1.2.2. Factores genéticos y ambientales

El cáncer es causado por múltiples factores genéticos y ambientales (Ponder, 2001; Peto, 2001), como se muestra en la Tabla 3. Algunos genes primarios se mostraron en la Tabla 1 (protoncogenes) y Tabla 2 (genes supresores). En este tipo de daño también se incluyen a los genes que se presentan en cánceres de tipo hereditario como el síndrome de Bloom, ataxia telangiectasa, la anemia de Falconi y neoplasias endocrinas múltiples (Hoeijmakers, 2001). Si se considera que el humano tiene de 30,000 a 40,000 genes que son altamente polimórficos (Claustres et al, 2002) y que dicho polimorfismo puede contribuir a diferencias en el metabolismo, ciclo celular, transporte iónico, reparación de ácidos nucleicos y proteínas, antígenos de histocompatibilidad y redes de traducción de señales, es comprensible que cada individuo tenga una gran variedad de haplotipos de genes que podrían contribuir al proceso canceroso.

Tabla 3. Causas del cáncer (Nebert, 2002).

A. Genéticas

1. Genes primarios.

a) Activación de proto-oncogenes.

b) Defectos en los genes supresores de los tumores.

c) Síndromes hereditarios.

2. Genes secundarios (modificadores).

B. Ambientales

1. Desnutrición.
2. Infección (virus, bacterias, parásitos).
3. Heridas.
4. Dieta (alimentos cocinados con carbón, altos en grasa, altos en colesterol)
5. Químicos (cigarro, asbesto, benceno).
6. Agentes físicos (energía ionizante, radiación ultravioleta, radiactividad).
7. Metales (níquel, cadmio, cromo).

C. Efectos sistémicos y parácrinos

1. Factores de crecimiento (IGF1, IGF2, TGFβ).
2. Hormonas (estrógenos, testosterona).
3. Citocinas implicadas en el proceso inflamatorio (IL-6, IL-8, IL-10) y quimocinas (TARC).

D. Epigénicos

1. Genes silenciosos anormales (ARN interferencia, co-represores).
2. Patrones de metilación anormal (sobrexpresión de IGF2, cambios en la mutación del fenotipo).
3. Daño mitocondrial.

Con respecto a los factores ambientales, quizás el estrés oxidativo sea la clave de todos los estímulos. El estrés oxidativo es genotóxico y puede conducir a mutaciones. Este tipo de estrés afecta al ciclo celular, entre la transición G1-S (división celular) y la apoptosis (Nebert et al, 2000).

Existen dos categorías de cáncer: a) Los cánceres hereditarios ocurren cuando un individuo nace con una mutación en alguno de los genes primarios y b) los que se generan como una consecuencia de factores ambientales.

Los estudios epidemiológicos han mostrado que el tabaco es el factor que más ha influido en el cáncer. En los inicios, este fue el agente condicionante del cáncer de pulmón, páncreas, vesícula y actúa de manera sinergística con el alcohol en el cáncer de laringe, boca y faringe. Recientemente se ha encontrado que el cáncer de estómago, hígado y probablemente el cervicouterino se han incrementado entre los fumadores (Peto, 2001).

Solamente la dieta rivaliza con el tabaco como una causa del cáncer en los EEUU (Trichopoulos et al, 1996).

1.3. Métodos de control del cáncer

El tratamiento de un paciente con cáncer puede tener una finalidad curativa o paliativa y para ello se emplean la cirugía, radioterapia y quimioterapia (Hellman & Vokes, 1996).

1.3.1 Cirugía

La cirugía fue la primera terapia anticancerosa empleada y hoy en día continúa siendo la más utilizada. La escisión quirúrgica es rápida y efectiva y es la que cuenta con el mayor

número de curaciones. La cirugía también es el método terapéutico que ofrece la oportunidad de confirmar que el tumor ha sido erradicado ya que el patólogo puede examinar el espécimen retirado, mismo que debe de presentar una capa de células normales alrededor de la forma cancerosa. Desafortunadamente este tipo de tratamiento también presenta inconvenientes ya que la eliminación de la masa tumoral visible no garantiza la eliminación de extensiones microscópicas, que son las que frecuentemente caracterizan al cáncer (Hellman & Vokes, 1996).

Para que todo el tumor sea retirado es necesario cortar una parte de tejido sano acción que dañará severamente funciones fisiológicas y apariencia del paciente. En algunas ocasiones los tumores presentan hacinamientos en estructuras vitales que no pueden ser removidas a través de procedimientos quirúrgicos. Quizás la limitación más importante de la cirugía es que ésta no puede emplearse en cánceres que han hecho metástasis en grandes áreas del cuerpo (Hellman & Vokes, 1996).

Las consecuencias indeseables de la cirugía han originado que en su lugar se emplee la radioterapia.

1.3.2. Radioterapia

La Radioterapia consiste en el empleo de energía ionizante y la finalidad es eliminar células cancerosas y reducir tumores. Esta energía ionizante daña a las células y tejidos al depositar la energía en una serie de eventos discretos. La radiación puede dañar a cualquier molécula dentro de la célula, pero el daño más severo ocurre a nivel del ADN causando letalidad celular que es expresada como pérdida de potencial proliferativo. Dependiendo del tipo celular, las células pueden morir por muerte en interfase

(usualmente asociada con morfología apoptótica) o por muerte relacionada con la mitosis. Los eventos moleculares muestran que la célula es arrestada en las fases G1 y G2 del ciclo celular e involucra a p53, así como otras proteínas asociadas con la regulación del ciclo celular (Tannock & Hill, 1998).

Son varios los factores que pueden influir en la manera como responden las células a la radiación. Esto incluye a la energía de transferencia lineal (LET), a la posición que tiene la célula dentro del ciclo celular, a hipoxia, así como a la expresión de ciertos oncogenes. Después de que las células son tratadas con un nivel bajo de LET, las células pueden reparar algunos de sus daños en un periodo de unas cuantas horas; así que si el tratamiento es prolongado o fraccionado será menos efectivo que si se da en una dosis única. El tiempo adecuado para que se vuelvan a unir las hebras rotas del ADN puede correlacionarse con la radiación relativa a la cual sobreviven las células normales y cancerosas (Tannock & Hill, 1998).

Por lo general, las células que se encuentran en la fase S del ciclo celular son más resistentes que las que se encuentran en las fases G2/M, aunque existe variabilidad entre los tipos celulares. Cuando las células son tratadas con radiación LET baja y en ausencia de oxígeno, se requiere de tres veces más de tiempo de radiación para producir muerte celular, que cuando se hace en presencia de oxígeno. La mayoría de los tumores experimentales y de humanos han mostrado que contienen una fracción importante de células hipóxicas que son resistentes a la radiación.

El acceso a los factores de crecimiento exógenos puede alterar la sensibilidad de las células a la radiación alterando las señales intracelulares y el arresto dentro del ciclo celular después de que el ADN ha sido dañado. Existe una asociación entre la expresión

aberrante de las proteínas ras, raf y p53 y la respuesta de la célula a la radiación ionizante (Tannock & Hill, 1998).

1.3.3. Quimioterapia

La quimioterapia con frecuencia se asocia a la cirugía y radioterapia, aunque en algunas ocasiones es el único tratamiento indicado.

La quimioterapia contra el cáncer se inició en 1943, a partir de la Segunda Guerra Mundial, al observar que los soldados que habían estado expuestos a los gases de mostaza nitrogenada presentaban una disminución en el tamaño de sus ganglios linfáticos, y se utilizó en el tratamiento del linfoma (Frei III, 1982). La actividad anticancerosa de este fármaco se debe a la alquilación de ADN, por lo que algunos agentes anticancerosos se desarrollaron en base a la modificación del ADN (Gibbs, 2000).

En la actualidad se dispone de 141 fármacos comerciales empleados en el tratamiento del cáncer (Newman et al, 2003) y dentro de estos fármacos también se encuentran los medicamentos empleados en la terapia hormonal (Hellman & Vokes, 1996), así como los agentes biológicos empleados en la inmunoterapia (Rosenberg, 2001). De manera tradicional se han agrupados en familias definidas en base a sus estructuras químicas y mecanismos de acción como agentes alquilantes, antibióticos, antimetabolitos, inhibidores de la mitosis, inhibidores de las topoisomeras I y II, (Hellman & Vokes, 1996) compuestos con platino y otros (Cragg et al, 1997) (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación clásica de los fármacos anticancerosos (Hellman & Vokes, 1996; Cragg et al, 1997).

Terapia	Fármaco
Quimioterapia	Agentes alquilantes Antimetabolitos Antibióticos Inhibidores de la Topoisomerasa Inhibidores de la mitosis "Otros"
Terapia hormonal	Esteroides Anti-estrógenos Anti-andrógenos Análogos de LH-RH Agentes anti-aromatasas
Inmunoterapia	Interferón Interleucina II Vacunas

El grupo "otros" se ha expandido y en la Tabla 5 se muestra la clasificación de los compuestos anticancerosos con base en el mecanismo de acción, ya que éstos pueden actuar sobre la célula cancerosa, el endotelio, la matriz extracelular, el sistema inmune o la célula huésped (Espinosa et al, 2003).

Tabla 5. Clasificación de los compuestos anticancerosos con base en el mecanismo de acción (Espinosa et al, 2003).

Blanco	Sitio de acción	Mecanismo, clase de compuestos, tipo de terapia
Tumor	ADN	No específico Rompimiento del ADN: quimioterapia. Proteínas relacionadas con el ADN: quimioterapia específica. Terapia hormonal, retinoides. Interferón α: inmunoterapia. Terapia génica.
	ARN	Oligonucleótidos antisentido.
	Proteínas	Receptores de membrana. Dominio Extracelular: [2]AbMo. Dominio intracelular: moléculas pequeñas. Citoplasma. Ciclos intracelulares: moléculas pequeñas. Tubulina: quimioterapia.
[1]Endotelio	ADN	Combrestatina.
	Proteínas	Moléculas pequeñas.
Matriz extracelular	[3]MMPs	Inhibidores de MMP.
	Otros elementos	Anticuerpos monoclonales y moléculas pequeñas.
Sistema inmune	Linfocitos y macrófagos	Interferón. Interleucina 2. Vacunas.
Células del huésped	Células óseas	Biofosfonatos, osteoprotogenina.

[1]En este grupo, podría desarrollarse en el futuro la terapia antisentido.
[2]Anticuerpos monoclonales. [3]Metaloproteinasas.

1.3.3.1. Compuestos dirigidos contra el ADN del tumor

Los compuestos pueden actuar sobre el ADN al romper la hélice, interferir con las proteínas relacionadas con el ADN (Hurley, 2002) o modificando la expresión de los genes específicos (Gibbs, 2000). La mayoría de los medicamentos anticancerosos clásicos tienen uno de estos mecanismos de acción y nuevos fármacos están siendo incorporados cada año. Estos medicamentos se muestran en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6. Fármacos dirigidos contra el ADN del tumor (Hurley, 2002).

Clase	Compuesto	Mecanismo de acción
Rompimiento del ADN		
Mostaza nitrogenada	Ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan, clorambucil, bendamustine.	Enlaces cruzados
Nitroureas	BCNU.	Enlaces cruzados
Triazenos	Dacarbazina, temozolomida.	Enlaces cruzados
Antibióticos	Bleomicina, mitomicina.	Enlaces cruzados
Compuestos con platino	Cisplatino, carboplatino, oxaliplatino.	Enlaces cruzados
Proteínas relacionadas con el ADN		
Antibióticos	Antraciclinas, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitroxantona.	Libera radicales libres y Ø Topo II
Podofilotoxinas	Etopósido.	Ø Topo II
Inhibidores de la Topo I	Topotecan, irinotecan.	Ø Topo I
Antimetabolitos	Antifolatos; metrotrexato, trimetatrexato.	Ø DHFR y otras enzimas
	Fluoropirimidinas (5FU, ftorafur, capecitabina) y raltitrexed.	Ø TS
	Pemetrexed.	ØDHFR, TS, FTRG
	Citarabina, fludarabina.	Ø ADN polimerasa y RR
	Gemcitabina.	Ø RR
	Análogos de la adenosina. clardribina, deoxicoformicina	Ø adenosin deaminasa
Otros	Ecteinascidina.	Ø factores de transcripción

Ø: inhibición. Topo: topoisomerasa. DHFR: dihidrofólico reductasa. TS: timidilato sintetasa.
FTRG: glicinamida Ribonucleótido formiltransferasa .
RR: ribonucleótido reductasa.

Tabla 7. Fármacos dirigidos contra el ADN del tumor: modificadores de genes específicos (Gibbs, 2000).

Clase	Compuesto	Mecanismo
Esteroides	Prednisolola, dexametasona.	Unión a receptores específicos, interacción transcripcional con genes específicos.
Antihormonas	Antiestrógenos: tamoxifen, fulvestrant Antiandrógenos: flutamida, bicalutamida. Antiaromatas: anastrozol, letrozol, exemestano. Agonistas de LH-RH: goserelina, triptorelina, buserelina.	
Retinoides	ATRA, fenretidina, bexaroteno	
Terapia génica		

1.3.3.2. Fármacos que actúan sobre el endotelio y la matriz extracelular

Los compuestos dirigidos contra el endotelio inhiben los factores de crecimientos endotelial o los receptores de tales factores (Raje & Anderson, 2002). Por otro lado, la mayoría de estos compuestos actúan inhibiendo las metaloproteinasas (MMPs) (Bramhall et al, 2002). La actividad que presentan es antiangiogénica (Tabla 8).

Tabla 8. Medicamentos dirigidos contra el endotelio y la matriz extracelular (Espinosa et al, 2003).

Compuesto	Mecanismo de acción
Factores de crecimiento endotelial	
Talidomida. Carboxiamida-triazol (CAI).	Ø VEGF, bFGF, TGF-α Ø síntesis de VEGF
Receptores de las células endoteliales	
Bevacizumab. SU-5416, SU-6668.	AntiVEGFR Ø tirosincinasa de VEGFR
Matriz extracelular	
Marimastat, AG-3340. (prinomastat), AE-941. (Neovastat) Vitaxin ABT-510	Ø Metaloproteinasas Anti-integrinas Mimetisa la trombospondina

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular. bFGF: factor de crecimiento básico de fibroblastos.
TGF-α: factor de crecimiento de fibroblastos-alfa.
VEGFR: receptor del crecimiento del endotelio vascular.

1.3.3.3. Medicamentos dirigidos contra los receptores de la membrana del tumor

Con respecto a este grupo se encuentran los anticuerpos monoclonales y moléculas pequeñas. El primero actúa en el nivel extracelular del receptor mientas que las moléculas

pequeñas atraviesan la membrana e inhiben el dominio intracelular, por lo general la tirosina cinasa (Tabla 9).

Tabla 9. Medicamentos anticancerosos dirigidos contra los receptores de membrana de la célula tumoral (Gibbs, 2000).

Compuestos	Sitio de acción
Dominio extracelular	
Anticuerpos monoclonales	
Rituximab	Anti CD20
*Ibritumomab-I	Anti CD20
*Tositumomab-I	
Alemtuzamab	Anti CD52
Trastuzumab	Anti Her-2
Cetuximab	Anti EGFR (Her-1)
Dominio intracelular	
Moléculas pequeñas	
ZD-1839 (gefitinib)	Ø tirosincinasa EGFR
OSI-774 (erlotinib)	Ø tirosincinasa EGFR
PKI-166	Ø tirosincinasa EGFR y Her-2
CI-1033	Ø tirosincinasa en todos los genes Her

CD20: Linfocito B
CD52: Linfocito
Her-2: Oncogene
Her-1: Oncogene
EGFR: Receptor del factor de crecimiento endotelial.

1.3.3.4. Medicamentos que actúan en el citoplasma de las células tumorales

Con respecto a los fármacos que actúan en el citoplasma, se consideran a los que afectan algunos ciclos metabólicos celulares que conducen al núcleo las señales de proliferación.

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACIÓN

Se consideran a los compuestos que afectan la mitosis, como es el caso de los alcaloides vinca, los taxanos y los epotilones (se encuentran en fase clínica II y III). Los alcaloides vinca se unen a sitios específicos de la tubulina mientras que los taxanos y epotilones estabilizan los microtúbulos (Warber, 1999; Espinosa et al, 2003; Horwitz, 2004).

1.4. La citotoxicidad como modelo para evaluar productos con potencial anticancerígeno

En la evaluación de compuestos con potencial anticancerígeno, se realizan los pasos metodológicos que se describen a continuación (Frei III, 1982).

a) Evaluación de la actividad *in vitro* empleando modelos celulares y moleculares.

b) Evaluación de la actividad antitumoral *in vivo*, en modelos animales a los que se les induce algún tipo de neoplasia.

c) Producción y formulación.

d) Estudios toxicológicos.

e) Evaluación en pacientes con cánceres refractarios a los agentes quimioterapéuticos.

1.4. 1. Ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* tienen el propósito de evaluar la actividad celular o molecular. Los ensayos de tipo celular emplean células intactas, en tanto que los moleculares buscan la actividad dentro de un sistema aislado, como es el caso de las enzimas, receptores o ADN. Algunas de las características que presentan ambos sistemas se muestran en la Tabla 10 (Suffness & Pezzuto, 1991).

Tabla 10. Características de los ensayos celulares y moleculares (Suffness & Pezzuto, 1991).

Característica	Ensayo molecular	Ensayo celular
Blanco	Blanco subcelular único	Cualquier blanco que inhiba el crecimiento celular.
Capacidad necesaria del ensayo	Muy alta	Moderada a alta
Número de sitios afectados	Pocos pero específicos	Muchos, pero no son de interés
Falso positivo	Agentes que no entran en las células o que se metabolizan rápidamente	Toxinas
Falso negativo	Todos los compuestos que trabajan por otros mecanismos	Algunos

Aunque los métodos moleculares son específicos, la desventaja principal reside en dicha característica ya que si se prueban compuestos que actúen a través de un mecanismo diferente, su actividad no podrá ser detectada.

Los ensayos celulares se pueden dividir en citotóxicos y los que incluyen cambios morfológicos. Si consideramos un ensayo de citotoxicidad que emplea una sola línea celular, el problema principal será un número de compuestos activos grande, siendo

algunos de estos desconocidos o bien no interesantes. La citotoxicidad tiene entonces la ventaja de incluir a todos aquellos compuestos que potencialmente ponen en riesgo la vida de la célula y por lo tanto no ofrece falsos negativos. Dentro de los materiales activos no deseados se encuentran los detergentes y los metales pesados (Suffness & Pezzuto, 1991).

La mayoría de los programas de investigación intentan aislar e identificar el potencial antitumoral de compuestos obtenidos de plantas y para ello se apoyan en el fraccionamiento químico biodirigido por pruebas de citotoxicidad.

En un inicio se emplearon los cultivos de células KB (carcinoma nasofaringeo) y P388 (leucemia murina) en los cuales se probaron a diferentes concentraciones el compuesto o extracto de elección y después de un proceso de incubación de 48 ó 72 horas se cuantificaba el crecimiento celular determinando la concentración de proteínas (KB) o conteo de células (P388). Los resultados se expresan en términos de CE_{50} (concentración requerida para inhibir en un 50% el crecimiento) y el criterio de actividad, establecido por el Instituto Nacional del Cáncer del EEUU, es ≤ 20 μg/ml para extractos y ≤ 4 μg/ml para compuestos puros (Suffness & Pezzuto, 1991).

En la actualidad el Instituto Nacional del Cáncer de EEUU emplea un programa en el que el potencial citotóxico de los compuestos se evalúa empleando una batería de células procedentes de 60 tipos de cánceres humanos (Boyd & Paull, 1995). El objetivo es descubrir a aquellos agentes que muestran actividad citotóxica selectiva con una línea de células derivada de un solo tipo de tumor humano. El uso de las células cancerosas humanas ofrece un gran valor teórico y práctico. Las células se pueden transportar como

tumores sólidos en ratones atímicos y de esta manera se facilitarán los estudios posteriores como es el caso de la actividad antineoplásica (Suffness & Pezzuto, 1991).

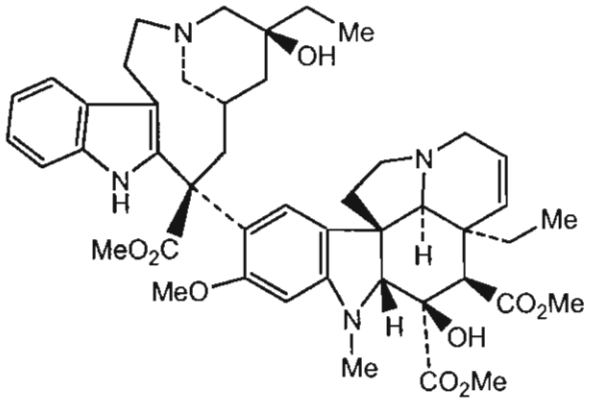
1.5. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos

Entre 1960 y 1970, científicos de Estados Unidos de Norteamérica iniciaron diversas investigaciones acerca de las plantas con actividad anticáncer (Cragg et al, 1994).

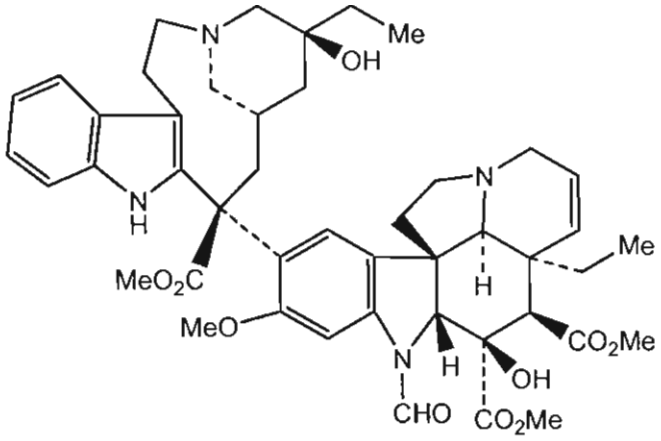
El Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América (NCI) desarrolló un programa de selección empleando la línea celular L1210 (leucemia linfocitica) en ratones y otros modelos animales para evaluar la capacidad antineoplásica de las plantas. Posteriormente evaluaron la actividad de las plantas a través de pruebas *in vitro* usando las líneas celulares P388 (leucemia linfocitica murina) y KB (carcinoma nasofaringeo humano). Para 1981 se habían evaluado 114,000 extractos procedentes de 35,000 plantas (Cragg et al, 1994). Los resultados del programa de NCI condujeron a la obtención de productos naturales que se han empleado como agentes quimioterapéuticos (Newman et al, 2000). Actualmente existen en el mercado de Estados Unidos de Norteamérica 141 medicamentos contra el cáncer y aproximadamente el 67 % de éstos son de origen natural (Newman et al, 2003). Los medicamentos de origen natural se han clasificado 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 (Cragg et al, 1997). Se consideran como productos naturales aquellos producidos por bacterias (p.ej. bleomicina), organismos marinos y a los obtenidos de plantas (Newman et al, 2000).

Los primeros compuestos anticancerosos obtenidos de las plantas fueron la vincristina (**1**) (oncovin®) y vinblastina (**2**) (velban®), los cuales fueron aislados del *Catharanthus roseus,* planta empleada por varias culturas para el tratamiento de la diabetes (Cragg et al, 1994). Las modificaciones químicas que se han realizado a la vincristina y vinblastina condujeron a la obtención de los compuestos semisintéticos vinolrebina (**3**) (navelbine®) y vindesina (**4**), aprobados en Europa para el tratamiento del cáncer (Newman et al, 2000).

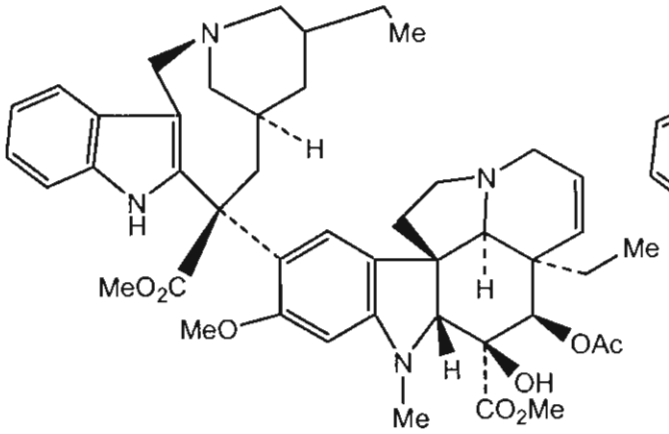
La vincristina se emplea en combinación con otros medicamentos anticancerígenos en el tratamiento de leucemia linfocítica infantil aguda, cáncer cervicouterino, cáncer de colon, mama y otros carcinomas (Moura et al, 2002). La vinblastina se emplea para el tratamiento de linfoma de Hodgkin (Warber 1999), carioepitelioma y cáncer de ovario (Silva et al, 2003). La vinolrebina se emplea en el tratamiento de cáncer de ovario avanzado (Silva et al, 2003). Estos compuestos son alcaloides y se unen a la tubulina evitando la polimerización de los dímeros de tubulina y de este modo rompen la formación de los microtúbulos (Warber, 1999; Espinosa et al, 2003). Los microtúbulos son críticos para la formación del huso en las células que se están preparando para la mitosis. También tienen la función de mantener la forma de la célula, la adherencia, motilidad y transporte celular (Warber, 1999). Cuando el complejo tubulina-alcaloide se une a los microtúbulos trae como consecuencia que la célula sea arrestada en la fase M del ciclo celular (Warber, 1999). Las estructuras químicas de estos alcaloides se muestran en la Figura 7 con los números 1, 2, 3 y 4.



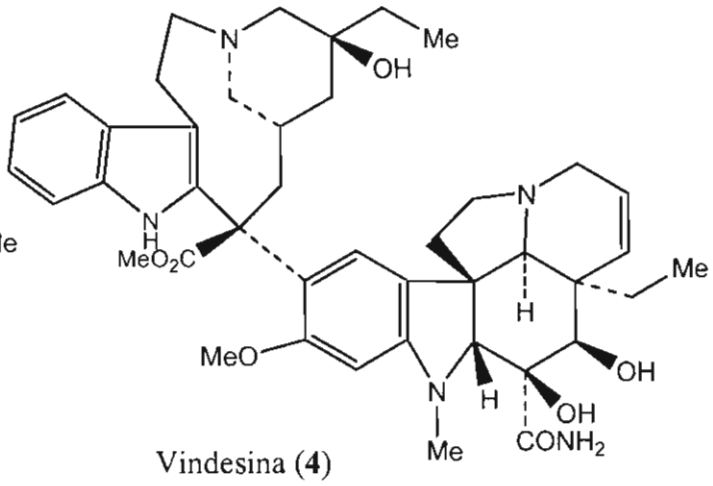
Vincristina (**1**)



Vinblastina (**2**)



Vinolrebina (**3**)



Vindesina (**4**)

Figura 7. Compuestos anticancerosos de origen natural y semisintéticos obtenidos del *Catharanthus roseus* (Newman et al, 2000).

El etopósido (**5**) (VP-16) y tenipósido (**6**) (VM-26) son dos glucósidos semisintéticos derivados de la epipodofilotoxina (**7**) (Tannock & Hill, 1998; Newman et al, 2000). La epipodofilotoxina es un isómero de la podofilotoxina el cual fue aislado de las raíces de varias especies del género *Podophyllum*. *Podophyllum emodi* y *Podophyllum peltatum* se han empleado en las culturas asiáticas y entre los indios americanos para tratar el cáncer de piel y verrugas (Hartwell, 1968; Cragg et al, 1994). Aunque la podofilotoxina fue investigada por el NCI, no se continúo el estudio debido a que presentaba problemas de toxicidad. Posteriormente el laboratorio Sandoz (antes de fusionarse con Ciba-Geigy) continúo el trabajo produciendo el etopósido y tenipósido, los que se emplean en la clínica desde 1996. La investigación también se continuó en Japón produciendo NK-611 (**8**), derivado del etopósido el cual es soluble en agua (Newman et al, 2000).

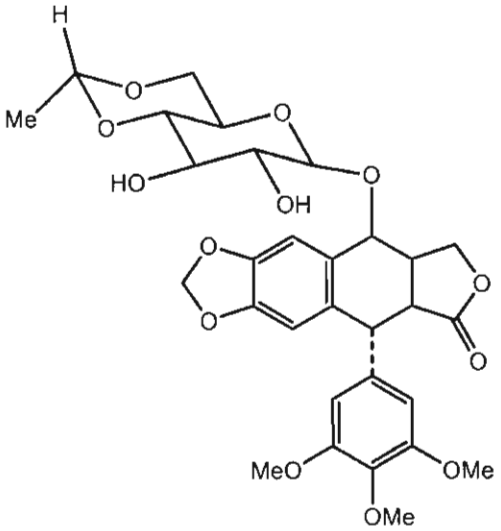
El etopósido y tenipósido se emplean en el tratamiento del cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer testicular, tumores pediátricos y linfomas malignos (Tannock & Hill, 1998). El NK-611 se emplea en el tratamiento del cáncer de pulmón (Shu, 1998).

A pesar de que la podofilotoxina se une a la tubulina e inhibe la polimerización (Tannock & Hill, 1998), el etopósido, tenipósido y NK-611 inhiben a la enzima topoisomerasa II (Van Mannen et al, 1988; Tannock et al, 1998; Shu, 1998).

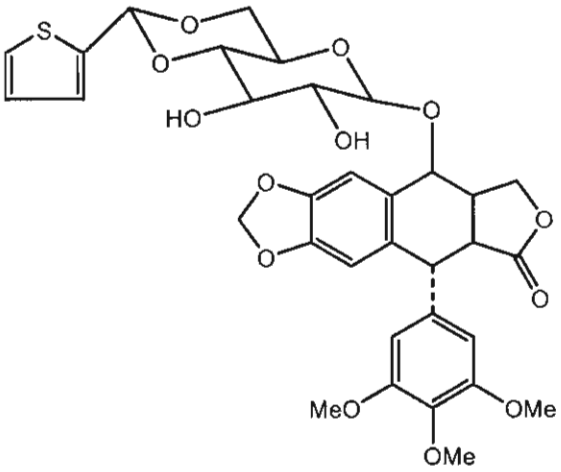
El etopósido, tenipósido y NK-611 forman un complejo con la topoisomerasa II después del rompimiento de la doble cadena del ADN e inhiben la unión de las dos hebras de ADN (Pommier, 1993). Esto conduce a la inhibición de la replicación del ADN y al rompimiento de las hebras del ADN (Tannock & Hill, 1998).

La topoisomerasa II es una enzima esencial para la replicación y transcripción del ADN, así como para la recombinación y segregación cromosómica.

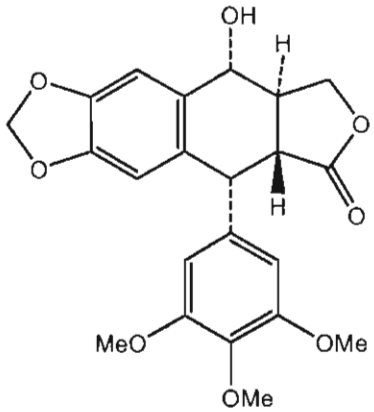
Las estructuras químicas de los derivados de la epipodofilotoxina se muestran en la Figura 8 con los números 5, 6, 7 y 8.



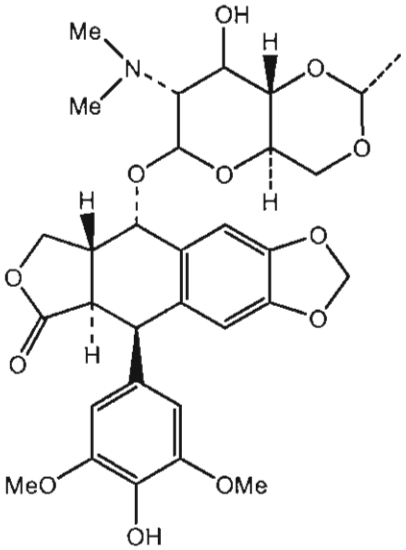
Etopósido (**5**)



Tenipósido (**6**)



Podofilotoxina (7)



NK-611 (**8**)

Figura 8. Compuestos anticancerosos semisintéticos derivados de la epipodofilotoxina aislada de varias especies del genero *Podophyllum* (Shu, 1998; Newman et al, 2000).

La camptotecina (**9**) se aisló de *Camptotheca acuminata*, árbol de ornato chino (Perdue, 1976). Los extractos de *C. acuminata* se investigaron en la década de 1950 como fuente de saponinas esteroidales para su posterior conversión en cortisona y fue al azar que se decidió evaluar la actividad antitumoral (Cragg et al, 1994). El primer reporte de actividad antitumoral fue generado por los estudios realizados en el NCI, y el principio activo resultó ser la camptotecina (Wall et al, 1966; Oberlies & Kroll, 2004). Los estudios clínicos de fase I, empleando la sal sódica de la camptotecina, se realizaron a los inicios de 1970, pero pronto fueron suspendidos debido a la severa toxicidad (Newman et al, 2000). Alrededor de 1985 se revivió el interés debido al novedoso mecanismo de acción que involucra a la enzima topoisomerasa I (Hsiang et al, 1985; Cragg & Newman, 2004).

A partir de estos estudios se realizaron modificaciones químicas a la camptotecina obteniendo el topotecan (**10**) (Hycamtin®) el cual se aprobó en los Estados Unidos de Norteamérica (EEUU) en 1996 (Shu, 1998) para el tratamiento de cáncer de ovario. Otras modificaciones básicas de la camptotecina produjeron al irinotecan (**11**) (Camptosar®), clínicamente investigado como CPT-11 (Tannock & Hill, 1998), al 9-amino-camptotecina (**12**) y 9 nitro-camptotecina (**13**). El uso del irinotecan se inició en 1994 en Japón y en 1996 fue aprobado en EEUU para el tratamiento del cáncer colorrectal, ovario, y pulmón (Shu, 1998; Oberlies & Kroll, 2004). La 9-aminocamptotecina (9-AC) es un agente muy potente, pero su aplicación en la clínica se atrasó debido a los problemas de solubilidad, mismos que ya se resolvieron y actualmente la 9-AC está en fase II (Tannock & Hill, 1998, Newman et al, 2000). Otro de los derivados de la camptotecina es el DX-8915F (**14**) (Lavergne et al, 1998), el cual se encuentra en fase I

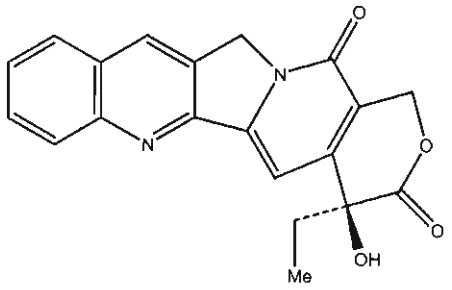
en EEUU, tiene una potencia mayor que irinotecan y topotecan y también actúa sobre la topoisomerasa I (Shu, 1998).

La Topo I es una enzima que tiene la capacidad de "relajar" el ADN muy enrollado durante la transcripción o replicación (Tannock & Hill, 1998). La topo I es un blanco muy atractivo ya que se ha encontrado que los niveles de esta enzima son más altos en los tumores malignos que en los tumores benignos o tejidos normales (Husain et al, 1994).

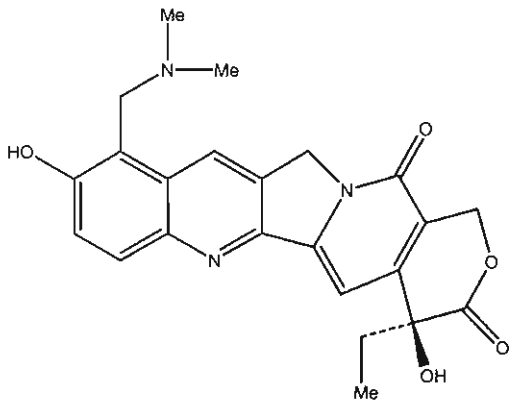
La camptotecina y sus análogos (CPTs) actúan al enlazarse con los aductos ADN-Topo I, lo que estabiliza el complejo divisible ADN-Topo I evitando la liberación del ADN y provocando la acumulación de complejos divisibles estabilizados. La formación del complejo ternario entre la CPTs-Topo l-ADN provoca la inhibición de la síntesis del ADN y ARN y la exposición prolongada a CPTs conduce a un daño irreparable en el ADN y por lo tanto provoca la muerte celular (Fan et al, 1998).

Las células en fase S son muy sensibles a las CPTs, posiblemente porque la replicación del ADN requiere la actividad de la Topo I asociada con la separación de las bandas del ADN y la conversión en la doble banda (Pommier, 1993).

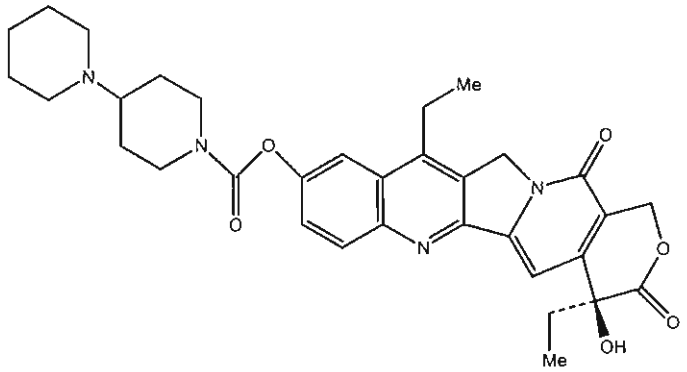
Las estructuras químicas de la camptotecina y sus derivados se muestran en la Figura 9 con los números 9, 10, 11, 12,13 y 14.



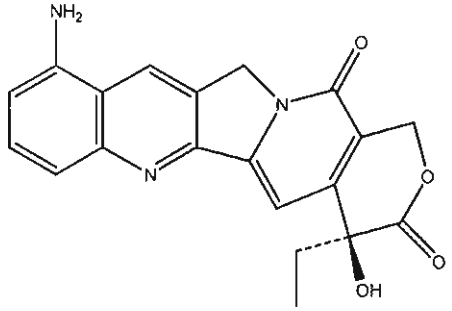
Camptotecina (**9**)



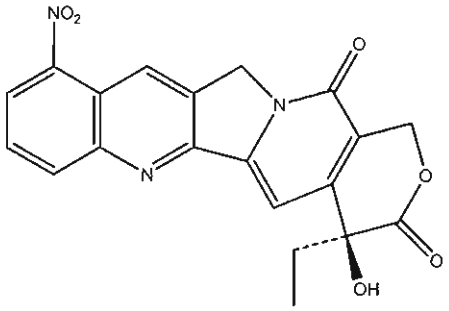
Topotecan (**10**)



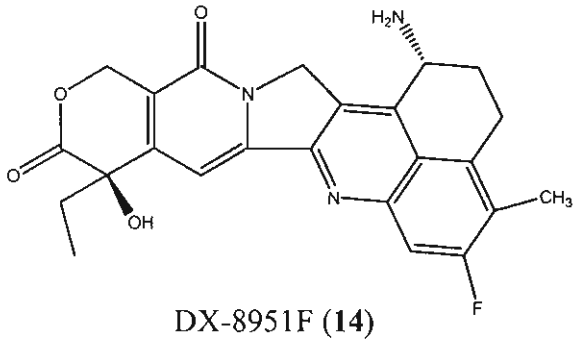
Irinotecan (**11**)



9-aminocamptotecan (**12**)



9-nitrocamptotecan (**13**)



DX-8951F (**14**)

Figura 9. Compuestos anticancerosos semisintéticos derivados de la camptotecina, alcaloide aislado de *C. acuminata* (Cragg & Newman, 2004; Shu, 1998).

El Taxol® (Paclitaxel) es un diterpeno que inicialmente se aisló de la corteza de *Taxus brevifolia*, colectado en 1962 en el estado de Washington por el botánico Arthur Barclay del Departamento de Agricultura de EEUU, como parte de un programa de colecta al azar por el Departamento de Agricultura del Instituto Nacional de Cáncer (Cragg et al, 1994). Aunque el interés por el Taxol (**15**) se inició en los años 1960s, las propiedades médicas del árbol "tejo" se han conocido desde hace varios siglos. Al árbol del tejo se le conocía como el árbol de la muerte por sus características venenosas que están documentadas en registros griegos y latinos. Julio César escribió al respecto, en el séptimo libro de la colección titulada "Sobre las guerras Gálicas" y publicada en el año 51 a.C., sobre la muerte de Catuvolcus (Caudillo de la tribu Celta de los Eburones) quien decidió suicidarse, bebiendo el té hecho con la corteza del tejo (Appendino, 1993; Nicolaou et al, 1996) en lugar de rendirse a los Romanos. Las tribus Quinault, Multnomah y Nez Percé, nativas del noreste de Norteamérica utilizaron la corteza del tejo como desinfectante, para inducir el aborto, así como en el tratamiento del cáncer de piel (Nicolaou et al, 1996).

El taxol junto con otros precursores claves (bacatinas) se encuentran presentes en las hojas y los frutos de *Taxus baccata*, árbol que se ha empleado en la medicina tradicional Ayurvédica (Cragg et al 1997) y existe un reporte sobre el uso de *T. baccata*, en India, para el tratamiento del cáncer (Hartwell, 1971).

En 1964 se descubrió (en el NCI) que un extracto de la corteza de *Taxus brevifolia* era tóxico para los cultivos de células de leucemia. El aislamiento del compuesto responsable de la actividad se realizó en los laboratorios de Monroe Wall (Lenaz & Furia, 1993) y en 1967 Mansukc C. Wani y Monroe E. Wall obtuvieron el compuesto responsable de la

actividad citotóxica y lo bautizaron con el nombre de taxol, dado que comparte similitudes químicas con la familia de taxanos, además de que se aisló de una planta del género *Taxus* (Oberlies & Kroll, 2004).

Las bacatinas se pueden transformar a través de síntesis químicas en el paclitaxel (Taxol®) y docetaxel **(16)** (Taxotere®), ambos compuestos conocidos como taxanos.

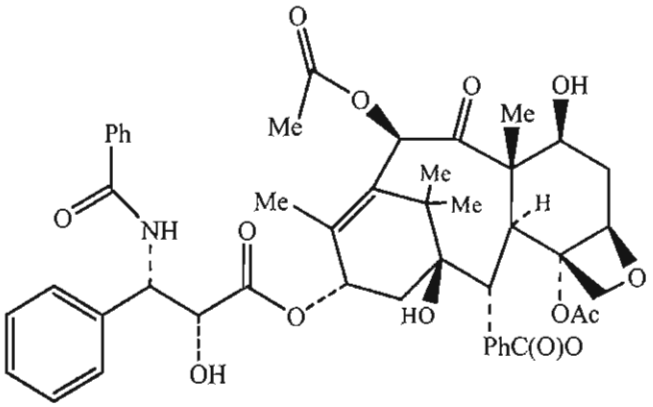
Los taxanos se unen a los microtúbulos (Horwitz, 2004), los que actúan como citoesqueleto interno de la célula. Los microtúbulos son estructuras flexibles que participan de manera dinámica en el proceso de la división celular. Cuando el paclitaxel y docetaxel se unen a los microtúbulos, éstos se convierten en estructuras estáticas lo que evita la división celular y de esta manera mata a las células (Rowinsky & Donehower, 1995; Tannock & Hill, 1998) en el punto G2/M (Gibbs, 2000) del ciclo celular.

El paclitaxel se lanzó al mercado en 1993 para el tratamiento de cáncer de ovario, cáncer de pulmón, sarcoma de Kaposi y cáncer de mama. El Docetaxel se aprobó en EEUU en 1996 para el tratamiento del cáncer de mama (Shu, 1998).

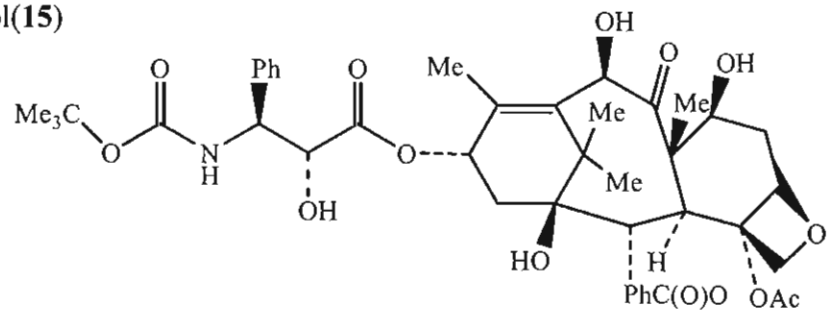
Las células cancerosas se dividen con más frecuencia que las células normales, así que estos medicamentos primero atacan a las células tumorales, pero también existen células normales que presentan una tasa de proliferación elevada, por ejemplo los linfocitos y células del cabello, que con frecuencia son afectados. Así que los efectos colaterales del taxol y docetaxel son la depresión del sistema inmune, retraso de las sensaciones nerviosas, náuseas y pérdida del cabello (Tannock & Hill, 1998).

Las estructuras químicas de los taxanos se muestran en la Figura 10 con los números 15 y 16.

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO



Taxol(**15**)



Docetaxel (**16**)

Figura 10. Diterpenos anticancerosos obtenidos de especies del genero *Taxus* (Shu, 1998).

Los alcaloides homoharringtonina (**17**) (HHT) y harringtonina (**18**) (HT) se aislaron de las semillas del árbol chino *Cephalotaxus harringtonia var drupacea* (Zieb or Zucci) así como de otras especies de éste género (Cragg et al, 1994). La actividad antitumoral de ambos alcaloides se observó dentro del programa de análisis sistemático efectuado por el NCI de EEUU (Powell et al, 1972).

Otra de las especies de *Cephalotaxus* que crece en China es la *C. hainanesis* y de ella se han aislado HHT y HT mismos que se emplean dentro de la clínica China para el tratamiento de la leucemia (Han, 1994).

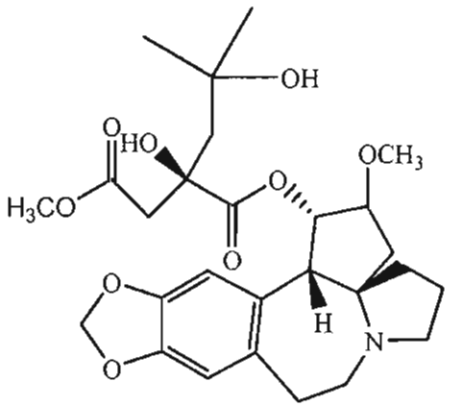
Dado que el *Cephalotaxus* es escaso y su crecimiento lento, el NCI patrocinó las investigaciones para realizar la síntesis de cefalotoxina y emplearla como precursor de HHT. Con este propósito se sintetizó el núcleo de la cefalotoxina, se esterificó el ácido y se unió a dos unidades a través de un proceso de esterificación. En este sentido también trabajaron investigadores de China los que reportaron la síntesis de la HT y HHT (Blaskó & Cordell, 1988).

El más activo de estos dos alcaloides es HHT (Warber, 1999) y en China se emplea en el tratamiento de leucemias agudas no linfoblástica y leucemia mielogenosa crónica (Lee, 2004). En los EEUU se están realizado estudios clínicos con la HHT (Shu, 1998). Probablemente la HHT sea el agente quimioterapeútico más prometedor para el tratamiento de leucemias mieloides agudas refractarias al tratamiento con medicamentos estándar. La Oficina de Patentes y Comercio de Estados Unidos de Norteamérica (US Patent and Trade Office) concedió el 17 de junio de 2003 a Oncopharm Corporation la patente de análogos de HHT de segunda generación (Oncopharm, 2003). El 2 de septiembre de 2004, la Comisión Europea (Stragen France SAS) aprobó el uso de la HHT (EU/3/04/224) para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (European Medicines Agency, 2004).

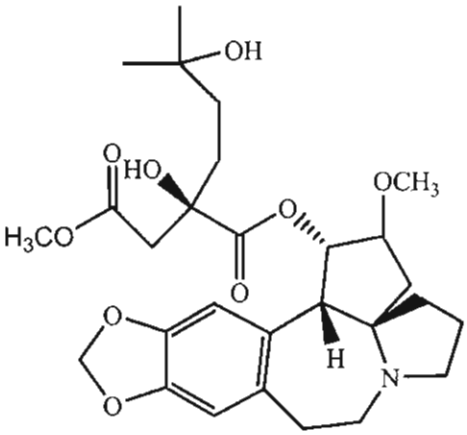
La HHT ejerce su efecto tóxico en las fases G1 y G2 del ciclo celular (Warber, 1999), fases donde es más activa la síntesis de proteínas. La síntesis de proteínas involucra las etapas de iniciación y elongación. La HHT inhibe la etapa de elongación por inhibición

competitiva de la enzima peptidil transferasa, la que cataliza la formación del enlace peptídico (Zhou et al, 1995). Existen evidencias de que la HHT interrumpe la síntesis de proteínas de diversas formas como son: despegando los ribosomas de retículo endoplásmico, degradando los ribosomas, así como inhibiendo la glicolisación de las proteínas terminadas (Zhou et al, 1995). La HHT también disminuye los niveles intracelulares de algunas proteínas de los centrómeros, probablemente al inhibir el ARNm de los genes correspondientes (Liang et al, 2003). A través de estos mecanismos la HHT puede inducir la apoptosis y la diferenciación de las células del cáncer (Weber, 1999).

Las estructuras químicas de éstos alcaloides se muestran en la Figura 11 con los números 17 y 18.



Homoharringtonina (17)



Harringtonina (**18**)

Figura 11. Alcaloides anticancerosos aislados de especies del genero *Cephalotaxus* (Lee, 2004; Shu, 1998).

La elipticina (**19**) (5,11-dimetil-6H-pirido [4,3-b] carbaxol) es un alcaloide con estructura plana que fue aislado en 1957 por Goodwin, Smith y Horning de las hojas del árbol *Ochrosia elliptica* Labil (*Apocinacea*), que crece de manera silvestre en Oceanía (Shi et al, 1998), pero fue hasta 1967 que se reportó la actividad anticáncer de la elipticina, 9-metoxielipticina y otros de sus derivados (Dalton et al, 1967).

El eliptinum (Celiptium®), derivado de la elipticina, se ha aislado de especies pertenecientes a la familia de las *Apocinaceas*, como es el caso de *Bleeckeria vitensis*, planta medicinal empleada en Fidji para el tratamiento del cáncer (Cragg et al, 1997b).

A partir del reporte de Dalton, varios grupos de investigación estudiaron la relación estructura-actividad de este tipo de compuestos y para 1998 se habían probado 112 derivados de la elipticina por el programa del NCI (Shie et al, 1998).

La elipticina, 9-metoxielipticina (**20**) y 9-hidroxilipticina (**21**) muestran actividad sobre las células de leucemia L1210, P388 y P1534, mieloma X5563 y linfosarcoma de Gardner (Blaskó & Cordell, 1988). Inhiben los carcinomas inducidos experimentalmente en el hígado de rata. La elipticina incrementa la producción del citocromo P450 (Cordell, 1977). También se ha encontrado que algunos derivados de la elipticina, especialmente los elipticiniums, muestran citotoxicidad selectiva sobre las líneas celulares cancerosas derivadas del Sistema Nervioso Central (Acton et al, 1994).

La elipticina y sus análogos se intercalan con el ADN, inhiben la topoisomerasa II (Shu, 1988), alquilan covalentemente las macromoléculas y generan radicales libres citotóxicos (Shi et al, 1998).

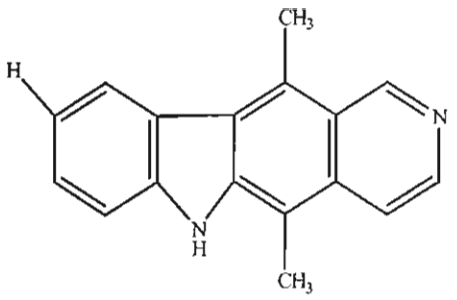
Debido a que la elipticina produce toxicidad cardiovascular y hemólisis, se detuvieron los estudios preclínicos y el interés se desplazó hacia la 9-hidroxielipticina, 9-metoxielipticina y eliptinium (Shi et al, 1998).

La 9-hidroxi-2-metilelipticina se empleó en un estudio clínico en un grupo de 135 pacientes con cáncer de mama con metástasis ósea y se encontró que dicho compuesto no presentó toxicidad ósea por lo que este quimioterapéutico puede emplearse en cánceres donde esté involucrado el sistema óseo. Los efectos colaterales que se presentaron fueron la inhibición de la secreción de saliva la que causó micosis en la lengua, anorexia y astenia. Los desórdenes inmunológicos no fueron frecuentes y 4 pacientes (4/135) desarrollaron insuficiencia renal severa (Juret et al, 1982).

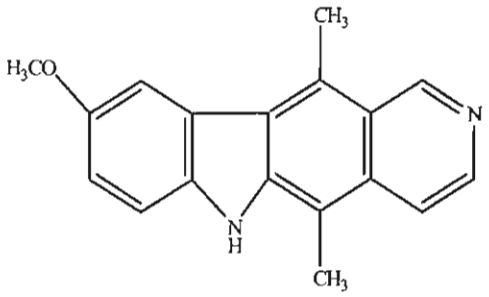
El dateliptium (**22**) (análogo de la elipticina) se encuentra en estudios clínicos de fase II (Shu, 1998).

El interés por la elipticina y sus derivados sigue vigente ya que se ha observado que algunos de estos compuestos restablecen la función del gen supresor p53 (Shi et al, 1998; Yanhua et al, 2003), inducen a los genes que responden a p53 (p21WAFI, MDM2) y activan el receptor luciferasa de p53 (Yanhua et al, 2003). Esta propiedad puede contribuir en la selección de los derivados de la elipticina para tratamiento de tumores cuyas células expresen mutaciones en el gen p-53.

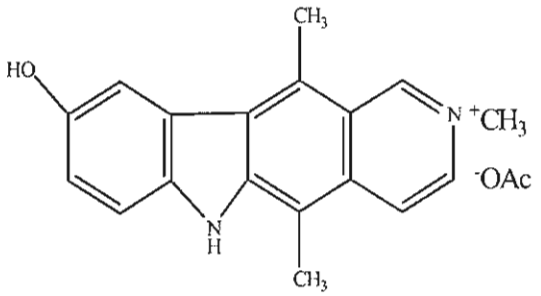
Las estructuras químicas de la elipticina y sus derivados se muestran en la Figura 12 con los números 19, 20, 21 y 22.



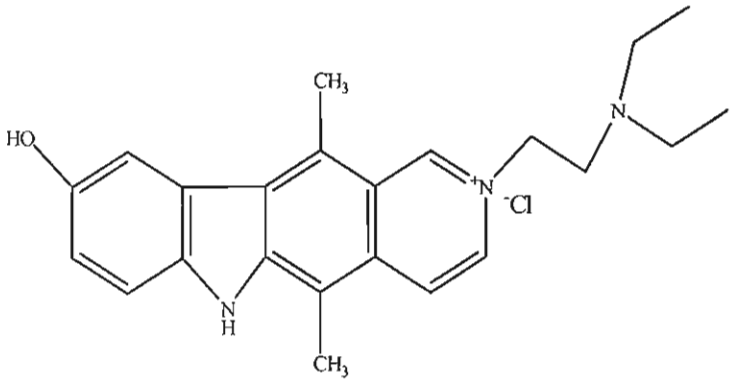
Elipticina (**19**)



9-metoxielipticina (**20**)



9-hidroxielipticina (Eliptidium) (**21**)



Dateliptium (**22**)

Figura 12. Compuesto anticancerosos semisintéticos derivados de la elipticina, alcaloide aislado de *Ochrosia elliptica* Labil (Shu, 1998; Shi et al 1998),

Los compuestos anticancerosos que se han obtenido de plantas han sido i) por serendipia (vincristina y vinblastina), ii) al azar (camptotecina), iii) a través de estudios sistemáticos (taxol). También se observa que algunos de estos compuestos se han aislado de plantas empleadas por diversas culturas en el tratamiento del cáncer. China es uno de los países que emplea la medicina herbolaria para el tratamiento del cáncer (Wong et al 2001; Lee, 2004) y quizás en un futuro próximo se cuente con nuevos fármacos anticancerosos obtenidos de plantas empleadas en la etnomedicina.

1.6 Asociación de la dieta en la protección contra el cáncer

Con respecto a la relación dieta contra el cáncer, ésta presenta un fenómeno muy complejo ya que existe consenso general de que el cáncer se presenta en personas obesas (Josefson, 2001).

Existen evidencias convincentes de que dietas ricas en vegetales y frutas protegen contra el cáncer de estómago (Word Cancer Research Fund, 1997). La vitamina C contenida en vegetales, frutas y otros alimentos de origen vegetal probablemente confieren protección (Peto, 2001), así que las dietas ricas en cereales de grano completos, carotenoides y té verde también tendrán efectos protectores (Parkin et al, 2001). Los estudios realizados en poblaciones italianas y chinas han indicado que el ajo y la cebolla pueden reducir el riesgo de contraer cáncer del estómago (Buiatti et al, 1989; You et al, 1989). Por lo anteriormente expuesto la dieta proporciona efectos protectores a través de los fitoconstituyentes presentes en algunas plantas que forman parte de la dieta. Los efectos quimoprotectores se atribuyen a las actividades antioxidantes y/o antiinflamatorias (Surh, 1999; Surh 2003).

El té verde, que forma parte de la dieta de las personas en los países asiáticos, contiene el 30% del peso seco de compuestos de tipo polifenólico. El galato de epigalocatequina es el compuesto que presenta la mayor actividad antioxidante y quimioprotectiva (Park & Surh, 2004).

El estudio epidemiológico, realizado en Japón con 8552 personas, mostró que el té verde tiene un efecto protector contra el cáncer de estómago, pulmón, colorrectal e hígado (Imai et al, 1997). Otro estudio realizado durante 12 años en Estados Unidos de Norteamérica en 34,651 mujeres postmenopaúsicas mostró que la ingesta de catequina,

derivada de alimentos, presentó una relación inversa sólo en el cáncer de colon (Arts et al, 2002).

Beber té verde también ha protegido del cáncer colorrectal a mujeres de la provincia de Hebei, China (Zhang et al, 2002), del cáncer de estómago a los residentes de Nagoya, Japón (Inoue et al, 1998), del cáncer colorrectal y pancreático a los residentes de Shangai, China (Ji et al, 1999) y mujeres post-menopáusicas de Saitama, Japón (Nakacki et al, 1998).

Los estudios realizados en células **HNSCC** (línea celular humana de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello) mostró que el galato de epigalocatequina en una concentración de 10 μg/ml mató al 70% de las células (CL_{70}), incrementó la proporción de las células en la fase G1, disminuyó la expresión de la ciclina D y también incrementó los niveles de las proteínas $p21^{WAP1/CIP1}$ (el gen p21, inhibe los complejos ciclina/CDK y de esta manera evita la fosforilación necesaria de pRB para que las células entren a la fase S) y $p27^{KIP1}$ (p27 es un inhibidor de CDK) (Masuda et al, 2001).

La administración de dosis de 0.10 μg/ml (concentración en el suero, después de la administración oral de galato de epigalocatequina) y medicamentos quimioterapéuticos actuaron de manera sinergística inhibiendo el crecimiento tumoral (Park et al, 2004).

En Estados Unidos de Norteamérica se ha evaluado la eficacia preventiva del extracto del té verde (estudios clínicos en fase I) en pacientes del Anderson Cancer Center (Houston, Tx.), en colaboración con el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (New York, N.Y) (Pisters et al, 2001).

Los estudios epidemiológicos también han mostrado que las poblaciones que tienen una ingesta alta de soya presentan una incidencia baja en cáncer de mama y próstata, así

como de otros carcinomas. El estudio epidemiológico, en el cual participaron 50 países, identificó a los productos de la soya como un alimento con efectos protectores contra el cáncer de próstata (Herbert et al, 1998). Con respecto a otros tipos de cánceres se ha encontrado que las mujeres asiáticas, las que consumen en gran cantidad productos derivados de la soya, presentan una baja incidencia en cáncer de mama, la cual no se conserva en las segundas generaciones asiáticas que emigran a los Estados Unidos de Norteamérica y que han adoptado los hábitos alimenticios occidentales (Park & Surh, 2004). También se ha encontrado una asociación entre la ingesta de soya y la baja incidencia en el cáncer de endometrio (Goodman et al, 1997).

El compuesto en la soya, que confiere la actividad protectora contra el cáncer (Barnes, 1995) es la genisteína (4',5,7-trihidroxi isoflavona), la que también se encuentra en otras verduras y se considera como un fitoestrógeno. La distancia molecular entre los hidroxilos del núcleo A y el que se encuentra en el 17β-estradiol son similares y son los dos hidroxilos de la genisteína los que le confieren una fuerte afinidad con el receptor del estrógeno (Brzozowski et al, 1997).

Dado que la genisteína interfiere con el nivel de receptores a estrógeno, se considera a dicho compuesto como inhibidor de tumores promovidos por estrógenos (Park & Surh, 2004). La genisteína es un inhibidor de la proteína tirosincinasa (enzima que con frecuencia se expresa en las células cancerosas), inhibe la angiogénesis, inhibe la formación de radicales libres e interacciona con la topoisomerasa (Warber, 1999).

La genisteína inhibe el crecimiento de las células NIH 3T3 (línea de fibroblastos embrionarios de ratón), sin afectar el crecimiento de células normales e inhibe la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas inducido por los proto-

oncogenes *c-fos*, *c-jun* en la línea de fibroblastos CH310T1/2 (Park & Surh, 2004). La supresión de los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* parece estar mediado a través de la inhibición de fosforilación de la proteína tirosina cinasa dependiente de receptor EGF. La importancia de los factores de crecimiento como blanco molecular de la genisteína, se ha observado en un modelo murino con adenocarcinomas prostáticos (Lamantiere et al, 2002).

Con respecto al ciclo celular, la genisteína detuvo las células de cáncer de mama, próstata, colon y pulmón en la fase G2/M (Park & Surh, 2004). El efecto antiproliferativo de la genisteína sobre las células de cáncer mamario se atribuyó a que las células detenidas en la fase G2/M tuvieron un aumento de p21 $^{WF/CIPI}$ el cual fue mediado por un mecanismo independiente de p-53.

La genisteína presenta efectos antiangiogénicos que han sido atribuidos a una baja en la regulación de MMP-9, VEGF y aumento en la regulación de MMP-1 (Park & Surh, 2004).

Con respecto a la apoptosis, se ha observado que la genisteína afecta la regulación de los genes *bcl-2* y/o *bax*, (Park & Surh, 2004). También se ha sugerido que la genisteína induce la apoptosis de las células DU-145 (cáncer prostático humano) a través de la proteasa caspasa –3 (Kumi-Kiaka et al, 2000).

Las plantas del genero *Linum*, en especial *Linum usitatissimum* L. se han empleado con fines alimenticios y medicinales. Diversas culturas, entre ellas la egipcia, hindú, griega, romana y mexicana, han empleado a la linaza (*Linum usitatissimum*) para tratar el cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de cervix, cáncer de útero, cáncer de piel, cáncer de boca, tumores del estómago e intestino (Hartwell, 1970).

La semilla es la parte que se emplea con fines alimenticios y medicinales. Dentro de los compuestos químicos presentes en la linaza están el ácido omega-3, ácido linoleico y los lignanos.

Los lignanos son compuestos difenólicos que generalmente tienen un esqueleto 2,3-dibencilbutano y se cree que son producidos dentro del ciclo de la lignina (Ayres & Loike, 1990). Dentro de las actividades biológicas de los lignanos está la actividad antibacteriana, antifúngica, antimitótica. Estas actividades sugieren que los lignanos de las plantas son fitoalexinas producidas bajo condiciones de estrés y que pueden jugar un papel en la defensa de la planta (Westcott & Muir, 2003).

La idea de que la linaza podría tener propiedades quimioprotectoras se generó a partir de estudios que mostraron que la excreción urinaria de lignanos era menor en mujeres con cáncer de mama. La similitud estructural química de los lignanos con el dietilstibestrol y el tamoxifen (medicamento empleado contra el cáncer de mama de tipo hormona dependiente) conducen a pensar que los efectos de los lignanos pueden estar relacionados con la actividad hormonal (Westcott & Muir, 2003).

Hoy en día continúan los estudios *in vitro* e *in vivo* para conocer el papel de la linaza y sus lignanos sobre diferentes tipos de cáncer.

1.7. Las plantas en el tratamiento del cáncer

El sistema de salud basado en plantas es muy antiguo y ha constituido parte de la medicina tradicional de las diferentes culturas (Velasco et al, 2004). Hoy en día se continúan empleando las plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades como lo constata la Organización Mundial de la Salud, misma que estima

que aproximadamente el 80% de la población mundial las usa para tratar diversos padecimientos (Newman et al, 2003).

En el caso de México, el primer libro de medicina herbolaria azteca se conoce como el Códice de la Cruz-Badiano, en reconocimiento al médico indígena Martín de la Cruz quien dictó los usos de las plantas en náhuatl y a Juan Badiano que lo tradujo al latín (De la Cruz, 1991). Este libro fue escrito en 1552 y contiene 251 especies vegetales endémicas de México.

Los trabajos de Jonathan Hartwell muestran que desde hace 3500 años el hombre ha empleado las plantas para el tratamiento del cáncer (Hartwell, 1967). En su obra compiló alrededor de 3000 especies de plantas, lista que publicó durante un periodo de 5 años en la revista *Lloydia* (Graham et al, 2000). Para la realización de este trabajo, Hartwell incluyó la revisión de literatura, fuentes etnomédicas y archivos del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de Norteamérica.

El trabajo de Harwell se continuó y en el año 2000 se adicionaron otras especies empleadas para este propósito, usando como fuente de información las base de datos de NAPRALET (Graham et al, 2000).

De los trabajos de Hartwell (Hartwell, 1967; Hartwell, 1968; Hartwell, 1969, Hartwell, 1969b; Hartwell, 1969c; Hartwell, 1970; Hartwell, 1979b; Hartwell, 1971, Hartwell, 1971b) y Graham (Graham et al, 2000) se concluye que en México se han empleado 238 especies de plantas pertenecientes a 78 familias para el tratamiento de enfermedades consistentes con sintomatología de cáncer (Apéndice 1). El lapso de tiempo revisado por Hartwell comprende desde el año 1552 (Códice de la Cruz Badiano) hasta 1959 (Erdos &

Ferenci, 1959). En dicha revisión también incluyó archivos del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de Norteamérica.

1.8 GENERALIDADES DE *Cuphea aequipetala* Cav.

1.8.1. Aspectos botánicos y etnomédicos

Cuphea aequipetala, pertenece a la familia Lythraceae y tiene la siguiente sinominia científica: *Cuphea scabrida* HBK., *Cuphea virgata* Cav., *Parsonsia aequipetala* Cav. Standley (SEMARNAT, 1997). Es una planta nativa de México (Argueta et al, 1994). Recibe los nombres comunes de alcáncer, alfilerillo, canchanchillo, cordón de San Francisco, guinda, hierba del ángel, hierba del descáncer, miel de abeja, mirto morado, moyote, pelatito, rama roja, apanchola, topo de indias, tripa de tuza, atlanchana, hierba del cáncer y tozancuitlaxcolli (Argueta et al, 1994).

Se localiza en los estados de Michoacán, Durango, Guerrero, Jalisco, Morelos, Estado de México y Veracruz (Argueta, 1994, Baytelman, 1993).

Su hábitat son los bosques de encino, pino-encino, junípero y otras latifoliadas. Se le encuentra entre 1900 y 2200 msnm. Se recoge de julio a noviembre y su colecta se rige de manera general por la NOM-007-RECANAT-1997, la cual establece los procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y comercialización de ramas, hojas o pencas, flores, frutos y semillas (SEMARNAT, 1997).

Cuphea aequipetala (Figura 13), es una planta perenne, de 30 a 80 cm. de altura, de tallo postrado y cubierto con pelillos violetas o rojizos. Las hojas son opuestas, con la base

más ancha. Sus flores tienen forma de trompeta y nacen en la unión de la hoja y el tallo (Argueta et al, 1994).

Las primeras referencias sobre la planta se encuentran en documentos del siglo XVI escritos por Fray Bernardino de Sahagún (Códice Florentino escrito entre 1557-1577) y el Dr. Francisco Hernández (1571-1577). Fray Bernardino de Sahagún describe el empleo de las raíces (tozancuitlacxolli) para tratar las cámaras de sangre (Baytelman, 1993). El Dr. Francisco Hernández (Hernández, 1959) clasifica la raíz como fría, astringente y un poco amarga. Indica que "la raíz de tozancuitlacxolli cura las úlceras pútridas y cancerosas y las que provienen del mal gálico y engorda a los que están consumidos y suelen también administrarlas los médicos indios a las parturientas para fortalecerlas; tomada en dosis de una onza contiene el flujo del vientre y las desinterías".

En la actualidad se continúa empleando como planta medicinal (Baytelman, 1993; Argueta et al, 1994; SEMARNAT, 1997) de acuerdo a los siguientes usos:

1) La infusión de la parte aérea se emplea en afecciones hepáticas y contra tumores cancerosos.
2) La planta hervida con sal y/o en cataplasma se emplea para curar heridas y tumores.
3) Se emplea el cocimiento de la planta contra los golpes, para embarazarse, para lavar heridas, granos, golpes e inflamaciones. También se emplea contra afecciones urinarias, estomacales, ardores, diarrea, disentería, afecciones de los ojos, para purificar la sangre y como somnífero. Además en casos de paperas, dolor de cintura, caída de pelo y como tónico vulnerario.

SERVICIOS DE INFORMACIO
ARCHIVO HISTORICO

Figura 13. ***Cuphea aequipetala*** **Cav.**

1.8.2. Aspectos químicos

Con respecto a la composición química, Maximino Martínez reporta en su libro *Las plantas Medicinales de México*: que "la planta contiene grasa sólida, concha, aceite esencial, ácido tónico 5.35%, clorofila y material colorante amarillo, un glucósido, resina ácida y glucosa, principios pépticos 8.85 %, dextrina y sus análogos 9.46 %, almidón, sales minerales, celulosa y leñosa" (Baytelman, 1993).

1.8.3. Aspectos farmacológicos.

Los estudios relacionados con actividad biológica (Villarreal et al, 1992) muestran que los extractos procedentes de las hojas de *Cuphea aequipetala* tienen CE_{50} >20 μg/ml. En estos estudios se evaluó la actividad citotóxica de los extractos obtenidos con hexano, cloroformo y etanol. Dichos extractos se ensayaron sobre cultivos de las siguientes

células cancerosas: P388 (leucemia murina), KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y KB-VI (células de carcinoma nasofaríngeo resistentes a vincristina). De acuerdo a los lineamientos del Instituto Nacional del Cáncer de los EEUU (Suffness & Pezuto, 1991), estos extractos fueron inactivos en las líneas celulares evaluadas.

Los extractos también fueron evaluados con la prueba de astrocitoma de células humanas. En este tipo de pruebas se emplea el dibutiril adenosin mono fosfato cíclico para convertir la morfología de las células gliomas de fibroepiteliales a neurogliales o forma de astrocito. Esta conversión se revierte en la presencia de inhibidores de la mitosis.

Los extractos, previamente mencionados, no mostraron respuestas positivas al ensayo de inhibición de astrocitos (Villarreal et al, 1992), lo que indica que estos extractos no actuaron sobre la mitosis (Suffness & Douros, 1982).

En estudios realizados con el extracto metanol:H_2O (7:3) de las partes aéreas de *C. aequipetala* se encontró actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* IID 1677 (MRSA). Sin embargo, este extracto no inhibió a la verotoxina producida por *Escherichia coli* O157:H7 (Sakagami et al, 2001).

2. JUSTIFICACIÓN

En México, al igual que en los países industrializados, se ha incrementado la incidencia del cáncer (Parkin et al, 2001; Mohar et al, 1997). Esto se debe a factores genéticos, ambientales y modificación en el estilo de vida de la población (Ponder, 2001; Peto 2001).

A pesar de que es grande la cantidad y diversidad de fármacos empleados en la quimioterapia del cáncer, la mortalidad causada por esta enfermedad continúa creciendo, debido en parte a que las células cancerosas no se encuentran en la misma fase del ciclo celular por lo que la radioterapia o quimioterapia no afectan a toda la población de dichas células (Tannock & Hill, 1998). Otro de los problemas se relaciona con la inestabilidad genética de las células cancerosas (Gibbs, 2000), lo que ocasiona que se formen nuevas clonas de células resistentes al o los fármacos empleados. Por lo anterior, la búsqueda de nuevos fármacos en contra del cáncer debe continuarse.

Algunos fármacos anticancerosos han sido obtenidos de plantas (Lee, 2004), de tal manera que es razonable suponer que se pueden aislar más substancias con propiedades terapéuticas anticancerosas de especies vegetales, sobre todo de aquellas usadas empíricamente por la población para el tratamiento de enfermedades con sintomatología cancerosa.

La existencia mundial de aproximadamente 250,000 especies vegetales, de las cuales 150,000 están en los trópicos, plantea la necesidad de contar con estrategias para elegir las especies potencialmente activas (Prance, 1977). Una de las estrategias empleadas se basa en elegir plantas que de manera tradicional se emplean en la medicina herbolaria (Cordell et al, 1994).

México es un país con una gran biodiversidad y con tradición en el empleo de la medicina herbolaria (Baytelman, 1992; Argueta et al, 1994), lo que lo convierte en una gran fuente potencial de compuestos de origen vegetal para el tratamiento del cáncer.

El interés de nuestro estudio se centra en *Cuphea aequipetala*, planta empleada desde la época prehispánica para el tratamiento de tumores cancerosos (Hernández, 1959).

Dentro de los métodos empleados para evaluar a compuestos con uso potencial en la clínica se encuentran los estudios *in vivo* e *in vitro*. Una ventaja importante que ofrecen los estudios *in vitro* es el empleo de concentraciones pequeñas de producto en estudio, así como la obtención de resultados en tiempos más cortos (Suffness & Pezzuto, 1991; Frei III, 1982).

La investigación de la actividad citotóxica de los extractos orgánicos de *C. aequipetala* así como la purificación de los posibles compuestos responsables de dicha actividad permite la validación científica de esta especie vegetal utilizada en la medicina tradicional mexicana.

3. HIPÓTESIS

Los extractos de *Cuphea aequipetala* poseen actividad citotóxica, la cual puede ser detectada *in vitro* mediante la inhibición del crecimiento de líneas de células cancerosas.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar mediante ensayos *in vitro* el efecto de los extractos y fracciones obtenidos de *C. aequipetala* sobre la proliferación de líneas celulares provenientes de cánceres humanos.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

4.2.1. Evaluar la actividad citotóxica de la infusión acuosa y los extractos en diversas líneas celulares cancerosas.

4.2.2. Fraccionar el extracto poseedor de la mayor actividad citotóxica

4.2.1. Determinar el tipo de metabolitos secundarios presentes en el extracto o fracciones con actividad citotóxica.

4.2.3. Iniciar estudios dirigidos a la purificación, aislamiento e identificación de la o las substancias responsable de la actividad citotóxica.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Adquisición de *Cuphea aequipetala*

Se adquirió la planta fresca, durante las primeras dos semanas del mes de mayo de 2000, en el Mercado de Sonora de la Ciudad de México. Se depositaron 3 ejemplares en el Herbario de la Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa siendo clasificada, por el Dr. Adolfo Serna Espejo como *Cuphea aequipetala* y se asigno el número de voucher UAMIZ56709.

5.2. Obtención de extractos y fracciones

5.2.1 Obtención de extractos

El resto de la planta se limpió de impurezas (otras plantas, tierra, etc.) y se secó a temperatura ambiente protegida de la luz y polvo. Se molió la planta completa y se colocaron en un matraz 500 g y 2.5 L de hexano. El matraz se tapó y cubrió con papel aluminio y se dejó macerar durante 48 horas a la temperatura del laboratorio. Después de este tiempo, se obtuvo el sobrenadante, se filtró a fin de que el extracto no tuviera restos de la planta y se eliminó el disolvente por destilación, empleando para ello el rotavapor. El extracto concentrado se colocó en un recipiente de vidrio previamente tarado y se calculó el rendimiento.

La planta contenida en el matraz se trató con acetato de etilo (segundo disolvente), metanol (tercer disolvente). Ambos extractos se obtuvieron de la manera descrita para el extracto hexánico.

Posteriormente se adicionó agua (2.5 L) al resto de la planta y se dejó macerar durante 48 horas a la temperatura del laboratorio y se obtuvieron aproximadamente 500 ml de un líquido de color amarillo, denso y difícil de filtrar por lo que se decidió poner nuevamente la planta en contacto con agua. Se observó que el agua extraía una sustancia de tipo mucilaginoso, lo que hacía difícil el filtrado y además restos de la sustancia quedaban en el papel filtro. Se lavaron los papeles filtro, utilizados para este fin, con acetona y se obtuvo una disolución amarilla a la cual se le evaporó el disolvente (extracto VII) por destilación.

La planta triturada dentro del matraz tomó la forma de pelota, probablemente unida a la sustancia mucilaginosa y se decidió extraer la mezcla de estas substancias con acetona, filtrar y evaporar los disolventes. Se detuvo la destilación en el rotavapor cuando la acetona dejó de hacerlo y el extracto se dejó en matraces abiertos, durante 24 horas, a fin de eliminar residuos de acetona. Después se guardó este extracto (VIII) en un frasco ámbar en el refrigerador hasta su liofilización. En el fondo de los matraces se formó un sedimento amarillo, el que se recuperó con lavados con agua caliente (extracto IX).

5.2.2. Obtención de las diferentes fracciones de la porción mucilaginosa

La sustancia mucilaginosa adherida a la planta se extrajo con 2.5 L de acetona y se dejó macerar durante 24 horas a la temperatura del laboratorio. Se filtró el sobrenadante y se destiló el disolvente a presión reducida. Este tratamiento se detuvo cuando la acetona dejó de destilar y el extracto se dejó en matraces abiertos, durante 24 horas, a fin de eliminar residuos de acetona. Después se guardó este extracto en un frasco ámbar en el refrigerador hasta su liofilización. En el mes de diciembre se liofilizó sólo una parte (100

ml) y el residuo obtenido fue difícil de sacar del matraz de liofilización, por lo que se le agregó primero metanol (extracto VIII-1), luego acetona (extracto VIII-2) y finalmente diclorometano (extracto VIII-3). Después de agregarse el diclorometano se separó en el matraz un polvo **(VIII-4)** y el resto se disolvió en agua. La porción acuosa se puso en contacto con disolventes orgánicos y se obtuvieron las fracciones extraídas con diclorometano (VII-51), acetato de etilo (VIII-52) y n-butanol (VIII-53). Después de este procedimiento también quedó una fase acuosa (VIII-56).

Una parte del extracto completo (VIII) no se terminó de liofilizar y se guardó el matraz con el extracto a 4°C, durante 40 días y después se procedió a terminar la liofilización. La parte que se obtuvo al raspar el matraz se marcó como **VIII** y el resto se trató como en al caso anterior agregando los disolventes en el siguiente orden: acetona, diclorometano y agua. Al conjunto de compuestos presentes en la fase acuosa se designó como **VIII-H_2O**. En el resto del material (guardado en el frasco ámbar), se observó que a la temperatura del refrigerador se formó una gran cantidad de un precipitado, el cual se separó por filtración **(VIII°)**. Como el material carecía de los compuestos de la fracción VIII° se marcó como **VIII- VIII°** a la cual se concentró por liofilización y el material resultante se le agregó etanol-H_2O (8:2) y una parte se llevó a sequedad empleando un flujo de argón y la otra se dejó en una caja Petri abierta y a la temperatura del laboratorio y al día siguiente se observó que la mezcla etanol-agua se evaporó totalmente por lo que se decidió utilizar esta forma de eliminar disolventes y obtener la mezcla de componentes **VIII- VIII°**. La fracción a la cual se le eliminó el disolvente utilizando un flujo de argón se marcó como **VIIIe-a**.

5.2.3. Obtención de la infusión acuosa (té)

Se preparó una infusión acuosa (té) adicionando 500 ml de agua caliente a 100 g de la planta triturada. Se tapó y se dejó macerar a la temperatura del laboratorio durante 10 minutos. Este procedimiento se repitió 2 veces. La infusión acuosa se obtuvo filtrando el sobrenadante a través de gasa, algodón y papel filtro y de esta manera se eliminaron restos de la planta, así como un sedimento mucilaginoso formado durante la infusión acuosa. La infusión acuosa se concentró por liofilización, se determinó el rendimiento y el efecto sobre las líneas de células cancerosas PC-3 y U-251.

5.2.4. Obtención y fraccionamiento del extracto acetona-agua

Dado que las fracciones obtenidas al extraer la fracción mucilaginosa con acetona mostraron mayor índice de citotoxicidad, se decidió obtener un extracto acetona-agua (7:3) con 100 gramos de la planta seca y completa usando 1000 ml de la mezcla de disolventes en tres ocasiones consecutivas. Se obtuvo el filtrado y se evaporó la acetona en el rotavapor. El licor madre que no se evaporó se filtró y se extrajo en diclorometano. Se evaporó el disolvente de la fase orgánica en tanto que la fase acuosa se guardó en un frasco ámbar en el refrigerador, mientras se continuaba con el proceso de liofilización, tiempo durante el cual se formó un precipitado que se disolvió con metanol caliente y se marcó como **P2.** Se concentró el extracto acuoso (**AC**), sin eliminar por completo el agua, y en la temperatura del refrigerador se formó nuevamente un precipitado, por lo que se filtró la solución y el precipitado (adherido a la pared del frasco) se extrajo con metanol caliente y se marcó como **S1**. En este extracto, a la temperatura del refrigerador, se formó después de S1, un nuevo precipitado que se marcó como **P3.**

Después de separar **P3**, se fraccionó **AC** en una columna empacada con celulosa. El orden de los eluyentes fue: agua, agua-metanol en proporciones crecientes de este último

disolvente. Se obtuvieron 27 fracciones de 100 ml cada una. La mezcla de disolventes se eliminó por calentamiento en baño María. Sólo se probó la actividad citotóxica de algunas de estas fracciones.

Como la fase orgánica (porción extraída con diclorometano) presentó actividad citotóxica sobre las líneas celulares U-251 y PC-3, y la cantidad de la que se disponía era poca para continuar con su fraccionamiento, se decidió trabajar una cantidad mayor de la planta.

5.2.5. Obtención y fraccionamiento de un nuevo extracto acetona-agua (3007 gramos de planta)

El 29 de mayo de 2002, se pesaron 3007 gramos del mismo lote de la planta seca y triturada de la que se elaboraron los extractos anteriores. La planta se colocó en tres matraces y se maceró con acetona:agua (7:3) de manera tal que la mezcla de disolventes cubriera en su totalidad a la planta, en tres ocasiones diferentes. El contacto entre la planta y la mezcla de disolventes fue de más de 48 horas, por el gran volumen (aproximadamente 30 litros en cada una de las extracciones) que había que destilar. El sobrenadante del extracto acetona:agua se filtró antes de eliminar la acetona en un rotavapor.

Una alícuota de este material se secó en la campana de extracción y se marcó como **CG.** El resto del material se concentró parcialmente (1/3 del volumen original) en la campana de extracción y se formó un precipitado, **PB1**. El sobrenadante se guardó en el refrigerador y se formaron de manera subsecuente los precipitados **PB2 (PB2a, PB2b)** y **PB3 (PB3a, PB3b)**. El sobrenadante se extrajo con **diclorometano** y **acetato de etilo**.

Se concentró una alícuota del material extraído con acetato de etilo (**CAcOEt**). Del resto del material extraído con acetato de etilo se han obtenido fracciones que se marcaron con un número que corresponde a la secuencia del fraccionamiento.

La porción acuosa se llevó a sequedad, en la campana de extracción, y se formó alrededor del contenedor un polvo dorado, **PB4**, y un residuo de apariencia chiclosa difícil de obtener por lo que se adicionó metanol, obteniéndose dos porciones. La porción que no fue soluble en metanol se secó, empleando la campana de extracción, quedando un sólido que se marcó como **PB5**.

Una alícuota de la porción soluble en metanol se calentó en el baño María durante 30 minutos, se enfrió y se conservó a 4°C durante 21 días, tiempo en el cual se formó un sólido de color amarillo-paja que se marcó como **SM1**. El líquido residual se filtró y dejó en el papel filtro cristales blancos, marcado como **SM2**. Se calentó (en baño Maria) nuevamente el líquido filtrado y se formó un precipitado de tipo coloidal. El precipitado se dejó madurar en presencia del sobrenadante a 4°C durante 7 días y posteriormente se separó por decantación. Este precipitado se obtuvo en forma de esferas blancas y se marcó como **SM3**.

La segunda alícuota de la porción soluble en metanol, se colocó en un vaso de precipitado y se concentró hasta la mitad del volumen en baño maría. Se dejó a la temperatura del laboratorio y después de 5 días se separó el precipitado. Dado que el punto fusión de este compuesto fue de 165°C se marcó el compuesto como **165**.

La tercera alícuota de la porción soluble en metanol también se concentró hasta la mitad del volumen, empleando el baño maría. Se dejó a la temperatura del laboratorio y a los 14 días se observó la formación de cristales de color ámbar. Cuando se realizó la

determinación del punto de fusión se observó que estos cristales eran hexagonales. El punto de fusión de este compuesto fue de 172 °C, por lo que se marcó como **172**.

5.3. Determinación de la actividad citotóxica

5.3.1. Líneas celulares

Las líneas celulares se obtuvieron del Instituto Nacional del Cáncer de EEUU en ampolletas congeladas conteniendo cada una $1x10^6$ células. Las líneas stock se descongelaron y crecieron en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10.0%, 2.0 mM de glutamina y 0.10% de antibióticos. Una vez que se estableció el crecimiento celular se emplearon dichas células para probar la actividad citotóxica de los extractos y compuestos.

5.3.2. Mantenimiento de la línea celular.

Las células se mantuvieron en botellas de cultivo de tejidos. Cada línea celular se sembró de manera tal que se tuviera del 70 al 90 % de células confluentes y continuar de manera rutinaria para probar las fracciones de interés en el cultivo celular.

5.3.3. Preparación e inoculación de las células

Las células adherentes se despegaron de las botellas de cultivo con 2 a 3 ml de una disolución 0.05% de tripsina–EDTA 0.53 mM. Después se inactivó la tripsina-EDTA con 10.0 ml de medio RPMI-1640 suplementado con 10.0 % de suero fetal bovino, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. El botón celular se resuspendió y determinó la viabilidad celular con el colorante de exclusión azul tripano. Las células se contaron en

un hemocitómetro (viabilidad > 97%) y se hicieron las diluciones para obtener la densidad celular adecuada. Las densidades celulares que se utilizaron en los experimentos estuvieron en función del crecimiento de la línea celular, dato que se indica en la Tabla 11.

Tabla 11. Densidades celulares empleadas en las diversas líneas celulares.

Línea	U-251	PC-3	K-562	HCT-15	MCF-7	HeLa	HEp-2	DU-145
Células/pozo	7500	7500	7500	9500	5000	5000	9500	10,000

Las células se inocularon en un volumen de 100 µl/pozo en 6 de los 8 carriles de la placa. En los dos carriles restantes se adicionaron 100 µl/pozo del medio de cultivo suplementado (basal). Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C, para permitir que las células se estabilizaran antes de la adición de los extractos (Likhitwitayawuid et al, 1993).

5.3.4. Solubilización y dilución de las muestras

Las muestras se solubilizaron en DMSO al 100.0 % para obtener una dilución stock de 20.0 mg/ml. Los extractos no se filtraron o esterilizaron ya que la contaminación bacteriana se controló con el empleo de medio de cultivo suplementado con antibióticos y antimicóticos (penicilina, estreptomicina, anfotericina B). Se realizaron diluciones sucesivas de manera tal que la concentración de las fracciones en el pozo fuera de 100, 10 y 1 µg/ml. En el caso de la fracción más pura y control positivo (colchicina) se partió de

una disolución stock de 4.0 mg/ml DMSO y las concentraciones de éstos en los pozos fueron de 20, 2.0 y 0.2 μg/ml. La concentración de DMSO/pozo en todas las fracciones y controles positivos fue de 0.5 %. Estas pruebas se realizaron por duplicado en dos experimentos independientes.

5.3.5. Placa al tiempo cero

Esta placa se utilizó como control para saber si las células se replicaron y se preparó con la misma densidad celular/pozo, y en lugar de extracto se adicionó medio. Después de 24 horas de incubación, en las condiciones anteriormente descritas, se fijaron mediante la adición de 50 μl de la disolución fría de ácido tricloroacético al 50.0% (10%/pozo) y se procesó de la misma manera que las placas que contenían los extractos de prueba. En el caso de las células K562 (leucemia eritroide humana) se fijaron con 50 μl de acido triclorocético frío al 80 % (16%/pozo) (Monks et al, 1991).

5.3.6. Incubación de los extractos de prueba

Después de 24 horas de incubación, en las condiciones descritas, se adicionaron los extractos, fracciones o compuestos y nuevamente se incubó la placa a 37°C durante 48 horas en una atmósfera de 5% de CO_2 y 100% de humedad relativa. Se evaluó el crecimiento celular de la placa por el método de sulforodamina B (Monks et al, 1991), colorante que se pega a las proteínas de las células.

5.3.7. Método de la sulforodamina B (SRD B)

Las células adheridas se fijaron *in situ* adicionando 50 μl/pozo de ácido tricloroacético frío al 50% (v/v) e incubando durante 1 hora a 4°C (la concentración final del ácido

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

tricloroacético fue de 10%/pozo). Se descargó el sobrenadante y se lavaron las placas 5 veces con agua de la llave y después se secaron a la temperatura del laboratorio. Las placas se tiñeron adicionando 50 µl/pozo de la disolución de SRD-B (0.4% masa/v en ácido acético al 1.0 % v/v) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se retiró la SRD-B que no se unió lavando 5 veces con ácido acético al 1.0 % v/v. Después se secaron las placas a la temperatura del laboratorio. La SRD-B unida a las proteínas celulares se solubilizó con 200 µl/pozo de una disolución de TRIS [tris (hidoximetil) aminometano] 10.0 mM, pH = 10.0. Las placas se colocaron sobre un agitador durante 5 minutos y posteriormente se determinó la Absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro automatizado para leer placas.

5.4. Análisis estadístico de datos biológicos

Los valores de absorbancia (^{492}A) de cada una de los pozos se procesaron para obtener la sobrevivencia celular, empleando la siguiente formula:

% Sobrevivencia celular = (A''_{real} / A''_{real} del control) x 100

Donde A'' real = $A'_{real} - A_{tiempo\ cero}$

$A_{tiempo\ cero}$ = valor medio de la A de las células en la placa T =0 menos el valor medio de la A de los pozos que sólo tienen medio.

A''_{real} del control = valor medio de la A de las células con los extractos de prueba menos la A del medio – la A al tiempo cero, To.

A'_{real} del control = Valor medio de la A debida al DMSO – la A debida al medio menos el valor medio de la A al tiempo cero, To.

En algunos casos se expresa el % Inhibición del crecimiento el cual se obtiene al restarle a 100 el valor de la sobrevivencia celular.

Los valores se expresan como la concentración a la que sobrevive el 50% de la población celular (CE_{50}). Para obtener dicho valor se realizó una gráfica (Figura 14) colocando en el eje de las "Y" el % de sobrevivencia y en el eje de las "X" el $\log_{10}$ de la concentración. Se obtuvo la ecuación de la recta, misma que se empleó para calcular la concentración a la cual sobrevive el 50 % de la población.

La actividad citotóxica también se expresa como la concentración que se inhibe en un 100% el crecimiento de la población celular (CE_{100}), así como la concentración que mata en un 50 % a la población celular (CL_{50}). CE_{100} se obtiene cuando el % de sobrevivencia es cero. CL_{50} se calcula empleando un porcentaje de sobrevivencia de -50 (Monks et al, 1991). En el Apéndice 2 se muestran las gráficas correspondientes a los diversos extractos y fracciones evaluadas sobre los cultivo de las células cancerosas HEp-2, HCT-15 y DU-145.

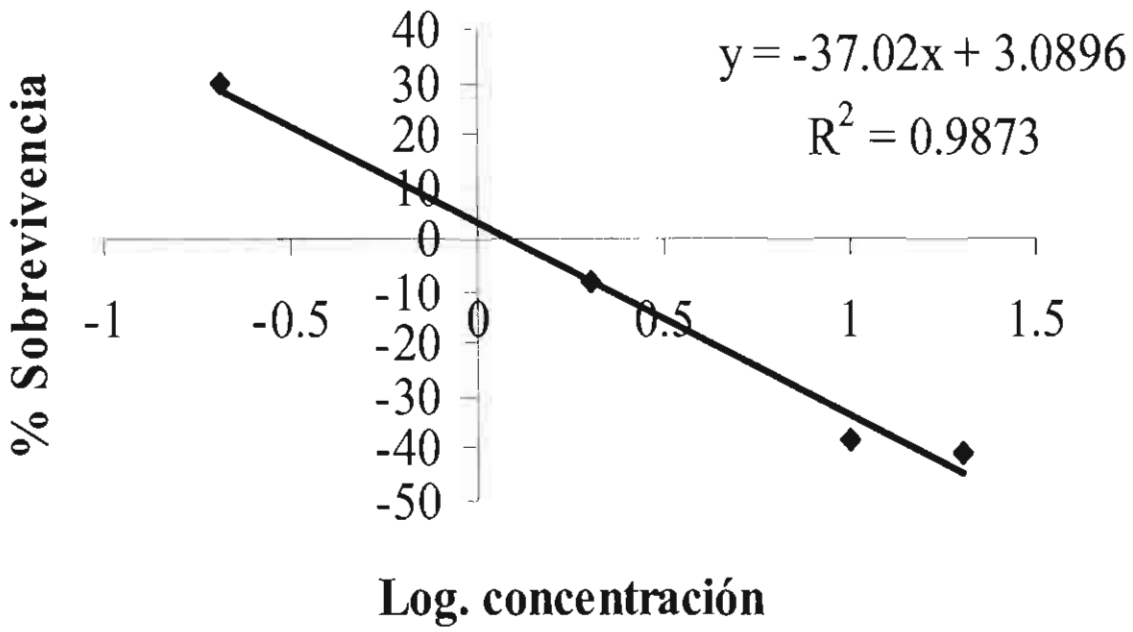


Figura 14. Efecto de la colchicina (control positivo) sobre el cultivo celular DU-145.

5.5. Pruebas químicas

5.5.1 Determinación de compuestos de tipo fenólicos y taninos

Una porción del extracto o fracción a investigar se disolvió en 10.0 ml de NaCl al 0.9 % p/v. La solución filtrada se colocó en dos tubos de ensaye. En el tubo 1 se adicionó 0.3 ml de $FeCl_3$ 1%-HCl 1.0 M. El desarrollo de colores azul o verde indica la presencia de compuestos de tipo fenólico.

En el tubo 2 se adicionó un volumen igual de una solución gelatina 1%-NaCl 0.9%.

La reacción con $FeCl_3$ se utiliza para identificar compuestos de tipo fenólico mientras que la reacción de gelatina identifica taninos (Risk, 1982).

5.6. Pruebas físicas

5.6.1 Determinación del punto de fusión

En algunas fracciones se determinó el punto de fusión, en un aparato Fisher y los datos que se muestran no están corregidos para presión atmosférica de la Ciudad de México.

5.6.2 Análisis espectroscópicos

Dentro de los estudios no destructivos que se emplean en la actualidad están la espectrofotometría infrarroja, la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas. En algunas las fracciones y compuestos se realizaron los estudios correspondientes a fin de obtener los espectros de infrarrojo (Apéndice 3), los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) ^{1}H-RMN (Apéndice 3B), ^{13}C-RMN a 300 MHZ (Apéndice 3C). En el compuesto 165 también se obtuvo el espectro de masas (Apéndice 1F). Los espectros se interpretaron con la ayuda de tablas y trabajos descritos en la literatura (Silverstein et al, 1981; Pouchert & Behnke, 1993).

5.7. Cromatografía en placa fina

Los primeros fraccionamientos se realizaron en cromatografía de placa fina (CCF) utilizando como fase estacionaria sílica gel y fase móvil una mezcla de acetato de etilo-metanol-agua (4:2:1) y se reveló con $FeCl_3$, dando positiva la reacción. La separación no fue satisfactoria por lo que se empleó cromatografía de fase reversa, empleando como fase móvil etanol-agua (8:2). Se emplearon reveladores como $Ce(SO_4)_2/H_2SO_4$, vainillina/HCl, $FeCl_3$/HCl, y $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ dando, en todos los casos, positivas las reacciones. En este sistema tampoco fue satisfactoria la separación por lo que se empleó

un sistema bidimensional empleando como fase estacionaria sílica gel y como primer sistema ácido acético-cloroformo (1:9) y segundo sistema acetato de etilo-tolueno (9:1) y el revelador fue $FeCl_3$/HCl. La cromatografía que correspondió a S1 mostró 2 manchas bien definidas.

Posteriormente se fraccionó S1 en placas de celulosa, de manera bidimensional empleando como primer sistema de disolventes ácido acético al 6% y como segunda fase móvil la fase superior de la mezcla de n-butanol-ácido acético-agua (4:2:1). Los reveladores empleados fueron $FeCl_3$/HCl, vainillina/HCl y reactivo de Folin (Waterman & Mole, 1994). Se ensayaron diferentes proporciones de los disolventes hasta lograr separar satisfactoriamente los compuestos. En este caso se observaron 3 manchas bien definidas. Como la celulosa resultó ser la fase estacionaria adecuada se fraccionó la porción acuosa del extracto acetona-agua (7:3) empleando como fases móviles agua, metanol, acetato de etilo y diclorometano. Estos disolventes se emplearon en proporciones tales que descienda lentamente el índice elutrópico de dichos constituyentes. A las fracciones colectadas se les realizó una cromatografía en placa fina, empleando como fase estacionaria celulosa y como fase móvil n-butanol: ácido acético: agua y revelando con $FeCl_3$/HCl y sulfato ferroso amoniacal.

Ya que el fraccionamiento fue satisfactorio se continuó fraccionando el extracto acuoso concentrado, por cromatografía en columna de celulosa. A las fracciones se les realizó una CCF a fin de verificar la pureza y así reunir las que sean similares y realizar con ellas las pruebas de citotoxicidad correspondiente.

La CCF que es usó para detectar azúcares empleó placas de sílica gel modificadas con bisulfito de sodio y la fase móvil fue una mezcla 2-propanol-agua (8.5:1.5). Se reveló la placa con fenol (Adachi, 1965).

La CCF que se usó para detectar la presencia de flavonoides empleó placas de sílica gel con fluorescina ($60F_{254}$) y la fase móvil fue una mezcla de AcOEt: ác. fórmico: ác. acético: agua (100:11:11:27). Se detectaron los compuestos al observar la placa bajo luz ultravioleta (254 nm) y con la placa teñida con el compuesto Fast Blue Salt (cloruro de 3,3'-dimetoxi-bifenil-4-4'-bis diazonio) (Wagner et al, 1984).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS

El rendimiento de los extractos (Tabla 12) y té de *C. aequipetala* se muestran a continuación.

Tabla 12. Rendimiento de los extractos y té de *Cuphea aequipetala.*

Extracto	% de rendimiento
Hexano	0.9284
Acetato de etilo	0.754
Metanol	6.83
Agua	5.06
Té	5.5

6.2. ACTIVIDAD CITOTÓXICA

6.2.1. Actividad citotóxica de los extractos y té sobre las líneas PC3 y U251

La citotoxicidad (Figura 15) se evaluó sobre las líneas cancerosas PC-3 (carcinoma de próstata humano) y U251 (glioma humano) y se probó en una concentración única de 100 µg/ml. Los datos obtenidos se muestran como % de inhibición del crecimiento (100-% de sobrevivencia).

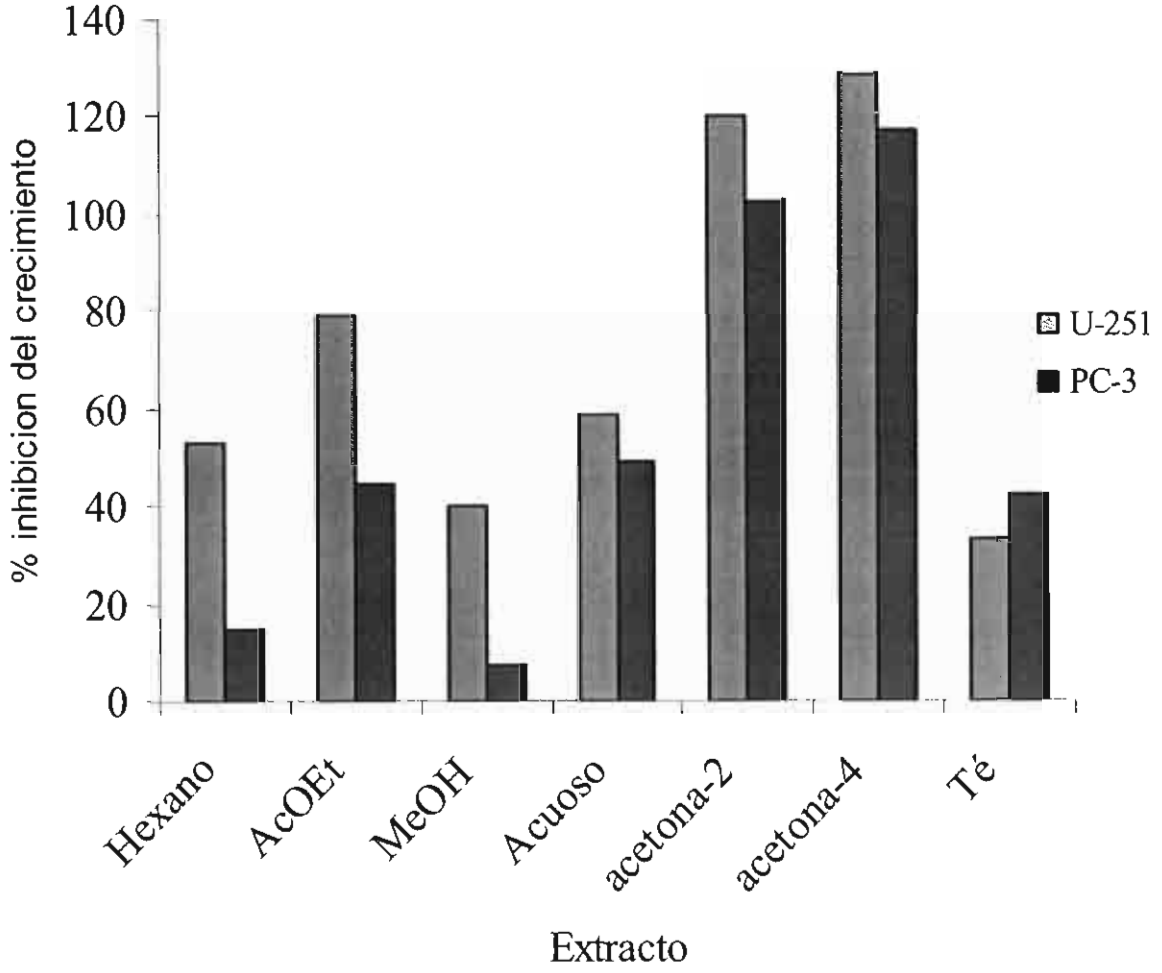


Figura 15. Inhibición del crecimiento de las diferentes preparaciones de *C. aequipetala* en una dosis única de 100 µg/ml.

Estos datos muestran que con excepción del té, todos los extractos presentaron mayor efecto sobre la línea cancerosa U-251. La concentración probada fue de 100 µg/ml, así que se puede inferir que los extractos obtenidos con hexano, metanol, agua y la infusión acuosa (té) necesitarán de una concentración >20µg/ml para inhibir el crecimiento celular en un 50 % (CE_{50}), por lo que se considera que dichos extractos y el té son inactivos sobre las dos líneas celulares probadas. Las fracciones provenientes de la

porción mucilaginosa extraída con acetona, Acetona-2 y Acetona-4, inhibieron el crecimiento de ambas líneas cancerosas en más de un 100%. Esto significa, que a la concentración probada, ambas fracciones ocasionan muerte celular en los cultivos de células U-251 y PC-3.

6.2.2. Actividad citotóxica de lo extractos y fracciones de la porción mucilaginosa sobre las líneas celulares HCT-15 y HEp-2

La actividad citotóxica de los extractos orgánicos, porción mucilaginosa extraída con acetona y sus fracciones se muestra en la Tabla 13. Dicha tabla contiene las concentraciones a las cuales se inhibe en un 50% el crecimiento celular (CE_{50}) de las líneas celulares HEp-2 (carcinoma humano de laringe) y HCT-15 (carcinoma de colon humano).

Tabla 13. Concentración en la cual los extractos y fracciones inhiben el 50% del crecimiento (CE_{50} en µg/ml) de los cultivos HCT-15 y HEp-2.

Extracto fracción	CE_{50} (µg/ml)	
	HCT-15	HEp-2
Hexano	No hay inhibición	No hay inhibición
Acetato de etilo	22.33	>100
Metanol	No hay inhibición	No hay inhibición
Acuoso	35.89	>100
VIII	18.64	>100
VIII°	16.33	>100
VIII-4	4.70	>100
Colchicina	0.074	0.040

De acuerdo a la nomenclatura empleada en la obtención de los extractos y fracciones:
VIII= Porción mucilaginosa extraída con acetona.
VIII°= Fracción precipitada, en frío, de VIII. VIII-4 = Fracción obtenida de VIII.

Estos datos muestran que los extractos obtenidos con hexano y metanol no inhibieron el crecimiento de los cultivos HEp-2 y HCT-15.

Con respecto a los extractos obtenidos con acetato de etilo, agua, porción mucilaginosa y sus fracciones afectaron más el crecimiento de las células transformadas, HCT-15.

De acuerdo a los lineamientos del Instituto Nacional del Cáncer de EEUU (Sufneess & Pezzuto, 1991), los extractos y fracciones probados no fueron activos sobre la línea HEp-2. La actividad mostrada por los extractos de acetato de etilo y acuoso sobre la línea HCT-15 de acetato de etilo están fuera de los intervalos que para el caso de extractos o compuestos no puros, considera el Instituto Nacional del Cáncer de EEUU (NCI) como activos. De acuerdo con dichos lineamientos, la porción mucilaginosa extraída con acetona (VIII), así como sus fracciones contienen compuesto(s) citotóxico(s) sobre la linea HCT-15 ya que la concentración en la que inhiben el 50% del crecimiento celular tienen valores de $CE_{50} < 20$ μg/ml.

Los datos de ésta Tabla permiten concluir que la actividad es específica ya que las fracciones y extractos probados mostraron actividad citotóxica diferente en las dos líneas de células cancerosas probadas.

La actividad citotóxica de la porción mucilaginosa extraída con acetona (VIII) y sus fracciones se muestran en los diferentes parámetros empleados para expresar la actividad citotóxica, (Tabla 14) sobre la línea HCT-15.

Tabla 14. Actividad citotóxica de la porción extraída con acetona (VIII) y algunas de sus fracciones (CE_{50} µg/ml) sobre la línea HCT-15.

Fracción	CE_{50} (µg/ml)	CE_{100} (µg/ml)	CL_{50} (µg/ml)
Completa (VIII)	18.70	$>1.0 \times 10^4$	$>1.0 \times 10^4$
VIII°	16.82	264.4	$>1.0 \times 10^4$
VIII-4	4.70	1733	$>1.0 \times 10^4$
Colchicina	0.074	974.7	$>1.0 \times 10^4$

La fracción VIII-4 es la que en una concentración menor inhibe el 50% del crecimiento celular, en tanto que la fracción VIII° es la que en concentraciones menores inhibe el 100 % del crecimiento (CE_{100}) y mata en un 50% a la población celular.

6.2.3 Actividad citotóxica de diversas fracciones del extracto acetona:agua de *C. aequipetala* sobre diversas líneas cancerosas

La citotoxicidad (Tabla 15) de las fases orgánica y acuosa del extracto acetona-agua (7:3) se probó sobre las líneas U-251 (cáncer de células gliadas humanas) y PC-3 (carcinoma prostático humano) en una concentración única de 100 µg/ml. Los resultados se muestran en % de inhibición.

Tabla 15. Porcentaje de inhibición del crecimiento de las fases orgánica y acuosa de *C. aequipetala*.

Fase	% Inhibición del crecimiento, U-251	% Inhibición del crecimiento, PC-3
Acuosa	82.55	91.55
Orgánica	162.99	134.2

Con estos datos se corrobora que el extracto acetona-agua es el que presenta la actividad citotóxica. A la concentración probada, la fracción orgánica ocasionó muerte celular y afectó más a la línea celular U-251. La fase acuosa también afectó el crecimiento de ambas líneas celulares pero no ocasionó muerte celular. Estos datos también muestran que los compuestos presentes en ambas fases afectan los cultivos de las dos líneas de células transformadas.

La actividad citotóxica (tabla 16) de la mezcla de compuestos provenientes de la fase acuosa del extracto acetona-agua (7:3), designado en el texto como **S1**, **P2**, **P3**, así como las fracciones procedentes de la cromatografía en columna que tuvieron una reacción positiva para los compuestos polifenólicos, se probaron en una concentración única de 100 µg/ml sobre las líneas neoplásicas K-562, U-251, HCT-15, HeLa, MCF-7 y PC-3.

Tabla 16. Porcentaje de inhibición del crecimiento de diversas fracciones presentes en la fase acuosa del extracto acetona:agua de *Cuphea aequipetala*, en una concentración de 100 µg/ml.

FRACCIÓN	LINEA CELULAR CANCEROSA (% DE INHIBICIÓN)					
	U-251	PC-3	K-562	HCT-15	MCF-7	HeLa
S1	47.29	27.34	**83.37**	46.81	29.65	41.12
P2	N.D.	N.D.	N.D.	54.43	**80.49**	N.D
"A"	N.D	N.D.	N.D.	39.58	**86.74**	N.D
AC1	**121.6**	66.64	**76.05**	**124.7**	63.5	N.D.
P3	**74.24**	32.1	N.D	**N.D.**	N.D	N.D.
ACC1	15.38	N. H.	N.H.	**128.3**	**116.8**	N.D
ACC3	20.80	N.H	11.64	40.10	61.89	N.D.

U-251, cáncer del sistema nervioso central; PC-3, carcinoma prostático; K-562, leucemia eritroide; HCT-15, carcinoma de colon; MCF-7, carcinoma de mama; HeLa, carcinoma cérvical.
N.D: No disponible. N.H: No hay inhibición

Como se puede observar, la mezcla de compuestos presentes en S1 y P3 mostró actividad importante sobre la línea K562 en tanto que P2 lo hace sobre MCF-7. Con respecto a los compuestos AC1 y ACC1, fraccionados por cromatografía en columna, presentaron actividad importante sobre HTC-15. AC1 y ACC1 presentaron actividad importante sobre las líneas U-251 y MCF-7, respectivamente.

También cabe mencionar que las fracciones que ocasionaron muerte celular fueron AC1 ACC1. La fracción AC1 ocasionó muerte en los cultivos celulares de las líneas U-251 y HCT-15, en tanto que ACC1 causó muerte en los cultivos celulares de HCT-15 y MCF-7. En el caso de las fracciones P3 y ACC3 no se encontró actividad importante. Estos datos nuevamente nos indican que las fracciones procedentes del extracto acetona-agua actúan de manera selectiva en los cultivos de células transformadas.

6.2.4. Fraccionamiento biodirigido del extracto acetona:agua *C. aequipetala*

En la Figura 16 y Tabla 17 se muestra la actividad citotóxica de las diferentes fracciones evaluadas sobre un cultivo de células cancerosas DU-145.

Tabla 17. Actividad citotóxica de las fracciones provenientes del extracto acetona-agua de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular DU-145.

Fracción o compuesto	CE_{50} (µg/ml)	CE_{100} (µg/ml)	CL_{50}(µg/ml)
E. completo (CG)	8.1	292.67	1.0×10^4
PB	2.48	3.131×10^3	$>1.0 \times 10^4$
PB2	96.7	5.76×10^3	$>1.0 \times 10^4$
PB3	>100	$>1.0 \times 10^4$	$>1.0 \times 10^4$
PB4	20.4	3.21×10^2	5.6×10^3
PB5	0.11	12.15	1.4×10^3
CAcOEt	0.418	4.9×10^2	$>1.0 \times 10^4$
SM3	3.90	75.85	1.47×10^3
Colchicina	0.054	1.211	27.17

El extracto acetona-agua, así como algunas de sus fracciones mostraron actividad citotóxica sobre la línea DU-145. Al comparar el efecto del extracto completo sobre las líneas HEp-2, HCT-15 (Tabla 13) y DU-145 observamos que el mayor efecto se presentó en la línea DU-145.

De acuerdo con los lineamientos establecidos por el NCI de EEUU, el extracto completo y las fracciones PB, PB5, CAcOEt y SM3 son activos. La fracción PB4 se encuentra muy cerca de los límites establecidos. Con respecto a quienes son más efectivos para inhibir el 100% del crecimiento están PB5, SM3, el extracto completo, PB4 y CAcOEt. Finalmente observamos que PB5, PB4 y SM3 son los que necesitan menores concentraciones para matar en un 50% la población celular.

Sin embargo, el extracto y sus fracciones fueron menos activos que la colchicina, alcaloide empleado como control positivo. A pesar de que la colchicina es un inhibidor de tumores con actividad antileucémica no se emplea en la clínica ya que tiene efectos tóxicos sobre todos los órganos secretores (Kintzios & Barberaki, 2004).

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTO

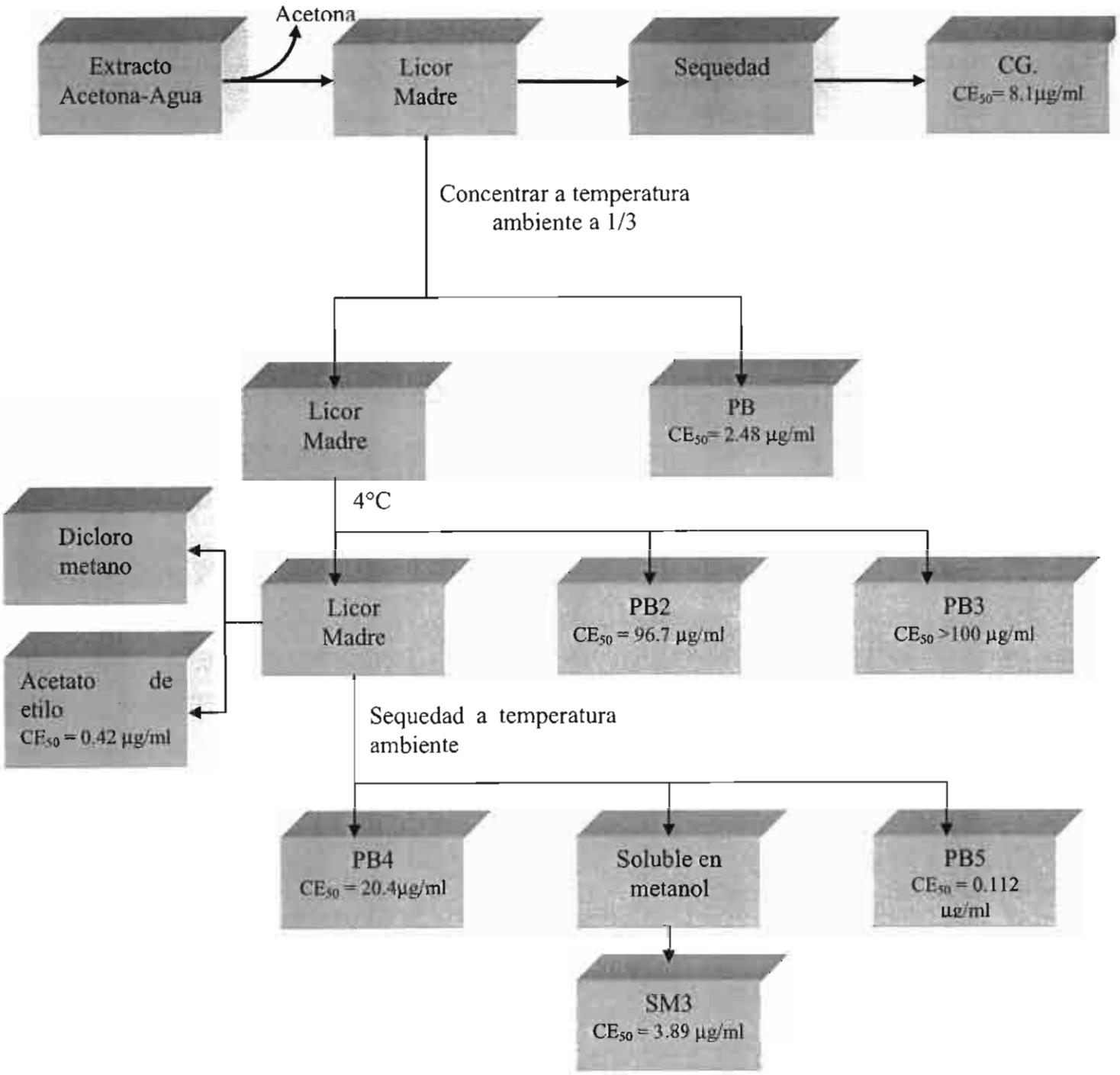


Figura 16. Fraccionamiento y actividad citotóxica del extracto acetona-agua *C. aequipetala* sobre la línea cancerosa DU-145.

6.3. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y DATOS ESPECTROSCÓPICOS

6.3.1. Características físicas y químicas de las diferentes fracciones de *C. aequipetala*

Extracto acuoso

La reacción con $FeCl_3$ mostró la presencia de compuestos de tipo fenólico. Los taninos son compuestos de tipo fenólico que están unidos a β-D-glucosa y presentan las reacciones características de los fenoles pero difieren de éstos por que tienen la capacidad de precipitar las proteínas (Haslam, 1996). Dado que al adicionar gelatina/NaCl al extracto acuoso se formó un precipitado se confirmó la presencia de taninos.

Fracción VIII-4

Es un polvo de color café-amarillo, soluble en DMSO. El espectro infrarrojo (Apéndice 3) mostró bandas en la región de: 3402 (grupo **OH** de fenoles o ácido carboxílico); 2967 (-C-**H**); 1723 (grupo carbonilo), 1612 (C=C de tipo aromático); 1041 (C-**O** de alcohol).

El espectro de resonancia de hidrógeno, (apéndice 3B), presentó señales entre 6.985, 6.9 y 6.91 ppm que sugieren la presencia de hidrógenos de anillos aromáticos. La señal ancha de 4 a 3.5 ppm indicó abundantes hidrógenos unidos a oxígeno, los que podrían asociarse a azúcares. La señal de 2.33 ppm se debe a un metilo unido al grupo fenilo. La señal de 2.50 ppm se debe al disolvente empleado (DMSO).

La presencia de anillos aromáticos y azúcares se evidencian en el espectro de ^{13}C-RMN, (apéndice 3C), que muestra las señales de 174.7 ppm (C=O), 145.4 ppm (C=C de compuesto aromático), 73.3, 79.1, 78.9, 98.5 ppm (C-O, pentosa); 72.7, 71.3, 70.6, 69.7 y 63.8 ppm (hexosa); 30.8 ppm (metilo) y 190.0 ppm (metilo unido a un carbonilo).

Los espectros de RMN, así como el de Infrarrojo sugieren la presencia de compuestos de tipo aromático unidos a hexosa y pentosa además de grupos hidroxilo y carbonilo.

La cromatografía bidimensional en placas de celulosa, revelada con $FeCl_3$/HCl mostró 5 manchas azules y 2 verdes. Las manchas azules se deben a la presencia de compuestos polifenólicos y los verdes a unidades flavan-3-ol. Las evidencias espectrales y las reacciones con $FeCl_3$ conducen a pensar en taninos (Haslam, 1996) hidrolizables (azules) y condensados (verdes).

Fracción VIII-2

Es un polvo de color amarillo soluble en DMSO. El espectro infrarrojo (Apéndice 3) muestra bandas en la región de 3402 (grupos OH de fenoles o ácido carboxílico); 2967 (-C-**H**); 1723 (grupo carbonilo), 1612 (C=C de tipo aromático); 1041 (C-**O** de alcohol). Es muy similar al espectro de la fracción VIII-4, la zona de los sustituyentes de los grupos aromáticos es donde presentan pequeñas diferencias.

Fracción VIII-VIII°

Polvo amarillo, soluble en DMSO. El espectro de resonancia de hidrógeno, Apéndice 4, mostró señales entre 7.0 a 6.5 ppm, mismas que sugieren la presencia de hidrógenos de anillos aromáticos. La señal ancha de 4-3.5 ppm indica abundantes hidrógenos unidos a oxígeno (OH) los que podrían asociarse a azúcares. La CCF revelada con $FeCl_3$ mostró varias machas azules, mismas que pueden asociarse a taninos hidrolizables.

Fracción S1

Sólido café claro de apariencia laminar. El espectro de ^{1}H-RMN (Apéndice 3) mostró señales entre 6.7 a 6.9 ppm que indican la presencia de hidrógenos unidos a oxígeno. El

doblete de 3.4 y 3.8 ppm con constante de acoplamiento de 5.76 Hz no se presenta en los otros espectros y probablemente se deba a que el DMSO empleado contenga algo de agua. La señal de 2.4 se asocia al disolvente empleado (DMSO). La señal de 1.2 ppm se asocia a una cadena alifática **(CH_2)**n.

La CCF bidimensional en placas de celulosa, revelada con $FeCl_3$/HCl mostró 3 manchas bien definidas. La Cromatografía bidimensional en placas de sílica gel, revelada con $FeCl_3$/HCl presentó 1 mancha azul en el origen y 2 manchas muy cercanas de color amarillo.

Fracción P2

Polvo café, que se formó en la fase acuosa del extracto.

Fracción A

Se refiere a la fracción acuosa concentrada, sin los precipitados S1 y P2. La reacción con $FeCl_3$ fue positiva o que indica la presencia de compuestos de tipo fenólico.

Fracción AC1

Primera fracción obtenida al separar por cromatografía en columna de celulosa los compuestos presentes en la fracción A. Es un polvo café brillante, soluble en DMSO y dio positiva la reacción con $FeCl_3$. Así que esta fracción contiene compuestos de tipo fenólico y/o taninos

Fracción P3

Polvo café que precipitó de A, adhiriéndose a la pared de la botella y extraído con metanol caliente. Es soluble en DMSO.

Fracción ACC1

Primera fracción obtenida al fraccionar AC (fracción acuosa sin el precipitado P3) en una columna empacada con celulosa y eluída con agua. Soluble en DMSO y dio positiva la reacción con $FeCl_3$ por lo que se trata de compuestos de tipo fenólico.

Fracción ACC3

Tercera fracción obtenida al fraccionar AC en una columna empacada con celulosa y eluída con agua. Soluble en DMSO y dio positiva la reacción con $FeCl_3$, lo que indica presencia de compuestos de tipo fenólico.

Fracción CG

Extracto completo obtenido con acetona-agua, soluble en agua y DMSO. Esta fracción se adhirió fuertemente sobre las placas de sílica gel lo que aunado a las pruebas de solubilidad sugieren la presencia de compuestos polares. La reacción positiva con $FeCl_3$ indica la presencia de compuestos de tipo fenólico mientras que la solubilidad sugiere la presencia de fracciones polihidroxílicas en la molécula.

PB

Sólido de apariencia metálica. Soluble en agua y DMSO. La CCF bidimensional realizada en placas de celulosa y revelada con $FeCl_3$ mostró 9 manchas, 7 de color azul y dos de color verde. Las manchas azules indican presencia de taninos de tipo hidrolizables mientras que las verdes sugieren la presencia de taninos condensados.

PB2a

Polvo café claro de apariencia metálica, soluble en DMSO. Dio positiva la reacción con $FeCl_3$, o que indica que está formado por compuestos de tipo fenólico.

PB3a

Polvo café claro de apariencia metálica. Dio positiva la reacción con $FeCl_3$, lo que indica que está formado por compuestos de tipo fenólico.

PB4

Polvo dorado de apariencia metálica. Dio positiva la reacción con $FeCl_3$, lo que indica la presencia de compuestos de tipo fenólico.

PB5

Polvo de apariencia metálica. Dio positiva la reacción con $FeCl_3$, lo que indica la presencia de compuestos de tipo fenólico. La CCF bidimensional realizada en placas de celulosa y revelada con $FeCl_3$ mostró 5 manchas, 3 de color azul y dos de color verde. Las manchas azules indican presencia de taninos de tipo hidrolizables mientras que las verdes sugieren la presencia de taninos condensados.

SM3

Sólido de apariencia globular, blanco-paja. Soluble en agua, DMSO. No dio positiva la reacción con $FeCl_3$.

Sus espectros de RMN ^{1}H y ^{13}C (Apéndice 3B y 3C) fueron similares a los del compuesto 165, indicando por lo tanto que se trataba del carbohidrato manitol. Sin embargo, el punto de fusión (158-161°C) obtenido es menor que el de manitol puro (pf = 168-169 °C) lo que indica que SM3 no esta formado por un solo compuesto.

165

Los datos espectroscópicos fueron similares a los del compuesto SM3. El espectro de ^{1}H-RMN mostró un conjunto de señales en la región de 3.6 a 3.9 ppm, sugiriendo un carbohidrato. El espectro de ^{13}C-RMN mostró tres señales en 63.2, 69.3 y 70.8 ppm, Estos valores de desplazamiento químico indicaron que cada átomo de carbono debe estar unido un átomo de oxigeno. Además, el experimento DEPT (Apéndice 3D) indicó que éstas corresponden a los carbonos de un metileno (63.2) y 2 metinos (69.3, 70.8), respectivamente. Este conjunto de datos sugiere la presencia de un monosacárido tipo hexosa. Al comparar los datos de RMN, así como el punto de fusión de este compuesto (165°C) con los reportados con la literatura se encontró que concordaban con los del compuesto D-manitol, cuya fórmula molecular es $C_6H_{14}O_6$, con peso molecular de 182. La identidad de este compuesto se corroboró mediante el espectro de masas obtenido por impacto electrónico (Apéndice 3F). Dicho espectro mostró el ión M+1 en m/z 183, así como el patrón típico de fragmentación de manitol, observando el pico base en m/z = 73.

IR (KBr) υ max (cm^{-1}): 3169 ancha (OH), 2754 (C-H), 1451 (CH_2), 1373 (CH), 1089, 1021 (C-O).

RMN^{13}C (75 MHz, D_2O), δ ppm: 63.2 (CH_2OH), 69.3 (CHOH), 70.8 (CHOH).

EMIE (70 eV, m/z): 183 M^{+}+1 [$C_6H_{14}O_6$+H] (3%), 123 (20%), 103 (65%), 73(100%), 61(75%), 43(35%) y 31 (18%).

CAcOEt

Porción extraída con acetato de etilo, sólido amarillo-naranja, soluble en metanol, dio positiva la reacción con vainillina-H_2SO_4 y $FeCl_3$. La CCF mostró manchas que

fluorescen bajo la luz ultravioleta de onda corta. La CCF, revelada con Fast Blue Salt mostró 4 compuestos con valores de Rf de 0.72, 0.80, 0.86 y 0.91. Los tres reveladores empleados sugieren la presencia de flavonoides (Wagner et al, 1984).

El espectro infrarrojo (Apéndice 3) mostró una banda ancha en 3344 que indica la presencia de grupos hidroxilo.

En su espectro ^{1}H-RMN (Apéndice 3B) está mezcla de compuestos muestra señales de 6.7 a.7.8 de protones aromáticos. Las señales dobles de 6.1 y 6.3 se asocian a protones vinílicos lo que permite suponer que corresponden a flavonas. Además la región de 3.40 a 4.0 ppm indica la presencia de 3 a 4 de hidrógenos característicos de azucares. La señal en 5.2 ppm, indica protones anomericos de los azucares. Lo anterior sugiere una flavona substituida por una porción glucosidica.

IR (KBr) υ max (cm^{-1}): 3344 ancha (OH).

Las características químicas y físicas de los extractos y fracciones de *Cuphea aequipetala* se resumen en la Tabla 18.

Tabla 18. Resumen de las características químicas y físicas de extractos y diversas fracciones de *Cuphea aequipetala.*

Código	Apariencia	Tipo de estructura química
Extracto acuoso	----------	Taninos
Fracción VIII-4	Polvo café-amarillo	Taninos
Fracción VIII-2	Polvo amarillo	Taninos
Fracción VIII-VIII°	Polvo amarillo	Taninos
Fracción S1	Sólido café de apariencia laminar	Taninos
Fracción A	----------	Compuesto polifenólicos
Fracción AC1	Polvo café brillante	Taninos
Fracción ACC1	----------	Compuesto polifenólicos
Fracción ACC3	----------	Compuesto polifenólicos
Fracción GC	----------	Taninos
PB	Sólido metálico	Taninos
PB2a	Café claro	Compuesto fenólico
PB3a	Polvo café de apariencia metálica	Compuesto fenólico
PB4	Polvo dorado metálico	Compuesto fenolico
PB5	Polvo de apariencia metálica	Taninos
SM3	Sólido de apariencia globular blanco-paja	Manitol y compuesto no identificado
165	----------	Manitol y compuesto no identificado
CAcOEt	Sólido amarillo-naranja	Flavonoides

6.4. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LAS FRACCIONES CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA

La planta emplea aproximadamente el 90 % de sus componentes en su desarrollo y crecimiento. Este tipo de compuestos se conocen como metabolitos primarios y son asimilados por la planta, principalmente a través de los principales ciclos catabólicos (Kintzios & Barberaki, 2004).

Los metabolitos secundarios (10%) son compuestos complejos que pertenecen a una gran variedad de compuestos químicos. Durante algún tiempo se consideró que los metabolitos secundarios eran productos que desechaban las plantas durante el metabolismo primario, acumulándose en éstas como consecuencia de defectos del sistema de excreción. Fraenkel sugirió en 1959 que dichas sustancias inducen o previenen la toma de nutrientes por animales herbívoros y, posteriormente Ehrlich & Raven propusieron que los metabolitos secundarios juegan un papel importante en la defensa de la planta contra el ataque de los insectos herbívoros (Harbone, 2001).

Debido a las funciones fisiológicas de los metabolitos secundarios, se sugirió que dichas substancias son fuente potencial de compuestos anticancerosos que actúan modulando o inhibiendo el crecimiento tumoral (Kintzios & Barberaki, 2004).

Aunque las plantas se han empleado desde hace 3500 años para tratar el cáncer (Hartwell, 1967), fue hasta 1959 que se iniciaron de manera sistemática los estudios para conocer la actividad antitumoral de las plantas (Cordell, 1977). Y para 1986 se habían evaluado la actividad citotóxica de aproximadamente 35,000 plantas (Philipson, 2003).

Los productos naturales que han mostrado actividad anticancerosa o tumoral representan una gran variedad de estructuras químicas. En el caso de los productos naturales que inhiben la neoplasia ovárica, se han reportado 69 compuestos que representan (Tabla 19) 15 clases de estructuras químicas (Silva et al, 2003).

Tabla 19. Porcentaje de productos naturales que presentan actividad en las neoplasias ováricas (Silva et al, 2003).

Tipo de estructura química	Porcentaje
Alcaloides	37
Compuestos no alcaloides, N-heterocíclicas	13
Lactonas diversas	11
Diterpenos	6
Proteínas	6
Antraquinonas	4
Péptidos	3
Flavonoides	3
Lignanos	3
Quinoides	3
Sesquiterpenos	3
Antracenos	1
Benzenoides	1
Carbohidratos	1
Carotenoides	1

Dentro de las estructuras químicas presentes en las fracciones con actividad citotóxica, procedentes del extracto acetona/agua de *C. aequipetala* se encuentran los flavonoides, mismos que están presentes en la fracción denominada en el texto como CAcOEt.

6.4.1. Características químicas y actividades biológicas de los flavonoides

La estructura básica de los flavonoides es el núcleo flavan, el cual contiene 15 átomos de carbono arreglados en tres anillos (C6-C3-C6). Se origina una gran variedad de flavonoides ya que el esqueleto básico puede tener diferentes grupos hidroxilo y metoxilo. Es común encontrarlos en las plantas en forma de glucósidos, característica que hace difícil la determinación de la estructura química. Las diferentes clases de los flavonoides incluyen a las auronas, antocianinas, catequinas, calconas, flavanonas, flavanonoles, flavonas, xantonas, flavonoles, isoflavonas y leucoantocianidinas. Estos compuestos se pueden distinguir porque presentan anillos heterocíclicos que contienen oxígeno y grupos hidroxilo (Brielman, 1999).

Los flavonoides se encuentran distribuidos ampliamente en el reino vegetal, y esto incluye algunos de los pigmentos más comunes, que con frecuencia fluorecen después de la irradiación de luz ultravioleta. También actúan como reguladores metabólicos y protegen a la célula vegetal de la radiación ultravioleta. Los flavonoides tienen una función clave en los mecanismos del reconocimiento bioquímico y traducciones de señales, similares a los reguladores del crecimiento (Kintzios & Barberaki, 2004).

Dentro del reino vegetal encontramos a los flavonoides en las frutas (p. ej., manzana, uvas, cereza y arándano), verduras (p. ej. cebolla, tomate, brócoli y pimiento verde), en las hojas de té, soya y hierbas (p. ej., *Silybum marianum,Alpinia officinarum,Hypericum*

peroratum y *Artemeia sylvatica*). Los flavonoides, presentes en la mayoría de plantas substancias comestibles, tienen acciones benéficas como son los efectos antioxidantes, inhiben la actividad de las células antitumorales e inducen la apoptosis en las líneas celulares cancerosas, de manera tal que los flavonoides han atraído la atención ya que se les considera como agentes quimioprotectores (Kang et al, 2004).

La raíz de *Scutellaria baicalensis* (Huangqin) contiene las flavonas baicaleina, wogonina y los 7-O-β-D-glucopiranosidos de baicalina y wogonosidos. Las baicalina y la baicaleina inhiben el crecimiento de las células HPL/PRF/5 (hepatoma humano) y Hep-G2 (hepatoma humana) así como las células BxPC-3 (carcinoma pancreático humano). La baicalina, baicaleina y wogonina muestran actividad citotóxica sobre las células cancerosas KU-1, EJ-1 (carcinomas de vesícula humana) (Ikemoto et al, 2000). La baicalina, baicaleina, wogonina, wogonosido y skulcapflavona II (neobaicaleina) inhiben el crecimiento de LKFL 529L (carcinoma humano de células grandes de pulmón) y HL60 (línea celular de leucemia promioelocítica) en concentraciones μmolar (μM) (Tang et al, 2003).

La baicaleina inhibe la topoisomerasa II, probablemente al estabilizar el enlace del complejo intermediario enzima-ADN (Matsuzaki et al, 1996).

La baicalina, wogonina, wogonosido y skulcapflavona II (neobaicaleina) sólo presentan actividades inhibitorias débiles sobre la tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) con IC_{50} mayor de 60 μM. Sin embargo, la baicaleina es un potente inhibidor de EGFR con IC_{50} de 1.1 μM. La baicaleina es mucho más activa en las células A431 (carcinoma epidermal humano), línea celular que tiene una sobre-expresión de EGFR (Tang et al, 2003).

La bacaileina y wogonina también inhiben la enzima xantina oxidasa, lo que indica que estos flavonoles podrían usarse en pacientes con tumores cerebrales ya que los niveles séricos de la enzima se incrementan en estos pacientes (Chang et al, 1993).

La Tangeretina y nobiletina son polimetoxiflavonas con actividades antiproliferativas contra un gran número de líneas celulares cancerosas (Kawaii et al, 1999), y también inducen *in vitro* la diferenciación de las células HL-60 (Tang et al, 2003).

De *Acronicia oblongifolia* se han aislado los flavonoides 5,3'-dihidroxi-3,6,7,8,4'-pentametoxiflavona, 5-hidroxy-3,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona, digicitrin, 3-O-demetildigicitrina, 3,5,3'-tribydroxy-6,7,8,4'-tetrametoxiflavone y 3,5-dibidroxy-6,7,8,3',4'-pentametoxiflavona. Estos flavonoides tienen actividad citotóxica contra células KB (carcinoma nasofaringeo humano) con un IC_{50} de 0.04μg /ml e inhiben el ensamble de la tubulina dentro de los microtubulos con un IC_{50} de 12 μM (Lichius et al., 1994).

Los flavonoides también inhiben a la enzima farnesil protein transfera (FPTasa). Esta enzima es necesaria durante la primera etapa post-translacional del proto-oncogene Ras (se encuentra mutado en aproximadamente el 25% de los cánceres humanos). La FPTasa puede tener un papel importante dentro del diseño de agentes anticancerosos específicos, ya que esta actividad enzimática podría conducir a la obtención de medicamentos anticancerosos que no afecten las funciones de las células normales (Kang et al, 2004). Dentro de los flavonoides que han probado tener actividad sobre la FPTasa están la morina (flavanol), TDF (flavona) y buteina (calcona). Estos flavonoides, a la concentración de 100 μg/ml, inhibieron la actividad de FPTasa en un 96, 84 y 72 %, respectivamente, y los valores de IC_{50} son de 6.0 μg/ml para la morina, 5.0 μg/ml para la

quercitina y 7.0 μg/ml para la miricetina. La naringenina (flavanona), genisteína (isoflavona), taxifolin (flavanonol) y catequina (flavanonol), en concentración de 100 μg/ml no afectaron significativamente la actividad enzimática (Kang et al, 2004). Estos datos indican que los flavonoides deben presentar determinadas estructuras químicas a fin de inhibir a la enzima FPTasa.

El flavopiridol (flavona sintética) se ha reportado en estudios clínicos de fase I/II, y se está empleando para tratar una gran variedad de tumores. Tiene un mecanismo de acción interesante ya que inhibe a las ciclinas dependientes de cinasa (CDK), por lo que regula el paso de las células durante las fases G2 a M del ciclo celular (Newman et al, 2000).

6.4.2 Características químicas y actividades biológicas de los taninos

Dentro de las estructuras químicas presentes en las fracciones con actividad citotóxica, procedentes del extracto acetona/agua de *C. aequipetala* se encuentran los taninos.

Los taninos son compuestos polifenólicos, solubles en agua y con masas molares entre 300 y 3000 Daltones. Presentan las reacciones características de los fenoles (p.ej. reaccionan con el Fe(III)/HCl, formando colores azul), precipita los alcaloides, gelatina y otras proteínas (Haslam, 1989). Sin embargo, esta definición no incluye a todos los taninos ya que recientemente se ha encontrado a compuestos de este tipo con masa molar de 20,000 Daltons.

Con base en el tipo de estructura molecular, se definen a los taninos como substancias fenólicas macromoleculares y se dividen en taninos hidrolizables y taninos condensados. Los taninos hidrolizables son esteres de galoil y hexahidroxidifenoles en tanto que los

taninos condesados contienen al menos dos unidades catequina (Khanbabaee & van Ree, 2001).

Los estudios fitoquímicos realizados en plantas empleadas en la medicina herbolaria china y japonesa han conducido al aislamiento e identificación de una gran variedad de taninos hidrolizables, mismos que han mostrado una diversidad de efectos farmacológicos (Yang et al, 1999).

Los taninos han atraído la atención ya que dentro de sus actividades biológicas se encuentran los efectos antivirales (Nakashima et al, 1992), antibacteriano (Burapadaja & Bunchoo, 1995) y antitumorales (Miyamoto et al, 1993). Además presentan actividad antioxidante ya que atrapan a los radicales libres (Miyamoto et al, 1999).

Agrimonia pilosa (Xian he cao) es una de las famosas hiervas mágicas empleadas en la medicina tradicional china. De esta planta se aisló el tanino agrimonia que mostró capacidad para inducir la producción de interleucina-1(IL-1) en un cultivo de células mononucleres sanguíneas humanas. La agrimonia también fue capaz de inducir la producción de IL-1 en ratones, de ahí que se le considere como inductor de citocinas (Murayama, 1992). *A. pilosa* también presentó actividad citotóxica contra células tumorales, además de que afecta menos a las células normales (Kintzios & Barberaki, 2004).

De *Cuphea hyssopifolia* se aislaron los elagitaninos macrociclicos cufina D_1, cufina D_2, oenoteina B y woodfordina C (Chen et al, 1999) y todos inhibieron el crecimiento de las líneas cancerosas humanas KB, HeLa, DU-145, HL-60 y Hep 3B (Wang et al, 1999). Estos taninos también inhibieron el crecimiento de tumores S-180 en ratones. La cufina

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

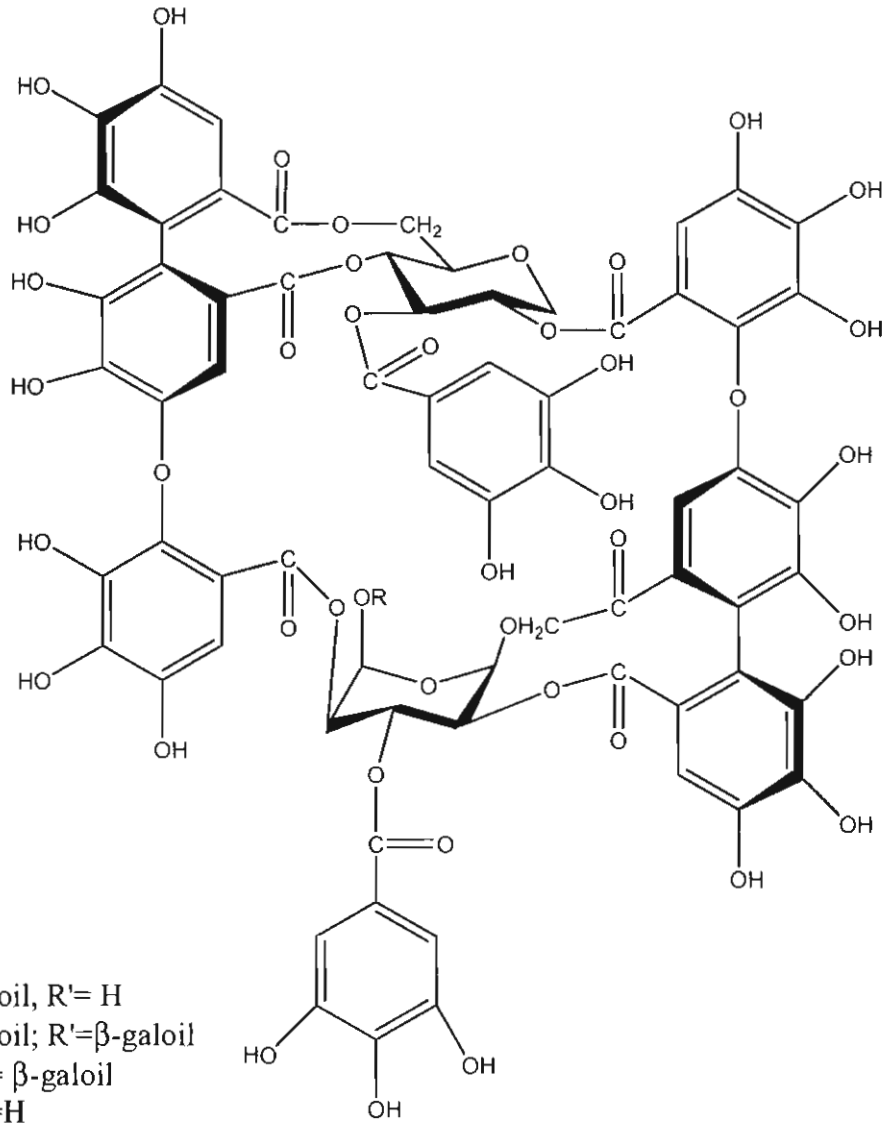
D_1 (CD_1) fue la que aumentó más la sobrevivencia de los ratones con tumores S-180 (Wang et al, 1999).

En concentraciones de 6.25 a 50 μg/ml CD_1 mejoró la incorporación de ^{3}H-timidina de la concanavalina A, estimuló la proliferación de células mononucleares sanguíneas y la secreción de citocinas. La CD_1 también estimuló a los linfocitos de la sangre a liberar la IL-1β, IL-2 y TNF-α. Estos datos indican que la actividad antitumoral *in vitro* puede deberse a un mecanismo de acción mediado por el huésped (Wang et al, 2002).

Las células Hela tratadas con CD_1 mostraron condensación de la cromatina, además de que el análisis de citometria de flujo mostró que las células tenias valores bajos de ADN. Otro de los efectos causados por CD_1 sobre las células HeLa fue la fragmentación del ADN, inhibición de Bcl-2 y pro caspasa 3. Estos resultados indican que CD_1 actúa sobre la células HeLa a través de un mecanismo de apoptosis (Wang et al, 2002a).

Las células HL-60 tratadas con CD_1 presentaron condensación de cromatina, además de que el análisis de citometría de flujo mostró que las células tenían bajo contenido de ADN, disminución de la población celular en la fase G2/M y un incremento de la población celular en la fase G1. CD_1 también causó fragmentación de DNA e inhibió la expresión en las células HL-60. Estos resultados sugieren que CD_1 induce la expresión de Bcl-2 en las células HL-60 y que actúa induciendo la apoptosis. (Wang et al, 2000).

Los taninos aislados de *Cuphea hyssopifolia*, así como los taninos presentes en algunas de las fracciones de de *Cuphea aequipetala* presentaron actividad citotóxica sobre la línea celular cancerosa DU-145. Las estructuras químicas de cufina D_1 (2), cufina D_2 (3), woodofordina C (1) y oenoteina B (4) aisladas de *Cuphea hyssopifolia* se muestran en la Figura 17.



1: R= α-galoil, R'= H
2: R= α-galoil; R'=β-galoil
3: R=H; R'= β-galoil
4: R=H, R'=H

Figura 17. Estructuras químicas de cufina D_1 (2), cupina D_2 (3), woodofordina C (1) y oenoteina B (4) aisladas de *Cuphea hyssopifolia* (Wang et al, 1999).

6.4.3. Características químicas y biológicas del manitol

El manitol es un polihidróxido con fórmula molecular $C_6H_{14}O_6$, con punto de fusión de 168- 169 °C (Pouchert & Behnke, 1993).

Este azúcar se aisló de *Cuphea wrightii* (Pérez & Maldonado, 20003) y las autoras reportan un punto de fusión de 168-169 °C, tomado en la ciudad de México. Otras especies de plantas del género *Cuphea* de las que se aisló manitol son *C. epilobilofia, C. infundibulum, C. carthagenesis* (González et al, 1994).

El manitol se emplea como marcador de permeabilidad intestinal (Melichar et al, 2001), diurético (Yoshizawa et al, 1998) y junto con medicamentos anticanceroso como el 5-fuoruracilo (Cartei et al, 1996). En el caso del 5-fluoruracilo (5-FU), se administró el fármaco en forma de tabletas cubierta con manitol a pacientes con cáncer gastrointestal y observaron que el 5-FU/manitol es más efectivo que el 5-FU además de que no presenta efectos mielosupresivos (Cartei et al, 1996).

En otro estudio clínico evaluaron la respuesta del etopósido intravenoso, así como la eficacia del manitol para aumentar el efecto tumoricida del etopósido en pacientes con tumores cerebrales recurrentes. La conclusión a la que llegaron fue que el etopósido tiene una baja actividad en el tratamiento de atrocitomas, meduloblastomas y tumores neuroectodermales primitivos. Además, la administración intravenosa de manitol no mejora la actividad del etopósido (Kobrinsky, et al, 1999).

Los estudios realizados en la línea celular cancerosa A549 (carcinoma humano de pulmón) la mezcla de manitol y arabitol no inhibieron el crecimiento de A549 (Isoda & Nakahara, 1997).

Los estudios realizados con SM3, obtenida de *C. aequipetala*, mostró tener actividad citotóxica sobre la línea DU-145 (CE_{50} = 3.89). SM3 se obtuvo en forma de glóbulos color blanco-paja, con punto de fusión de 158-161°C, cuyos estudios espectrales indican que la estructura química de SM3 corresponde al carbohidrato manitol.

La actividad citotóxica de SM3 se puede explicar con base en:

i) El punto de fusión de SM3 está un poco alejado del obtenido por Pérez & Maldonado, quienes reportaron un valor de 168-169°C, lo que indica que SM3 está formado por otro compuesto además del manitol.

ii) La forma de glóbulo de SM3, quizás se deba a que debido a la forma en la cual se aisló, se formaron nanoesferas entre los dos compuestos lo que condujo a que el segundo compuesto presentara una mayor citotoxicidad (Santhi, et al, 2002).

iii) El segundo compuesto que conforma SM3 está en una concentración baja, así que si dicho compuesto estuviera puro, tendría una actividad citotóxica alta.

iv) O bien que el manitol actuara incrementado la permeabilidad celular y de esta manera el segundo compuesto tiene una mayor oportunidad de dar en un blanco de las células cancerosas.

¿Y como explicar la actividad citotóxica de *Cuphea aequipetala* cuando un trabajo científico tenía CE_{50} mayores a los aceptados para los extractos considerados activos?
Los estudios previos de la actividad citotóxica de *Cuphea aequipetala* mostraron que los extractos etanólico, clorofórmico y éter de petróleo inhibieron el crecimiento con valores de CE_{50} mayores a 20 μg/ml. En dicho estudio se emplearon las hojas y los extractos se probaron en las líneas celulares P338 (leucemia murina), KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y KB-V1 (carcinoma nasofaríngeo humano resistente a vinblastina) (Villarreal et al, 1992). Nuestros estudios muestran que los extractos obtenidos con hexano y

metanol no inhibieron el crecimiento de los cultivos de células cancerosas HCT-15 y HEp-2. El extracto obtenido con acetato de etilo tiene un CE_{50} de 22.33 μg/ml en la línea neoplásica HCT-15 y para HEp-2 de >100 μg/ml. El extracto acetona/agua, que fue el extracto activo, mostró valores de CE_{50} para las líneas DU-145, HCT-15 y HEp-2 de 8.1, 11.9 y > 100 μg/ml, respectivamente, e indican que la citotoxicidad es selectiva.

Si bien, los investigadores (Villarreal et al, 1992) emplearon solventes diferentes, las polaridades del hexano y éter del petróleo son similares, por lo que también los compuestos extraídos con ambos disolventes son similares. En este caso, los datos obtenidos por ambos grupos de trabajo coinciden ya que el extracto hexánico no presentó actividad citotóxica en ninguna de las líneas cancerosas probadas.

Por otra parte el etanol y metanol también presentan polaridades cercanas, así que al igual que con el éter de petróleo y hexano, los compuestos extraídos serían muy similares y los valores de citotoxicidad obtenidos por los dos grupos de trabajo muestran que estos extractos no se consideran con actividad citotóxica.

Otros investigadores (Wang et al, 1999) mostraron que la actividad citotóxica que ejerce un compuesto varía dependiendo de la línea celular donde se pruebe y en éste estudio encontramos que la actividad citotóxica fue selectiva.

7. CONCLUSIONES

1. Cuphea *aequipetala* Cav. posee actividad citotóxica en la porción extraída con acetona-agua y es selectiva ya que la inhibición del crecimiento celular varía en las diferentes líneas celulares empleadas, siendo la línea celular cancerosa DU-145 la de mayor sensibilidad.
2. Las fracciones PB, PB5, SM3 y CAcOEt inhiben el 50 % el crecimiento celular de la línea neoplásica DU-145 en concentraciones menores a los límites que establece el NCI de EEUU.
3. A pesar de que la fracción PB4 se encuentra muy cerca del límite superior que el NCI de EEUU considera para extractos o compuestos no puros citotóxicos, ésta quedó dentro de las tres fracciones que matan al 50% de la población celular DU-145.
4. Las pruebas químicas indican que las fracciones PB y PB5 están formadas por taninos, en tanto que CAcOEt está formado por flavonoides.
5. Con respecto a las fracciones más efectivas para inhibir el 100% del crecimiento celular de las líneas cancerosas estudiadas, están PB5, SM3, el extracto completo, PB4 y CAcOEt. Las fracciones PB5, PB4 y SM3 son las más activas para matar en un 50% la población celular.
6. Los estudios espectroscópicos indican que SM3 contiene manitol. El punto de fusión indica que SM3 esta constituida por manitol mas otro compuesto en pequeña proposición. La actividad citotóxica de SM3 se debe al compuesto presente en menor proporción y es favorecida por el mismo manitol.

8. PERSPECTIVAS

1. La revisión bibliográfica efectuada no mostró estudios químicos previos en *C. aequipetala* por lo que se purificará la fracción CAcOEt, que está formada por 4 flavonoides.
2. En los cristales (SM4) obtenidos del licor madre, que quedaron al separar a SM3, se realizarán los estudios químicos y espectroscópicos que conducirán a la identificación de l compuesto.
3. Se identificará químicamente al compuesto que acompaña al manitol en SM3 y establecer si tiene relación con SM4.
4. La actividad de las fracciones PB5 y CAcOEt actualmente está siendo evaluada sobre los cultivos primarios de células de bazo y medula ósea de ratón.

10. REFERENCIAS

- Acton, E.M., Narayanan, V.L., Risbood, P.A., Shoemaker, R.H., Vistica, D.T. & Boyd, M.R. 1994. Anticancer specificity of some ellipticinium salts against human tumors in vitro. *J. Med. Chem.* **37**:2185-2189.
- Adachi, S. 1965. Thin layer chromatography of carbohydrates in the presence of bisulfite. *J Chromatog.* **17**:295-99.
- Appendino, G. 1993. TAXOL* (paclitaxel): historical and ecological aspects. *Fitoterapia* **64**:5-26.
- Argueta, V. A., Cano, A. L. M. & Rodarte, M. E. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. Volumen II. México. pp.731.
- Arts, I.C., Jacobs, D.R., Gross, M., Harnack, L.J. & Folsom, A.R. 2002. Dietary catechins and cancer incidence among postmenopausal women: the Iowa women's health study (United States). *Cancer Causes Control* **13**:373-378.
- Ayres, D. C. & Loike, J.D. 1990. Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties. Cambridge University Press.
- Baytelman, B. 1992. Acerca de Plantas y Curanderos. Etnobotánica y Antropología Médica en el Estado de Morelos. Insituto Nacional de Antropologia e Historia. p.p.123-6.
- Bishop, J. M. 1991. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**: 235-48.
- Bishop, J.M. 1981. Enemies within. The genesis of retrovirus oncogenes. *Cell* **23**:5-6.

- Blaskó, G. & Cordell, G. A. 1988. Recent developments in the chemistry of plant-derived anticancer agents. Economic and Medicine Plants Research. Academic Press. Vol 2. 119-191.
- Boyd, M. R. & Paull, K. D. 1995. Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute *in vitro* anticancer drug discovery screen. *Drug Dev. Res.* **34**:91-109.
- Bramhall, S.R., Halissey, M.T., Whiting, J., Scholefield, J.,Tierney, G., Stuart, R.C., et al. 2001. Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomized trial. *Br. J. Cancer* **87**:161-167.
- Brielmann, Jr., H.L. 1999. Phyochemicals: the chemical components of plants. In "Natural Products from Plants". Kaudman, P., Cseke, L.J., Warber, S., Duke, J. & Brielmann, H.L. eds. *CRC Press*. pp 2-25.
- Brzozowski, A.M., Pike, C.W., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., et al. 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **389**:753-758.
- Buiatti, E., Palli, D., Decarli, A., et al. A case control study of gastric cancer and diet in Italy. *Int. J. Cancer* **44**: 611-616.
- Burapadaja, S. & Bunchoo, A. 1995. Antimicrobial activity of tannins from *Terminalia citrina*. *Planta Med.* **61**:365-366.
- Cartei, F., Cartei, G., Giraldi, T., Interlandi, G., Meneghini, G., Imperato, A., Vigevani, E. & Tabaro, G. 1996. A phase II study of oral fluorouracil for gastrointestinal cancer. *Anticancer drugs* 7:48-53.

- Chang, W.S., Lee, Y.J., Lu, F.J. & Chang, H.C. 1993. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Research* **13**:2165-2170.
- Chen, L.G., Yen, K,Y., Hatano, T., Okuda, T., Yoshida, T. 1999. Macrocyclic ellagitannin dimers, cuphins D1 and D2 and accompanying tannins from *Cuphea hyssopifolia. Phytochemistry* **50**:307-312.
- Claustres, M., Huraitis, O., Vanevski, M. & Cotton, R.G. 2002. Time for a unified system of mutation description and reporting: a review of locus-specific mutation databases. *Genome Res.* **12**:680-688.
- Cordell, G.A. 1977. Recent experimental and clinical data concerning antitumor and cytotoxic agents from plants. In "Proceedings in Life Sciences. New Natural Products and Plants Drugs with Pharmacological, Biological and Therapeutical Activity". H. Wagner & P. Wolff eds. Spring Verlang. pp 54-81.
- Cordell, G.A., Farnsworth. N.R., Beecher, C.W.W., Soejarto, D.D., Kinghorn, A. D., Pezzuto & et al. 1994. Novel strategies for the discovery of plant-derived anticancer agents. In "Anticancer Drug Discovery and Development; Natural Products and new Molecular Models". Valeriote, F.A., Corbett, T.H & Baker, L.H. eds. Kluwer Academic Publishers. pp 63-83.
- Cortinas, C. 1995. Cáncer: Herencia y Ambiente. La Ciencia desde México. Fondo de Cultura Económica. **96**. México.
- Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T. 1999. Neoplasia. In "Robbins Pathologic Basis of disease". W. B Saunders Company. 6th ed. pp.260-328.
- Cragg, G.G., Boyd, M.R., Cardellina II, J.H., Newman, D.J., Snader, K.M. & McCloud, T.G. 1994. Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US

National Cancer Institute. In "Ethnobotany and the Search for New Drugs". *Ciba Foundation Symposium* 185. Chadwick, D.J. & Marsh, J. eds. Chichester, United Kingdom, Wiley & Sons. pp 178-196.

- Cragg, G.M. & Newman, D.J. 2004. A tale of two tumor targets: topoisomerase I and tubulin. The Wall and Wani contribution to cancer chemotherapy. *J. Nat. Prod.* **67**: 232-244.
- Cragg, G.M., Newman, D.J. & Snader, K.M. 1997. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* **60**:52-60.
- Cragg, G.M., Newman, D.J. & Weiss, R.B. 1997b. Coral reefs, forests, and thermal vents: the worldwide exploration on nature for novel antitumor agents. *Semin.Oncol.* **24**:156-163.
- Cuevas-Urióstegui, M.L., Villasis-Keever, M.A. & Fajardo-Gutierrez-A. 2003. Epidemiología del cáncer en adolescentes. *Salud Pública de México* **45**:S115-S123.
- Dalton, L. K., Demerac, S., Elmes, B.C., Lorder, J. W., Swan, J. M. & Teitel, T. 1967. Synthesis of the tumor-inhibitory alkaloids, ellipticine, 9-metoxyellipticine, and related pyrido[4,3-b]carbazoles. *Aust. J. Chem.* **20**:2715-2727.
- Das, B.C., Gopalkrishna, V., Hedau, S. & Katiyar, S. 2000. Cancer of the uterine cervix and human papillomavirus infection. *Curr. Science* **78**: 52-61.
- De la Cruz, M. 1991. *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis.* Manuscrito Azteca de 1552. Según traducción latina de Juan Badiano. Versión española con estudios y comentarios por diversos autores. Fondo de Cultura Económica. Instituto Mexicano del Seguro Social. México.

- Dirección de Estadística, Informática y Evaluación. 2002. Estadísticas de mortalidad en México. *Secretaria de Salud*. México, D. F.
- Erdos, J. & Ferenci, A. 1959. Preliminary report on the study of the cytostatic effect of a plant. *Medicina* (Mexico) **39**:230-244.
- Espinosa, E., Zamora, P., Feliu, J. & González, B. M. 2003. Classification of anticancer drugs - a new system based on therapeutic targets. *Cancer Treat. Rev.* **29**:515-523.
- European Medicines Agency. 2004. www.emea.eu.int.
- Fan, Y., Weinstein, J.N., Kohn, K.W., Shi, L. M. & Pommier, Y. 1998. Molecular modeling studies of the DNA-topoisomerase I ternary cleavable complex with camptothecin. *J.Med. Chem.* **41**:2216-2226.
- Fedi, P., Tronick, S.R. & Aaronson, S.A. 1997. Growth factor in Cancer Medicine. J.F.Holland, R.C Bast, D.L. Morton, E. Frei, D. W. Kufe & R.E. Weinchselbaum, eds. Williams and Wilkins. Baltimore, M.D. pp.41-64.
- Frei III, E. 1982. The National Cancer chemotherapy program. *Science* **217**:600-606.
- Gibbs, J.B. 2000. Mechanism –based target identification and drug discovery in cancer research. *Science* **287**:1969-72.
- Gonzáles, A.G., Valencia, E., Siverio, E.T., Bermejo, B.J., Gupta, M.P. 1994 Chemical components of *Cuphea* species. Carthagenol: a new triterpene from *C. carthagenesis*. *Planta Med.* **60**:592-593.

XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

- Goodman, M.T., Wilkens, L.R., Hankin, J.H., Hyu, L.C., Wu, A.H. & Kolonel, L.N. 1997. Association of soy and fiber consumption with the risk of endometrial cancer. *Am. J. Epidemiol.* **146**:294-306.
- Graham, J.G., Quinn, M. L., Fabricant, D. S. & Farnsworth, N.R. 2000. Plants used against cancer–an extension of the work of Jonathan Hartwell. *J. Ethnopharmacology* **73**:347-377.
- Han, R. 1994. Highlight on the studies of anticancer drugs derived from plants in China. *Stem Cells* **12**:53-63.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**:57-70.
- Harbone, J.B. 2001. Twenthy-five years of chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.* **18**:361-379.
- Hartwel, J. 1969b. Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* **32**:153-205
- Hartwel, J. 1969c. Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* **32**:247-296
- Hartwel, J. 1970. Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* **33**:97-194
- Hartwel, J. 1970b. Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* **33**:288-392
- Hartwell, J. 1967. Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* **30**:379-436
- Hartwell, J. 1968. Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* **31**:71-170.
- Hartwell, J. 1971. Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* **34**:103-160
- Hartwell, J. 1971b. Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* **34**:204-310.
- Haslam, E. 1989. Plants polyphenols-vegetable tannins revisited. In "Chemistry and Pharmacology of Natural Products". Cambridge University Press. pp9.
- Haslam, E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible models of action. *J. Nat. Prod.* **59**:205-15.

- Hellman, S. & Vokes, E. E. 1996. Advancing current treatments for cancer. *Sci. American* **275**:84-89.
- Herbert, J., Hurley, T. Olendzki, B., Teas, T. ,Yunsheng, M., et al. 1998. Nutritional and socioeconomic factors in relation to prostate cancer mortality: a cross-national study. *J. Nat. Cancer Inst.* **90**:1637-1647.
- Hernández, F. 1959. Historia Natural de la Nueva España. México. *U.N.A.M.* Tomo III. pp.137.
- Hoeijmakers, J.H.J. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancers. *Nature* **411**:366-374.
- Horwitz, S.B. 2004. Personal recollections on the early development of taxol. *J. Nat. Prod.* **67**:136-138.
- Hsiang, Y. H., Hertzberg, R., Hecht, S. & Liu, L.F. 1985. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **260**:14873-14878.
- Hurley, L. H. 2002. DNA and its associated processes as target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2**:188-200.
- Husain, I., Mohler, J.L., Seigler, H.F. & Besterman, J. M. 1994. Evaluation of topoisomerase I messenger RNA, protein, and catalytic activity in human tumors: demonstration of tumor-type specificity and implications for cancer chemotherapy. *Cancer Res.* **54**:539-546.
- Ikemoto, S., Sugimura, K., Yoshida, N., Yasumoto, T., Wada, S., Yamamoto, K., Kishimoto, T. 2000. Antitumor effects of *Scutellariae* radix and its components baicalein, baicalin and wogonin on bladder cancer cell line. *Urology* **55**:951-955.

- Imai, K., Suga, K. & Nakachi, K. 1997. Cancer-preventive effects of drinking green tea among Japanese populations. *Prev. Med.* **26**:769-775.
- Inoue. M., Tajima, K., Hirose, K., Hamajima, N., Takezade, T., Kuroishi, T. & Tominaga, S. 1998. Tea and coffee consumption and risk of digestive tract cancer: data from a comparative case-referent study in Japan. *Cancer Causes Control* **9**:209-216.
- Isoda, H. & Nakahara, T. 1997. Antiproliferative effect of polyol lipids, 3,5-dihydroxydecanoyl and 5-hydroxy-2-decenoyl esters of arabitol and mannitol on lung cancer cell line A549. *J. Ferment. Bioeng.* **84**:403-406.
- Ji, B.T., Chow, W.H., Hsiang, A.W., McLaughlin, J.K., Dai, Q., Gao, Y.T., Blot, W.J. & Fraumeni Jr. J. F. 1999. Green tea consumption and the risk of pancreatic and colorectal cancers. *Int. J. Cancer* **70**:255-258.
- Josefson, D. 2001. Obesity and inactivity fuel global cancer epidemic. *Br. Med. J.* **322**:945.
- Juret, P., Heron, J, F., Couette, J.E., Delozier, T. & Le Talayer, J.Y. 1982. Hydroxy-9-methyl-2-ellipticinium for osseous metastases from breast cancer: a 5 years experience. *Cancer Treat. Rep.* **66**:1909-1916.
- Kang, H-M., Kim, J-H., Lee-M-Y., Son, K-H., Yang, D. Ch., Baek, N-I. & Kwong, B-M. 2004. Relationship between flavonoid structure and inhibition of farnesyl protein transferase. *Nat. Prod. Res.* **18**:349-356.
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K. & Yano, M. 1999. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Bios. Biotech.& Biochem.* **63**:896-899.

- Khanbabaee, K. & van Ree, T. 2001. Tannins: classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* **18**:641-649.
- Kintzios, S.E. & Barberaki, M. G. 2004. Plants that Fight Cancer. CRC Press.
- Kobrinsky, N.L., Packer, R.J., Boyett, J.M., Stanley, P., Shiminski-Maher, T., Allen, J.C., Garvin, J.H., Stewart, D.J. & Finlay, J. L.1999. Etoposide with or without mannitol for the treatment of recurrent or primarily unresponsive brain tumors: a children's cancer group study, CCG-9881. *J Neuro Oncology* **45**:47-54.
- Kotin, P.1970. Conceptualizing cancer. *Science* **168**:106-7.
- Kumi-Kiaka, J., Sanderson, N.A. & Hall, A. 2000. The mediating role of caspase-3 protease in the intracellular mechanism of genistein-induced apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines, DU145 and LNCaP. *Biol. Cell.* **92**:595-604.
- Lamatiniere, C.A., Cotroneo, M.S., Fritz, W.A., Wang, J., Mentor-Marcel, R. & Elgavish, A. 2002. Genistein chemoprevention: timing and mechanism of action in murine mammary and prostate. *J. Nutr.* **132**:552S-558S.
- Lascano-Ponce, E.C. & Hernández-Avila, M. 1997. Cáncer: frecuencia, factores de riesgo y medidas de prevención. *Salud Pública de México* **39**:251-2.
- Lavergne, O., Lesueur-Ginot, L., Rodas, F.P., Kasprzyk, P.G., Pommier, J., et al. 1988. Homocamptothecins: Synthesis and antitumor activity of novel E-ring-modified camptothecin analogues. *J. Med. Chem.* **41**:5410-5419.
- Lee, K-H. 2004. Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads. *J. Nat. Prod.* **67**:273-283.
- Lenaz, L. & De Furia, M. D. 1993. Taxol®: a novel natural product with significant anticancer activity. *Fitoterapia* **64**:27-35.

- Liang, Q. J., Liang, S.H., Peng, A., Wang, Y.C., Zhang, H.X., Li, Y.Z. & Cui, J.T. 2003. Effects of anti-leukemia drug harringtonine on the levels of centromere proteins and gene expression of CenpB in L1210 cells. *Yi Chuan Xue Bao*. **30**:521-527.
- Lichius, J.J., Thoison, O., Montagnac, A., Pais, M., Gueritte-Voegelein, F., Sevenet, T., Cosson, J.P. & Hadi, A.H. 1994. Antimitotic and cytotoxic flavonols from *Zieridium pseudobtusifolium* and *Acronychia porteri*. *J. Nat. Prod.* **57**: 1012-6.
- Likhitwitayawuid, K., Angerhofer, C. K., Cordell, G. A. & Pezzuto, J. M. 1993. Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania erecta*. *J. Nat. Prod.* **56**:30-38.
- Masuda, M., Suzui, M. & Weinstein, I.B. 2001. Effects of epigallocatechin-3-gallate on growth, epidermal growth factor receptor signaling pathways, gene expression, and chemosensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clin. Cancer Res.* **12**:4220-4229.
- Matsuzaki, Y., Kurokawa, N., Terai, S., Matsumura, Y., Kobayashi, N., & Okita, K. 1996. Cell death induced by baicalein in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Japanese J. Cancer Res.* **87**:170-177.
- Melichar, B., Kohout,P., Bratova, M., Solichova, D., Kralickova, P. & Zadak, Z. 2001. Intestinal permeability in patients with chemotherapy-induced stomatitis. *J. Cancer Research & Clinical Oncology* **127**:314-318.
- Miyamoto, K. I., Murayama, T., Hatano, T., Yoshida, T. & Okuda, T. 1999. Host-mediated anticancer activity of tannins. In "Plant Polyphenols 2: Chemistry,

Biology, Ecology". Gross, G.G., Hemingway, R.W. & Yoshida, T. Academic Plenum Publishers. 643-663.

- Miyamoto, K.I., Nomura, M., Murayama, T., Furkawa, T., Hatano, T., Yoshida, T., Koshiura, R. & Okuda, T. 1993. Antitumor activities of ellagitannins against sarcoma-180 in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **16**:379-387.
- Mohar, A., Frias-Mendivil, M., Suchil-Bernal, L., Mora-Macias, T. & De la Garza, J. G. 1997. Epidemiología descriptiva de cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México. *Salud Pública de México* **39**:253-58.
- Monks, A., Scudiero, D., Shekan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., et al. 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drugs screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**:757-66.
- Moura, M.D., Silva, J. S., Oliveira, R. A. G., Diniz, M. F. F. M. & Barbosa-Filho, J. M. 2002. Natural products reported as potential inhibitors of uterine cervical neoplasia. *Acta Farm. Bonaerense* **21**:67-74.
- Murayama, T., Kishi, N., Koshiura, R., Takagi, K., Furukawa, T. & Miyamoto, K. 1992. Agrimoniin, an antitumor tannin of *Agrimonia pilosa* Ledeb., induces interleukin-1. *Anticancer Res.* **12**: 1471-1474.
- Nakachi, K.,Suemasu, K., Suga, K.,Takeo,T., Imai, K. & Higashi, Y. 1998. Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients. *Jpn. J. Cancer Res.* **80**:254-261.
- Nakashima, H., Murakami, T., Yamamoto, N., Sakagami, H., Tanuma, S.I., Hatano, T., Yoshida, T. & Okuda. T. 1992. Inhibition of human immunodeficiency viral replication by tannins and related compounds. *Antiviral Res.* **18**:91-103.

- Nebert, D.H., Roe, A.L., Dieter, M.Z., Solís W, A.,Yang, Y. & Dalton, T. P. 2000. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [*Ah*] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **59**:65-85.
- Nebert, D.W. 2002. Transcription factors and cancer: an overview. *Toxicology* **181-182**:131-141.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. & Snader, K.M. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* **17**:215-234.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. & Snader, K.M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* **66**:1022-1037.
- Nicolaou, K.C., Guy, R. K & Potier, P. 1996. Taxoids: New weapons against cancer. *Sci. American* **274**: 84-88.
- Nowell, P.C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**:23-28.
- Oberlies, N. H. & Kroll, D.J. 2004. Camptothecin and Taxol: historic achievements in natural products research. *J. Nat. Prod.* **67**:129-135.
- Oncopharm Corporation. 2003. http://www.oncopharm.com/.
- Park, O.J. & Surh, Y-J. 2004. Chemoprotective potential of epigallocatechin gallate and genistein: evidence from epidemiological and laboratory studies. *Tocicology Lett.* **150**:43-56.
- Parkin D.M., Bray, F.I. & Devesa, S.S. 2001. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur. J. Cancer* **37**:S4-S66.
- Parkin, D.M., Pisani, P., Muñoz, N. & Ferlay, I. 1999. The global health burden of infection associated cancers. *Cancer Surv.* **33**:5-33.

- Perdue, R.E. 1976. Procurement of plant materials for antitumor screening. *Cancer Treat Rep.* **60**:987-998.
- Perez-Castorena, A. L. & Maldonado, E. 2003. Triterpenes and flavonoid glycosides from *Cuphea wrigtii*. *Biochemical Systematic and Ecology.* **31**:331-334.
- Peto, J. 2001. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* **411**: 390-5.
- Phillipson, D.J. 2003. 50 years of medicinal plant research–every progress in methodology is a progress in science. *Planta Med.* **69**:491-495.
- Pisters, K.M., Newman, R.A., Coldman, B., Shin, D.M., Khuri, F.R., Hong, W.K., Glisson, B.S. & Lee, J. S. 2001. Phase I trial of oral green tea extract in adult patients with solid tumours. *J. Clin. Oncol.* **19**:1830-1838.
- Pommier, Y. 1993. DNA topoisomerases I & II in cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* **32**:103-112.
- Ponder, B. A. 2001. Cancer genetics. *Nature* **411**:236-341.
- Pouchert, C. J. & Behnke, J. 1993. The Aldrich Library of ^{13}C and ^{1}H FT NMR Spectra. Edition I. Aldrich Chemical Co Inc, USA.
- Powell, R.G., Weisleder, D. & Smith. C. R. Jr. 1972. Antitumor alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia*. Structure and activity. *J. Pharm. Sci.* **61**:1227-1230.
- Prance, G.T. 1977. Floristic inventory of the tropics; Where do we stand? *Ann. Missouri Bot. Garden* **64**:659-84.
- Raje, N. & Anderson, K.C. 2002. Thalidomide and immunomodulatory drugs as cancer therapy. *Curr. Opin. Oncol.* **14**:635-640.

- Rizk, A.M. 1982. Constituents of plants growing in Qatar. I. A chemical survey of sixty plants. *Fitoterapia* **53**:35-44.
- Rosenberg, S. A. 2001. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* **411**:380-384.
- Rowinsky, E. K. & Donehower, R. C. 1995. Paclitaxel. *N. Engl. J. Med.* **443**:1004 - 1014.
- Sakagami, Y., Murata, H., Nakanishi, T., Inatomi, Y., Watabe, K., Iinuma, M., et al. 2001. Inhibitory effect of plant extracts on production of verotoxin by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Health Science* **47**:473-477.
- Santhi, K., Dhanaraj, S.A., Joseph, V., Ponnusankar, S. & Suresh, B. 2002. A study on the preparation and anti-tumor efficacy of bovine serum albumin nanospheres containing 5-fluorouracil. *Drug development and Industry Pharmacy* **28**:1171-1179.
- SEMARNAT, 1997. http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/CupheaAequipetala.htlm
- Shi, L.M., Myers, T.G., Fan, Y., O'Connor, P.M., Paull, K.D., Friend, S.H. & Weinstein, J.N. 1998. Mining the National Cancer Institute anticancer drug discovery database: Cluster analysis of Ellipticine analogs with p53-inverse and central nervous system-selective patterns of activity. *Mol. Phar.* **53**:241-251.
- Shu, Y-Z. 1998. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.* **61**:1053-1071.
- Silva, J.S., Moura, M.D., Oliveira, R.A.G., Diniz, M.F.F. & Barbosa-Filho, J. M. 2003. Natural product inhibitors of ovarian neoplasia. *Phytomedicine* **10**:221-232.

- Silverstein, R. M., Bassler, G. C. Morril, T.C. 1981Spectrometric Identification of Organic Compounds. *John Wiley and Sons Inc*. New York.
- Suffness, M. & Douros, J. 1982. Current status of the NCI plant and animal product program. *J. Nat. Prod.* **45**:1-14.
- Suffness, M. & Pezutto, J. M. 1991. Assays related to cancer drug discovery. In "Methods in Plant Biochemistry". Hostettmann, K., ed. Academic Press Limited. Vol **6**. pp71-133.
- Surh, Y.J. 2003. Cancer chemoprotection with dietary phytochemicals. *Nature Rev. Cancer* **3**:768-780.
- Surh,Y-J. 1999. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mut. Res.* **428**:305-307.
- Tang, W., Hemm, I. & Bertram, B. 2003. Recent development of antitumor agents from Chinese herbal medicines: Part I. Low molecular compounds. *Planta Med.* **69**:97-108.
- Tannock, I. F. & Hill, R. P. 1998. The Basic Science of Oncology. 3rd edition. *McGraw-Hill*. USA.
- Torroella, K. M. & Villa, T. S. 1998. Bases Genéticas del Cáncer. *Fondo de Cultura Económica*. México.
- Trichopoulos, D., Li, F.P. & Hunter, D.J. 1996. What causes cancer? *Sci. American* **275**:50-57.
- Vann Mannen, J.M., Retel, J., de Vries, J. & Pinedo, H.M. 1988. Mechanism of action of antitumor drug etoposide. A review. *J. Nat. Cancer. Inst.* **80**:1526-1533.

- Velasco, L.R., Tapia, A. R. & Vega, A. E. 2004. Aspectos históricos para el uso de las plantas medicinales. *Contactos* **51**:11-20.
- Villarreal, M.L. Alonso, D., Melesio, G. 1992. Cytotoxic activity of some Mexican plants used in tradional medicine. *Fitoterapia* **63**:518-22.
- Wagner, H., Bladt, S. & Zgainski. E.M. 1984. A Thin Layer Cromatography Atlas. Spring Verlang.
- Walboomers, J. M., Jacobs, M.V., Manos, M. M, et al. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol* **189**:12-19.
- Wall, M.E., Wani, M.C., Cook, C.E., Palmer, K.H., McPhail, A.T. & Sim, G.A. 1966. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J. Am. Chem. Soc.* **88**:3888-3890.
- Wang, C. C., Chen, L. G. & Yang, L.L. 1999. Antitumor activity of four macrocyclic ellagitannins from *Cuphea hyssopifolia*. *Cancer Letters* **140**:195-200.
- Wang, C.C., Chen, LG. & Yang, L.L. 2000. Cuphiin D1, the macrocyclic hydrolysable tannin induced apoptosis in HL-60 cell line. *Cancer Letters* **149**: 77-83.
- Wang, C.C., Chen, L.G. & Yang, L.L. 2002. *In vitro* immunomodulatory effects of cuphiin D1 on human mononuclear cells. *Anticancer Research* **22**: 4233-4236.
- Wang, C.C., Chen, L. G. & Yang, L.L. 2002a. Cytotoxic effects of cuphiin D1 on the growth of human cervical carcinoma and normal cells. *Anticancer Research* **22**: 2677-2684.

- Warber, S. 1999. Models of action at target sites. In "Natural Products from Plants". Kaufman, P., Cseke, L.J., Warber, S., Duke, J.A. & Brielmann, H.L. eds. *CRC Press*. pp 158-181.
- Waterman, P., Mole, S. 1994. Analysis of Peholic Plant Metabolites. *Backwell Scientific Publications*. USA.
- Weinberg, R. 1996. How cancer arises. *Sci. American* **275**:32-40.
- Westcott, N. D & Muir, A. D. 2003. Flax: The genus Linum. Taylos & Francis Group.
- Wong, R., Sagar, C.M. & Sagar, S.M. 2001. Integration of Chinase medicine into supportive cancer care: A modern role for an ancient tradition. *Cancer Treatments Reviews* **27**:235-246.
- World Cancer Research Found (WCRF) Panel. 1997: Diet, Nutrition and the Prevention of Cancer. A Global Perspective. Washington, USA. World Cancer Research Fund.
- Yang, L/L., Wang, C.C., Yen, K-Y., Yoshida, T., Hatano, T. & Okuda, T. 1999. Antitumor activities of ellagitannins on tumor cell lines. In "Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Ecology". Gross, G.G., Hemingway, R.W. & Yoshida, T. Academic Plenum Publishers. 615-641.
- Yanhua, P., Changgong, L., Lihong, C., Said, S. & Jiandong, C. 2003. Rescue of mutant p53 transcription function by ellipticine. *Oncogene* **22**:4478-4487.
- Yoshizawa, H., Suzuki, E. & Arakawa, M. 1998. Early phase II study of FK352 in cisplatin-induced nephropathy. Niigata Prefecture FK352 study group. *Cancer & Chemotherapy* **25**:2085-2094.

- You, W.C., Blot, W.J., Chang, Y.Sl. 1989. Allium vegetables and reduced risk of stomach cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**:162-164.
- Zhang, B., Li, X., Nakama, H., Zhang, X., Wei, N., Zhang, X. & Xhang, L. 2002. A case-control study on risk of changing food consumtion for colorectal cancer. *Cancer Invest.* **20**:458-463.
- Zhou, D.C., Zittoun, R. & Marie, J.P. 1995. Homoharringtonine: an effective new natural product in cancer chemotherapy. *Bull. Cancer* **82**:987-995.

APÉNDICE 1

Compilación de plantas mexicanas empleadas contra enfermedades con sintomatología

Nombre Científico	Nombre común	Parte empleada	Preparación	Enfermedad
Alternathera ramosissima (Mart). Chad.	Chac-mo-al			Tumores
Gomphrena decumbens Jacq.	Hierba del cáncer de México	Hojas	Cataplasmas o decocción	Úlceras cancerosas
Agave americana L.	Maguey	Jugo de las hojas		Úlceras cancerosas
Agave sp.	Teoamatl, maguey, maguey chichimeco, duba xha (en Tehuantepec)	Jugo de la corteza, hojas, corteza	Decocción, lavados	Tumores, Tumores internos
Metopium brownei Urb.		Corteza		
Narcisus sp.	Axochitl			Tumores
Anacardium occidentale L.	Marañón	Pericarpio, jugo		Verrugas
Comocladia engleriana Loes.	Cinco negritos	Savia		Verrugas
Rhus terebinthifolia Schlecht & Cham	Quauhchichioalli	Polvo		Úlceras cancerosas
Schinus molle L.	Schinus			Tumores
Echites yucatanensis Stand.		Látex (hoja)		Usado contra granos, verrugas
Tabernaemontana citrifolia L.	Cojón de gato, lecherillo	Látex		Verrugas
Thevetia ahouia A.D.C.		Hojas y partes aéreas		Verrugas

Thevetia thevetioides (H.B.K)	Codo de fraile, venenillo, yoyote,	Hojas, semillas		Tumores
Thevetia gaumeri Hemsley		Hojas y partes aéreas		Verrugas
Thevetia peruviana Schum		Hojas, partes aéreas		Destruir tumores
Thevetia yacotli A.D.C.	Yoyotli, yoyote	Hojas		Tumores
Posiblemente sea una apocinacea	Conguricua			Úlceras cancerosas de partes sexuales (Michoacán)
Spathiphyllum sp.	Hierba del manso		Decocción	Cáncer, empleado por tribu Yaqui.
Aristolochia odoratissima L.	Hoehoetzontecomatl, cacanac, xoclütl, Aconextzon, tzonpantli	Raíz	Ungüento	Tumores
Aristolochia so. O spp.	Tomahuactlacopatli, totomahuac, tlatlacopatli	Raíz	Emplasto	Tumores
Asclepias curassavica L.	Ponchishuis, cancerillo, clülillo-xiu, cancerillo, algodoncillo rojo	Hojas, raíz	Fresca, pulverizada fresca, decocción	Cáncer de estómago, intestino, útero y riñón
Asclepias glaucescens H.B.K.	Cenanan (el quinto), cenantli, quauhnahuacense, tozampotzali, quantaxuqua	Leche		Cáncer, tumores
Asclepias lanuginosa H.B.K.	Cenanan tetzcoquense, cenanan de Tezcuco cenantli; centlinan, centli yuan			Tumores
Asclepiaas verticillata L.	Yamanquipahtli Tepeacoxoyatl	Jugo		Condiloma, tumores
Gonolobus pedunculatus Hemsl	Ttallayotli	Raíz	Emplasto	Tumores

Tabetula rosea D.C.		Corteza		Cáncer uterino
Bixa orellana L.	Tlapalachiyotl, achiotl, changuarica, pamaqua	Semillas	Pócima	Condiloma, tumores
*Bourreria huanita (*Llave & Lex) Hemsl.	Yzquixochitl	Corteza	Pócima	Condiloma
Heliotropium curassavicum L.	Queyauhquilitl	Hoja	Triturado	Úlceras cancerosas
Heliotropium sp (?)	Totecyxiuh	Jugo		Tumores de mama
Lithospermum sp (?)	Zacazilin	Raíz		Tumores
Tournefortia capitata Mart. &Gal.	Tlachichinoa			Cáncer de útero
Tournefortia mexicana Vatke			Polvo para cataplasmas o inyección	Cáncer
Tournefortia umbelatta H.B.K.				Tumores (México)
Bursera fagaroides (H.B.K) Engl. *Elaphrium fagaroides* H.B.K..	Yztacquauhxiotl, changuarica, pamaqua iztac quauhxiotl, palo leproso, árbol leproso	Goma		Tumores
Bursera tecomaca (D.C.) Standl. *(Elphrium tecomaca* (D.C.) Standl.	Yztac quauhxiotl, palo leproso, árbol leproso	Goma		Tumores
Simmondsia chinensis (Link) Schneid.	Jojoba	Aceite		Cáncer, citando a Clavijero, 1789.
Lophocereus schottii (Engelm) Britt&Rose.	Totem pole, cactus, cinita, sinita, cana, cancerina	Parte aérea	Decocción para beber o lavados	Cáncer, Cáncer de intestinos
Mammillaria geminispina Haw *(Mamillaria bicolor* Lehm.)	Metzollin, hoeicomitl	Jugo, leche		Carnosidades en los o
Neomammillaria spp.		Savia		Verrugas
Pachycereus pecten-aboriginum (Engelm.) Britt & Rose.	Pitahayo, cardón, cactus, órgano	Partes aéreas	Hecho en una bebida	Cáncer
Pachyycereus pringlei (Wats.)			Decocción para	Cáncer de útero. Una

			enema y administración oral	paciente en buen estad de salud (1961)
Especie no identificada	Musaro, echo (cactus)		Decocción para beber	Cáncer. Reporte de 2 casos curados
Canna indica L.	Tozcuitlapilxochitl, cocoyotzin			Tumores
Drymaria gracilis Cham & Schltdl		Hojas y partes aéreas		Tumores
Carica papaya L.	Chich-put, papaw, papaya	Goma, hoja		Tumoraciones rojas o úlceras (mayas)
Drymaria cordata L. Willd.	Ahuachpatli			Tumores
Maytenus trichotoma Turcz.		Planta completa		Agente antitumoral
Stellaria nemorum L.	Cococaton	Jugo		Tumores
Stellaria spp	Aoachcueton			Tumores
Beta vulgaris L. var. crassa Alef.	Remolacha	Jugo		Carcinoma de pulmón
Terminala catappa L.	Almendro	Partes aéreas	Pócima	Condiloma
Commelina spp.	Matlalitztic de Tezcuco	Raíz	Emplasto	
Achillea millefolium L.	Tlalquequetzal		Polvo	Tumor
Baccharis glutinosa Pers.	Axixtlacotl, quapopoltzin, iztacxihuatl, vara diurética			Tumor
Calendula officinalis L.	Mercadela	Hojas, flores, jugo	Decocción en leche	Cáncer
Conyza filaginoides (D. C.)	Tzonpopoto			Carnosidades
Dahlia Cariabilis Desf.	Acocotli,			Tumores

	quauhnahuacense, chichipatli			
Gnaphalium conoideum H.B.K.	Gordolobo			Cáncer (Empleado en Arizona por Mexicano indios)
Mikania micrantha H.B.K.	Uahkoxiu	Planta completa		Tumores (Yucatán)
Montanoa tormentosa Cerv.	Cihoapactli sinhuapastli, zoapatle, zoapatli			Tumores de estómago, fibromas uterinos, tumores uterinos
Senecio bellidifolius	Chucaca	Planta completa	Mezclado con aceite de oliva para usarlo como emplasto	Tumores. Medicina na de México. 1946
Tagetes lucida Cav. (?)	Yauhtli, tzitziqui		Triturado	Tumores
Tagetes sp.	Rosa del ángel	Hojas	Decocción para fomentos	Canceres, llagas
Verbesina crocata (Cav.) Less* * de acuerdo a Maximino Martínez	Nauhtepotzet	Hojas	Emplasto	Tumor
Especie no determinada.	Atziyatl, campozahuac de quauhquechulla, medicina de los tumores	Hojas		Tumor
Especie no determinada	Campozactli, yacapichtlense			Tumores
Ipomea sp.	Atezcanenxochitl			Tumores
Cornus urbiniana Rose	Chichicquahuitl	Hojas	Untado	Tumores
Colyledon umbilicus L.	Ombligo de Venus	Pulpa		Granos
Seddum acre L.		Jugo		Granos
Seddum spp (?)	Siempreviva	Hojas	Triturado	Granos (medicina tradicional de hispano americanos de Nuevo México

Sempervivum tectorum L.		Pulpa		Granos
Brassica oleracea L.	Col	Partes aéreas	Espolvoreado	Cáncer (remedio usad por los Mayas)
Dithraea wislizeni Engelm.			Lociones, emplasto o ungüento	Granos (usado por los indios Navajo de Nue México)
Sisymbrium nasturtium L.	Berros		Emplasto	Tumores glandulares
Dioscorea alata L (?)	Tepatli	Raíz		Tumores
Equisetum arvense L.	vara de oro			Cáncer (1959)
Acalypha californica Benth.		Hojas		Cáncer
Acalypha hederacea	Yerba del (de) cáncer (nombre común desde 1940)			Cáncer
Acalypha hypogaea	Yerba de cáncer (nombre común desde 1937)			Cáncer
Acalypha phleoides Cav.	Yerba del cáncer;, castañuela		Decocción para lavados	Cáncer (1847)
Acalypha langiana Muell. Arg.	Hierba del cáncer			Cáncer (nombre comú
Acalypha lindheimeri	Yerba del (de) cáncer			Cáncer (nombre comú desde 1941)
Acalypha phleoides Cav.	Hierba del cáncer			Cáncer (en Sinaloa)
Cnidoscolus chayamansa McVaugh				
Croton cortesianus H.B.K.	Chilpatli	Jugo, hojas, leche		Verrugas, tumores, úlceras cancerosas
Croton flavens L.		Hojas		Verrugas
Croton morifolius Wild.	Palillo			Dolor de estómago, cáncer
Euphorbia campestris Cham et Schlecht	Cucultzin			Carnosidades en los o

Euphorbia heterophylla L.		Partes aéreas		Verrugas
Euphorbia hypericifolia L.	Acocotli quaunhnahuacense (el segundo), mememyain	Leche		Tumores, carnosidade
Euphorbia lathyris L.	Tártago	Jugo		Verrugas
Euphorbia maculata L (?)	Xpakumpak			Verrugas (citando un trabajo de 1834)
Euphorbia maculata L	Yerba de la golondrina			Verrugas (hispano-americanos de Nuevo México).
Euphorbia pilulifera L.				Carnosidades en los oj
Euphorbia postrata Ait.				Carnosidades en los oj
Euphorbia serphyllifolia Pers.	Yerba de la golondrina	Partes aéreas, raíz	Savia	Cáncer (Hispanoamericanos d Nuevo México)
Euphorbia sp y spp (?)	Memeya, ocopetlayucense, yxpapachca, memeya quauhnahuacense	Leche, raíz		Tumores, cáncer
Hura polyandra Hill.		Hojas		Verrugas
Jatropha canescens Muell. Arg.		Jugo		Verrugas
Mannihot esculenta Crantz (Manihot utilissima)	Quauhayohuachti	Jugo		Carnosidades en los oj
Jatropha dioica Sesse		Raíz		Cáncer
Pedilanthus pavonis (Kl & Garcke) Boiss (?)	Chapolxochitl, mincapatli, flecha, pinipiniche	Hojas, parte aérea		Tumores
Pedilanthus tithymaloides Poit (?)	Chapolxochitl, mincapatli, flecha pinipiniche	Hojas, parte aérea		Tumores
Pedilanthus tithymaloides		Látex		Verrugas

Sapium macrocarpum Muell		Partes aéreas		Verrugas
Tragia nepetaefolia Cav	Popox			Cáncer (citando un tra de 1834)
Quercus gambelii Nutt.	Encino	Corteza	Hervido para loción	Cánceres externos (us por Hispano-american de Nuevo México)
Quercus sp. y spp.	Roble	Corteza	Decocción	Llagas cancerosas (se citan dos casos curado México)
Garrya racemosa Ramírez	Cuauchichic	Hojas		Inflamación de tumo (de acuerdo a Hernández)
Geranium carolinianum L.	Tlaltlauhcapatli	Raíz		Tumores
Isoloma deppeanum Hemsl.	Tlachichinoa			Cáncer uterino (curas reportadas)
Cenchrus tribuloides L.	Zacapolin			Tumores
Liquidambar styraciflua L.	Xochicotzoquahuitl	Savia, resina.		Tumores
Amphipterygium adstringens (Schlechts.) Schiede (?) *Juliana adstringens* (?)	Chalalactli	Corteza	Molido	Tumores
Juliana adstringens	Cuachalaláa, cuachalalate, cuachalalá, matixerán, volador	Corteza	Molido	Cáncer estomacal e intestinal
Krameria cytisoides Cav		Raíz		Cáncer de estómago
Lepechinia spicata Wild		Parte no especificad a		Tumores uterinos
Mentha sp. y spp.	Chiciantic oaxtepecense			Tumores
Salvia hispanica L.	Chía	Raíz	Polvos para	Tumores (citando a A

			cataplasmas	Baz, 1851)
Salvia indica	Hierba del cáncer de México	Hojas	Cataplasma y decocciones	Llagas cancerosas
Especie sin nombrar	Hoitzitziltapazollin			Tumores
Persea gatissima Gaertn.	Aguacate	Pulpa		Tumores
Aeschnomene fasciculares Schlecht &Cham.	Cabalpich, pega-pega	Planta completa	Decocción	Tumores (remedio ca en Yucatán)
Caesalpina pulcherrima (L.) Swartz. *(Poinciana pulcherima* (L.) Swartz).	Chamolxochitl, cacalca	Flores		Tumores
Calliandra anomala Kunth. Macbr.	Tlacoxilohxochitl, xiloxochitl, tzonxcochitl	Corteza, flores	Decocción Trituradas en agua	Condiloma, carnosida superfluas alrededor los ojos
Calliandra grandiflora. Benth.	Tlacoxilohxochitl, xiloxochitl, tzonxcochitl	Flores	Mezcladas con agua, trituradas	Carnosidades superfl alrededor de los ojos
Canavalia villosa Benth.	Cicimatic, palancapatli			Carnosidades saliente
Cassia occidentalis L.	Tlalhoaxin, ecapatli			Tumores
Centrosema pubescens Beth		Flores		Cáncer
Dalea lagopus Wild	Colcotl			Tumores
Dalea leporina Bullock		Parte no especificad a		Tumores
Dalea lutea Wild		Parte no especificad a		Tumores
Dalea plumosa S. Watts *(Parosela plumosa* S. Watts	Axixpatli (el segundo)			Tumores
Dalea sp. (?)	Zahoyacpatli	Resina	Polvo	Tumores
Desmodium parviflorum Mart & Gal.	Cimatl totopecense (el segundo)	Raíz	En agua	Tumores

Haematoxylon basiletto Karst.	Huitzquahuitl	Corteza	Decocción	Condiloma
Krameria lanceolata Torr. *(Krameria pauciflora* Moc & Sessé	Crameria			Cáncer
Myroxylon pereirae (Royle) Klotzsch	Hoitziloxitl			Tumores
Prosopis juliflora (Sw). DC (de acuerdo a Martínez)	Mizquitl	Jugo		Carnosidades superfl
Sesbania sesban (L.) Merr. *(Sesbania picta Pers).*		Hojas	Molido con aceite de castor	Inflamación, tumores
Especie no identificada	Quachtlacalhoaztli			Carnosidades en los
Aloe vulgaris Lam.	Zábila	Jugo, hojas	Cataplasma	Tumores
Schoenocaulon officinale A. Gray	Sebadilla		Polvos	Cáncer (usado por los Mayas)
Smilax cordifolia Humb & Bompl	Cozolmecatl, cocolmecatl, olcacan	Raiz	Polvo	Carnosidades superfl
Smilax mexicana Griseb (?)	Cozolmecatl, cocolmecatl, olcacan	Raíz	Polvo	Carnosidades superfl
Especie no identificada.	Zacatelpatli (el segundo), tletalia	Raíz	Triturada	Tumores
Especie no identificada	Cozticpatli huexocinense, cozcatlacuaton, cozcatlacuatzin	Hojas		Tumores
Linum usitatissimum L.	Linaza		Emoliente	Tumores en el estoma intestinos
Mentzelia sp. (?)	Zazalic de Chietla			Tumores (México, 15
Buddleia americana L.	Zayolizcan, topozan, cayolican, topocan	Raíz, corteza, hojas	Emplasto	Tumores (México, 15
Cuphea aequipetala Cav.	Apanchola, Yerba del cáncer, alcáncer		Decocción	Tumores (México, 15 Cáncer (usado por in

				y mexicanos del sure de Arizona)
Lythrum alatum Pursh.	Yerba del cáncer	Hojas	Cataplasmas y decocción	Ulceras cancerosas, Cáncer (usado por in y mexicanos del sure de Arizona
Lythrum album H.B.K.	Hierba del cáncer de México	Hojas	Cataplasmas y decocciones	Úlceras cancerosas
Nesaeu sp. (?)	Chiantzotzolco	Raíz	Pulverizada	Tumores (México, 1
Byrsonima crassifolia (L.). DC.	Nanche	Corteza	Polvo	Tumores de las pierna (citando a F. Hernánd 1652)
Gossypium indicum Lam.	Algodón	Corteza		Fibromas uterinos
Hibiscus sp (?)	Achilton			Tumores (México, 15
Sphaeralceae fendeleri A. Gray	Yerba de la negrita	Hojas	Infusión	Tumores (usado por hispano americanos d Nuevo México)
Swietenia humilis		Semillas		Cáncer
Swietenia sp.	Tzopilotzontencomatl, tzopilotl	Semillas	Líquido aceitoso	Tumores (1577)
Castilla elastica Cerv.	Holli	Resina	Pócima	Condiloma (usado po aztecas)
Cecropia mexicana Hemsl.	Coiltapalo	Jugo	Usado como emplasto	Carnosidades y verru
Cecropia spp.		Jugo		Verrugas
Dorstenia contrajerva L.	Contrahierba, tozpatli, cabalahauche, cabalhau	Raíz		Tumores
Ficus petiolaris H.B.K.	Texcalamatlchichic	Hojas, corteza	Pócima	Condiloma (usado po Aztecas)
Ficus spp		Fruto, hojas		Verrugas
Commicarpus scandens Standl.	Chiriqara, mala hierba, siricusa	Hojas, partes		Cáncer (usado por in Austeco de México;

		aéreas		
Olea europaea L.	Oliva	Aceite	Ungüento, pomada	Tumores en los dedos (usado por Hispanoamericanos d Nuevo México.
Oenthera rosea Ait.	Yerba del golpe			Cáncer (usado por mexicanos e indios nativos de Arizona)
Oenthera sp.	Coscatlacualtzin	Flores, tubérculo	Cataplasma	Tumores
Sabal japa Wright	Xan; xaan; guano			Tumores en el brazo (medicina popular M.
Argemone mexicana L.	Chicallotl	Jugo		Verrugas
Argemone ochoroleuca Swett	Chicalote, chillazotl, chilacotl, chichillotl	Jugo		Verrugas
Argemone ochoroleuca Swett		Jugo		Verrugas
Bocconia arboreae S. Watts.	Coccoxihuitl, llora sangre	Hojas, Aceite del fruto, aceite de las semillas		Verrugas de la parte sexual, tumores
Bocconia frutescens L.	Coccoxihuitl	Aceite del fruto, planta completa		Tumores
Petiveria alliacea L.	Payche, payche zorrillo, yerba de las gallinitas, zorrillo	Hojas	Cataplasma, emplasto	Tumores
Phytholacca americana L.	Yyamilin			Tumores
Phytholacca icosandra L. (*Phytholacca longisperma* Moq.)	Yyamolin			Tumores
Phytholacca octandra L.	Yyamolin			Tumores
Yyamolin rugosa A. Br. &	Yyamolin			Tumores

Broché				
Rivina humilis L.	Yerba del cáncer			Cáncer
Taxodium distichum L.		Hojas		Tumores
Taxodium mucronatum Ten.	Ahuehuete, tambor de agua	Hojas, resina, corteza	Ungüento o emplasto	Tumores, tumores de piernas, tumores de la mucosa
Genero y especie no determinada	Cedar	Hojas y jugo de la piña		Tumores de mama
Plantago hirtella Kunth		Planta completa		Enfermedades cancer
Plantago mexicana Link.	Acaxilotic			Tumores (de uso pop en México, cerca de Xochimilco)
Plumbago europea L.		Raíz		Verrugas
Rumex hymenosepalus Torr.	Canegeira	Raíz		Cáncer de piel (usado indios y mexicanos e Nuevo México)
Adiantum sp (?)	Cozticpatli adiantito, cocoztli, cocoztic	Raíz	Aguas	Cataratas
Adiantum trapeciforma	Tlalquequetzal	Jugo	Partes rastrera en agua caliente y beberla	Condiloma
Polypodium lanceolatum L.	Tlaquequetzal	Jugo	Mezclarlo en agua caliente y beberlo	Condiloma
Portulaca satina Haw.	Ancharupa	Planta completa	Triturada en vinagre	Carnosidades de la u verrugas (usado en México por los indio
Clematis dioica L.	Barbas de chivo	Raíz	Polvo	Carnosidades en la u (citando a Ximénez)
Ranunculus sp. & spp (?)	Ichcatlepatli (el cuarto)	Raíz	Triturada	Carnosidades
Ranunculus stoloniferas Hemsl.	Atlepatli			Carnosidades superfl

(?)				
Thalictrum hernandezii Tausch.	Cotzticpatli, Araxi	Raíz, jugo		Tumores, cataratas
Chrysobalanus icaco L.	Capollaxipehualli	Corteza	Pócima	Condiloma
Amygdalus communis L.	Almendro	Aceite		Tumores
Prunus capuli H.B.K.	Capollaxipechualli	Corteza	Pócima	Condiloma
Prunus sp. (?)	Cacapolton	Hojas		Tumores
Rosa spp &sp	Rosa	Hoja, aceite	Triturada	Tumores
Didymaea mexicana Hook F.	Acocoxochitl	Planta completa	Molida	Tumores
Pshychotria papantlensia Oerst. Hemsl.	Cancerillo			Se emplea en Yucatán
Sickingia rhodoclada Standl. (?)	Chupire, charapeti	Raíz	Decocción	Tumores
Exandra rhodoclada Standl. (?)	Charapeti	Raíz, hojas	Triturado	Tumores
Casimiroa edulis Llave & Lex	Zapote blanco, cochitzapotl	Semillas	Asadas y molidas	Carnosidades grandes
Casimiroa sapota Oerst.	Zapote blanco, cochitzapotl	Semillas	Asadas y molidas	Carnosidades grandes
Serjania mexicana Wild.	Quahmecatl (el segundo)			Tumores
Serjania mexicana Wild. (?)	Qualmecatl, cozcozcapatli, cozcozgig, palancapatli			Tumores
Amemopsis californica Hook. & Arn.	Yerba del manza, collar de Apache	Raíz	Pasado por agua	Cáncer (usado por inc y mexicanos en el áre Phoenix, Arizona (19
Amemopsis californica Hook. & Arn.	Yerba mansa			Cáncer (usado por mexicanos e indios en área de Tucson, Arizo (1964)
Castilleja tenuiflora Benth			Parte no especificada	Cáncer

Waltheria americana L			Ramas, hojas, raíz	Cáncer
Tropaeolum majus L			Hojas y partes aéreas	Cáncer de pulmón
Coulteri S. Wats (?)	Aquilotl	Hojas	Molida, emplasto, cataplasma	Tumores
Castilleja communis Benth. (*Castilleja arvensis* Millsp)	Hierba del cáncer			Tumores (Yucatán)
Veronica americans Schwein (?)	Tonalxihuitl, yacapichtlense			Tumores
Capsicum frutescens var. longum Bailey	Chile, chili			Tumores internos (us por los aztecas, de acuerdo con F. Hernández). Usado p Hispanoamericanos d Nuevo México
Datura arborea L.	Floripondio	Hojas	Cataplasma	Tumores
Nicotina rustica L.	Picietl, taunaco	Hojas	Emplasto	Verrugas cancerosas, induraciones y ulcera
Nicotina sp. & spp	Yetecompatli			Tumores
Physalis nicandroides Schecht. (?)	Coyotomatl			Tumores
Physalis sp. (?)	Totomaton			Tumores
Solanum somniculentum Kunze (?)	Quauyacahtli			Tumores
Solanum or Physalis sp: (prob)	Ayacachtomatl			Tumores
Solanum sp & spp (?)	Toonchichi			Tumores
Ayenia pusilla L.	Hierba del cáncer			Sinaloa, no hay datos sobre los usos
Arracacia aegopodioidese (H.B.K) Coult. & Rose (?)	Pipitzatli, hoeitzitziquilitl		Decocción	Tumores
Petroselinum sp (?)	Perejil	Hojas		Tumores

Urtica chamaedryoides Pursch (?)	Yohuayantzitzicaztli		Triturada	Tumores
Valeriana ceratophylla H.B.K.	Valeriana	Raíz	Cataplasma	Tumores
Lipia cuneifolia (Torr). Steud.	Planta del cáncer			Cáncer
Verbena litoralis H.B.K.	Verbena del campo	Varas	Decocción para beber	Tumores internos
Verbena officinalis L.	Chichiantic			Tumores
Vitis sp & spp.	Pasas de uva	Fruto	Decocción	Tumores internos (refiriéndose a una publicación de 1837.
Geranium carolinianum L.	Tlaltlauhcapatli	Raíz		Tumores
Isoloma deppeanum Hemsl.	Tlachichinoa			Cáncer uterino (curas reportadas)
Cenchrus tribuloides L.	Zacapolin			Tumores
Liquidambar styraciflua L.	Xochicotzoquahuitl	Savia, resina.		Tumores
Amphipterygium adstringens (Schlechts.) Schiede (?) *Juliana adstringens* (?)	Chalalactli	Corteza	Molido	Tumores
Juliana adstringens	Cuachalaláa, cuachalalate, cuachalalá, matixerán, volador	Corteza	Molido	Cáncer estomacal e intestinal
Krameria cytisoides Cav		Raíz		Cáncer de estómago
Lepechinia spicata Wild		Parte no especificada		Tumores uterinos
Mentha sp. y spp.	Chiciantic oaxtepecense			Tumores
Salvia hispanica L.	Chía	Raíz	Polvos para cataplasmas	Tumores (citando a A Baz, 1851)

Salvia indica	Hierba del cáncer de México	Hojas	Cataplasma y decocciones	Llagas cancerosas
Especie sin nombrar	Hoitzitziltapazollin			Tumores
Persea gatissima Gaertn.	Aguacate	Pulpa		Tumores
Aeschnomene fasciculares Schlecht &Cham.	Cabalpich, pega-pega	Planta completa	Decocción	Tumores (remedio ca en Yucatán)
Caesalpina pulcherrima (L.) Swartz. *(Poinciana pulcherima* (L.) Swartz).	Chamolxochitl, cacalca	Flores		Tumores
Calliandra anomala Kunth. Macbr.	Tlacoxilohxochitl, xiloxochitl, tzonxcochitl	Corteza, flores	Decocción Trituradas en agua	Condiloma, carnosida superfluas alrededor los ojos
Calliandra grandiflora. Benth.	Tlacoxilohxochitl, xiloxochitl, tzonxcochitl	Flores	Mezcladas con agua, trituradas	Carnosidades superfl alrededor de los ojos
Canavalia villosa Benth.	Cicimatic, palancapatli			Carnosidades saliente
Cassia occidentalis L.	Tlalhoaxin, ecapatli			Tumores
Centrosema pubescens Beth		Flores		Cáncer
Dalea lagopus Wild	Colcotl			Tumores
Dalea leporina Bullock		Parte no especificad a		Tumores
Dalea lutea Wild		Parte no especificad a		Tumores
Dalea plumosa S. Watts *(Parosela plumosa* S. Watts	Axixpatli (el segundo)			Tumores
Dalea sp. (?)	Zahoyacpatli	Resina	Polvo	Tumores
Desmodium parviflorum Mart & Gal.	Cimatl totopecense (el segundo)	Raíz	En agua	Tumores
Haematoxylon basiletto Karst.	Huitzquahuitl	Corteza	Decocción	Condiloma

Krameria lanceolata Torr. *(Krameria pauciflora* Moc & Sessé	Crameria			Cáncer
Vitis tiliaefolia Humb & Bompl (?)	Ceoalchichiltic, xocomecatl	Hojas		Tumores

Hartwell, 1967; Hartwell, 1968, Hartwell, 1969; Hartwell, 1969b; Hartwell, 1969c; Hartwell, 1970; Hartwell, 1970b; Hartwell
Hartwell, 1971c; Graham et al, 2000.

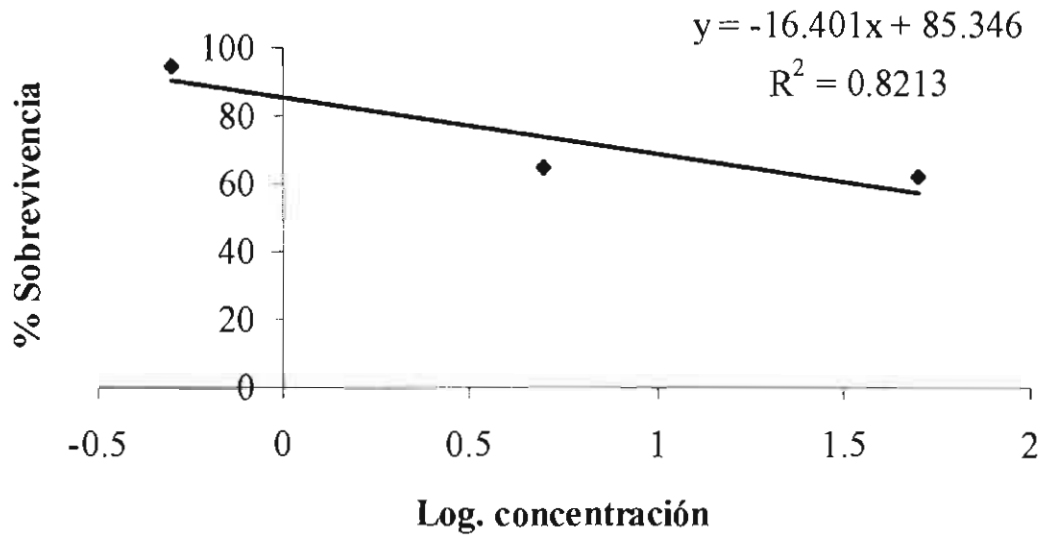


Figura 18. Efecto del extracto AcOEt de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular HEp-2.

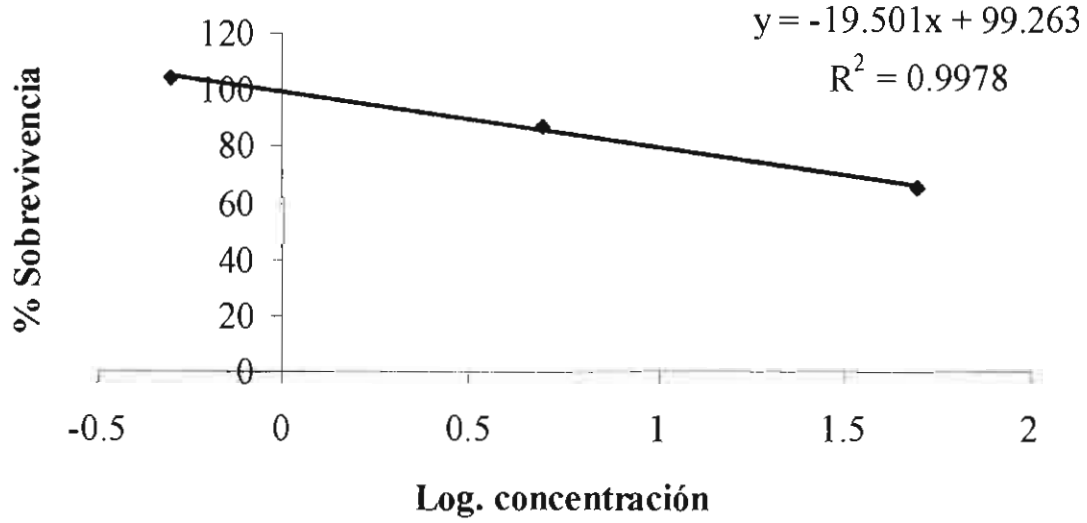


Figura 19. Efecto del extracto acuoso de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular HEp-2.

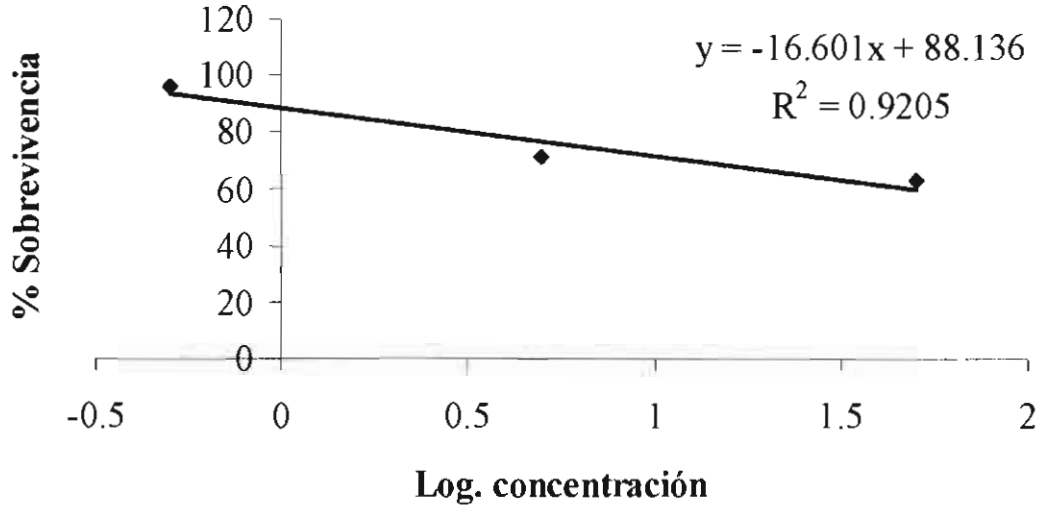


Figura 20. Efecto de la Fracción VIII° de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular HEp-2.

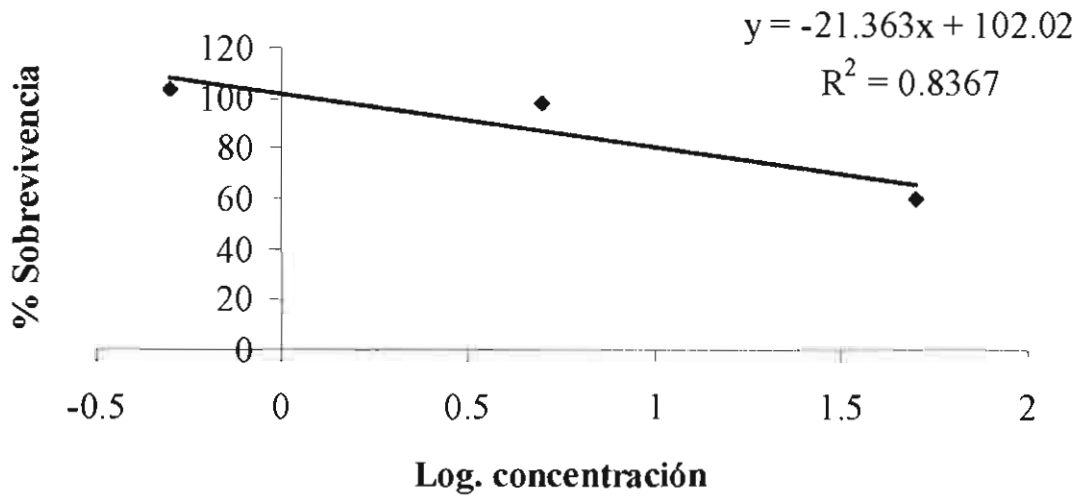


Figura 21. Efecto de la fracción VIII-4 de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular HEp-2.

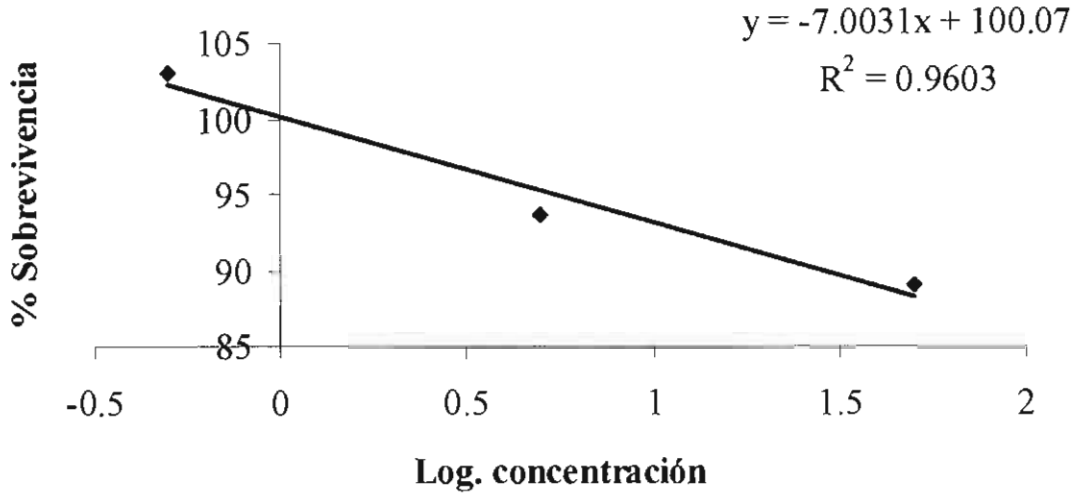


Figura 22. Efecto de la fracción VIII de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular HEp-2.

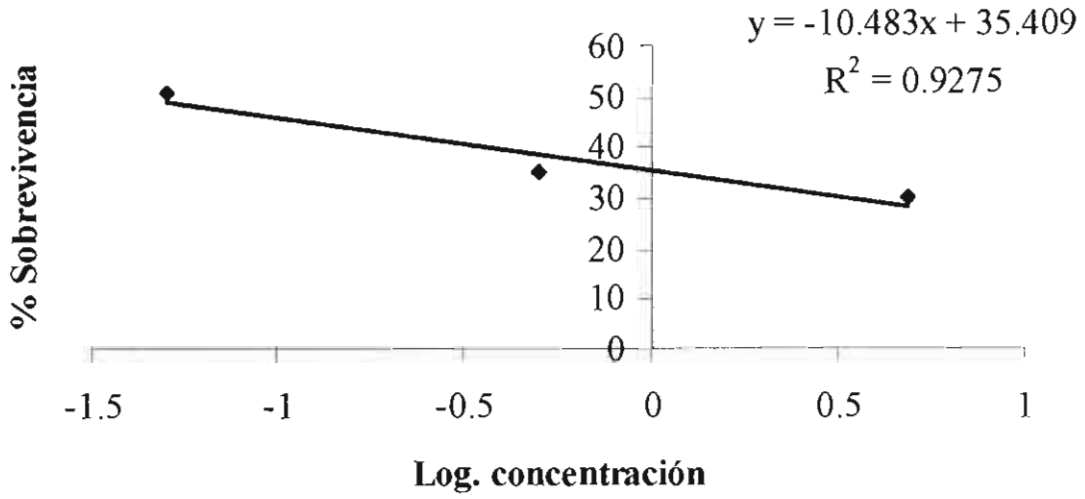


Figura 23. Efecto de la colchicina sobre el cultivo celular HEp-2.

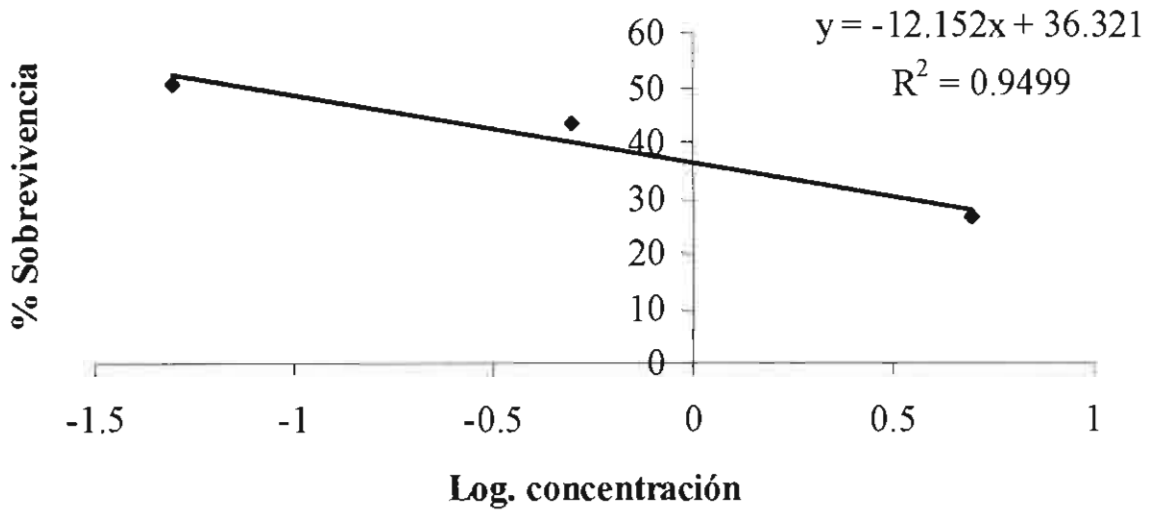


Figura 24. Efecto de la Colchicina sobre el cultivo celular HCT-15.

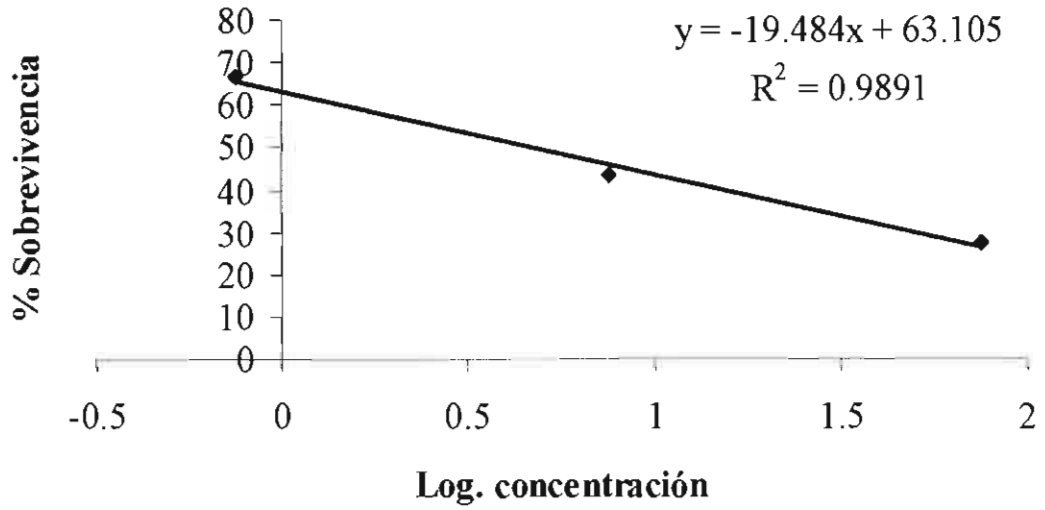


Figura 25. Efecto de la Fracción VIII-4 de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular HCT-15.

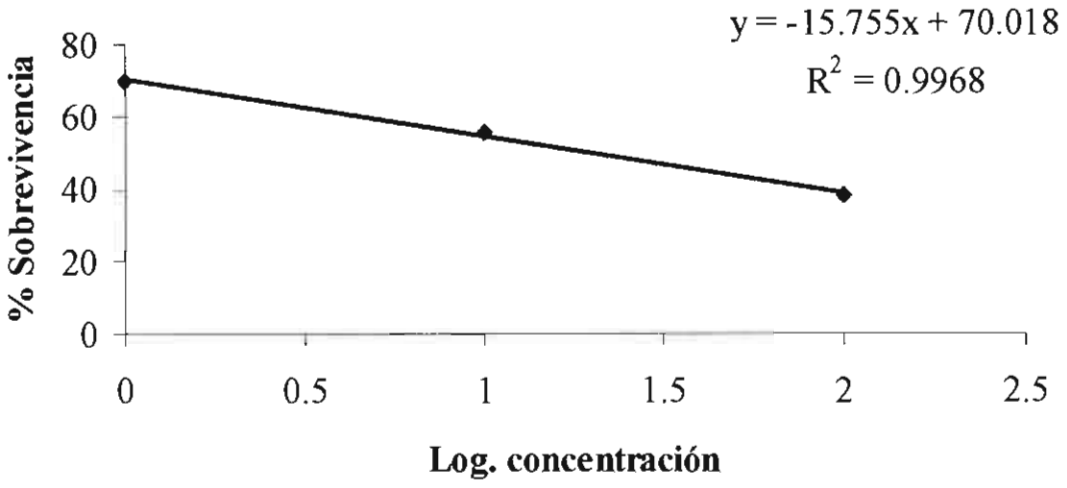


Figura 26. Efecto de la Fracción VIII de *C. aequipetala* sobre el cultivo de células cancerosas HCT-15.

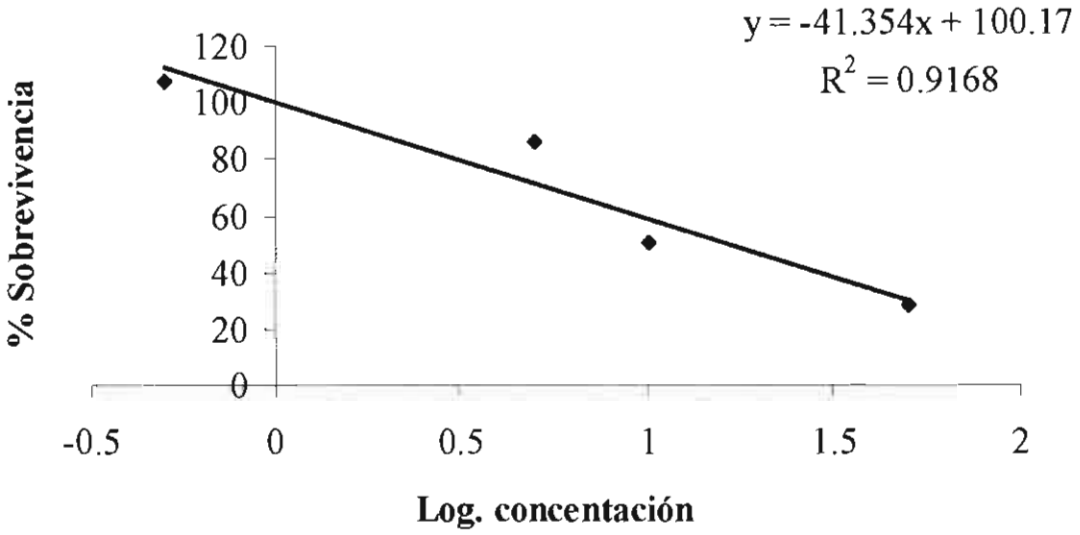


Figura 27. Efecto de la Fracción VIII° de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular HCT-15.

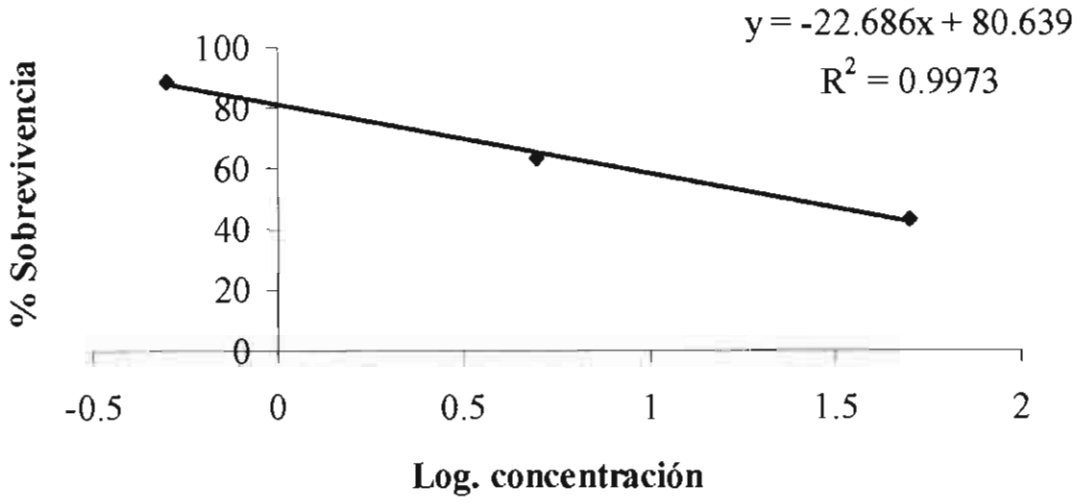


Figura 28. Efecto del extracto de Acetato de etilo de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular HCT-15.

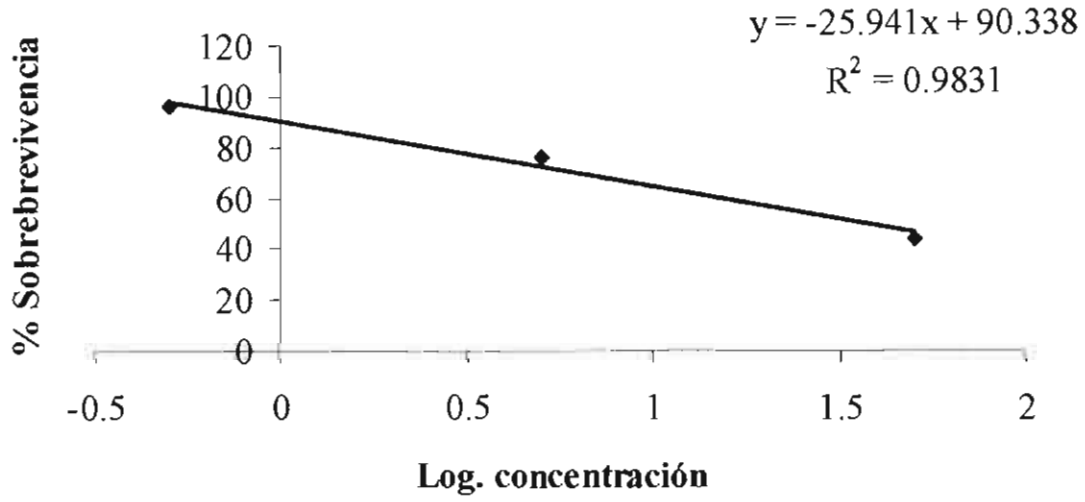


Figura 29. Efecto del extracto acuoso de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular HCT-15.

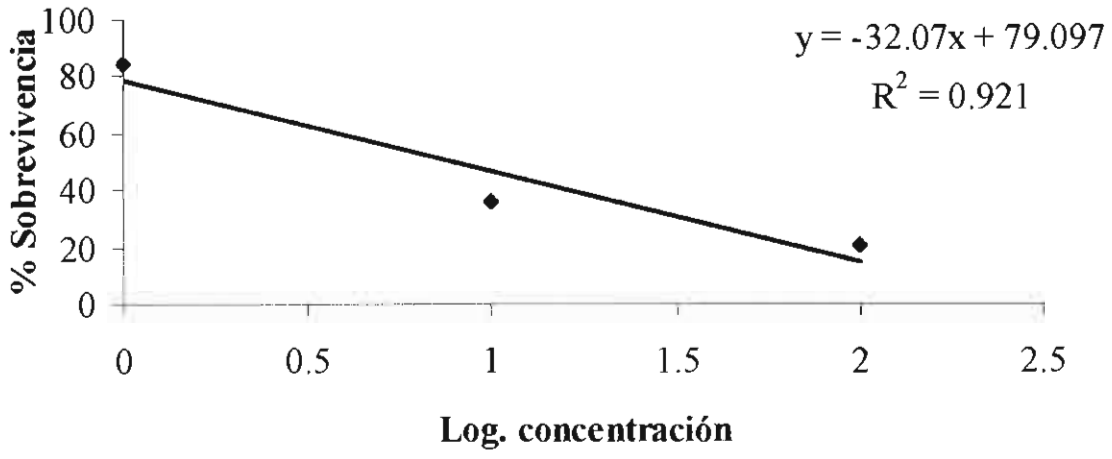


Figura 30. Efecto del extracto acetona-agua (CG) de *C. aquipetala* sobre el cultivo celular DU-145.

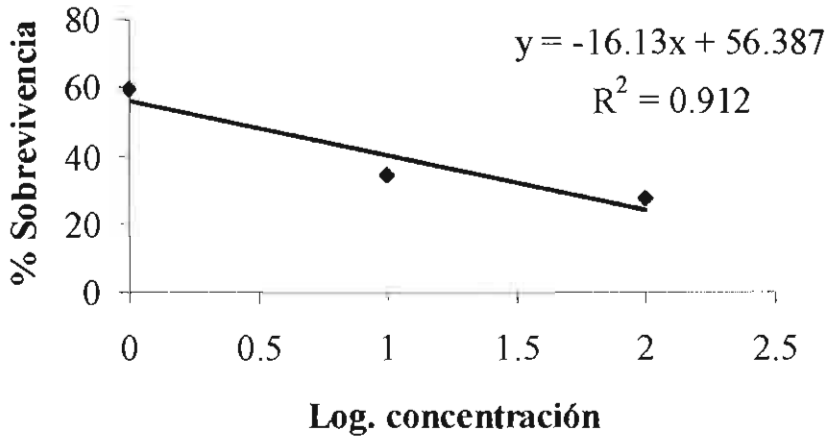


Figura 31. Efecto de la fracción PB de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular DU-145.

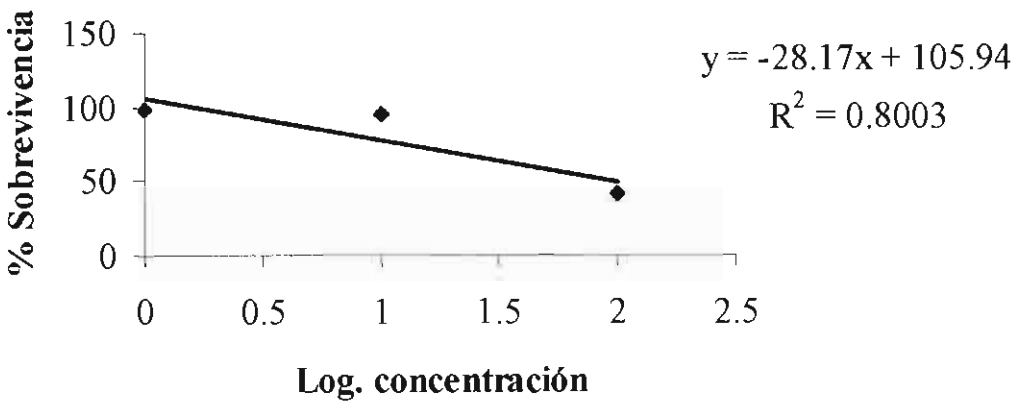


Figura 32. Efecto de la fracción PB2 de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular DU-145

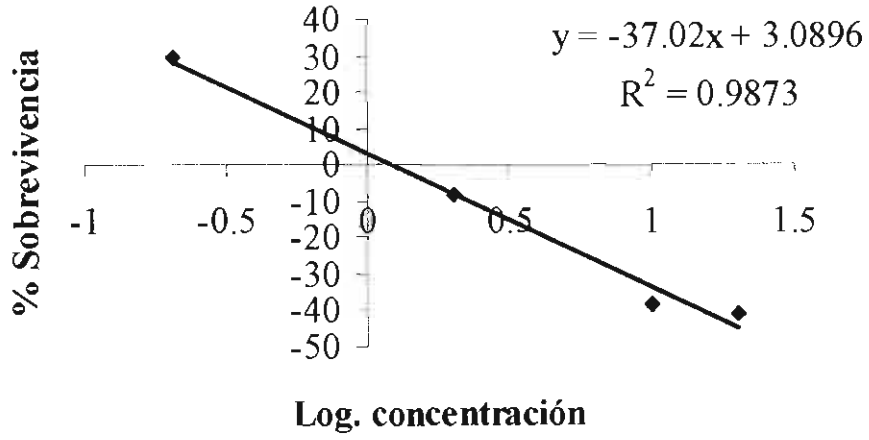


Figura 14. Efecto de la Colchicina sobre el cultivo celular DU-145.

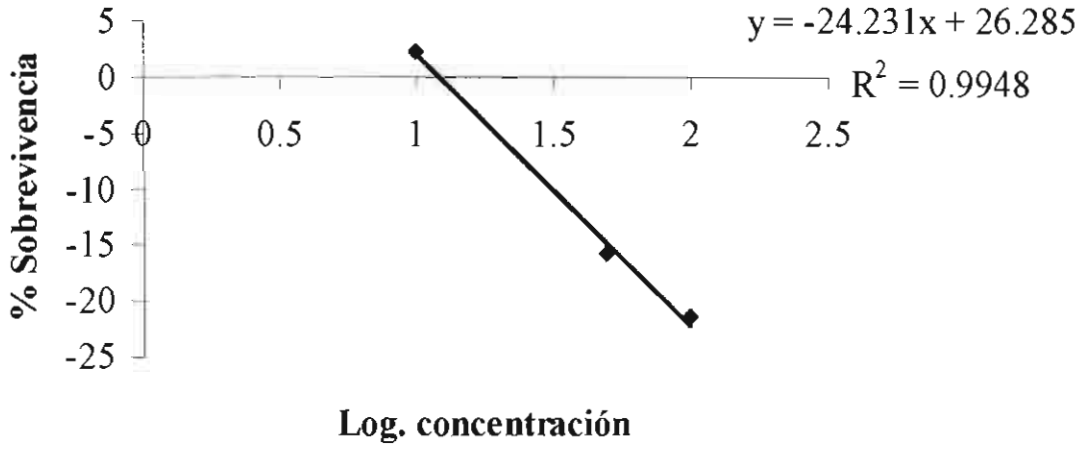


Figura 33. Efecto de la fracción PB5 de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular DU-145.

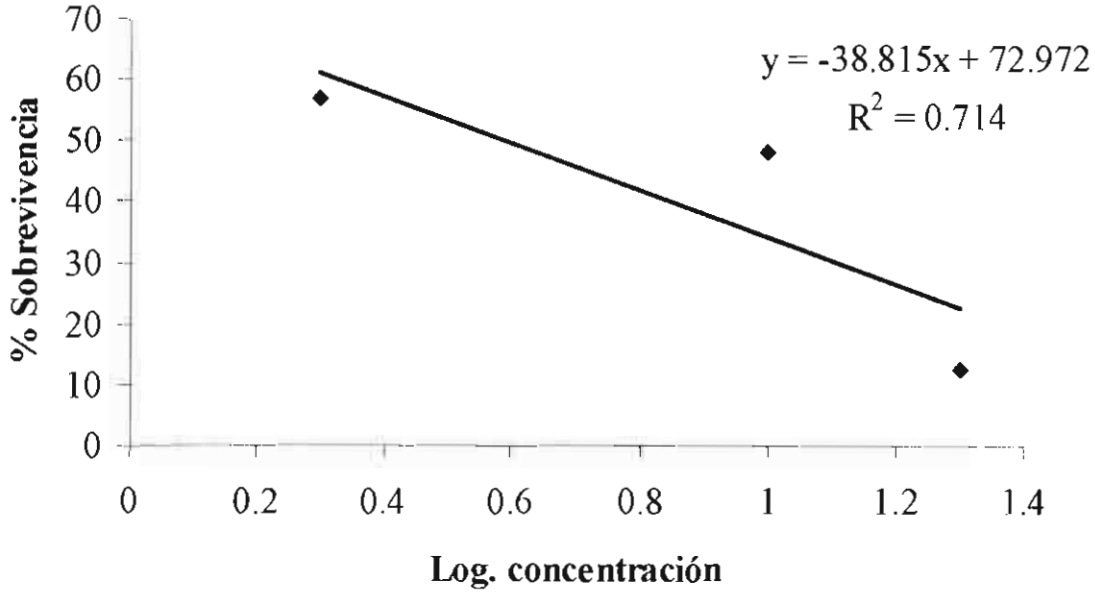


Figura 34. Efecto del compuesto SM3 de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular DU-145.

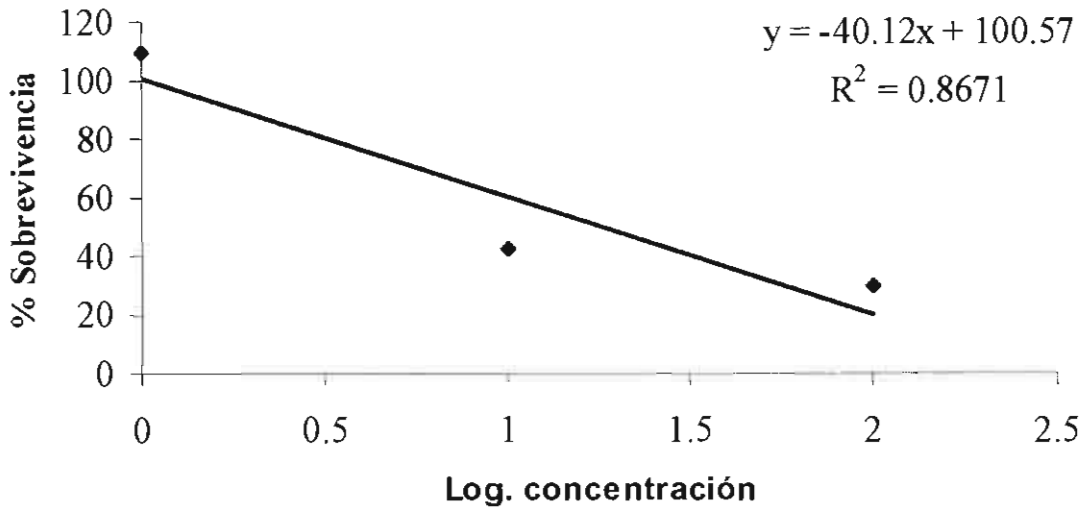


Figura 35. Efecto de la fracción PB4 de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular DU-145.

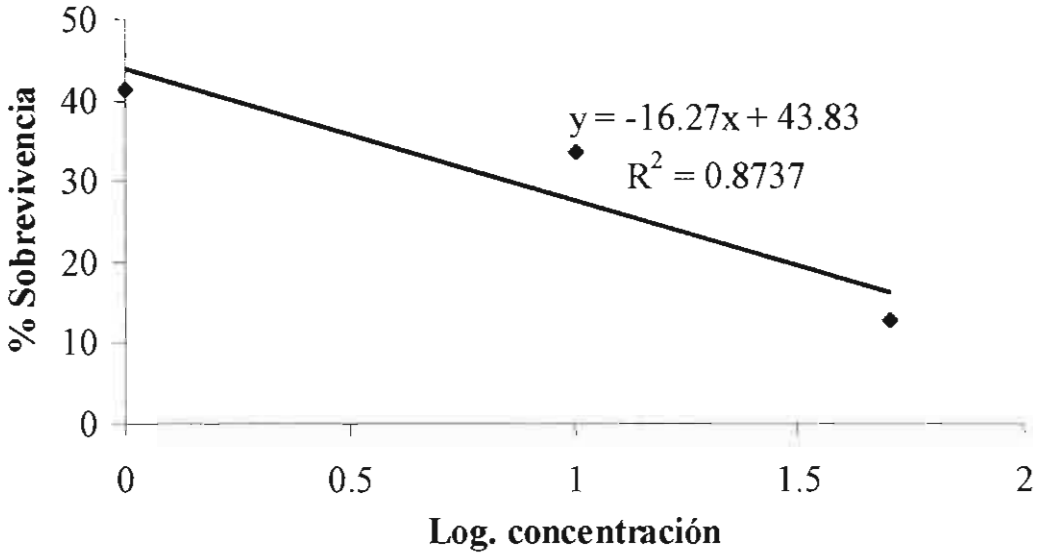


Figura 36. Efecto de la fracción CAcOEt de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular DU-145.

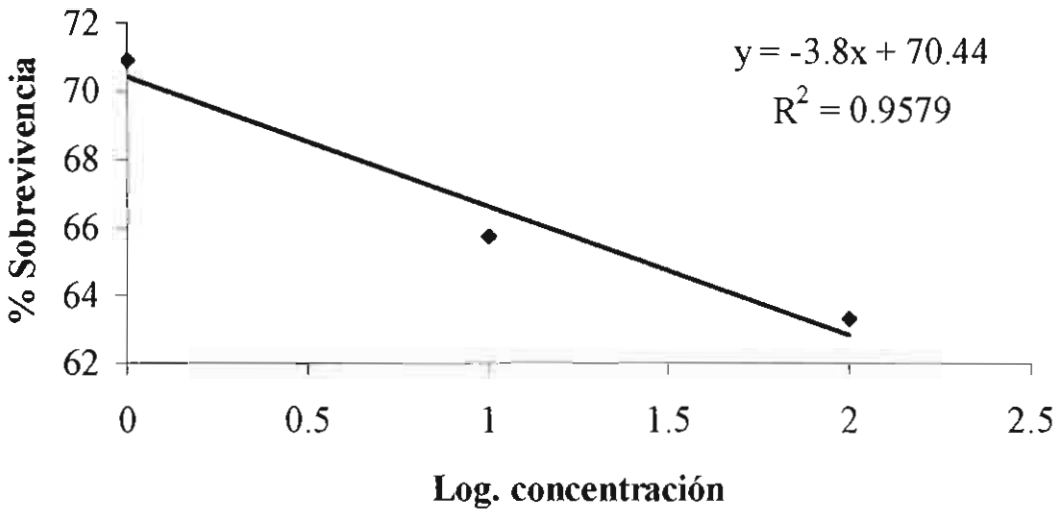


Figura 37. Efecto de la fracción PB3 de *C. aequipetala* sobre el cultivo celular DU-145.

APÉNDICE 3

ESPECTROS DE INFRARROJO

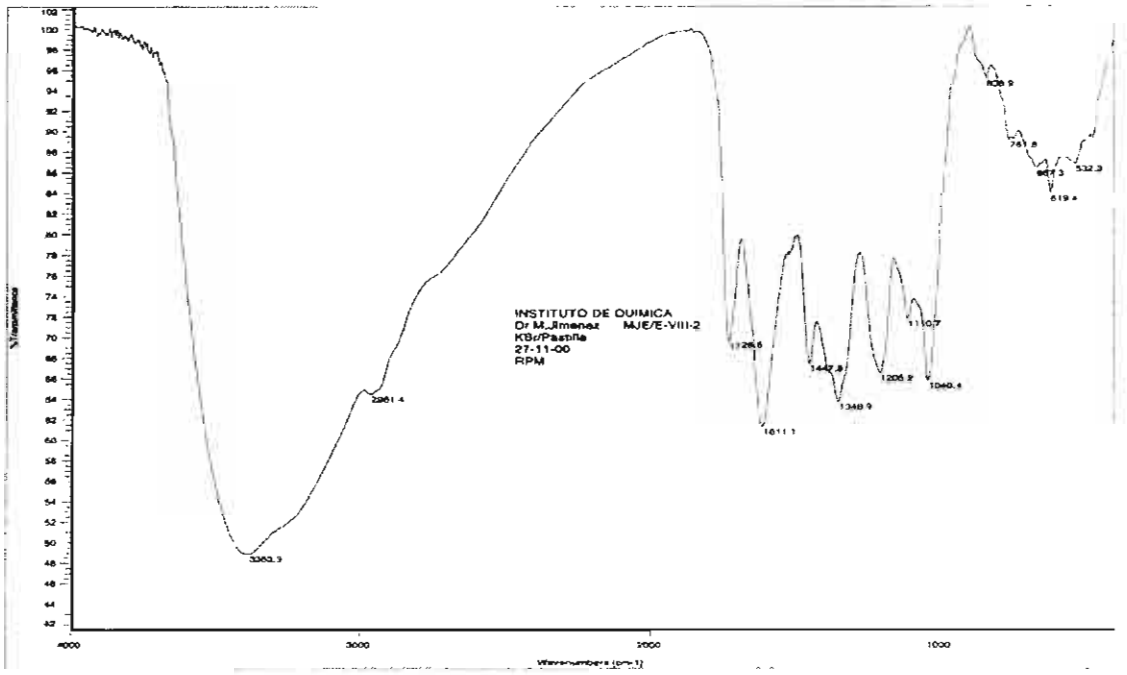


Figura 38. Espectro infrarrojo de la fracción VIII-2 de *C. aequipetala.*

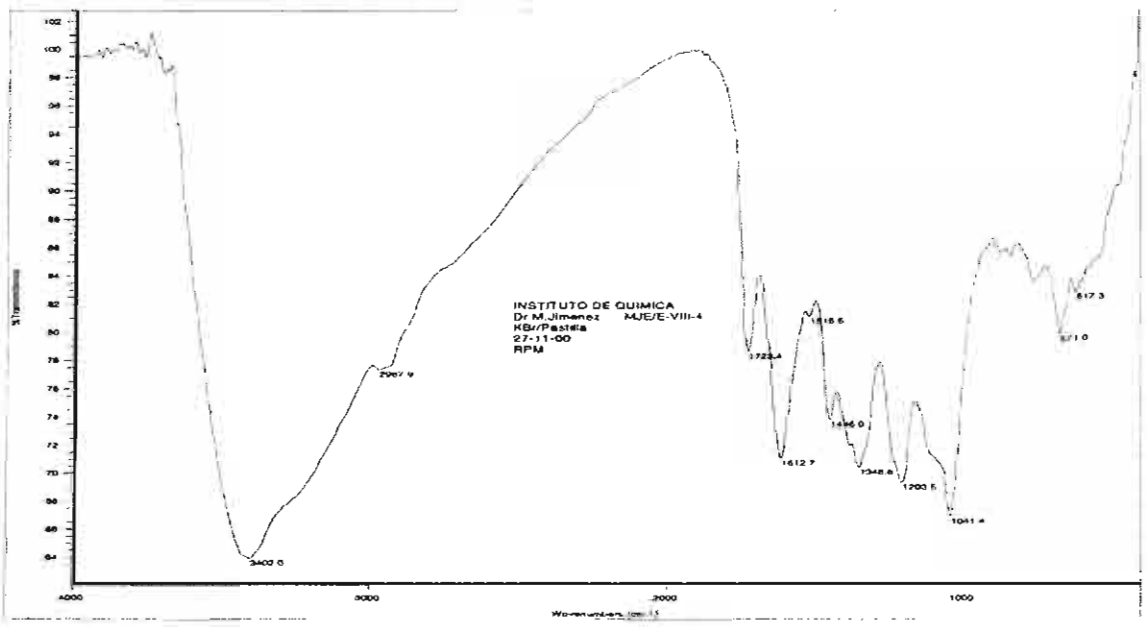
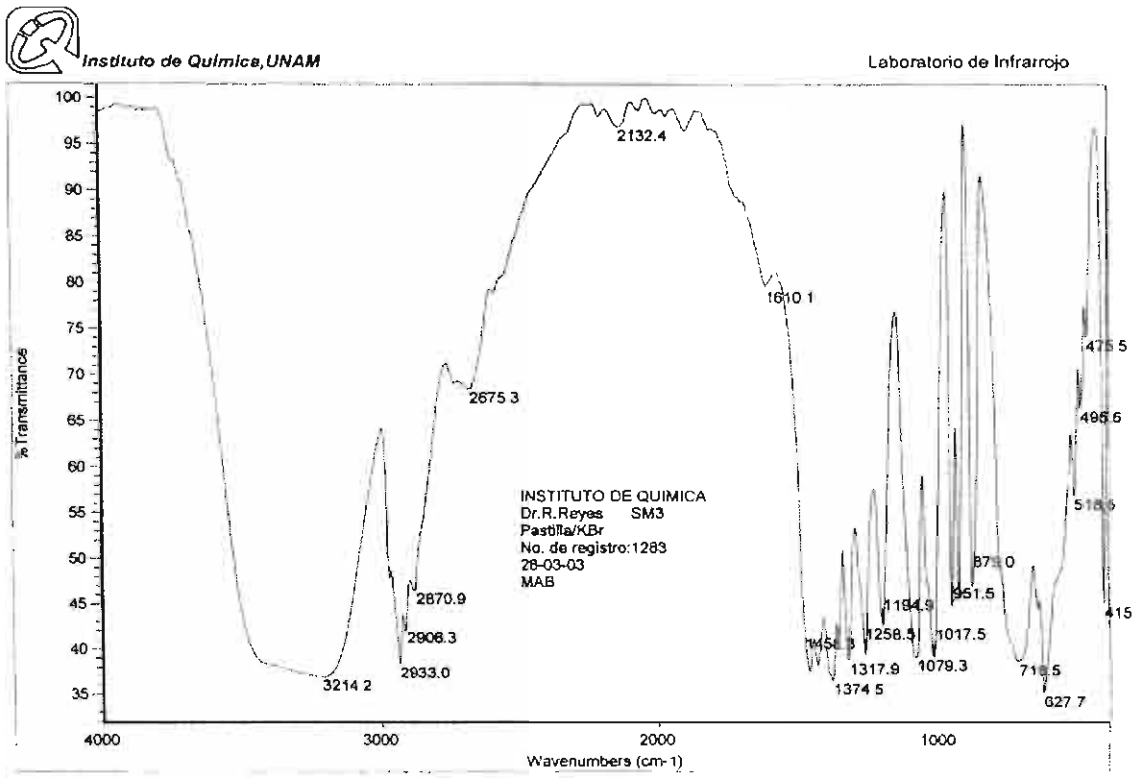


Figura 39. Espectro infrarrojo de la fracción VIII-4 de *C. aequipetala.*



40. Espectro infrarrojo del SM3 de *C. aequipetala.*

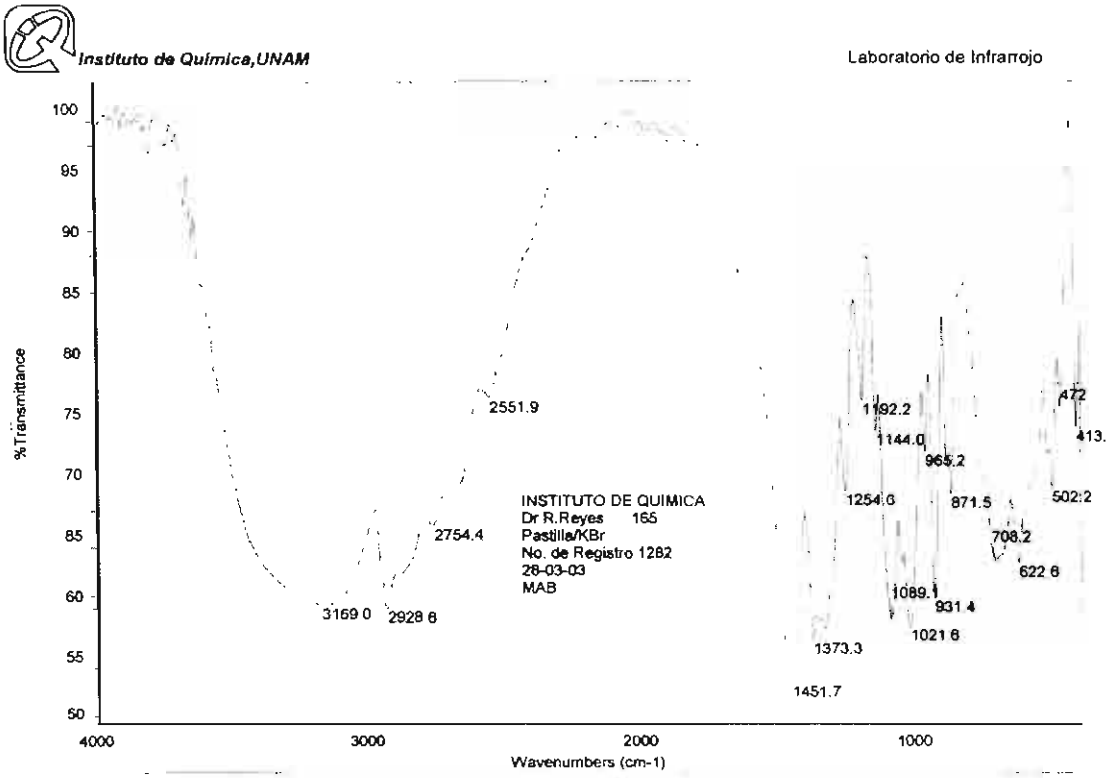


Figura 41. Espectro infrarrojo de 165 de *C. aequipetela.*

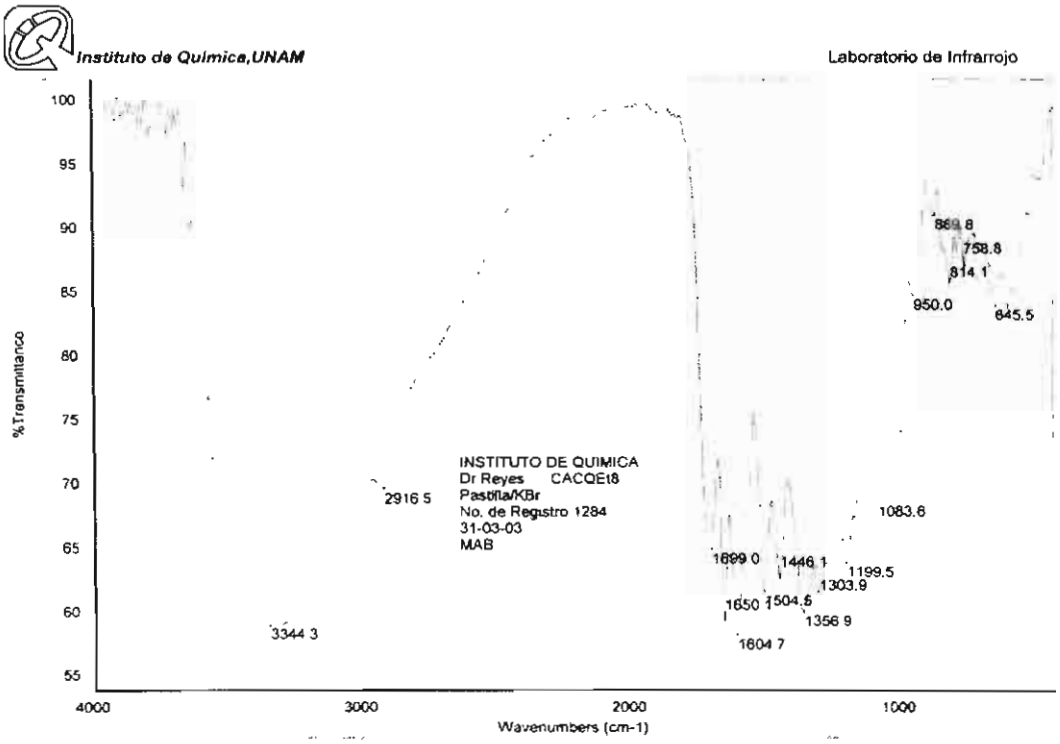


Figura 42. Espectro infrarrojo de la fracción CAcOEt de *C. aequipetala*.

APÉNDICE 3 B

ESPECTROS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE HIDROGENO (^{1}H-RMN)

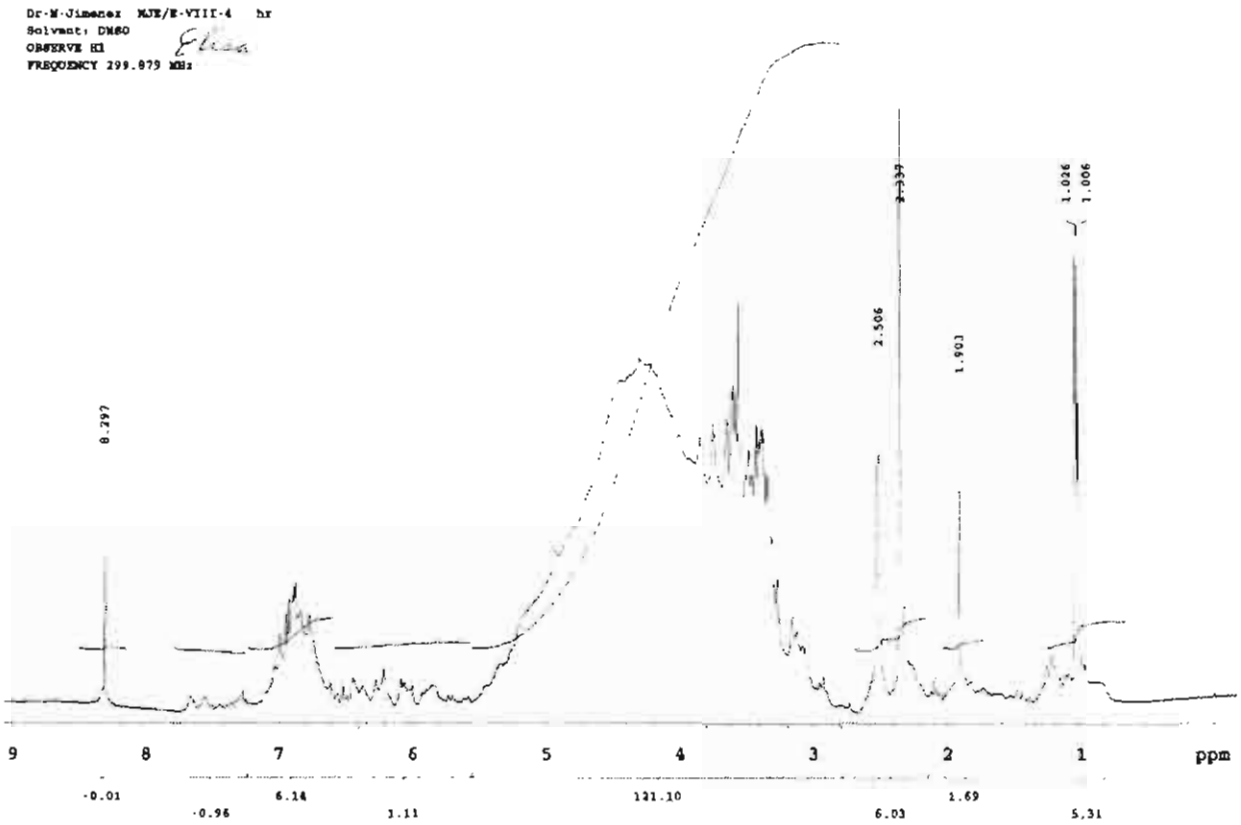


Figura 43. Espectro (^{1}H-RMN) de la fracción VIII-4 de *C. aequipetala.*

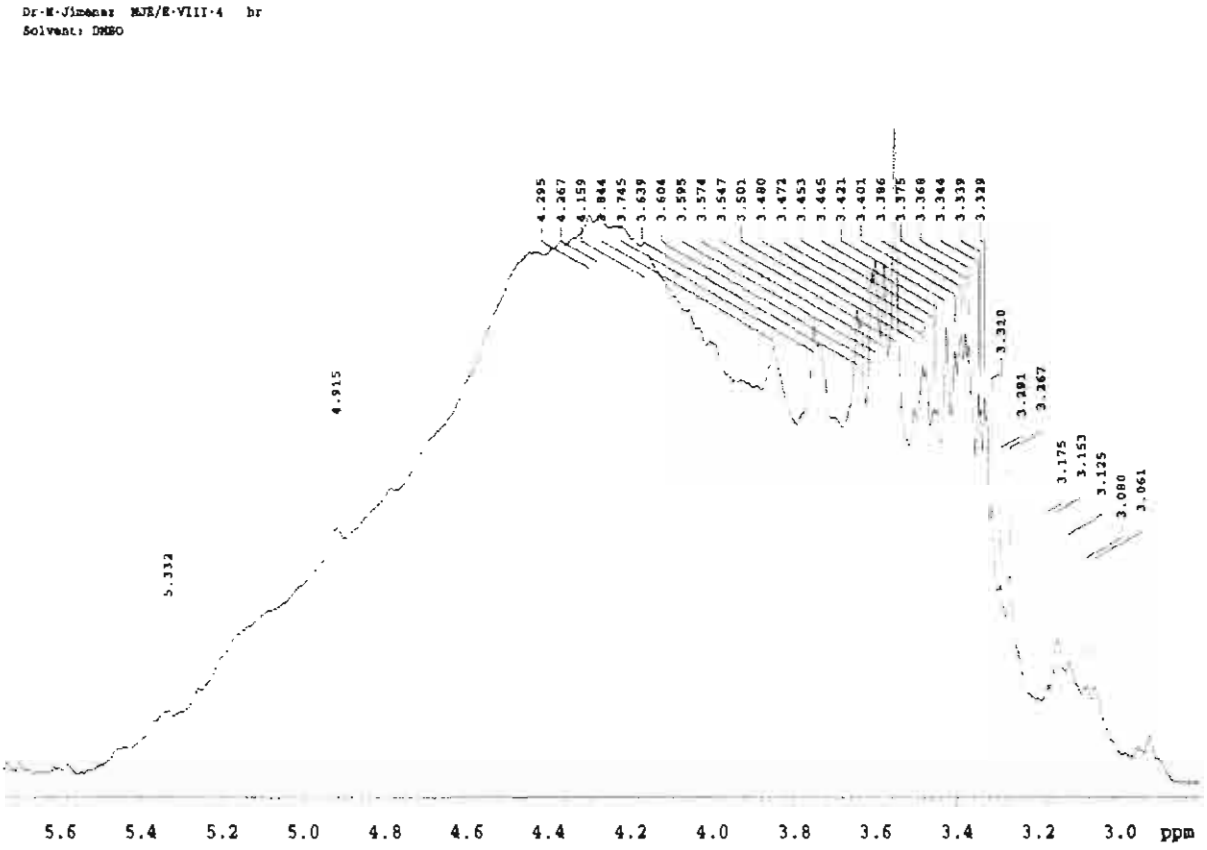


Figura 44. Espectro (^{1}H-RMN) de la fracción VIII-4 de *C. aequipetala.*

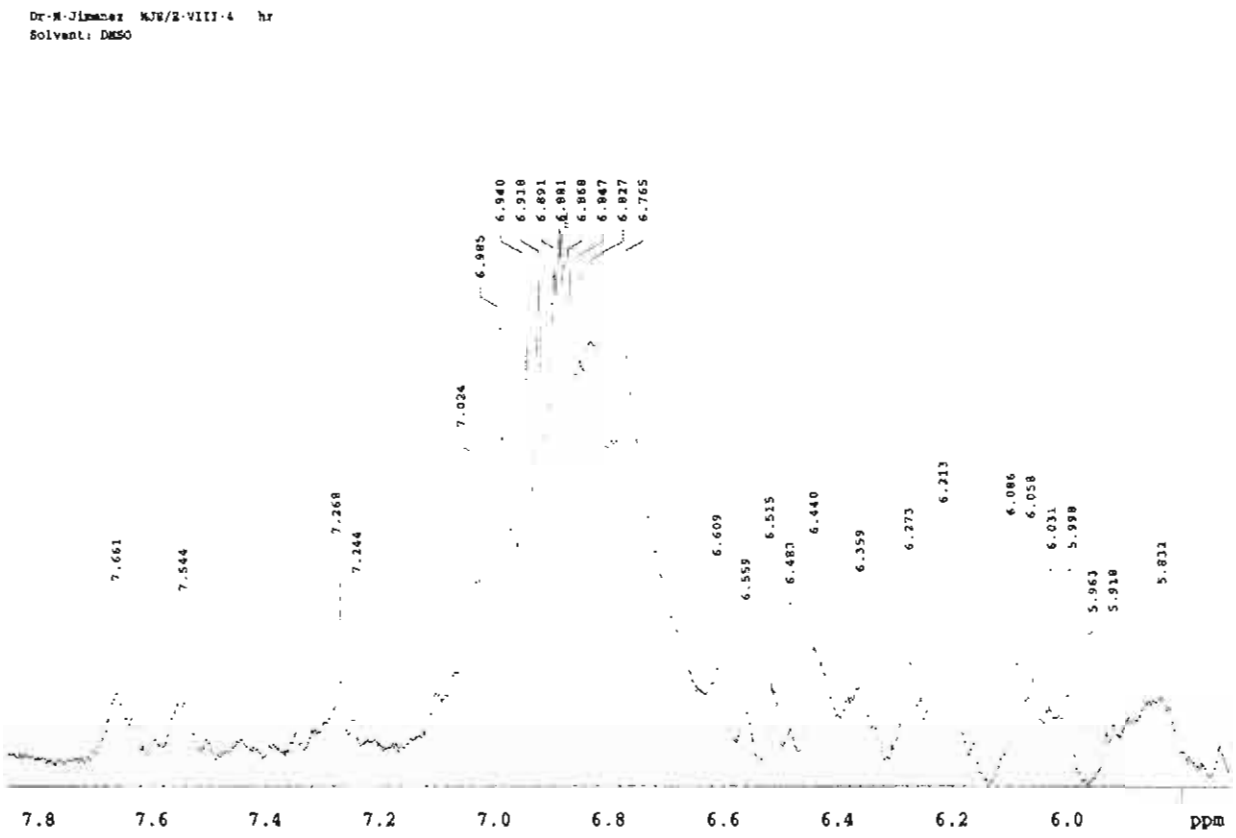


Figura 45. Espectro (^{1}H-RMN) de la fracción VIII-4 de *C. aequipetala.*

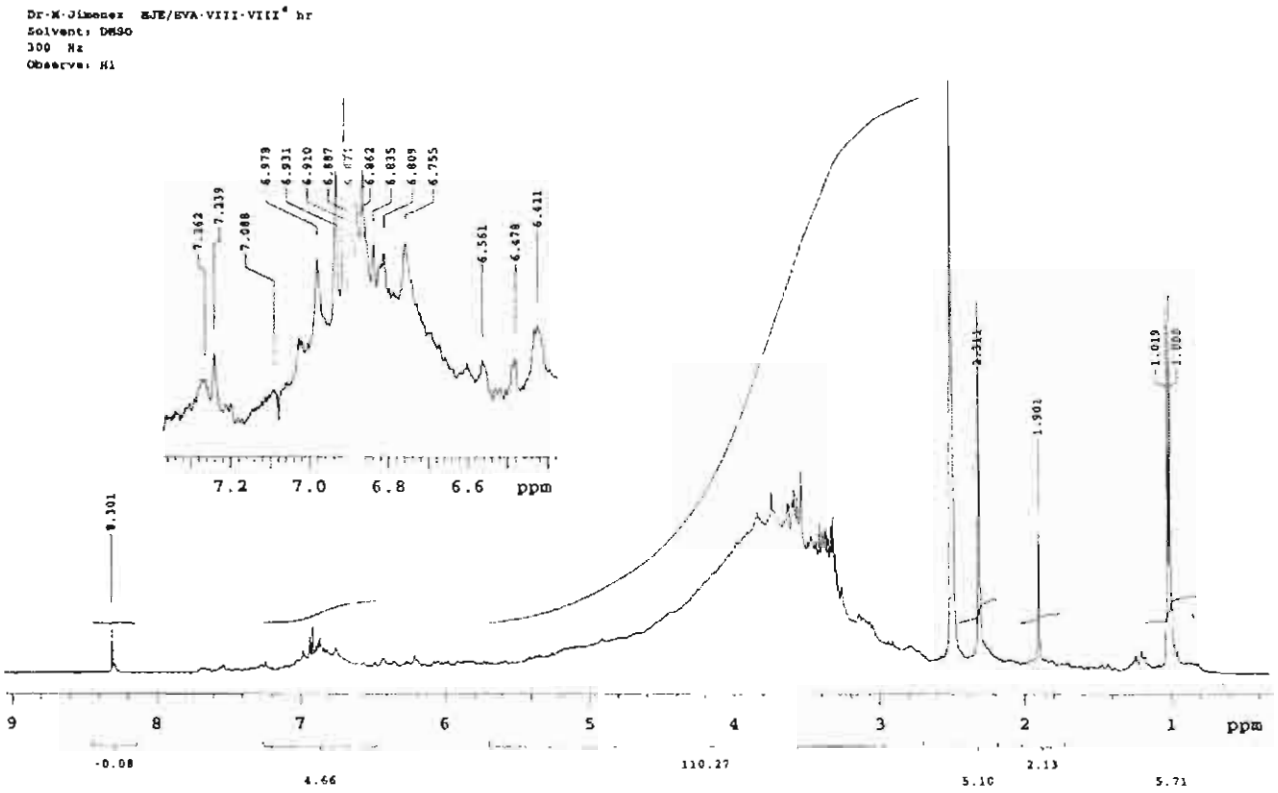


Figura 46. Espectro (^{1}H-RMN) de la fracción VIII-VIII^0 de *C. aequipetala.*

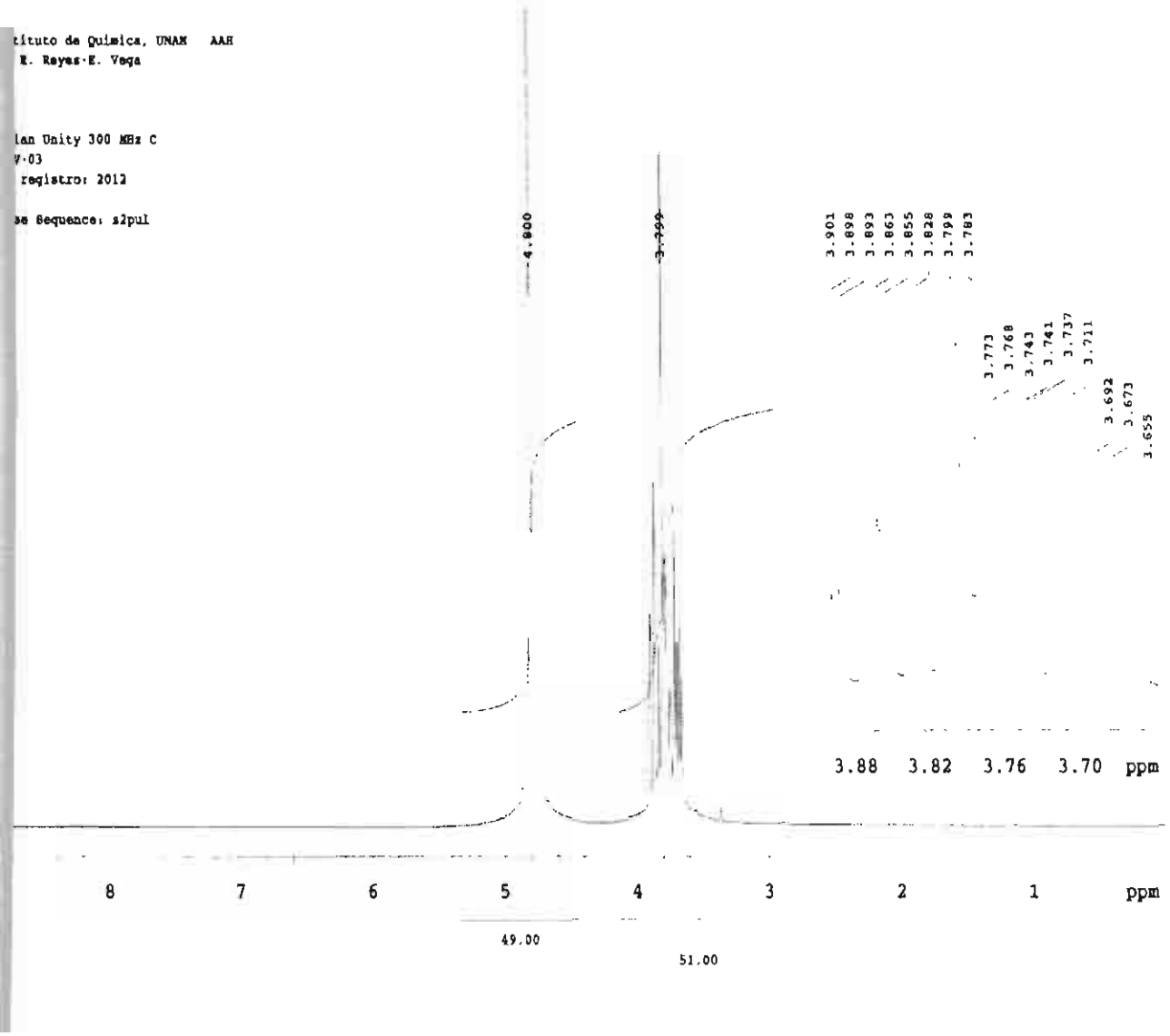


Figura 47. Espectro (^{1}H-RMN) del compuesto de 165 de *C. aequipetala.*

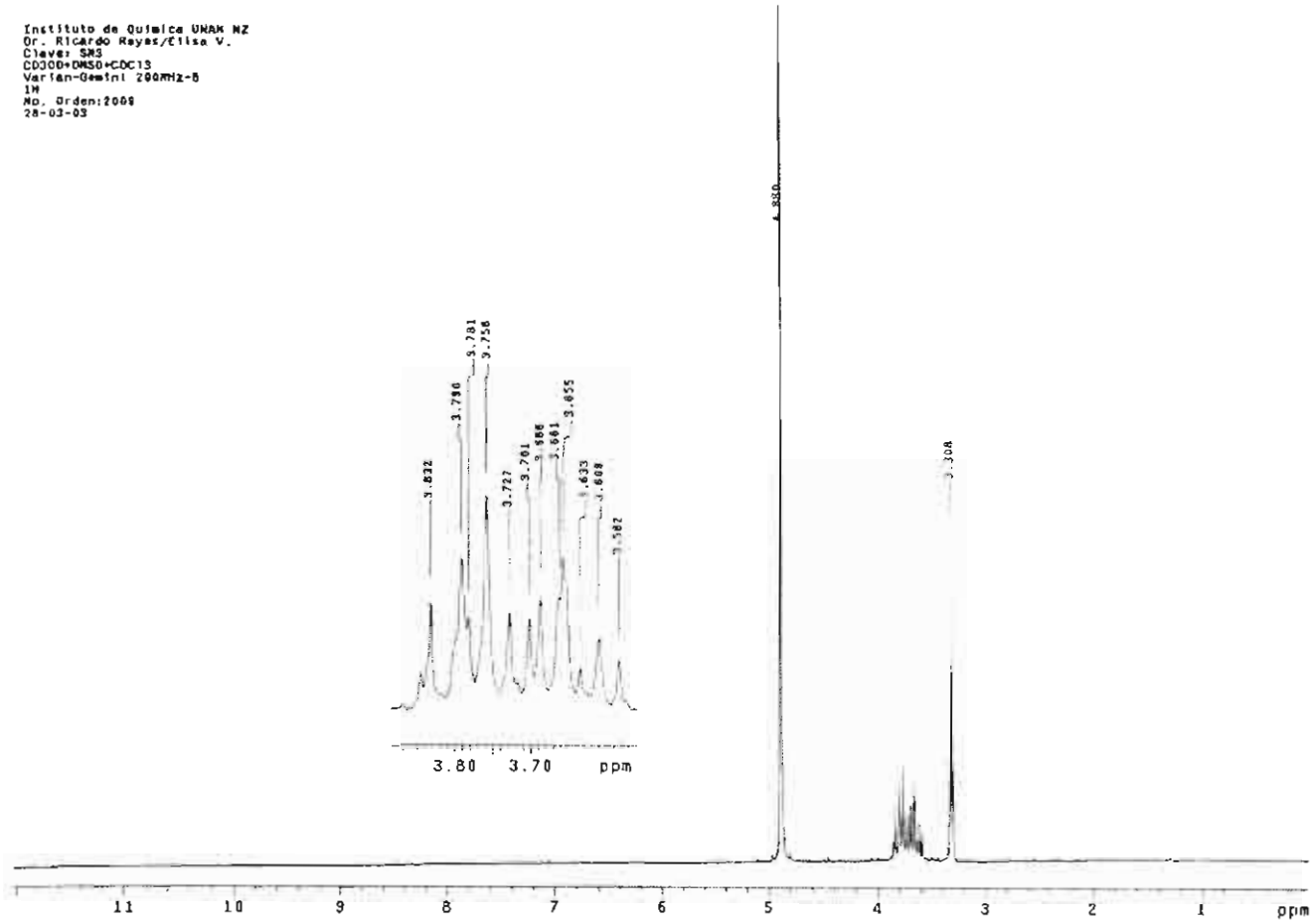


Figura 48. Espectro (^{1}H-RMN) del compuesto SM3 de *C. aequipetala.*

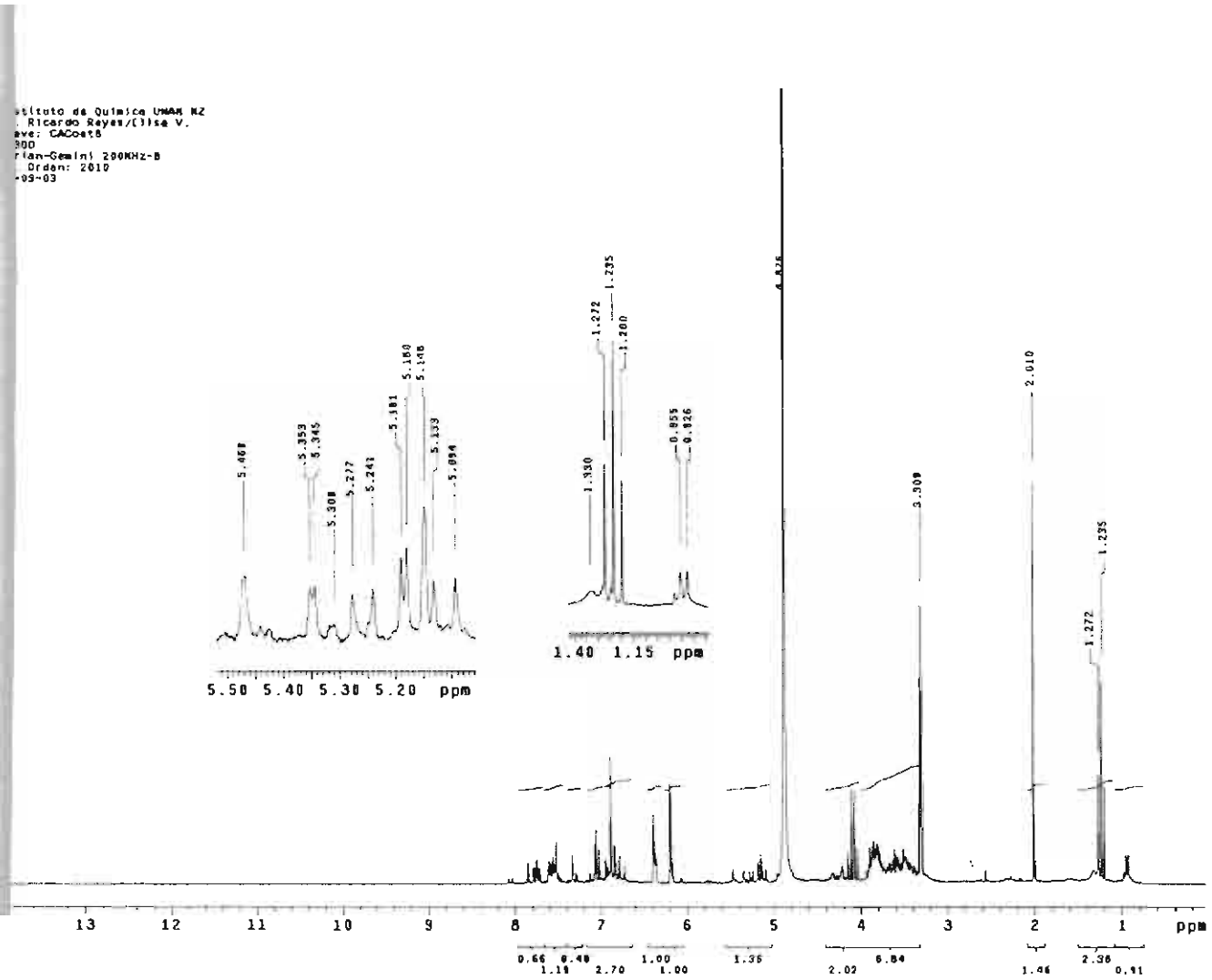


Figura 49. Espectro (^{1}H-RMN) de la fracción CAcOEt 8 de *C. aequipetala.*

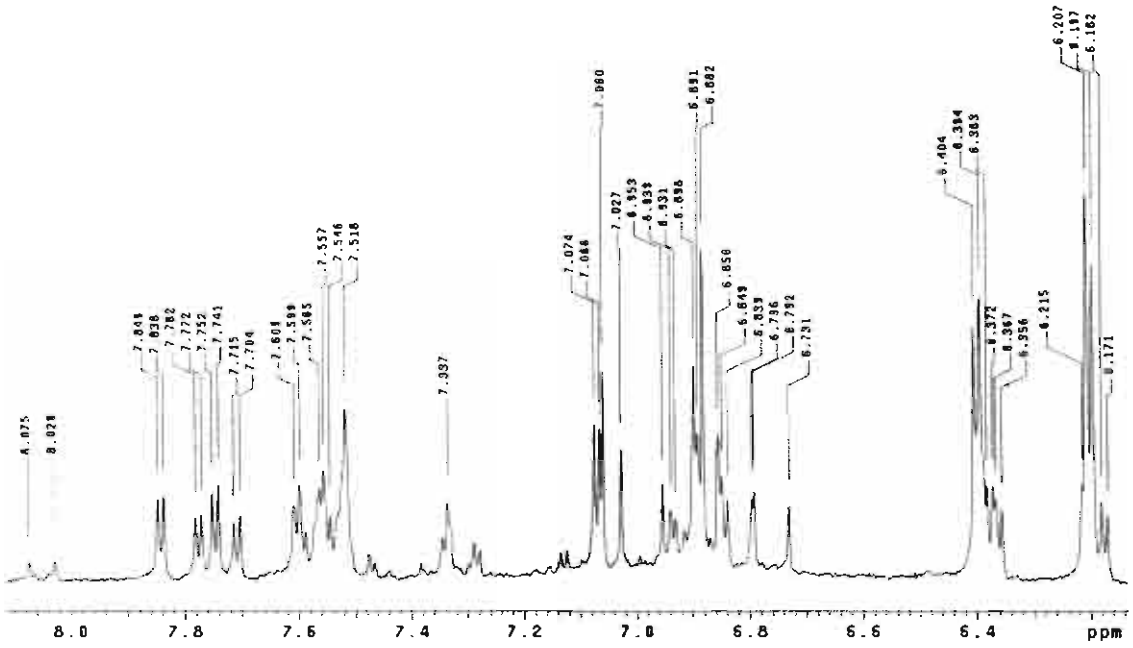


Figura 50. Espectro (^{1}H-RMN) de la fracción CAcOEt 8 de *C. aequipetala.*

APENDICE 3C

ESPECTROS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE CARBONO (^{13}C-RMN)

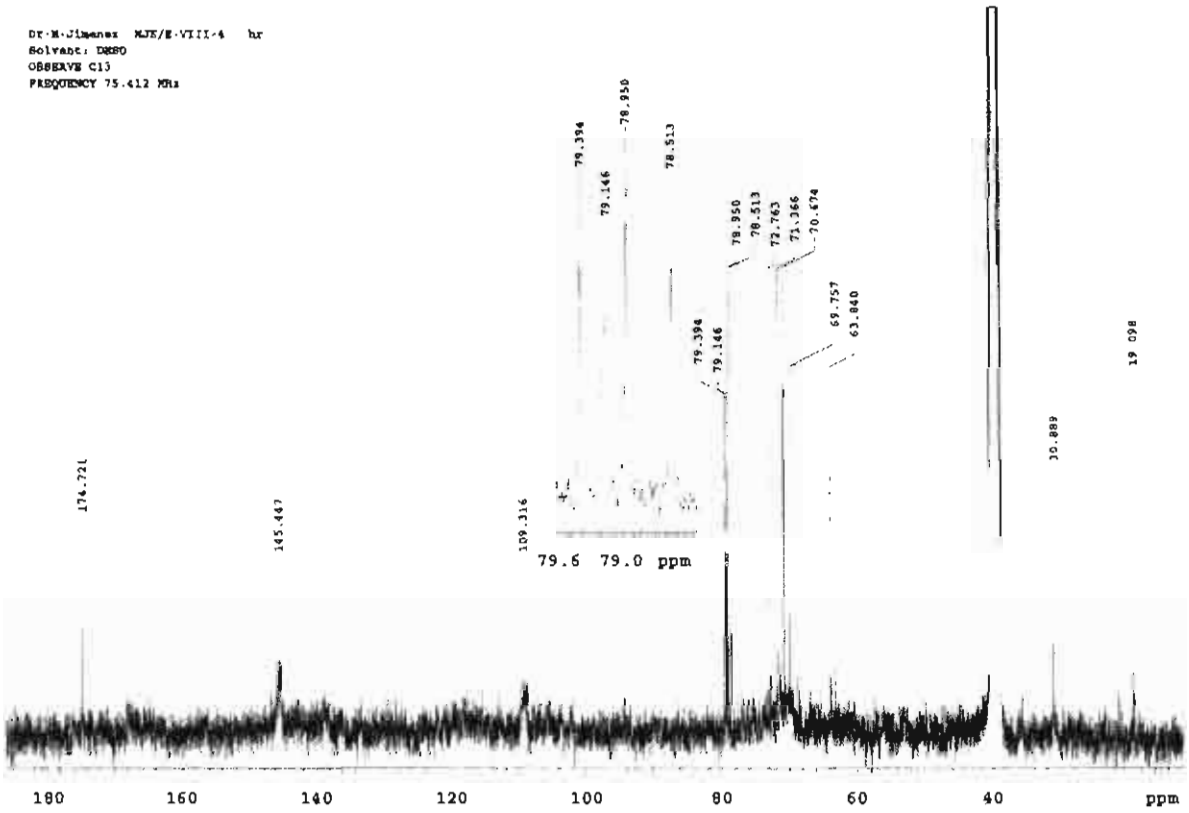


Figura 51. Espectro de resonancia de la fracción VIII-4 de *C. aequipetala.*

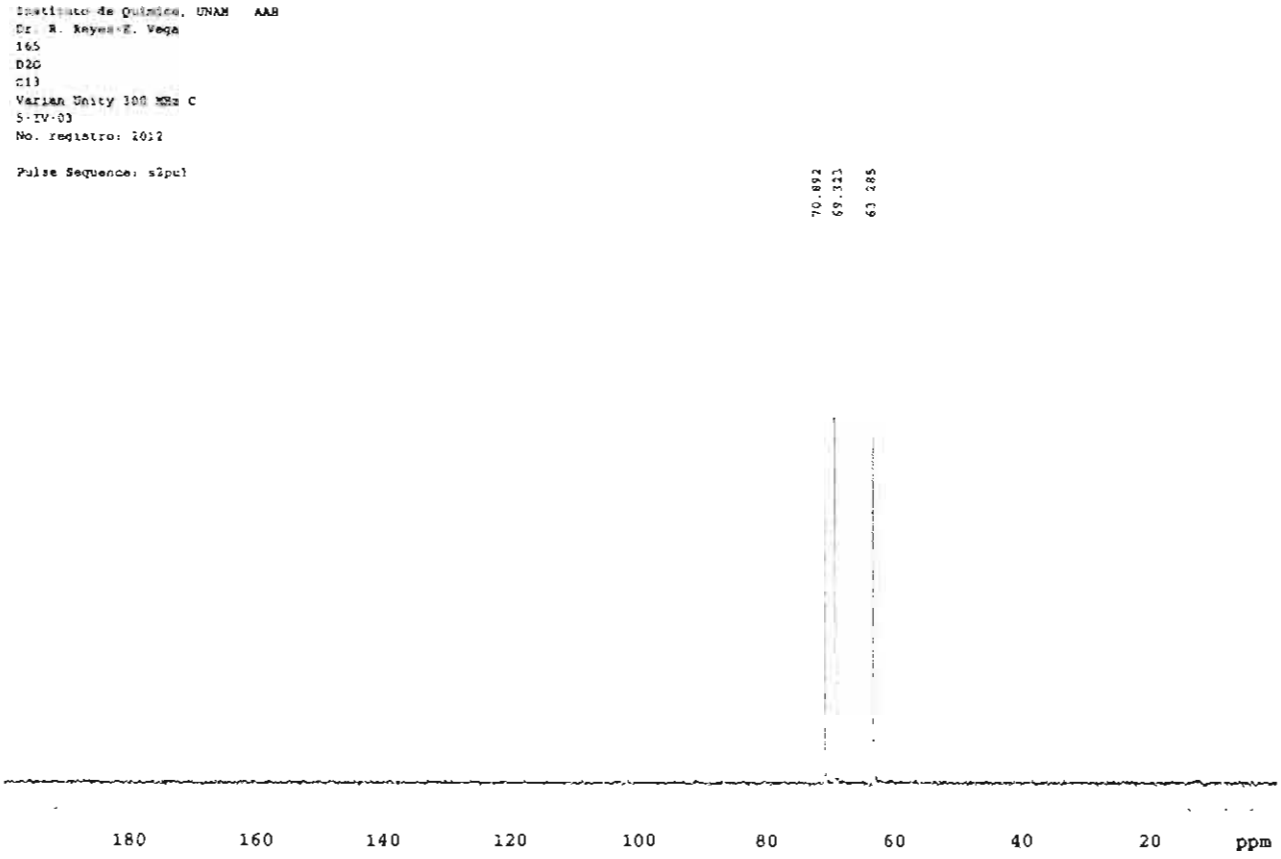


Figura 52. Espectro de resonancia del compuesto 165 de *C. aequipetala*.

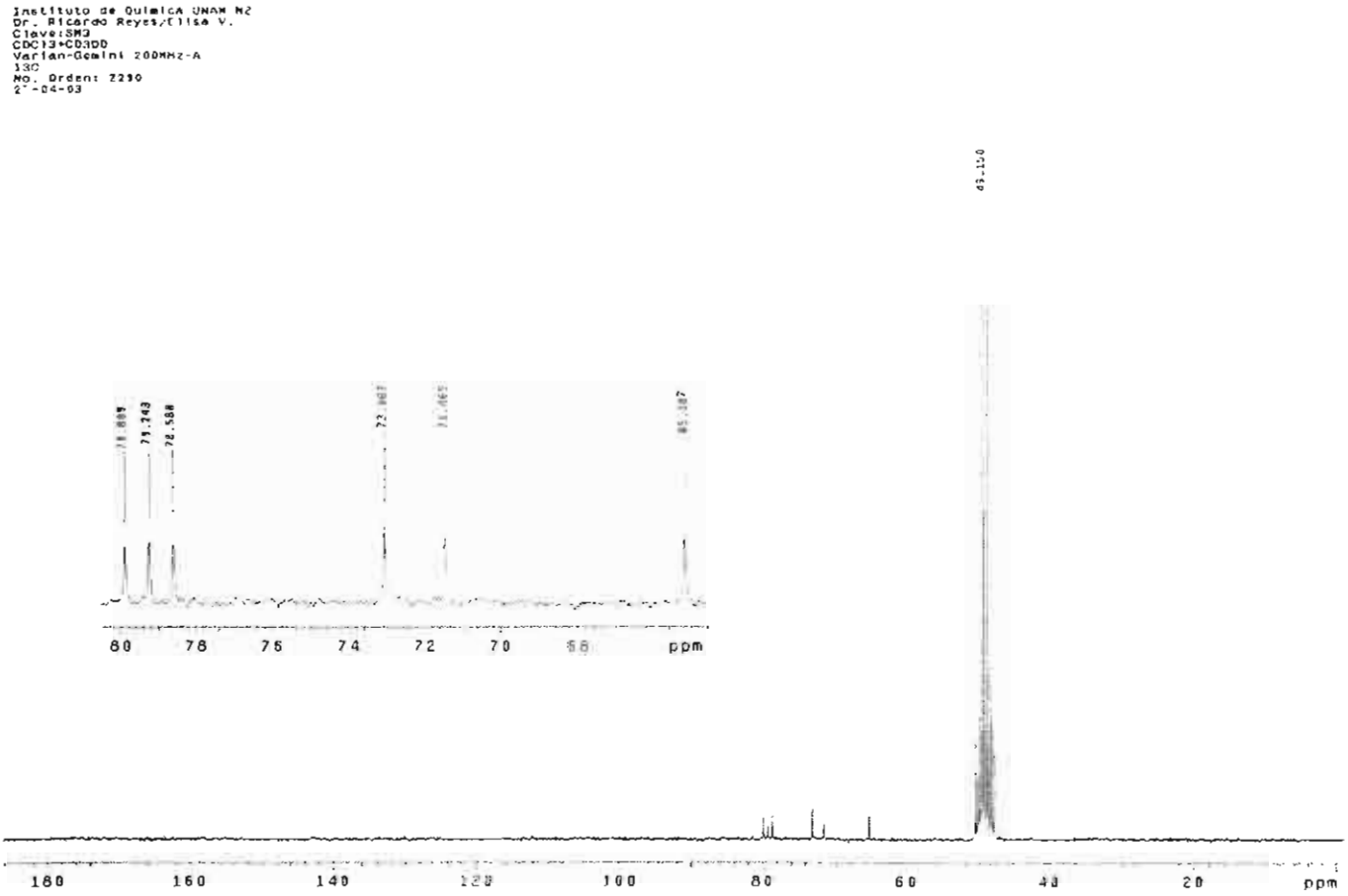


Figura 53. Espectro de resonancia del compuesto SM3 de *C. aequipetala.*

APENDICE 3D

ESPECTROS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE CARBONO (^{13}C-RMN), DEPT.

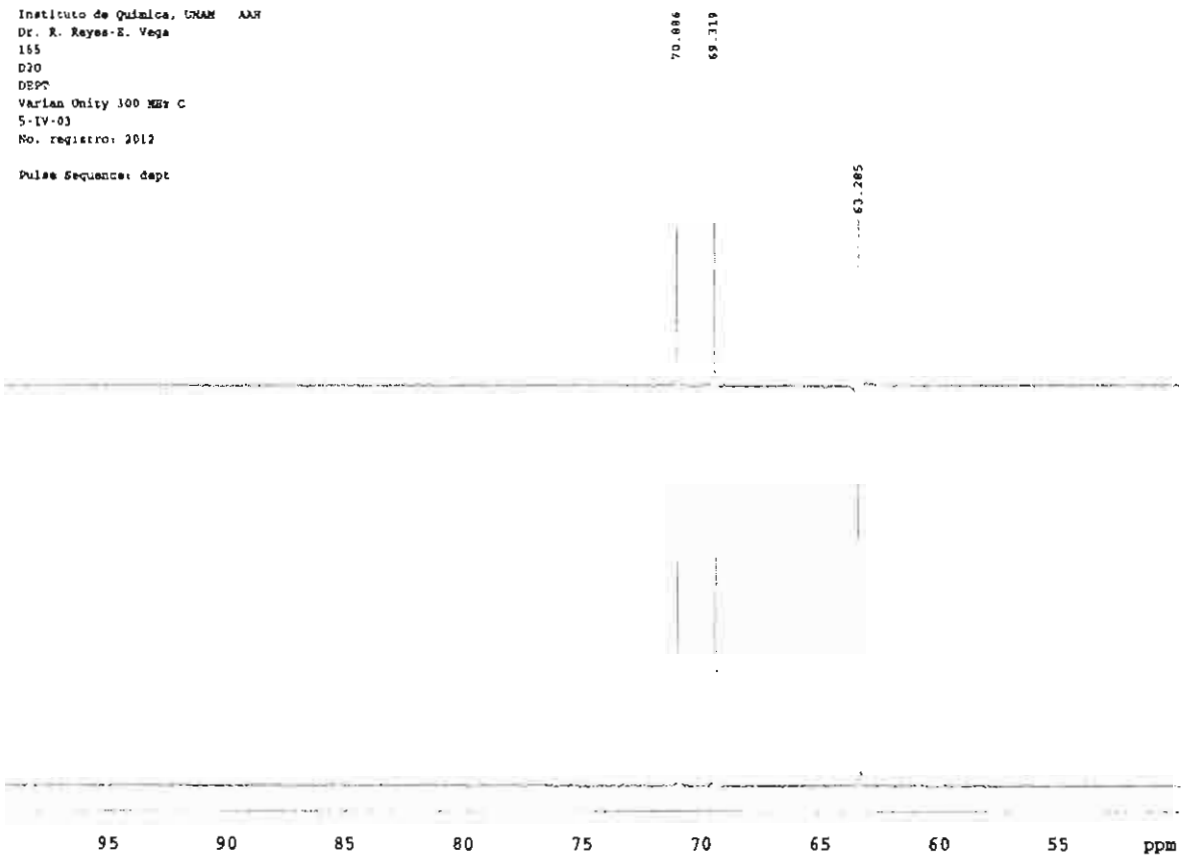


Figura 54. Espectro de resonancia, (DEPT), del compuesto 165 de *C. aequipetala.*

APENDICE 3E

ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE HIDROGENO (^{1}H-RMN) Y CARBONO (^{13}C-RMN). HETCOR.

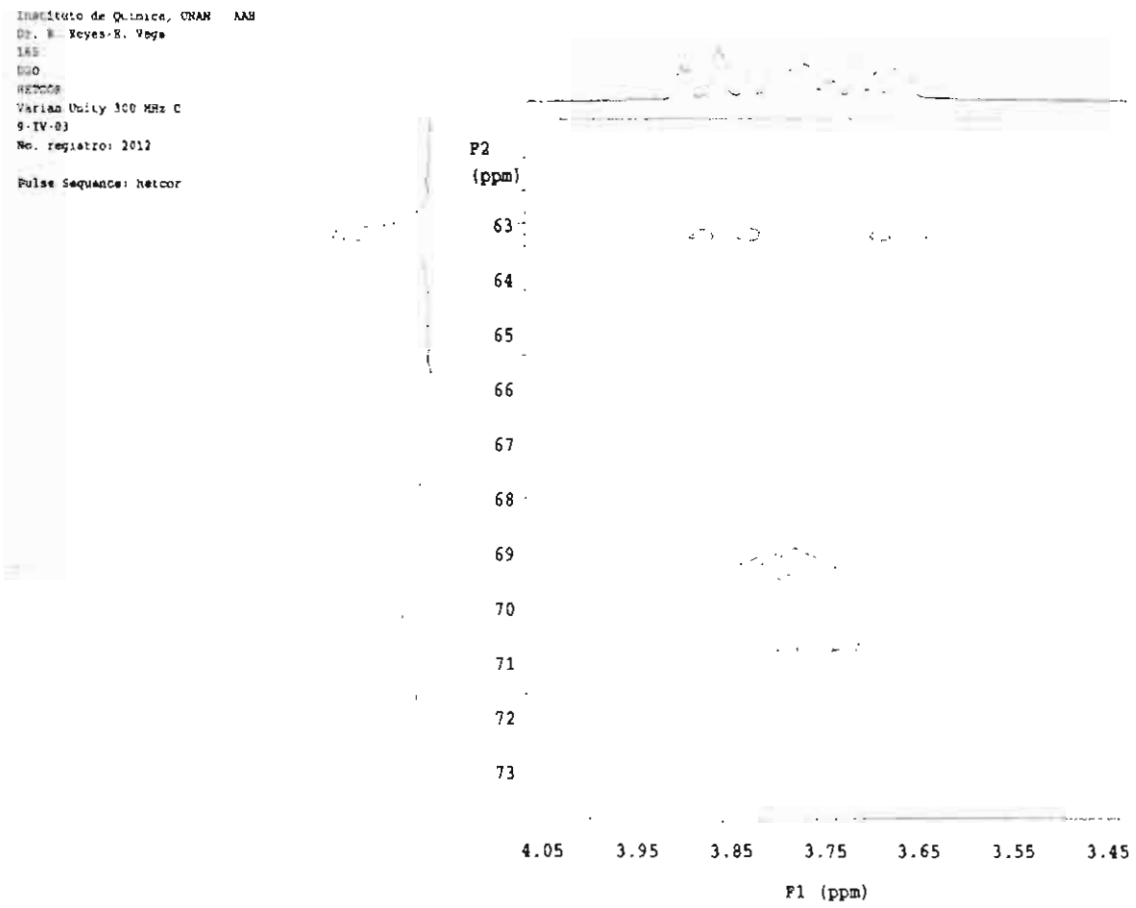


Figura 55. Espectro HETCOR del compuesto 165 de *C. aequipetala.*

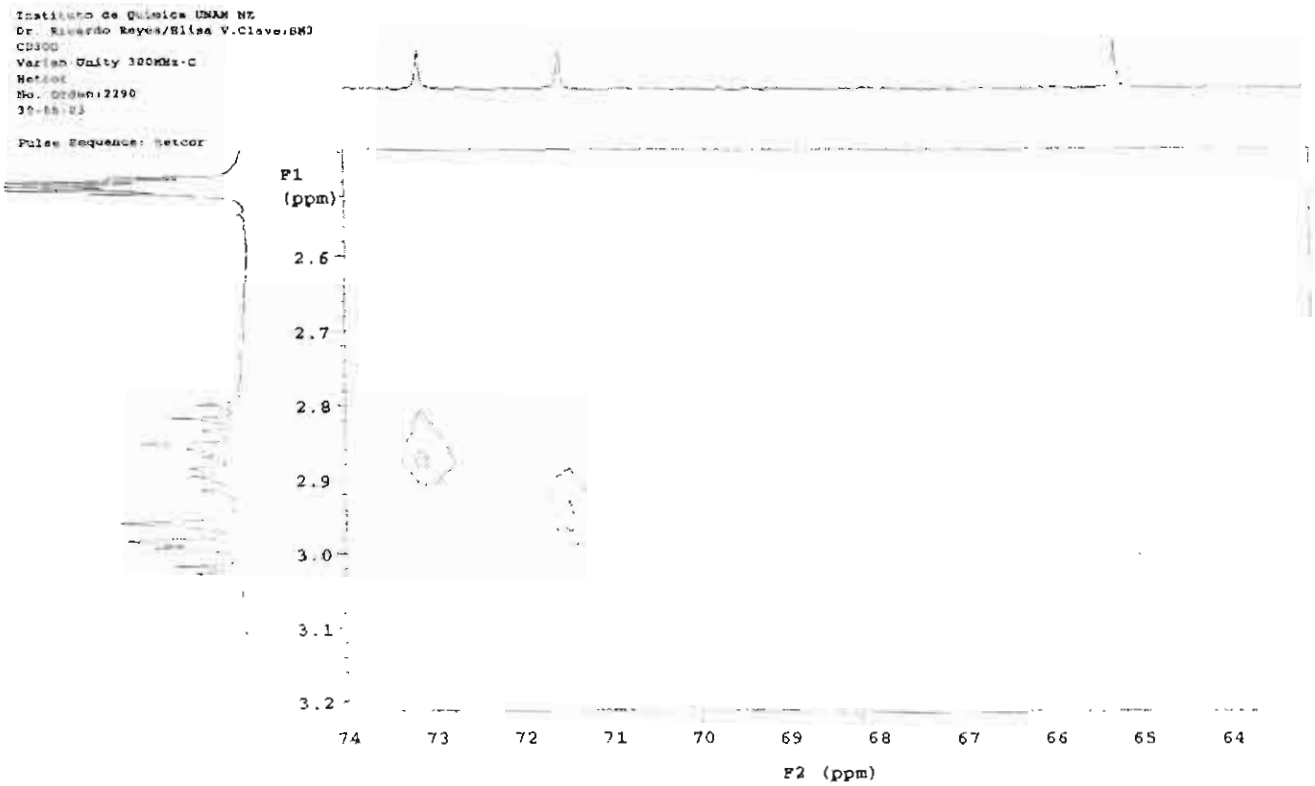


Figura 56. Espectro HETCOR del compuesto SM3 de *C. aequipetala.*

APENDICE 3 F

ESPECTRO DE MASAS

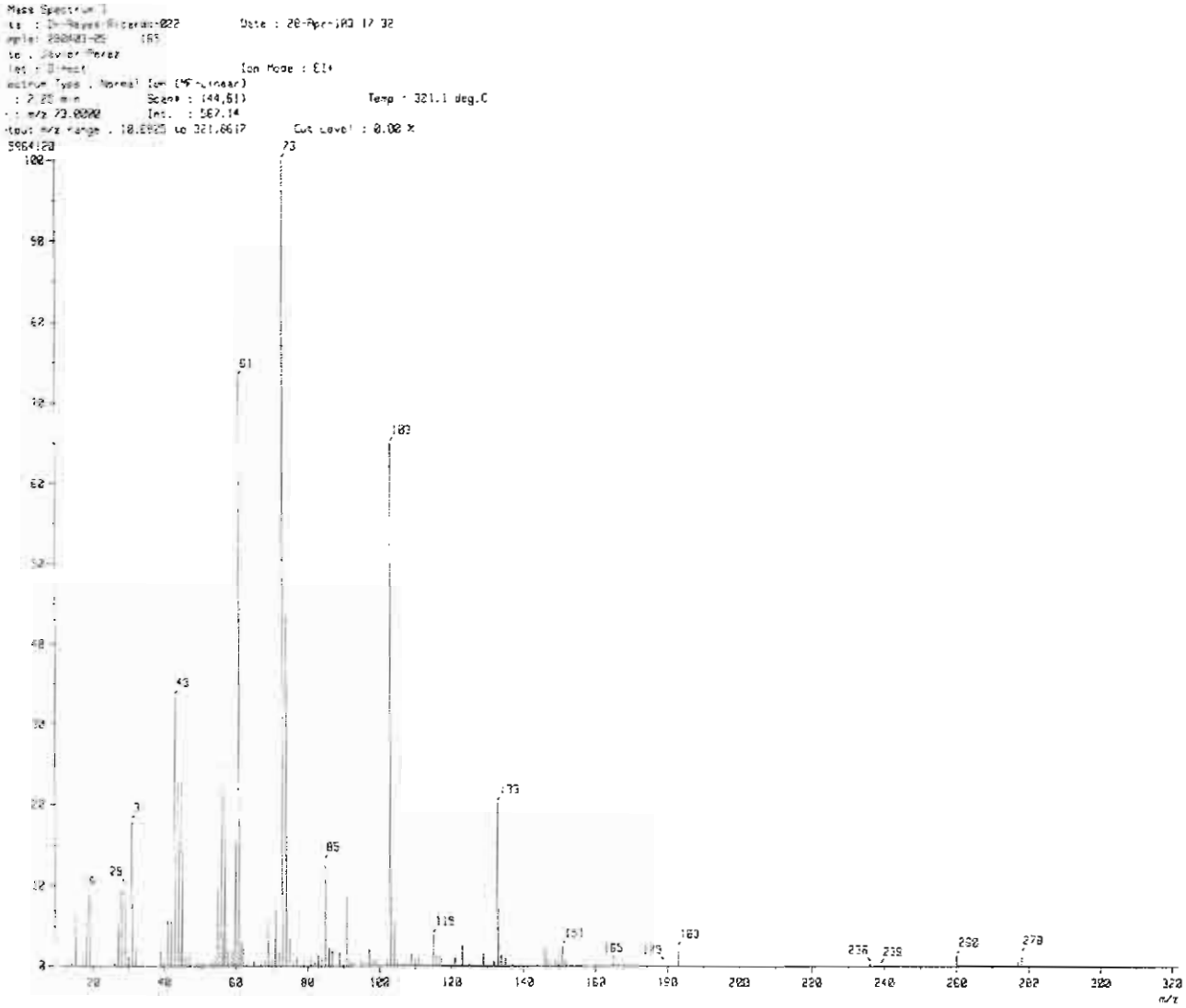


Figura 57. Espectro de masas del compuesto 165 de *C. aequipetala.*

APÉNDICE 4

PREPARACIÓN DE REACTIVOS y TÉCNICAS DE REVELADO

1. Suero Fetal. En condiciones de esterilidad, se inactiva el suero fetal a 56 °C durante treinta minutos. Se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos. Se filtra el sobrenadante, empleando membranas millipore estériles de 0.22 μm de diámetro y se guarda en alícuotas en el congelador hasta su uso.
2. Medio de cultivo suplementado con suero fetal de bovino. En condiciones de esterilidad se mezclan 41.5 de medio RPMI-1640, 4.5 ml de suero fetal bovino inactivado y 45 μl de la suspensión de antibióticos.
3. 0.05% de tripsina–EDTA 0.53 mM (comercial).
4. Ácido tricloroacético (TCA) al 50.0% p/v. Se disuelven 50.0 g de TCA y se afora con agua destilada hasta un volumen final de 100 ml.
5. Ácido tricloroacético (TCA) al 80.0% p/v. Se disuelven 80.0 g de TCA y se afora con agua destilada hasta un volumen final de 100 ml.
6. Ácido acético al 1.0 % v/v. Se diluye 1.0 ml de ácido acético glacial con agua destilada hasta un volumen final de 100 ml.
7. Sulforodamina B (SRD-B). Se disuelven 0.40 g de SRD-B en ácido acético al 1.0 % v/v y se afora con el mismo ácido hasta un volumen final de 100 ml.
8. TRIS [tris(hidoximetil)aminometano] 10.0 mM, pH = 10.0. Se disuelven 1.22 g de TRIS y se afora agua destilada hasta un volumen final de 1.0 ℓ.
9. NaCl al 0.9%. Se disuelven 0.90 g de NaCl y se afora con agua destilada hasta un volumen final de 100 ml.

10. HCl 0.10 M. Se coloca en un matraz volumétrico de 100 ml, aproximadamente 75 ml de agua destilada y se adiciona resbalando por la pared 0.85 ml de HCl concentrado (ρ = 1.18 g/ml, %pureza = 37.0)
11. $FeCl_3$ 0.10 M-HCl 0.10 M. Se disuelven 2.70 g de $FeCl_3.6H_2O$ en 100 ml de HCl 0.10 M.
12. Solución gelatina 1%-NaCl 0.9%. Se disuelve 1.0 g de gelatina en 100 ml de NaCl al 0.9 %.
13. $Ce(SO_4)_2/H_2SO_4$. Se disuelve 12.0 g de $CeSO_4$ en 350 g de hielo y lentamente se adiciona 22.3 ml de H_2SO_4 concentrado. Ésta solución se aplica a la placa por aspersión y posteriormente se calienta la placa hasta la aparición de colores.
14. Vainillina/HCl. Se disuelve 5.0 g de vainillina en etanol y se afora a 100 ml. La mezcla que se emplea para revelar se prepara antes de usarse en una proporción de 4 partes de vainillina al 5.0% con una parte de HCl concentrado. Los colores se intensifican al calentar la placa durante 5 minutos a 100° C.
15. Vainillina/H_2SO_4. Solución I. Diluye 5.0 ml de H_2SO_4 concentrado con etanol y afore a 100 ml. Solución II. Se disuelve 1.0 g de vainillina en etanol y se afora a 100 ml. La placa se rocía primero con la solución I y posteriormente con la solución II. Después caliente la placa durante 5 minutos a 100°C.
16. $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ 0.20 % p/v. Se disuelven y 0.20 g de sulfato ferroso amonical en agua, y se afora a un volumen de 100 ml. Se rocía la placa e inmediatamente se forman los colores.

17. Fenol/H_2SO_4. Se disuelven 3.0 g de fenol en 95 ml de etanol y se mezclan con 5.0 ml de H_2SO_4. Se aplica la mezcla por aspersión y posteriormente se calienta la placa a 110°C durante 10 minutos.
18. Fast Bue Salt (FBS). Solución I. FBS al 0.5%. Se disuelven y aforan 0.5 de FBS en 100 ml de agua. Solución II. NaOH 0.10 M. Se disuelven y aforan 0.40 g de NaOH en 100 ml de agua. Se aplica, por aspersión, a la placa la solución I y posteriormente la solución II.

Proc. West. Pharmacol. Soc. 47: 129-133 (2004)

Cytotoxic Activity of *Cuphea aequipetala*

Elisa Vega Avila[1,2*], Rafaela Tapia Aguilar[2], Manuel Jiménez Estrada[3], Ma. Luisa Villarreal Ortega[4] and Rubén Román Ramos[2]

[1]*Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud,* [2]*Departamento de Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Apdo. Postal.55-535, 09340 México, D.F,* [3]*Instituto de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.,*
[4]*Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autonoma del Estado del Estado, Cuernavaca, Mor. México.*
**email: evegavila@yahoo.com.mx*

ABSTRACT

Cuphea aequipetala (Lytraceae) is a perennial plant that has been used in Mexican traditional medicine to treat different types of tumors since prehispanic times. In the present work the cytotoxic potential of different fractions from acetone-water extract from the whole plant was investigated using a sulforhodamine B assay. Fractions were subjected to a bioscreening assay using several cell lines: HEp-2 (human larynx carcinoma), HCT-15 (human colon cancer) and DU-145 (human prostate carcinoma). Colchicine was used as positive control. Data are presented as the dose that inhibited 50.0% control growth (ED_{50}). The cytotoxic activity is selective since the ED_{50} is different for the three cell lines employed. The highest activity was seen against the DU-145 cell line. "E" and PB1 fractions had the highest cytotoxic activities with ED_{50} values of 0.418 and 2.40 μg/ml respectively, on the DU-145 cell line. The "E" fraction was a yellow powder; it was methanol soluble and contained at least four separate components when separated by thin-layer chromatography. PB1 was a solid with metallic appearance; it was water soluble and its two dimensional chromatography showed 9 spots. These fractions have cytotoxic actives because their ED_{50} is less than 20 μg/ml and they will be further characterized.

INTRODUCTION

Cancer is a group of more than 100 illnesses with different etiology and symptomatology [1] whose cells have defects in regulatory signaling that govern normal cell proliferation and homeostasis [2].

Cancer has become the second leading disease-related cause of death of the human population [3]. For example, in Mexico, cancer is the second leading cause of death behind cardiovascular disease and produced 56,201 deaths in 2001 [4], representing 12.68% of all mortality. Incidence of cancer in persons under 24 years of age consisted of leukemias, lymphomas and sarcomas [4,5]. Carcinoma of the cervix is the first cause of death in women between 24-65 years meanwhile prostate cancer is the principal cause of death in men over 65 years [4]. Carcinomas are rare in persons under 24 years, and their appearance with increasing age emphasizes the importance of cumulative exposure to environment carcinogens in their induction [6].

Carcinogenesis is a multi-step process. Most, if not all, cancer cells have genetic damages two sorts: dominant, with targets known as proto-oncogenes; and recessive, with targets known variously as tumor suppressor genes, growth suppressor genes, recessive oncogenes or anti-oncogenes. The dominant damage typically results in a gain of function, whereas the recessive lesions cause a loss of function [7]. The cancer cells genotype is a manifestation of six essential alterations in cell physiology that collectively dictate malignant growth: self-sufficiency in growth signals, insensitivity to growth-inhibitory (antigrowth signals), evasion of programmed cell death (apoptosis), limitless replicative potential, sustained angiogenesis, tissue invasion and metastasis [2].

The curative therapies for cancer are surgery, radiation and anticancer drugs. Anticancer drugs are grouped as chemotherapy, hormonal therapy and immunotherapy. Chemotherapy included a number of families defined by their chemical structure and mechanisms of action: alkylating agents, antibiotics, antimetabolites, topoisomerase I and II inhibitors, mitosis inhibitors, platinum compounds and others [8].

Cancer chemotherapy emerged in the 1940s from toxicological studies of nitrogen mustard-based war gas [9]. Presently there are 140 anticancer drugs commercially available and approximately 67% have

Table I. Cytotoxic values (ED_{50}) in μg/ml on human cancer cells lines.

Sample	Hep-2	HCT-15	DU-145
Whole acetone-water extract	>50	18.70	8.1
Colchicine	<0.006	0.006	0.099

a natural origin [10]. Drugs of natural origin have been classified as original natural products, products derived semi-synthetically from natural products, or synthetic products based on natural products models [11]. The original natural products include microbial agents and plant-derived agents [12].

Plants have been used in the treatment of cancer for more than 3500 years [13]. The plant-based treatments continue to play an essential role in primary health care, and it has been estimated by the World Health Organization that approximately 80% of the world's inhabitants rely mainly on traditional medicines for their primary health care [14]. In Mexico, about 25% of the population still depends on the use of medicinal plants [15]. Mexican traditional medicine has its roots in the ancient Meso America [16].

In the present work, we have chosen *Cuphea aequipetala* (Fig. 1) that has been used to treat different types of tumors since pre-Hispanic times [17]. It is a perennial plant, known as "hierba del cáncer", and its habitat is forest's pine-oak [18].

MATERIALS AND METHODS

Plant Material. The plant was obtained in May 2000 from the "Mercado de Sonora" in Mexico City (a public market), and it was authenticated in the herbarium at the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa by Dr. Adolfo Espejo Serna. A voucher is kept in this university with the reference number 56709UAMIZ HERBARIUM for future reference. The whole plant was cleaned, dried at room temperature and ground.

Plant Extract and Their Fractions. The plant powder was macerated with acetone-water (7:3) during 48 hr (3 times); the extract was filtered and concentrated under reduced pressure until acetone was eliminated (liquor). One aliquot of this liquor was taken, and all solvent was removed and dry residue (CG) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at concentration of 20 mg/ml. Their cytotoxic activities were evaluated with sulforhodamine B assay [19] using three different cancer cell lines and ED_{50} values as shown in Table I.

The other aliquot was concentrated at room temperature to one third of the total volume and a first precipitate (PB1) was formed and separated from the residual liquid (L1). This liquid was stored at 4°C. Precipitators (PB2) and (PB3) were generated in an identical fashion from the residual liquid (L2). The residual liquid was extracted with dichloromethane (D) and ethyl acetate (E). All these fractions were dried, and their cytotoxic activities were assayed using DU-145 cancer cell line as was described previously. A block diagram of the separation with cytotoxic values is shown in Figure 2.

Evaluation of Cytotoxic Activity. Human carcinoma cell lines were obtained from the American type Culture Collection (ATCC) (Rockville, Maryland, USA). Hep-2 (Human larynx carcinoma), HCT-15 (Human colon cancer) and DU145 (human prostate carcinoma) were grown in RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, USA) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (GIBCO), 2 mM L-glutamine and an antibiotic mixture of streptomycin (50 μg/ml) and penicillin (50 UI/ml). All cells were cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2/95% air (100% humidity). At 70-80% confluence cells were detached from the cultured flask by treatment with 0.05% trypsin-EDTA (GIBCO). The cells were counted and their viability determined using trypan-blue exclusion dye on a hemocytometer. After counting, dilutions were made to obtain the densities of 1.0×10^5 cells/ml. In each case, 96 well tissue culture plates were used. A 100 μl of cell suspension was added to the 96-well plates. 100 μl of complete medium was added to cell-free wells. The microtiter plates containing cells, and medium were preincubated for approximately 24 hr at 37°C in a CO_2 incubator to allow stabilization prior to the addition of sample. After this, 100 μl test samples were added to the wells. Test samples were solubilized in DMSO and serial dilutions were made with culture medium and its final concentration in the well was 0.5%. Three concentrations were tested (for triplicate), and three independent experiments were made. The plates were incubated for 48 hr and fixed by addition of 50 μl of cold 50% (w/v) aqueous trichloroacetic acid –TCA- (Sigma) and plates were incubated for 60 min at 4°C. The supernatant was discarded, and the plates washed five times with tap water and dried. One hundred microliters of sulforhodamine B –SRB- (Sigma) solution (0.4% w/v in 1% acetic acid) was added to each microtiter well, and were incubated for 30 min at room temperature. Unbound SRB was removed by washing five times with 1% acetic acid. Plates were air-dried; bound SRB was solubilized with 200 μl of 10 mM unbuffered Tris base (Sigma) pH 10. The plates were placed on a shaker for 5 min. and the absorbance was read in a spectrophotometric plate reader at 495 nm (BIO-RAD Model 450, USA). A measure was also made of the cell population density at time zero (the time at which the sample was added) from reference plates of cells fixed with TCA just prior to sample addition and processed as described above. The absorption values obtained with each of the treatment procedures were averaged, and the average value obtained with the zero-day control subtracted. Cell survival was obtained as (T/C) x 100 where T and C represent the mean absorbance cell treated with sample and vehicle control (DMSO) respectively. Results were expressed as the dose that inhibits 50% control growth after the incubation period (ED_{50}). The ED_{50} values were calculated by regression analysis (percent survival versus log concentration). Colchicine (Sigma) was used a positive control. According to the standards of the National Cancer Institute (NCI), ED_{50} values of $\leq$ 20μg/ml for extracts and $\leq$ 4μg/ml for pure compounds are considered active [20].

Chemical Analysis. The solubility test was made with CG, PB1 and E fractions (Fig. 2). One solution of each sample was used to investigate the presence of phenolic compounds by adding a few drops of 1% $FeCl_3$-HCl (1.0 M) solution. The reaction was considered positive when a blue, green or blue-green color was formed [21].

Thin Layer Chromatography. Cellulose and silica gel plates were used as adsorbent for the preliminary chromatography. **CG** and **PB1** were best separated by a cellulose layer, using a two-dimensional system; the first system was n-butanol: acetic acid: water (4:1:5) and the second system was acetic acid 2%. The plates were dried and wetted with 0.2% ferrous sulfate ammonium solution [22]. "E" was applied over silica-gel plates with fluorescein, Silica gel $60F_{254}$ (Merck) and developed with flavonoid chromatography solvents ethyl acetate: formic acid: acetic acid: water (100:10:11:27) solution. The dry plates were viewed under ultraviolet (U.V) light for spot detection and then treated with 1%$FeCl_3$-HCl (1.0M), 1%vanillin/ 5% H_2SO_4 or Fast Blue Salt reagents [23]. The spots were marked and Rf values were obtained.

Figure 1. *Cuphea aequipetala*

- Francisco Hernández (1514-1578) wrote: "Tozancuitlaxcolli's roots are employed to treat putrid ulcer and cancerous ulcer" [17].
- *Cuphea auquipetala* is a perennial plant, 30 to 40 cm high. Its stems are covered with violet hair and opposed leafs with a wide base. Its flowers are small and violet.
- Currently it is used to treat infections in mucocutaneous tissues and the gastrointestinal tract. It is also employed as a soporific and a treatment against certain cancers.

RESULTS AND DISCUSSION

Cytotoxic activity of extracts of *C. aequipetala* was different in the three cancer cell lines employed. The whole acetone-water extract didn't show cytotoxic activity on Hep-2 cells and the best cytotoxic activity was on DU-145 cells (Table I). Therefore DU-145 cells were used for the bio-guided assay.

The cytotoxic activity of different fractions from acetone-water extract is resumed in Fig. 2. "E" had the highest cytotoxic activity (ED_{50} = 0.418 μg/ml). According to the National Cancer Institute (NCI) [20], PB1 (ED_{50} = 2.48 μg/ml) and "E" fractions can be considered as having cytotoxic activity.

"E" was a yellow powder, soluble in methanol and its chromatographic plate showed four spots. These spots were viewed under U.V. light and gave positive reaction with $FeCl_3$-HCl, vanillin/H_2SO_4 reagents. This plate was treated with Fast Blue Salt solutions [23] and their Rf values were 0.72; 0.80; 0.86 and 0.91. Maybe, "E" fraction has compounds with flavonoid structures [23].

CG was a brown powder. PB1 was a solid with metallic appearance. They were water-soluble and positive in the $FeCl_3$-HCl test, strongly adsorbed by silica gel and their solubility suggests presence of polar compounds. The positive reaction with the $FeCl_3$ test indicates phenolic compounds meanwhile solubility suggests the presence of polyhydroxyls [24].

PB1 two-dimensional chromatography (cellulose plates) showed nine spots, 7 blue and 2 green. The blue spots could be hydrolysable tannins meanwhile green spots might be condensed tannins. Bate-Smith and Swain [25] defined the plant tannins as water-soluble phenolic compounds having a molecular weight between 500-3000, showing the usual phenol reactions (e.g. Blue color with $FeCl_3$, and precipitating alkaloids, gelatins and others proteins). Meanwhile Griffith [26] defined tannins as "macromolecular phenolic substances" and divided them in two major groups, the "hydrolysable" and "condensed" tannins.

Tannins are polyphenolic secondary metabolites of higher plants, and are galloyl esters and their derivatives in which galloyl moieties or their derivatives are attached to a variety of polyol-, catechin- and triterpenoid cores (gallotannins, ellagitannins and complex tannins), or they are oligomeric and polymeric proanthocyanidins that can possess different interflavanyl coupling and substitution patterns (condensed tannins) [27].

In medicine, especially in Asian (Japanese and Chinese) natural healing, the tannin-containing plant extracts are used against stomach and duodenal tumors [28]. Studies have led to the characterization of numerous hydrolysable tannins with diverse structures and biological activities [29]. The pharmacological properties found include inhibitory effects on various enzymes as reverse transcriptase, histidine carboxylase and protein kinase C. Tannins are also antitumoral, antiviral and antiinflammatory activities [30]. Tannins with antitumor activities were obtained from *Cuphea hissopifolia* and had cytotoxic activities over DU-145 cells [31].

More experiments are needed to examine the PB1 and "E" fractions. There must be fractionated and their pure products analyzed to elucidate their structures and biological activities.

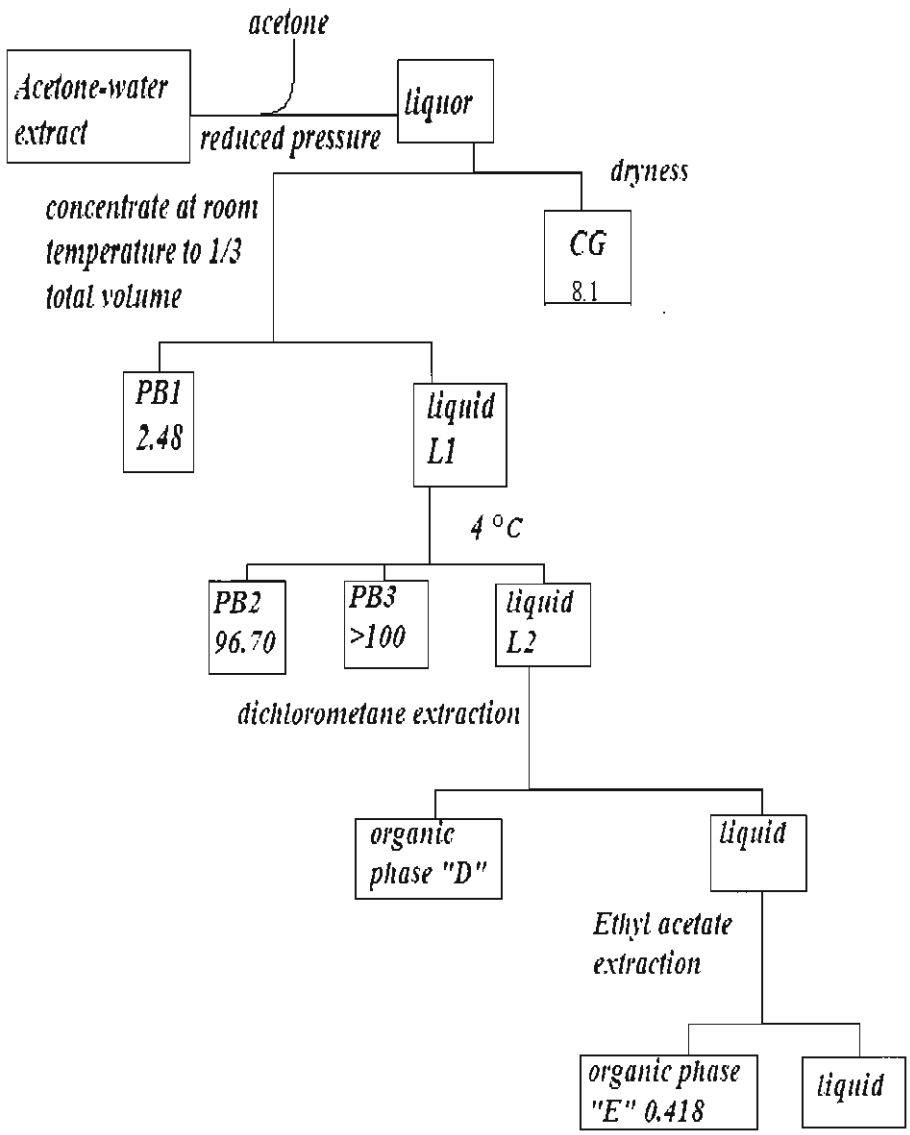


Figure 2. Block diagram. The cytotoxic values, ED_{50} (μg/ml) on the DU-145 cell line are indicated.

CONCLUSION

The PB1 and "E" fractions obtained from acetone-water extract of *Cuphea aequipetala* have cytotoxic selective actives.

REFERENCES

1. Kotin, P.: *Science* 168:106 (1970).
2. Hanahan, D. and Weinberg, R.A.: *Cell* 10:57 (2000).
3. Peto, J.: *Nature* 411:390 (2001).
4. *Estadísticas del Sector Salud y Seguridad Social* 19:49 (2002).
5. Cuevas-Urióstegui, M.L., Villasis-Keever, M.A., and Fajardo-Gutiérrez, A.: *Salud Pública de México* 45:S115 (2003).
6. Sherr, C.J.: *Science* 274:1672 (1996).
7. Bishop, J.M.: *Cell* 64:235 (1991).
8. Espinosa, E., Zamora, P., Feliu, J., and González, B.M.: *Cancer Treat. Rev.* 29:515 (2003).
9. Gibbs, F.B.: *Science* 287:1969 (2000).
10. Newman, D.J., Cragg, G.M., and Snader, K.M.: *J. Nat. Prod.* 66:1022 (2003).
11. Cragg, G.M., Newman, D.J., and Snader, K.M.: J. *Nat. Prod.* 60: 52 (1997).
12. Newman, D.J., Cragg, G.M., and Snader, K.M.: *Nat. Prod. Rep.* 17:215 (2000).
13. Hartwell, J.L.: *Lloydia* 30:379 (1967).
14. Cragg, G.M., Newman, D.J., and Weiss, R.B.: *Semin. Oncol.* 24:156 (1997).
15. Argueta, V.A. and Cano, A.J.: *Instituto Nacional Indigenista. México.* (1994).

16. Lozoya, X.: In: *Ethnobotany and the Search for New Drugs.* Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 185):130 (1994).
17. Hernández, F. *Universidad Nacional Autónoma de México.* México. Tomo III. pp. 137. (1959).
18. Baytelman, B. *Instituto Nacional de Antropología e Historia.* México. pp.123-6. (1993).
19. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vairo-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., and Boyd, M.: *J. Natl. Cancer Inst.* 83:757 (1991).
20. Cordell, G.A., Kinghorn, D., and Pezzuto, J.M.: In: Colegate, S.M. and Molyneux, R.J. (Eds): *Bioactive Natural Products.* Boca Raton, CRC Press. pp 195-216 (1993).
21. Rizk, A.M.: *Fitoterapia* 53:35 (1982).
22. Skeil, M.K.: In Geissman TA (Ed.): *The Chemistry of Flavonoid Compounds.* Spring-Verlang. pp. 34-69 (1962).
23. Wagner, H., Bladt, S., and Zgainski, E.M. *Spring-Verlang.* pp 163-193. (1984).
24. Heger,K.: In: Stahl E (Ed): *Thin Layer Chromatography. Spring –Verlang.* pp. 687-706 (1969).
25. Haslman, E.: In: Gross, G.G., Hemingway, R.W., and Yoshida, T. (Eds). *Plant polyphenols* 2. Kluger Academic/Plenum Publishers. pp 15-40. (1999).
26. Griffith, D.W.: In: D'Mello, J.P.F., Duffus, D.M., and Duffus, J.H. (Eds). *Toxic Substances in Crop Plants. The Royal Society of Chemistry.* Cambridge. pp 80 (1991).
27. Khanbabaee, K. and van Ree, T.: *Natl. Prod. Rep.* 18:641 (2001).
28. Saijo, R., Nonaka, G.-I. and Nishioka, I.: *Chem. Phar. Bull.* 37:2063 (1989).
29. Okuda, T., Yoshida, T., and Hatano, T.: *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 66:1 (1995).
30. Yang, L.-L., Wang, Chi-Chi Yen, K.-Y., Yoshida, T., Hatano, T., and Okuda, T. In: Gross, G.G., Hemingway, R.W., and Yoshida, T. (Eds). *Plants Polyphenols* 2. Kluwer Academic/Plenun Publishers. pp. 615 (1999).
31. Wang, Ch.-Ch., Chen, L.-G., and Yang, L.-L.: *Cancer Letters* 140:195 (1999).