

UNIVERSIDAD DE SONORA

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

Determinación de la actividad antiproliferativa y mecanismo de apoptosis de fracciones del extracto metanólico de *Krameria*

erecta



TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Salud

PRESENTA

Davisela Guadalupe Sierras Canchola

Hermosillo, Sonora

Febrero de 2013

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



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

FORMA DE APROBACION

Los miembros del jurado calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Davisela Guadalupe Sierras Canchola**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda

Director académico




Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras

Secretario



Dra. Olivia Valenzuela Antelo

Vocal



M.C. Moisés Navarro Navarro

Suplente

DEDICATORIAS

Con mucho amor....para mi familia...

A mi mamá Isela, por enseñarme tantas cosas de la vida y apoyarme en todo, estar conmigo siempre y enseñarme a salir a adelante, espero te sientas orgullosa de mi, te amo mamá.

A mi papá David, aún ante todo, siempre estas presente pendiente de todos mis logros, espero que siempre sea así.

A mi hermano David, porque eres el mejor hermano del mundo, y siempre estás conmigo, apoyándome y dándome razones para seguir adelante.

A mi sobrino Davisito, que día con día nos enseña cosas bellas de la vida, espero que todos tus sueños siempre se cumplan y te conviertas en una persona con todo el éxito del mundo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios por permitirme llegar a donde estoy ahora, por brindarme salud y fuerza para seguir este camino.

A mi director de tesis, Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda, no solo por dejarme ser su alumna y enseñarme tantas cosas, también por su apoyo incondicional, su confianza y por todas las oportunidades que me ha brindado a lo largo de este proyecto, gracias por dejarme formar parte de su equipo de trabajo, por ayudarme, por su paciencia, por su tiempo y por formarme para convertirme en alguien mejor, de corazón, muchas gracias.

A mis sinodales, Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras, Dra. Olivia Valenzuela Antelo y Mtro. Moisés Navarro Navarro, gracias por apoyarme y enseñarme a trabajar mejor cada día, sus consejos son muy valiosos para mí, me hicieron aprender y entender muchas cosas, gracias por su apoyo y por el tiempo que han dedicado a mi formación.

A la maestra Judith Valdez y a la maestra Lucila Rascón, por su apoyo incondicional, por sus consejos, por dejarme formar parte de su lugar de trabajo, gracias por la confianza y por brindarme su amistad, sin duda, ambas tienen mi respeto y mi admiración por compartir tantos momentos, muchas gracias.

Al Dr. Manuel Jiménez Estrada por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y compartir conmigo sus enseñanzas.

A Dora Edith Valencia Rivera "Dorita", sabes que mi agradecimiento hacia ti es inmenso, me enseñaste tantas cosas, aprendí demasiado contigo, aprendimos juntas y nos convertimos en un excelente equipo, no solo de trabajo sino también de amistad, el mejor diría yo, te agradezco todo tu tiempo, tus consejos, tus enseñanzas, tu apoyo, tu paciencia, tu amistad y tu cariño,

créeme que eres una parte muy importante en mi desarrollo y te agradezco inmensamente todo el tiempo que compartimos este proyecto, fue muy fácil y realmente divertido trabajar contigo y convertirnos en grandes amigas, te quiero mucho Dorita.

A Jorge Becerra y Zuilma García, agradezco que formaran parte de este importante proyecto, por compartir conmigo tantas cosas, por convertirse en mis compañeros, mis amigos y estar conmigo siempre, sin ustedes no habría sido nada fácil, gracias por su apoyo y por su amistad.

A mis compañeros de de laboratorio y amigos Efraín, Adriana, Ivonne, Jael, Paola, Iván, Wenses, Sergio, Lily, Heriberto por compartir tantas experiencias juntos, por hacer que el laboratorio se convirtiera en nuestro segundo hogar, por el apoyo y los consejos que me brindaron y sobre todo por su amistad.

Al Cuerpo Académico de Bioquímica y Biología por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, al Dr. Eduardo Ruiz Bustos, Dra. Adriana Garibay Escobar y al Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz, gracias por su apoyo y confianza durante este trabajo.

A mi familia por estar al pendiente de cada paso de este importante trabajo.

A mis amigos, Marlenne, Marina, Ángel, Damaris, Christian Lujan, Memo, Daniel y Natalia por su apoyo para salir adelante y formar siempre parte importante de mi formación, los quiero amigos.

Agradezco a todos los que de alguna manera participaron en la elaboración de este proyecto.

A mis alumnos que motivan a seguir adelante y enseñarme lo bello de la docencia.

AGRADECIMIENTO A CONACYT

Agradecemos el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo de tesis al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto

“In All things there is a poison, and there is
nothing without a poison. It depends on only
upon the dose whether a poison is a poison or not”

Paracelsus Switzerland

INDICE

LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	xi
OBJETIVOS.....	xivii
General.....	vii
Particulares	vii
RESUMEN.....	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Cáncer.....	4
Visión General del Proceso del Cáncer.....	4
La Apoptosis y el Cáncer	6
Epidemiología	8
Plantas Medicinales.....	11
Historia de la Medicina Tradicional	11
Fitoquímica.....	13
Componentes Químicos de las Plantas.....	16
Isoprenoides.....	18
Compuestos Fenólicos.....	20
Alcaloides.....	24
Planta en estudio.....	25

Género <i>Krameria</i>	25
<i>Krameria erecta</i> (Cosahui)	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
Obtención del Extracto	33
Obtención de Fracciones del Extracto.....	33
Líneas Celulares.....	34
Determinación de la Actividad Antiproliferativa de las Fracciones Obtenidas del Extracto Metanólico de <i>K. erecta</i>	35
Fraccionamiento Biodirigido del Extracto Metanólico de <i>K. erecta</i>	37
Cromatografía en Placa Fina	37
Cromatografía en Columna	37
Evaluación del Mecanismo de Inducción de Muerte Celular Mediado por Apoptosis.....	38
Reducción del Potencial de Membrana Mitocondrial	38
Evaluación de la Actividad de las Caspasas	39
Análisis Estadístico.....	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
Obtención del Extracto Metanólico de <i>Krameria erecta</i> y sus Fracciones. 41	
Determinación de la Actividad Antiproliferativa de las Fracciones Obtenidas del Extracto Metanólico de <i>K. erecta</i>	41
Fraccionamiento Biodirigido del Extracto Metanólico de <i>K. erecta</i>	46
Cromatografía en Placa Fina	46
Cromatografía en Columna	46

Actividad Antiproliferativa de Fracciones Cromatográficas.....	49
Fraccionamiento de la Fracción Cromatográfica Activa F3 por Cromatografía en Placa Fina.....	58
Determinación de la Actividad Antiproliferativa de las Subfracciones Obtenidas de la Fracción Activa F3.....	61
Evaluación del Mecanismo de Inducción de Muerte Celular Mediado por Apoptosis.....	64
Efecto de <i>Krameria erecta</i> Sobre el Potencial de Membrana Mitocondrial.....	64
Inducción de Apoptosis por Activación de la Vía Dependiente de Caspasas	65
CONCLUSIONES	70
BIBLIOGRAFÍA.....	71

LISTA DE TABLAS

		Página
I	Clasificación de los isoprenoides y su función	21
II	Estudios realizados en especies de <i>Krameria erecta</i>	28
III	Rendimiento y peso en gramos de las fracciones obtenidas del extracto metanólico de <i>Krameria erecta</i>	42
IV	Determinación de IC ₅₀ de fracciones de <i>Krameria erecta</i> en líneas celulares cancerosas y no cancerosas	44
V	Especificaciones de subfracciones cromatográficas de la fracción de acetato de etilo de <i>Krameria erecta</i>	47
VI	Actividad antiproliferativa de las subfracciones activas de la fracción de acetato de etilo de <i>Krameria erecta</i>	56
VII	Pesos de los extractos de las subfracciones de la subfracción activa F3 obtenidos por la cromatografía en placa fina de <i>Krameria erecta</i>	60

LISTA DE FIGURAS

		Página
1	Proceso del cáncer	5
2	Vías de apoptosis	9
3	Polimerización del isopreno	19
4	Clasificación de compuestos fenólicos	23
5	Lignanos aislados de especies de <i>Krameria erecta</i>	27
6	Fotografías de la especie de <i>Krameria erecta</i>	32
7	Tamizaje de actividad antiproliferativa de fracciones cromatográficas.	50
8	Características morfológicas de la línea celular M12.A ^k C3F6 frente a diferentes concentraciones de las subfracciones cromatográficas 2, 3 y 4	52
9	Características morfológicas de la línea celular M12.A ^k C3F6 frente a diferentes concentraciones de las subfracciones cromatográficas 5, 6 y 7	53
10	Características morfológicas de la línea celular M12.A ^k C3F6 frente a diferentes concentraciones de las subfracciones cromatográficas 8, 9 y 10	54

11	Características morfológicas de la línea celular M12.A ^k C3F6 frente a diferentes concentraciones de las subfracciones cromatográficas 1, 12 y 13	55
12	Cromatografía en placa fina realizada en la fracción activa F3	59
13	Evaluación de la actividad antiproliferativa de las subfracciones de la fracción activa F3 a 25 µg/ml concentración	62
14	Actividad antiproliferativa de la subfracción activa F3-F2 de <i>K. erecta</i> .	63
15	Disminución del potencial de membrana mitocondrial.	66
16	Activación de caspasas 3,8 y 9	68

OBJETIVOS

General

Determinar la actividad antiproliferativa y mecanismo de apoptosis de fracciones obtenidas del extracto metanólico de *Krameria erecta*.

Particulares

- a) Obtener las fracciones con hexano, acetato de etilo y etanol a partir del extracto metanólico de *Krameria erecta*.
- b) Determinar la actividad antiproliferativa del extracto metanólico, así como de las distintas fracciones obtenidas de *Krameria erecta* frente a líneas de tipo cancerosas HeLa, M12.A^k C3F6, Raw 264.7.
- c) Fraccionar por cromatografía en placa fina y columna las fracciones con actividad antiproliferativa.
- d) Evaluar el mecanismo de muerte celular de las fracciones con actividad antiproliferativa.

RESUMEN

En la actualidad existen numerosas enfermedades degenerativas o procesos patológicos tales como cáncer, diabetes, Alzheimer entre otras, con un elevado índice de mortalidad. En México, el cáncer es la tercera causa de muerte. En la antigüedad las plantas medicinales sirvieron como remedios para aliviar síntomas o tratar enfermedades. Hoy en día existen gran cantidad de métodos y técnicas para determinar la actividad biológica de las plantas y contribuir al desarrollo de fármacos. Estudios previos de la especie *Krameria erecta* han demostrado que el extracto metanólico tienen actividad antiproliferativa, actúa como un potente antioxidante además de la presencia de compuestos fenólicos, lignanos y terpenoides. El objetivo de este trabajo es identificar las fracciones del extracto metanólico de *Krameria erecta* con actividad antiproliferativa así como determinar su mecanismo apoptosis. La actividad antiproliferativa se midió por métodos de viabilidad celular (MTT y azul de tripano) y el fraccionamiento del extracto con solventes de distinto índice de polaridad y por cromatografía en columna y placa preparativa; el mecanismo de apoptosis fue evaluado por la pérdida de potencial de membrana mitocondrial con JC-1 y activación de caspasas 3, 8 y 9 mediante citometría de flujo. El extracto metanólico crudo y las fracciones de acetato de etilo y hexano mostraron actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares cancerígenas M12. A^k C3F6, HeLa y Raw 264.7; mientras que en la línea celular no cancerígena L-929 no mostró actividad; la fracción de acetato de etilo fue subfraccionada por cromatografía en columna obteniendo 37 (F1-F37) subfracciones, siendo la subfracción F3 como la más activa y se continuó su fraccionamiento; se encontró que la subfracción F3-F2 mostró la mayor actividad antiproliferativa sobre la línea celular cancerosa M12.A^k C3F6; así mismo se encontró que la posible vía apoptótica en este trabajo fue la vía intrínseca o mitocondrial por

observarse un cambio en la despolarización de la membrana de células M12.A^k C3F6 tras haber sido expuestas a la subfracción F3-F2 de *Krameria erecta*.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen numerosas enfermedades degenerativas o procesos patológicos tales como cáncer, diabetes, enfermedades del corazón, Alzheimer entre otras, con un elevado índice de mortalidad. En México el cáncer es la tercera causa de muerte (Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 2010); es debido a esto, que la búsqueda de nuevas terapias alternativas para el tratamiento del cáncer es ahora el foco de atención de muchos estudios. El cáncer es un conjunto de enfermedades en las cuales el organismo produce un exceso de células malignas debido a un crecimiento incontrolado y una propagación de células anormales. Todos los organismos vivos están compuestos de miles de células, es debido a esto que existen una gran cantidad de tipos de cáncer dependiendo del tejido u órgano donde se inició; estas células crecen y se dividen para producir nuevas células bajo un proceso controlado, muchas veces este proceso ordenado se descontrola y es cuando inicia la propagación incontrolada de células anormales (Instituto Nacional del Cáncer, 2006).

En condiciones normales existe un equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis, pero en el cáncer aparecen mutaciones que dan lugar a la activación de *oncogenes* (codifican proteínas del ciclo celular que favorecen la proliferación celular) o a la inactivación de *genes supresores* (codifican proteínas que frenan el ciclo celular). De este modo el equilibrio se rompe y la balanza se decanta hacia la proliferación desenfrenada y la inmortalización de la línea celular (Burgués et al, 2005). En el cáncer hay una pérdida del balance de la división celular y la muerte celular y aquellas células que debieron haber muerto pero no recibieron señales para hacerlo (Wong, 2011). Las señales apoptóticas, tanto intra como extracelulares, convergen para activar a las caspasas. La condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN, la rotura

de la membrana nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos son consecuencias directas de la actividad de caspasas efectoras, se han descrito dos vías principales de la apoptosis, la vía intrínseca o mitocondrial que activa inicialmente a la caspasa 9 y la vía extrínseca mediada por receptores tales como Fas y el factor de necrosis tumoral (TNF) activando la caspasa 8 (Sánchez et al., 2003; Wong, 2011). Las vías apoptóticas, tanto intracelulares como extracelulares, convergen para activar a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 (Sánchez-Torres et al., 2003).

Actualmente, existen una gran cantidad de tipos de cáncer y están diferenciados por etiología, historia natural y procedimientos (Kohn et al., 2006). Así mismo esta enfermedad es tratada clínicamente con quimioterapia, cirugías y radioterapia, aún después de estos métodos, la metástasis de células cancerosas puede continuar y seguir avanzando hasta que el tratamiento se dificulta (Demirtas et al., 2009).

El mecanismo de acción de las drogas contra el cáncer y la radiación radioactiva es el daño al DNA, para así suprimir la duplicación de DNA de células malignas evitando su proliferación y así mueran, aun así este tratamiento también tiene el mismo efecto con células normales provocando importantes efectos adversos (Demirtas et al., 2009).

Por esta razón el cáncer es considerado un problema a nivel mundial, la Sociedad Americana del Cáncer afirma que un estimado de 7.6 millones de personas murieron en el 2007 debido a esta enfermedad. Esta situación ha inducido a una intensa búsqueda de nuevos tratamientos contra el cáncer más eficientes y específicos a células cancerosas.

El uso de plantas con fines terapéuticos, es un legado que nos han dejado nuestros ancestros. En la medicina tradicional de Sonora existen reportadas alrededor de 450 especies de plantas con alguna utilidad. *Krameria erecta* es una especie de planta nativa del Estado de Sonora, utilizada tradicionalmente

como tratamiento contra la diabetes, gripe y enfermedades del riñón; además en estudios previos se demostró su efecto antiproliferativo, así como una elevada actividad antioxidante con un alto contenido de fenoles totales y flavonoides, compuestos que han sido relacionados con actividad antiproliferativa.

Con base a lo anterior, el presente estudio tuvo la finalidad de evaluar el efecto antiproliferativo de la especie de *Krameria erecta* sobre distintas líneas celulares e identificar la fracción con la mayor actividad para posteriormente describir un compuesto activo.

ANTECEDENTES

Cáncer

Visión General del Proceso del Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento desmesurado (proliferación) y diseminación (metástasis) de células anormales, se desarrolla a través de un proceso complejo que involucra muchos cambios graduales y pequeños en el comportamiento de las células normales. Todos los organismos vivos están compuestos de miles de células, es debido a esto que existen una gran cantidad de tipos de cáncer dependiendo del tejido u órgano donde se inició; estas células crecen se dividen para producir nuevas células bajo un proceso totalmente controlado, muchas veces este proceso ordenado se descontrola y es cuando inicia la propagación incontrolada de células anormales (Instituto Nacional del Cáncer, 2006). Actualmente, más de un centenar de tipos de cáncer son conocidos y están diferenciados por etiología, historia natural y procedimientos (Kohn et al., 2006). En la figura 1 se muestra un esquema el proceso del cáncer. El ADN de las células normales puede dañarse al ser expuesto a la luz solar, agentes infecciosos, el humo del tabaco ó los químicos industriales. Algunos factores internos como las hormonas y un ADN hereditario dañado (llamado mutaciones genéticas) también contribuyen al desarrollo del cáncer. Cerca del 30% al 40% de los casos de cáncer alrededor del mundo pueden ser atribuidos a dietas no saludables y a un modo de vida sedentario (Díaz y Domínguez, 2010).

Las células tienen varios métodos para reparar el daño al ADN y restaurar su funcionamiento normal. No obstante, cuando dicho proceso de restauración

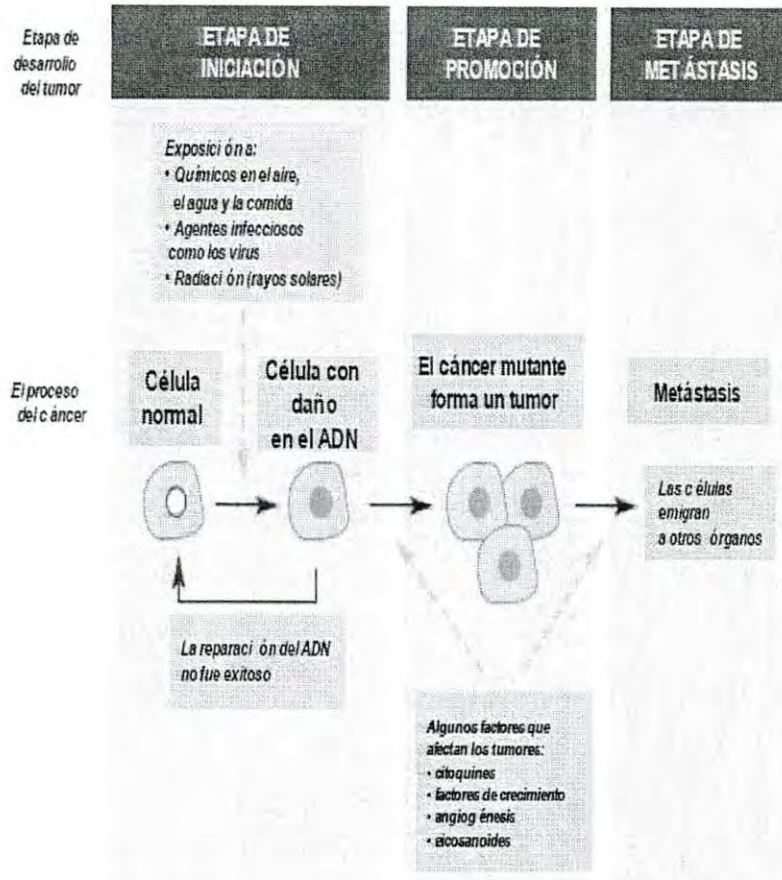


Figura 1. Proceso del cáncer. El cáncer se divide en tres etapas, la primera es la etapa de iniciación, donde las células se exponen a químicos, agentes infecciosos y mutaciones genéticas dañando al DNA, cuando no hay una reparación de DNA exitosa, se pasa a la etapa de promoción, donde algún agente promotor induce a la reproducción estable de las células mutadas, estos agentes promotores pueden ser citocinas, factores de crecimiento entre otros; Finalmente se pasa a la etapa de metástasis, cuando las células mutadas tienen la capacidad de invadir otros tejidos circundantes y propagarse (Díaz y Domínguez, 2010).

falla, las células pasan a través de mutaciones adicionales (cambios) y comienzan a multiplicarse (proliferarse) descontroladamente. Esta es la etapa de iniciación del proceso del cáncer. Muchos factores contribuyen al crecimiento de estas células cancerígenas mutantes, como: las citocinas, los eicosanoides, las hormonas y algunos nutrientes como los ácidos grasos. Cuando las condiciones son apropiadas, las células mutantes forman un tumor que puede desarrollar una red de vasos sanguíneos para garantizar un suministro constante de oxígeno y nutrientes para su crecimiento. Este proceso se denomina angiogénesis y representa la etapa de promoción. La metástasis ocurre cuando algunas células del tumor se separan del tumor principal y se desplazan a otros tejidos del cuerpo. Los agentes que dañan el ADN, predominantemente radiación y quimioterapias citotóxicas, se han utilizado exitosamente en el tratamiento de pacientes con una gran variedad de tumores durante varias décadas y continúan siendo clave en los protocolos actuales de tratamiento contra el cáncer. Sin embargo, aunque estos tratamientos poseen cierta selectividad por la inducción de muerte en células tumorales, la utilidad clínica de tales agentes es frecuentemente limitada por ocasionar efectos adversos en tejidos normales (vías de reparación del DNA) (Díaz y Domínguez, 2010).

La Apoptosis y el Cáncer

La apoptosis es la forma fisiológica de muerte celular que interviene en la embriogénesis, en el recambio celular de los tejidos y en la eliminación de células infectadas, mutadas o dañadas (Burgués et al., 2005), es un proceso celular genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos (Lawen, 2003). El proceso es innato y ha sido evolutivamente conservado, las células se inactivan, se

desensamblan y degradan su propia estructura y componentes de manera coordinada y característica (Sánchez-Torres et al., 2003)

En condiciones normales existe un equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis, pero en el cáncer aparecen mutaciones que dan lugar a la activación de *oncogenes* (codifican proteínas del ciclo celular que favorecen la proliferación celular) o a la inactivación de *genes supresores* (codifican proteínas que frenan el ciclo celular). De este modo el equilibrio se rompe y la balanza se decanta hacia la proliferación desenfrenada y la inmortalización de la línea celular. Pero un cáncer se define no sólo por la inmortalización de las células sino también por la capacidad invasora local y a distancia (Burgués et al, 2005). En el cáncer hay una pérdida del balance de la división celular y la muerte celular y aquellas células que debieron haber muerto pero no recibieron señales para hacerlo (Wong, 2011).

Morfológicamente, en la apoptosis se produce la fragmentación de ADN mientras se mantiene la integridad de la membrana hasta estadios tardíos en la muerte celular (Burgués et al, 2005). Las células que entran en apoptosis muestran un estrechamiento rápido del citosol y una pérdida de contacto con las células vecinas por alteraciones en las moléculas de adhesión de la membrana plasmática. En el núcleo hay compactación del material genético y segregación hacia la membrana nuclear e intervención de las desoxirribonucleasas que fragmenta al ADN. Asimismo el citoplasma se condensa y se forman vesículas, denominadas cuerpos apoptóticos que contienen restos del núcleo protegido por la membrana nuclear, organelos y retículo endoplásmico (Elinos-Báez et al., 2001; Miguelañez, 2007).

La vía extrínseca puede ejemplificarse con la señal pro-apoptotica que se desencadena por la unión de Fas con su ligando. FasL (CD95L) es un trímero que al unirse con Fas (CD95 o APO-1) induce la trimerización de éste. Esta unión provoca el reclutamiento del complejo DISC (death inducing signaling

complex) al dominio citoplasmático de Fas. DISC contiene proteínas adaptadoras que permiten la unión a la pro-caspasa 8 favoreciendo su auto activación; la caspasa 8 puede activar entonces a las caspasas efectoras 3, 6 y 7. La vía intrínseca o mitocondrial se activa por estrés y otras señales que provocan la translocación de la mitocondria de miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, como Bax. Lo anterior provoca la liberación del citocromo C al citosol, lo cual se acompaña de la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. En el citosol, el citocromo C se une a Apaf-1 y una vez unido y en presencia de ADP o ATP se forma el complejo conocido como apoptosoma, el cual recluta y activa a la pro-caspasa 9 que a su vez puede activar a las caspasas efectoras 3, 6 y 7(Sánchez-Torres et al., 2003) (Figura 2), donde sus consecuencias directas son la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN, la rotura de la membrana nuclear, la pérdida de contacto con las células vecinas, contracción del citoplasma provocando disminución del tamaño celular y la formación de cuerpos apoptóticos. Las caspasas en las células vivas existen como zimógenos inactivos que se activan por rotura proteolítica mediante dos vías alternativas (Burgués et al., 2005; Sánchez-Torres et al., 2003).

El conocimiento de la apoptosis en condiciones de enfermedad es muy importante, ya que no solo nos da una idea acerca de la patogénesis de la enfermedad sino que también nos da información sobre cómo tratarla (Wong, 2011).

Epidemiología

El cáncer es considerado un problema a nivel mundial, la Sociedad Americana del Cáncer afirma que un estimado de 7.9 millones de personas murieron (13% de defunciones) en el 2007 debido a esta enfermedad; se estima que para el

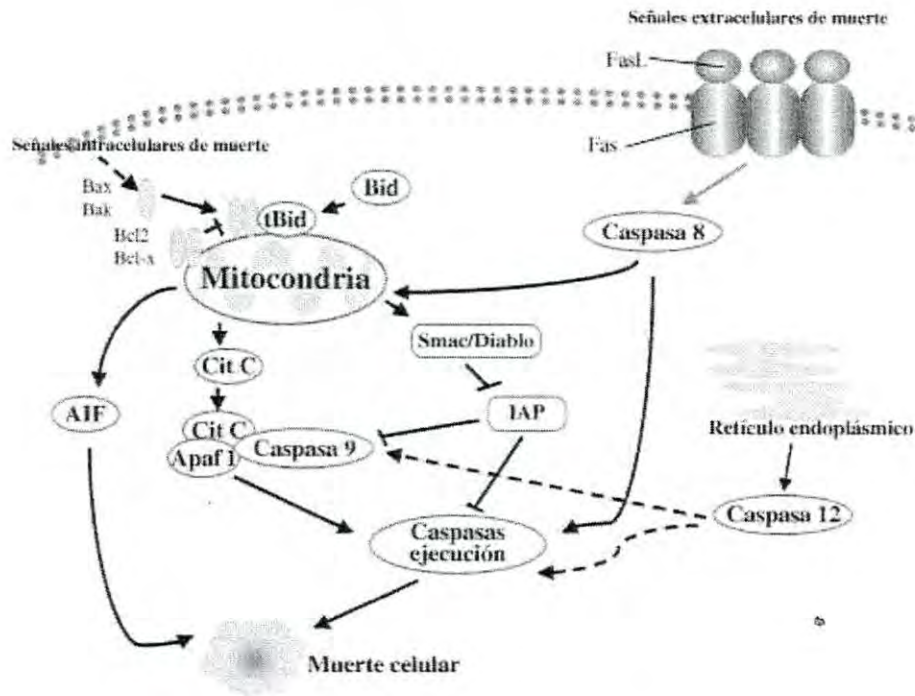


Figura 2. Vías de apoptosis. La vía intrínseca inicia con señales intracelulares derivadas de estrés o radiaciones activando proteínas de tipo Bcl-2 y la liberación del citocromo c que provocan la unión a apaf-1 (apoptotic protease-activating factor) que activa la caspasa 9. La vía extrínseca inicia con los receptores de muerte Fas (CD95) que activa el complejo FADD (Fas associated death domain) que forma el complejo DISC (death-inducing signaling complex) activando la caspasa 8. La activación de la caspasa 8 y 9, dan como resultado una cascada de activación de caspasas que tienen como objetivo la liberación de caspasas efectoras como la caspasa 3 que comienza el mecanismo apoptótico de muerte celular (Burgués et al., 2005).

2020 se presentarán alrededor de 14.7 millones de casos (Instituto nacional de cancerología, 2004). En México el INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) muestra que en el 2011, el cáncer ocupó el tercer lugar en mortalidad con un total de 71 350 muertes en ese año, de las cuales 34 852 fueron hombres, siendo el cáncer de próstata, tráquea, bronquios y pulmón los más representativos; y un total de 36 497 muertes en mujeres, siendo el cáncer de mama y de cuello uterino los que ocupan el primer lugar, sin embargo, existen aún millones de personas que viven con cáncer o han padecido esta enfermedad (Demirtas et al., 2009).

Es debido a esto que instituciones como el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos ha implementado las investigaciones *in vitro* para el descubrimiento y búsqueda de nuevos tratamientos contra el cáncer que sean más eficientes y específicos a células cancerosas. Con el propósito de examinar esta búsqueda, se propone una evaluación inicial de más de 10,000 nuevas sustancias por año para la actividad citotóxica y/o la inhibición del crecimiento contra una gran diversidad de tipos de tumores y permitir la detección de la sensibilidad que un tumor puede tener a una determinada droga (Castro., 2006). Es por esta razón que los investigadores han puesto sus esfuerzos en nuevas alternativas para la obtención de nuevas sustancias que puedan ser efectivas contra el tratamiento del cáncer, es aquí en donde entran los productos naturales y las plantas medicinales. Las compañías farmacéuticas están buscando drogas alternativas de otras fuentes incluyendo las plantas y los animales. Las plantas medicinales son consideradas como una fuente potencial de nuevas drogas quimioterapéuticas debido a su contenido de fitoquímicos y a su poco o nulo efecto secundario en las personas (García et al., 2010).

Plantas Medicinales

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera como planta medicinal todo vegetal que contiene, en uno o más de sus órganos, sustancias que pueden ser usadas con finalidades terapéuticas o que son precursores en la semisíntesis químico-farmacéutica (Schreiber et al., 2004). Estas sustancias secretadas por las plantas son llamadas metabolitos secundarios, que son sustancias que se encuentran muy distribuidas pero a la vez muy restringidas a ciertas especies, géneros o familias, están divididas en tres grandes grupos, los compuestos fenólicos, isoprenoides y alcaloides (Martínez, 2005); Compuestos que en la actualidad son conocidos como los responsables de las propiedades biológicas de las plantas (Croteau et al., 2000).

Historia de la Medicina Tradicional

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempos inmemorables. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso único recurso que disponían los médicos. El uso de estas plantas con propósitos medicinales se ha transferido a través de las generaciones mediante la tradición oral, por lo que muchas veces estos efectos solo son conocidos por los habitantes de las regiones (Waizel, 2006). Dichas plantas medicinales y los remedios que utilizaban se siguen utilizando hoy en día (Araujo, 1998).

La medicina tradicional ha sido utilizada por miles de años con grandes contribuciones llevadas a cabo por personas que trabajan en el sector salud; Existen un buen número de sustancias químicas vegetales que pueden considerarse fármacos y son empleados en uno o más países, de las cuales el

74 % fue descubierto a partir de su empleo en la medicina tradicional (Maguna et al., 2006).

El descubrimiento de nuevas sustancias a partir de plantas con actividad terapéutica constituye todo un reto científico. El reino vegetal contiene un enorme potencial de moléculas por descubrir; se estima que más del 90% de las especies no han sido estudiadas. La naturaleza ha demostrado ser una fuente importante de compuestos anticancerígenos efectivos; por ejemplo drogas derivadas de microorganismos y de plantas. Los productos naturales representan el 50% de las drogas de uso clínico en países desarrollados, el 25% de los cuales derivan de plantas superiores (Castro, 2006). En la actualidad, el estudio de plantas medicinales es muy intenso y los métodos modernos de separación permiten obtener componentes que se pueden analizar evaluando sus posibles efectos terapéuticos, aunque aún se cuenta con la desventaja de que estos componentes se encuentran en pequeñas cantidades y muestran estructuras muy complicadas (Waizel, 2006).

De los medicamentos que usa la medicina moderna, aproximadamente el sesenta por ciento proviene de las plantas; en la actualidad, de 300,000 de plantas identificadas en el mundo, unas 20,000 sirven para fines medicinales. En México, hay alrededor de 40,000 especies de plantas, muchas más que en otros países, y de éstas unas 4,000 son medicinales (García, 1982). De acuerdo con López e Hinojosa (1988), Sonora, cuenta con alrededor de 450 especies con uso medicinal entre los diferentes grupos étnicos algunas de las cuales han sido valoradas científicamente por sus propiedades anticancerígenas, antiproliferativas, antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas, entre otras (Alday, 2008; Becerra, 2011; Fimbres y Sierras 2009; Rascón, 2009; Valencia, 2012).

Fitoquímica

La fitoquímica o de la química de las plantas se ha ido desarrollando en los años recientes como una disciplina distinta, se encuentra estrechamente relacionado entre la química de los productos orgánicos naturales y la bioquímica vegetal. Incluye una enorme variedad de sustancias químicas orgánicas que son elaboradas y acumuladas por las plantas; además de ocuparse de la estructura química de estas sustancias, su biosíntesis, su distribución natural y su función biológica (Harborne, 1974)

El estudio de los componentes de las plantas medicinales se centran en las sustancias que ejercen una acción farmacológica sobre el ser humano o los seres vivos. Los principios activos de las plantas pueden ser sustancias simples (como alcaloides) o sustancias complejas (resinas, aceites esenciales etc.). Los compuestos más comunes son azúcares y heterósidos (azúcar más un compuesto sin azúcar), que pueden ser glucósidos, galactósidos, etc. Otros componentes activos de las plantas son los alcaloides, lípidos, gomas, mucílagos, principios amargos, taninos, aceites esenciales, resinas, bálsamos, oleorresinas, ácidos orgánicos, enzimas y vitaminas. En esta disciplina se necesitan distintos métodos para la extracción, separación, purificación e identificación de los diferentes compuestos presentes en las plantas. Por lo tanto, los avances en la fitoquímica están directamente relacionados con la explotación exitosa de conocimientos y desarrollo de nuevas técnicas (Harborne, 1974).

Métodos de extracción y aislamiento. Actualmente existen nuevas alternativas para la extracción de los compuestos, basados en desecar la planta antes de la extracción bajo condiciones controladas para evitar que ocurran cambios químicos, debe ser secada lo más rápido posible sin utilizar altas

temperaturas, lo ideal es dejar a la temperatura ambiente, una vez seca la planta puede ser utilizada para el análisis en ese momento o en un tiempo indefinido.

El modo preciso de extracción naturalmente depende de la textura y del contenido de agua del material vegetal que se extrae además del tipo de sustancia que se desea aislar. El alcohol es el disolvente ideal para la extracción preliminar. Es necesario después macerar el material vegetal si se quiere obtener una extracción exhaustiva. El procedimiento químico clásico para la obtención de componentes orgánicos a partir de tejido de la planta seca es extraer continuamente el pulverizado en un aparato Soxhlet con una gama de disolventes, comenzando a su vez con el hexano, éter, el petróleo y el cloroformo (para separar los lípidos y terpenoides) y el uso de alcohol y acetato de etilo (para más componentes polares). El extracto obtenido es filtrado y después concentrado en condiciones de vacío, usualmente en un evaporador rotatorio que concentrara soluciones voluminosas hasta pequeños volúmenes y con temperaturas entre 30 a 50°C (Harborne, 1974)

Métodos de separación. Para la separación y purificación de los constituyentes de las plantas es necesaria la utilización de una o de la combinación de tres técnicas cromatográficas. Cromatografía en papel (PC, por sus siglas en inglés, paper chromatography), cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés, thin layer chromatography) y cromatografía líquida de gases (GLC, por sus siglas en inglés, gas liquid chromatography). La elección de la técnica depende de las propiedades de solubilidad y volatilidad de los compuestos a separar. PC es particularmente aplicable a constituyentes de plantas solubles en agua, entre ellos carbohidratos, aminoácidos, bases de ácidos nucleicos, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos. TLC es el método de elección para separar todos los componentes solubles en lípidos como por

ejemplo lípidos, esteroides, carotenoides, quinonas y clorofilas. En contraste la última técnica GLC encuentra su principal aplicación en compuestos volátiles, ácidos grasos, mono y sesquiterpenos, hidrocarburos y compuestos sulfurados.

Todas las técnicas pueden ser utilizadas a gran o pequeña escala. Para el aislamiento en una escala mucho más grande es usual el uso de una columna cromatográfica acoplada a la colección de fracciones, este procedimiento producirá la purificación de compuestos en una mayor cantidad. También existe la posibilidad de aislar compuestos por medio de electroforesis, en primera instancia esta técnica es solo aplicable a compuestos que tienen carga ya sea aminoácidos, algunos alcaloides, aminas, ácidos orgánicos y proteínas. (Harborne, 1974).

Métodos de identificación. En la identificación de los componentes de las plantas, una vez realizada el aislamiento y purificación es necesario primero determinar la clase de compuesto y después encontrar una sustancia particular dentro de esta clase. La clase de compuestos es usualmente determinada por su respuesta a algún método colorimétrico, su solubilidad, sus propiedades R_f y por las características de su espectro en UV. La identificación completa de las clases depende en la medición de otras propiedades y la después comparación de esos datos con aquellos que ya hayan sido establecidos en la bibliografía.

Estas propiedades incluyen punto de fusión para sólidos, punto de ebullición para líquidos y rotación óptica para compuestos activos ópticamente.

Sin embargo, los datos informativos sobre una sustancia vegetal son sus características espectrales: estas incluye ultravioleta (UV), Infrarrojo (IR) resonancia magnética nuclear (NMR) y espectrofotometría de masas (MS). La directa comparación con material auténtico (si están disponibles) ayuda a la identificación final; Si la información no está disponible con ayuda de la

bibliografía comparando los compuestos obtenidos con referencias bibliográficas es suficiente (Harborne, 1974).

Componentes Químicos de las Plantas

Las plantas mediante el proceso de la fotosíntesis producen las sustancias necesarias para todos los ciclos vitales de la naturaleza. A través de conocidos mecanismos bioquímicos producen carbohidratos, proteínas, grasas, vitaminas entre otros, que intervienen directamente en los procesos de supervivencia, crecimiento y reproducción; como la fotosíntesis, la respiración, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes y la formación de proteínas que intervienen en la parte estructural de la planta; adicionalmente mantienen la atmósfera rica en oxígeno y deficiente en dióxido de carbono, permitiéndonos respirar; es por esto que los investigadores los han denominado metabolitos primarios, dado que se encuentran en prácticamente todas las formas de vida y cumplen funciones básicas para la misma. Existen otras sustancias que no se encuentran tan distribuidas y que se hallan restringidas solo a ciertas especies, géneros o familias como son los alcaloides, las saponinas esteroides, los aceites esenciales, los terpenoides, compuestos fenólicos etc., a los cuales se les denomina metabolitos secundarios (Martínez, 2005). Estos metabolitos no cumplen un rol directo en la supervivencia de la planta y por lo tanto su ausencia no es letal para ésta, en consecuencia, incluyen a los compuestos sintetizados por las plantas y que aparentemente no tienen una función esencial (Taiz et al., 2006).

Por muchos años el valor adaptativo de la mayoría de los metabolitos secundarios fue desconocido. Muchas veces fueron pensados simplemente como productos finales de procesos metabólicos, sin función específica, o directamente como productos de desecho de las plantas. El estudio de estas

sustancias fue iniciado por la importancia de éstas como drogas medicinales, venenos, saborizantes, pegamentos, aceites, ceras, y otros materiales utilizados en la industria. En estudios biológicos más recientes se determinó que la mayoría de los metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos actuando como agentes alelopáticos, o para atraer a los polinizadores o a los dispersores de las semillas (Croteau et al., 2000).

Los principales componentes químicos de estas mezclas son: mono y sesquiterpenos además de carbohidratos, alcoholes, éter, aldehídos y cetonas, los cuales son responsables de las fragancias y de las propiedades biológicas de las plantas aromáticas y medicinales. Los aceites esenciales y extractos vegetales cubren un amplio espectro de efectos farmacológicos mostrando diversas propiedades como antiinflamatorios, antioxidantes, y anticancerígenos. Otras actividades biológicas se reportan como biocidas en contra de una amplia gama de microorganismos como bacterias, hongos, virus, protozoarios, insectos y plantas (García et al., 2010).

Ciertamente, las plantas poseen un enorme y desconocido reservorio de sustancias derivado de sus actividades metabólicas enfocado a sus sistemas de defensa en contra de microorganismos, insectos y herbívoros. Aunque se han identificado algunas sustancias simples como fenoles, derivados de los fenoles (quinonas, flavonas, flavonoides, flavonoles, taninos y cumarinas), terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, pectinas y polipéptidos, los extractos de plantas completas permanecen en uso (García et al., 2010).

Mientras que se conocen las composiciones químicas de algunos extractos vegetales y aceites esenciales, y ya son usados en base a sus propiedades que se tienen bien documentadas *in vitro*, hay pocos datos para muchos otros (García et al., 2010; Montes-Belmont, 2007).

Desde 1961 se han aislado compuestos de plantas que se utilizan como agentes anticancerígenos como los alcaloides vinblastina, vinorelbina y vincristina aislados de *Catharantus roseus*; podofilotoxina aislado de especies de *Podophyllum*, que inhiben la proliferación celular y forman parte de los metabolitos secundarios (Cragg, 1994; Dholwani et al., 2008; Newman et al., 2000).

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser divididos en 3 grandes grupos, en base a sus orígenes biosintéticos:

Isoprenoides

Una gran cantidad de sustancias de las plantas están bajo el nombre de los isoprenoides o terpenoides, estos están todos basados en la molécula del isopreno $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{-CH}=\text{CH}_2$ y su esqueleto de carbonos se construye de la unión de dos ó más unidades de cinco carbonos, se clasifican de acuerdo a número de unidades que contengan (Figura 3); en las plantas se les han considerado una gran cantidad de funciones; sus propiedades reguladoras del crecimiento están muy bien documentadas tales como los sesquiterpenos y los diterpenos. La importante contribución de los carotenoides (tetraterpenoides) al color de la planta es muy conocida y también están asociados a la fotosíntesis. Los monos y sesquiterpenos contribuyen a dar un olor distintivo a las plantas (Harbone, 1974).

Químicamente los isoprenoides son generalmente solubles en lípidos y se encuentran localizados en el citoplasma de las células de las plantas, los aceites esenciales se encuentran en células glandulares en la superficie de la hoja, mientras que los carotenoides están asociados a los cloroplastos en las hojas y en pétalos. Son normalmente extraídos de las plantas con petróleo,

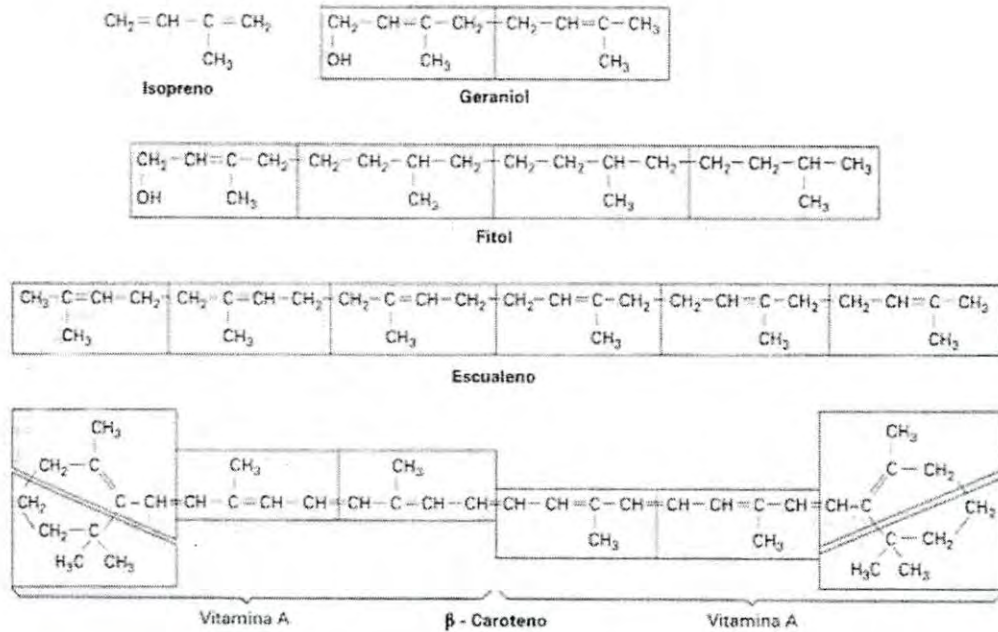


Figura 3. Polimerización del Isopreno. Los isoprenoides están todos basados en la molécula del isopreno $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{-CH}=\text{CH}_2$ y su esqueleto de carbonos se construye de la unión de dos ó más unidades de cinco carbonos, se clasifican de acuerdo a número de unidades que contengan por ejemplo: dos (C_{10}), tres (C_{15}), cuatro (C_{20}), seis (C_{30}) u ocho (C_{40}).

éter, cloroformo, hexano o pueden ser separados por cromatografía en columna con silica gel utilizando los mismos disolventes (Harborne, 1974).

Una diversidad de terpenos tiene aplicaciones importantes para la sociedad humana. Algunos monoterpenos y sesquiterpenos son usados como saborizantes y aromatizantes en alimentos, bebidas, perfumes, jabones, pasta de dientes, tabaco y otros productos (Tabla I) (Gershenzon y Kreis, 1999). Entre los isoprenoides se encuentran compuestos con actividad farmacológica importante como el diterpeno paclitaxel, conocido como taxol, aislado de *Taxus baccata* y *T. brevifolia* con actividad antineoplástica contra cáncer de ovario y pecho (Laskaris et al., 1999; Lee, 2004); los diterpenoides ent-kaurenos de *Annona senegalensis* con actividad citotóxica contra células cancerígenas de pecho y próstata (Fatope et al., 1996), el sesquiterpeno artemisinina de *Artemisia annua*, planta medicinal tradicional en China, que es utilizada contra el paludismo (Duke et al., 1994).

Compuestos Fenólicos

El término de compuestos fenólicos comprende un amplio rango de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos. Las sustancias fenólicas tienden a ser solubles en agua ya que en con frecuencia se encuentran combinados con azúcares que son glicósidos y normalmente están en la vacuola celular. Existe una gran cantidad de compuestos y estructuras conocidas, los flavonoides que forman el mayor grupo de compuestos y son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc; entre ellos están los flavonoles que parecen ser importantes en

Tabla I. Clasificación y función de los isoprenoides.

Clasificación de los Isoprenoides			
Nombres	No. De isoprenos	Función	Ejemplo
Monoterpenos	2	Aromas y esencias	Geranio y mentol
Sesquiterpenos	3	Intermediario en la síntesis de colesterol	Farnesol
Diterpenos	4	Forman pigmentos y vitaminas	Fitol, Vitamina A, E y K
Triterpenos	6	Intermediarios en la síntesis de colesterol	Escualeno
Tetraterpenos	8	Pigmentos vegetales	Carotenoides y Xantofilas
Politerpenos	N	Aislantes	Látex, caucho.

Fuente: (Gershenzon y Kreis, 1999).

la regulación del control de crecimiento en la planta y su presencia en cloroplastos han sugerido su participación en la fotosíntesis sin embargo esto no ha sido establecido aún. Los fenilpropanoides y las quinonas fenólicas también existen en un número favorable. Algunos grupos importantes como las ligninas, melaninas y taninos que se encuentran normalmente en proteínas.

Mientras que las funciones de algunas clases de fenoles están bien establecidas como por ejemplo las ligninas que junto con la celulosa está presente como material estructural de la pared celular ayudando a mantener su rigidez; las antocianidinas como pigmentos en flores, el propósito de muchos otros compuestos aún no es muy conocido. Los fenilpropanoides son compuestos fenólicos que tienen un anillo aromático que están unido a una cadena de tres carbonos, son derivados de la fenilalanina y pueden contener uno o más residuos C_3F_6 . Los más importantes son los ácidos hidroxycianímicos que están relacionados no solo con las ligninas, sino también con la regulación del crecimiento de la planta así como de su resistencia. Dentro de los fenilpropanoides también se encuentran hidroxycoumarinas, fenilpropenos y los lignanos (Harborne, 1974).

Los compuestos fenólicos representan un grupo inmenso de moléculas con una gran variedad de funciones en el crecimiento, desarrollo y defensa de la planta (Figura 4). Los compuestos fenólicos incluyen pigmentos y sabores que pueden atraer o repeler, así como compuestos que pueden proteger a la planta en contra de insectos, hongos, bacterias y virus. La mayoría de los compuestos fenólicos se representan como ésteres o glucósidos. Los taninos y lignanos son polímeros fenólicos. Los taninos son utilizados comercialmente como tintes y astringentes, y los lignanos juegan un papel importante en la rigidez células y tejidos son esenciales para el desarrollo vascular (Vermerris et al., 2006).

Para la bioquímica de la planta, los fenoles pueden ser considerados a veces una molestia por su capacidad de formar complejos con proteínas, cuando los

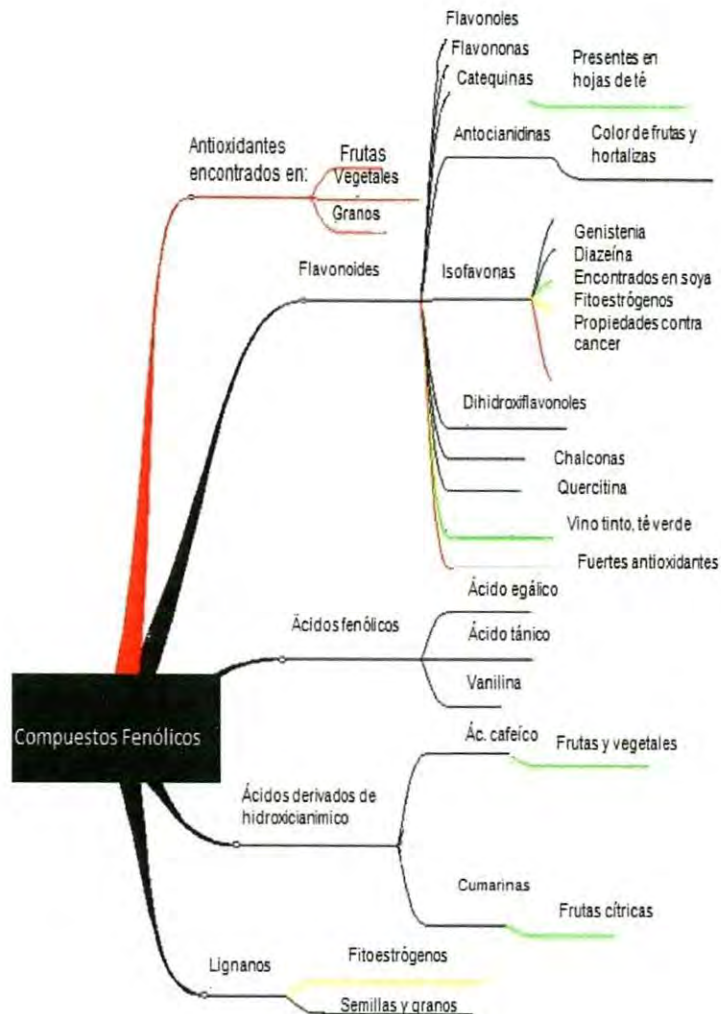


Figura 4. Clasificación de compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos representan un grupo inmenso de moléculas con una gran variedad de funciones en el crecimiento, desarrollo y defensa de la planta. Su principal fuente son frutas, verduras, granos y semillas, flores, vinos, té verde, soya entre otros. (Vermerris et al., 2006).

componentes celulares de las plantas se unen y sus membranas son destruidas durante procesos de aislamientos, los fenoles rápidamente forman complejos con proteínas y como resultado a menudo se da una inhibición de la actividad enzimática en los extractos crudos de las plantas.

La mayoría de los compuestos fenólicos principalmente los flavonoides pueden ser detectados en cromatogramas por sus colores o su fluorescencia en UV. Los pigmentos fenólicos son visiblemente coloridos y son fáciles de identificar durante el aislamiento. Los compuestos fenólicos son todos aromáticos, así que todos muestran una gran absorción en la región del espectro de UV. Los fenoles absorben en UV y pueden ser detectados en una longitud de onda de 253 nm, aunque también es preferible detectarlos por un reactivo específico, el más conocido es el reactivo de Folin-Ciocalteu (Harborne, 1974).

Alcaloides

Los alcaloides, de los cuales hay 5,500 conocidos, se comprenden la más grande clase de compuestos simples de los metabolitos secundarios de las plantas. No hay una definición para el término alcaloide que sea totalmente satisfactoria, pero los alcaloides incluyen generalmente, "esas sustancias básicas que contienen uno ó más átomos de nitrógeno, usualmente en combinación con un sistema cíclico". Son considerados tóxicos al hombre y tienen muchas actividades psicológicas dramáticas, por lo cual su uso es exclusivo a la medicina. Son compuestos incoloros muchas veces cristalinos y son líquidos a temperatura ambiente (Harbone, 1974)

Los precursores de los alcaloides son comúnmente los aminoácidos, químicamente son un grupo muy heterogéneo que van de compuestos simples a estructuras un poco más complejas. Muchos alcaloides son terpenoides en su

naturaleza (como la solanina, un alcaloide esteroideo que interfiere en la transmisión nerviosa, obtenido de la papa (*Solanum tuberosum*) y algunos son considerados desde un punto de vista como terpenoides modificados; otros son compuestos con anillo aromáticos como por ejemplo la colchicina.

La función de los alcaloides en plantas aún no está muy elucidada, algunos han demostrado tener un efecto en la regulación del crecimiento de la planta además de servir como repelentes para insectos evitando que la planta sea atacada, también se considera que puede ser una forma de almacenar nitrógeno.

Las plantas que contienen alcaloides, se distinguen por sus propiedades tóxicas o medicamentosas generalmente muy notables.

Entre los alcaloides más conocidos y de mayor importancia en la medicina, están los siguientes: morfina, codeína, cocaína, quinina, nicotina, atropina, curarina, estricnina, entre otros (Ruiz et al., 1985).

Planta en estudio

Género *Krameria*

Krameria erecta es una planta perteneciente al género *Krameria* de la familia *krameriacea*; son especies de arbustos o hierbas perenne, con flor rosada violeta que crecen en zonas áridas o desérticas; estas especies crecen en lugares del norte de México, Brasil y Chile (Achenbach et al., 1995; Arroyo et al., 2005; Carini et al., 2002; Domínguez et al., 1987; Simpson et al., 1999; Yetman et al., 2002). Los estudios fitoquímicos de este género muestran la presencia de compuestos de tipo terpenoide, fenólicos dentro de los cuales se

caracterizan lignanos y taninos (Arroyo 2005; Domínguez et al., 1987; Fimbres y Sierras, 2009).

Durante un tiempo un grupo de investigación en la ciudad de Monterrey, Nuevo León se dedicó a la búsqueda exhaustiva de compuestos presentes en las especies de *Krameria*, donde encontraron una gran cantidad de lignanos presentes en las plantas, entre ellos destacan derivados de lignanos ya identificados que nombraron: Canocarpan un compuesto aislado de la especie de *K. sonoreae*; Eupomatenoide, Hermosillo compuesto que fue aislado de una especie de *Krameria sonoreae* que se encuentra en Hermosillo y de ahí el nombre del compuesto (Domínguez et al., 1987), rataniafenol un compuesto presente en todas las especies de *Krameria* que al ser conocida en algunos lugares como Ratania, los investigadores decidieron nombrarla así como un compuesto exclusivo de esta especie además de estar presente en grandes cantidades y fue descrito por primera vez como el mayor componente de la especie de *K. triandra*, y también ha sido descubierto en especies de *K. cystisoides* y *K. sonoreae* (Dominguez et al., 1993); Ramosisina es el primer lignano que se aísla que cuenta con solamente sustituyentes pentametoxifenol (Domínguez et al., 1987) (Figura 5). Sin embargo los estudios realizados sobre este género son muy escasos (Tabla II).

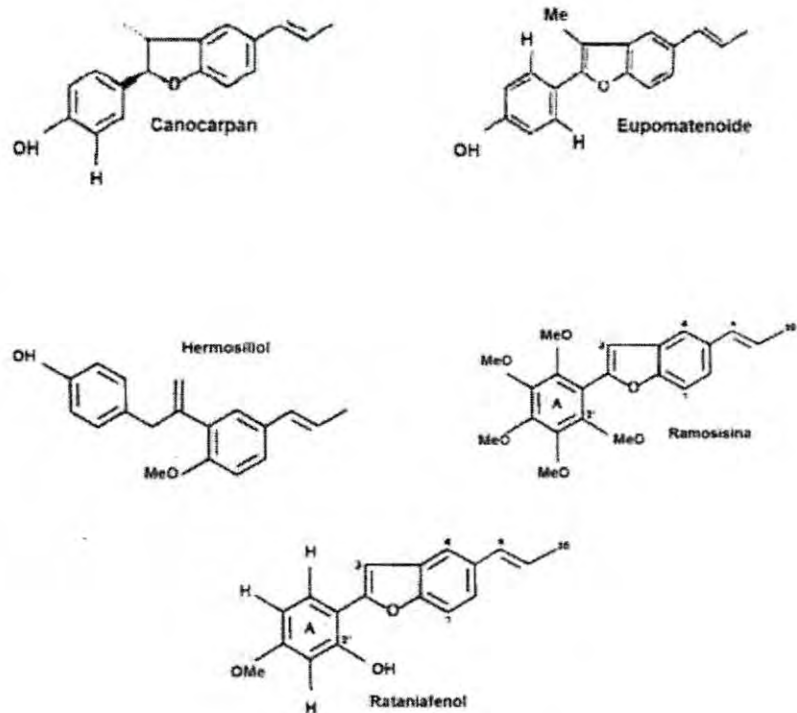


Figura 5. Lignanos aislados de las especies del género *Krameria*. Una gran cantidad de lignanos se han aislado de las especies de *Krameria*, todos se derivan de estructuras como la del canocarpan, eupomatenoido, hermosillo, ramosisina y rataniafenol. Estos compuestos son los que se han encontrado en mayor cantidad en estas especies y están presentes en la mayoría de ellas. Se ha observado que los nuevos lignanos descubiertos son muy parecidos a estas estructuras, solo que varían en los sustituyentes de los anillos presentes en la molécula (Domínguez et al., 1987).

Tabla II. Estudios realizados en especies del género *Krameria*.

Especie	Distribución	Características y propiedades
<i>K. lappacea</i>	Chile-Perú	Antiinflamatoria, Astringente, Hemostáticos Estudios revelan actividad citotóxica frente a líneas cancerosas MF7 y H460.
<i>K. grayii</i>	Norte de Sonora y EUA	Estudios revelan actividad antiproliferativa sobre la línea celular cancerígena murina M12 Ak C3F6. Propiedades Antioxidantes, Astringentes, diuréticas. Utilizada en infecciones de ojos.
<i>K. trianda</i>	Brasil-México	Propiedades antioxidantes, astringentes y hemostático. Utilizada en cosmética para tratar el acné y contra algunas enfermedades de riñón.

<i>K. erecta</i>	San Carlos Guaymas Sonora	y	Utilizada para tratar enfermedades venéreas y como purificadora de la sangre. Utilizada también para el reumatismo.
<i>K. ramosissima</i>	Monterrey León	Nuevo	Utilizada contra la diarrea y para tratar fiebres leves. Aislamiento de Neo-lignanos.
<i>K. sonoreae</i>	Hermosillo Sonora		Se aisló un nuevo compuesto que llamaron hermosillool, un lignano; A demás de siete compuestos neo-lignanos ya conocidos.
<i>K. cistysoides</i>	Tamaulipas		Utilizada para el tratamiento de cáncer de estómago e intestino. Aislamiento de nuevos lignanos y neo-lignanos.
<i>K. paucifolia</i>	Ciudad Sonora	Obregón	Aislamiento de dos nuevos neolignanos y de ocho lignanos ya conocidos
<i>K. interior</i>	Saltillo Coahuila		Aislamiento de nuevos lignanos y neo-lignanos

Tabla II. Continuación.

Krameria erecta (Cosahui)

Descripción botánica. Es una especie conocida por diferentes nombres comunes, incluyendo cosahui, rhatany, calentadora púrpura y rhatany de hoja pequeña. Es una hierba pequeña muy colorida y de baja estatura, de menos de un metro, sus hojas son muy coloridas, y sus tallos son delgados, está cubierta con pequeñas vellosidades y sus hojas son lineales. Las flores en la primavera vuelven a crecer de forma muy atractiva con un color violeta intenso, para caerse durante el otoño. La flor tiene cuatro o cinco pétalos en forma de copa que son de forma triangular los cuales son rosa violeta con bases verdes. Los tres pétalos más altos se encuentran muy extendidos y los otros dos pétalos se encuentran a un lado de los ovarios de la planta, seguidos de 4 estambres de forma curvada. La fruta es un cuerpo en forma de un corazón con abundantes vellosidades, cubierto de espinas dorsales de color rosa como se observa en la figura 6. Esta especie y otras en su género son parásitos de la raíz, golpean ligeramente los tejidos de las plantas próximas a ellas para los alimentos, especialmente agua (Figura 6) (García, 1982).

Distribución geográfica. Planta nativa del suroeste de los Estados Unidos y norte de México, en Estados como Sonora y Arizona, donde crece en áreas muy secas como son los desiertos y tierras áridas (Yetman et al., 2002).

Usos medicinales tradicionales sonorenses. Esta planta es conocida por los mayos como una purificadora de la sangre y utilizada para tratar enfermedades como la diabetes, dolores de espalda y riñones (Yetman et al., 2002), además de ayudar en el tratamiento contra cáncer de lengua, intestino y estómago. (Johnson et al., 1996).

Estudios realizados. Estudios previos realizados de la especie en la Universidad de Sonora por Fimbres y Sierras en el 2008 han demostrado una potente capacidad antioxidante del 92% a concentraciones de 100, 50 y 25

mg/mL determinado por el método de DPPH en comparación con el trólox un antioxidante comercial; y de 1.62 mg/mL EQ. De quercitina por el método de FRAP; además de contener un alto contenido de fenoles totales (598 mg/mL EQ de ácido gálico) y alto contenido de flavonoides (3.8 mg/mL EQ de quercitina). De igual manera se le ha evaluado la actividad antiproliferativa del extracto metanólico crudo frente a distintas líneas celulares cancerosas y no cancerosas por el método de MTT; Para la línea celular cancerígena M12.A^k C3F6 de linfoma B de ratón y para la línea celular cancerígena Raw 264.7 proveniente de macrófago-monocito transformado por un virus de la leucemia de Abelson se encontró un rango de IC₅₀ menor a 200 µg/mL, mientras que en la línea celular no cancerígena L929, proveniente de tejido subcutáneo de ratón normal mostró un rango de IC₅₀ mayor a 200 µg/mL (Ortiz, 2010). Son pocos los estudios realizados en *Krameria erecta*.



Figura 6. Fotografías de la especie de *Krameria erecta*. Hierba pequeña muy colorida y de baja estatura, de menos de un metro, sus hojas son muy coloridas, y sus tallos son delgados, está cubierta con pequeñas vellosidades de la planta y sus hojas son lineales. Las flores en la primavera vuelven a crecer de forma muy atractiva con un color violeta intenso, para caerse durante el otoño. La flor tiene cuatro o cinco pétalos en forma de copa que son de forma triangular los cuales son rosa violeta con bases verdes. Su fruto es en forma de corazón (García, 1982)

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del Extracto

El material vegetal, se secó a temperatura ambiente y se homogenizó (malla 2-3 mm) en un molino tipo Wiley. Se le adicionó metanol (1:10 p/v) y se mantuvo por 10 días en recipientes con agitación periódica. Se filtró en papel Whatman. El extracto metanólico después se concentró en un evaporador rotatorio a 60°C bajo presión reducida (Fimbres y Sierras, 2009).

Obtención de Fracciones del Extracto

El extracto metanólico fue fraccionado con los disolventes de distinto índice de polaridad: hexano, acetato de etilo y etanol en una proporción 1:2 p/v, además de la recolección de un residuo metanólico. Al extracto metanólico se le agregó el primer disolvente y se mantuvo con agitación constante por 12 hrs con un agitador magnético, se realizaron varios lavados de cada uno de los solventes hasta que se dejó de obtener color, lo colectado fue, posteriormente, evaporado en un evaporador rotatorio para su concentración a una temperatura de 50° C y en condiciones de vacío. Se obtuvieron cuatro fracciones de distinta polaridad del extracto metanólico, la primera fracción (Hexánica) fue una fracción de hexano, la segunda (Acetato de etilo) una fracción de acetato de etilo, la tercera (Etanólica) fue la fracción de etanol y el residuo metanólico restante (Residual).

Líneas Celulares

Las líneas celulares a utilizadas fueron células de origen animal y humano L-929 (Tejido subcutáneo de ratón), M12.A^k C3F6 (linfoma B de ratón), HeLa (Adenocarcinoma de cérvix humano) y Raw 264.7 (macrófagos transformados por el virus de la leucemia de Abelson) que se han adaptado a vivir en cultivo, poseen capacidad de proliferación ilimitada, debido a que han sufrido un proceso de transformación, que implica la alteración de las características de crecimiento. Las líneas celulares establecidas se pueden dividir en dos tipos principales: adherentes (células en monocapa) que se fijan al material plástico de un frasco o placa y por lo tanto tienen que desprenderse de esa superficie con tripsina-EDTA antes de utilizarla; y no adherentes (células en suspensión) que normalmente no se fijan a la superficie de recipiente de cultivo o lo hacen muy débilmente y se desprenden muy fácilmente de manera mecánica (Castro, 2006).

Las células fueron mantenidas en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5%. Este medio nutritivo debe contener una fuente de carbono, aminoácidos esenciales, iones y factores de crecimiento a portados por el SFB. También fue necesario agregar otro tipo de suplementos como antibióticos para disminuir el riesgo de contaminación por microorganismos. Fueron mantenidas a una temperatura de 37° C, en una atmósfera de CO₂ al 5% y bajo humedad relativa del 80-90% en una incubadora ISoterm (Fisher Scientific).

Determinación de la Actividad Antiproliferativa de las Fracciones Obtenidas del Extracto Metanólico de *K. erecta*

Para evaluar el efecto de supervivencia y/o proliferación de las distintas fracciones y del extracto metanólico de *K. erecta* sobre las líneas celulares cancerosas, se utilizaron dos métodos.

Reducción del MTT. Un ensayo colorimétrico rápido basado en una sal de tetrazolio MTT (Metil tiazol tetrazolio) ó (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)- 2,5 difenil tetrazolio bromuro) que mide sólo células vivientes y puede medirse espectrofotométricamente leyendo la absorbancia entre 540 y 570 nm. El MTT es una sal de tetrazolio color amarillo que se utiliza para medir la actividad y viabilidad celular por el rompimiento causado por la reducción (aceptación de un H^+) del anillo de la sal de tetrazolio MTT por acción de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales: succinato-deshidrogenasas, para formar unos cristales azules de formazan insolubles en agua, pero solubles en dimetil sulfóxido (DMSO). La viabilidad celular es proporcional a la absorbancia, (Castro 2006; Hernández et al., 2007). Utilizado para la evaluación antiproliferativa sobre las líneas HeLa, Raw 264.7 y L-929.

Cuenta con azul de tripano. El método de viabilidad celular se realizó mediante la cuenta en cámara de Neubauer, para esto se utilizó el colorante azul de tripano que permitió diferenciar células vivas de células muertas. Las células con su membrana celular intacta no permiten el paso del colorante, ya que la célula es muy selectiva en los compuestos que permite que entren a su interior, mientras que las células que tienen su membrana comprometida permite el paso del colorante tiñéndolas de color azul, se tomaron 15 μ l de muestra y 15 μ l de azul de tripano, para contar es necesario una cámara de

Neubauer contando los cuatro cuadros principales (Hernández et al., 2007). Utilizado para la línea celular M12.A^k C3F6.

Para evaluar esta actividad fue necesario realizar ensayos independientes de proliferación por triplicado, primeramente se ajustó a una densidad celular de 10, 000 células (50µl) por pozo y se colocaron en una placa de 96 pozos. Después se incubaron por 24 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂, después a las células se les agregaron 50µl de extracto metanólico o de las fracciones y se incubaron por otras 24 hrs. Para realización de los stocks de las fracciones de extractos metanólicos, primero se tomaron 20 mg de extracto y se disolvieron en 1 mL de DMSO, y después para obtener las concentraciones deseadas se realizaron diluciones seriadas para llegar 400 a 6.25 µg/mL. Se anotaron observaciones de las características morfológicas de las células a las 24 hrs de haberse añadido el extracto. A las 48 hrs de haberse agregado el extracto, a las células adherentes se le adicionaron 10 µL de la solución de stock de MTT (5mg/mL) a cada pozo de la placa y se dejó reposar por 4 horas: Los cristales formados son disueltos con ácido-2-propanol y las placas fueron leídas en un lector de placas de ELISA (Benchmark microplate reader: Bio-Rad: Hercules CA. USA) usando una lectura a una longitud de onda de 570 nm y una referencia de longitud de onda de 665 nm (Hernández et al., 2007). Con las células no adherentes se realizó el conteo con azul de tripano. Como control negativo las células fueron incubadas con solamente DMSO a las mismas concentraciones, y para control positivo se utilizaron controles de drogas anticancerígenos conocidas como 5FU (5- fluoracil) y DOXO (doxorubicina).

Fraccionamiento Biodirigido del Extracto Metanólico de *K. erecta*

Cromatografía en Placa Fina

Se realizaron ensayos en cromatofolios de sílica gel 60 PF₂₅₄ (Merck) con aproximadamente 5 cm de altura y 0.5 cm de separación entre muestras, se utilizó como mezcla eluyente los solventes con distinta polaridad, hexano, acetato de etilo y metanol, el eluyente fluyó por capilaridad. Los cromatofolios fueron expuestos a radiación UV.

Cromatografía en Columna

Una vez identificada la fracción con la mayor actividad antiproliferativa, se realizó el fraccionamiento mediante cromatografía en columna de sílica gel. Para las condiciones de la columna se siguió el protocolo de Arroyo et al., 2005, donde se agregaron 5 g de muestra con 150 g de sílica gel 30-70 mesh, cuidando que no se rebasara la capacidad de la sílica del 10%. Se utilizaron como eluyentes mezclas de los disolventes de hexano, acetato de etilo, metanol y agua. Se tomaron fracciones de 250 mL que después se pasaron a un evaporador rotatorio para su concentración, se realizó después cromatografía en placa fina de cada fracción obtenida para el seguimiento de la purificación.

Los revelados se realizaron con lámpara UV y con sulfato cérico, un agente revelador oxidante. Las fracciones cromatográficas con un perfil similar, fueron agrupadas y nuevamente se determinó la capacidad antiproliferativa por el método de MTT y Azul de tripano mencionados anteriormente (Hernández et al., 2007).

Posteriormente para el subfraccionamiento de la fracción activa se realizó nuevamente cromatografía en placa fina pero en distintas condiciones, se

utilizaron cromatofolios de sílica gel con un grosor de 2.0mm, una altura de 20 cm y un ancho de 25 cm en una base de vidrio para el subfraccionamiento de las fracciones obtenidas por la cromatografía en columna; Se aplicó la muestra en el borde inferior de la placa y se colocó en una cámara de cromatografía, como eluyente se utilizó una mezcla de hexano y acetato de etilo y se dejó a que el eluyente fluyera por capilaridad. La placa fue expuesta a radiación UV, las manchas observadas que representaban distintos grupos de compuestos fueron tomadas de la placa y suspendidas en acetato de etilo, la solución se filtró y se dejó secar para obtener el extracto.

Evaluación del Mecanismo de Inducción de Muerte Celular Mediado por Apoptosis

Reducción del Potencial de Membrana Mitocondrial

Para evaluar la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, se utilizó el colorante catiónico lipofílico JC-1 (yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbencimidazolcarbocianina) que es una molécula con autofluorescencia dual. En las células sanas, la carga negativa es estabilizada por el potencial de membrana mitocondrial permite la entrada al colorante lipofílico catiónico a la mitocondria donde se forman agregados, cuando se encuentra en forma de agregados fluorescé de color rojo (acumulados dentro de la mitocondria en forma JC-agregados), cuando el potencial de membrana colapsa en células apoptóticas éste se encuentra en forma de monómero (disuelto en el citosol) y presenta un desplazamiento de su fluorescencia hacia verde. Este desplazamiento esta directamente asociado a la reducción del potencial de membrana mitocondrial (GenScript). Se tomaron cuatrocientos cincuenta mil células por pozo (200,000 células/mL) que fueron incubadas en placas de 6

pozos de fondo plano (Costar, Corning, N.Y. USA) e incubadas con extracto metanólico y con la Subfracción F3-F2 activa a 24 horas a una concentración de 7.5, 15 y 30 $\mu\text{g/mL}$, la subfracción F3-F2 a 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$, se utilizó DMSO como control negativo y CAPE (éster fenílico del ácido cafeico) 7.5 μM conocido por su efecto inductor de apoptosis (Valencia, 2012), como control positivo. Las células fueron cosechadas y lavadas dos veces con PBS frío (1700 rpm, 7 minutos, 4°C). El botón celular fue resuspendido en una solución de tinción (JC-1 10 $\mu\text{g/mL}$ en medio de cultivo), se mantuvo en incubación por 15 minutos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 y una humedad relativa de 80 a 90% en una incubadora Isoterm (Fisher Scientific, USA). Finalmente se realizaron dos lavados con medio de cultivo utilizando las mismas condiciones de centrifugación y las células fueron resuspendidas en 400 μL de D5F (DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino) para su inmediato análisis por citometría de flujo (Valencia, 2012).

Evaluación de la Actividad de las Caspasas

La evaluación de la activación de las caspasas 3, 8 y 9 se llevó a cabo utilizando kits comerciales adquiridos en la compañía Abcam, los kits utilizados para cada caspasa fueron los siguientes: Fluorescein Active Caspase 3 staining kit, Fluorescein Active Caspase 8 staining kit, Fluorescein Active Caspase 9 staining kit con ligeras modificaciones.

Las células M12.A^k C3F6 fueron cultivadas en placas de 6 pozos con una densidad celular de 200, 000 células/mL, se incubaron con los extractos a 30 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto metanólico crudo y 20 $\mu\text{g/mL}$ con la fracción activa F3-F2 por 24 hrs, se utilizó DMSO como control negativo de la inducción de activación. Posteriormente las células fueron cosechadas y lavadas con D5F frío (dos veces), el botón celular se resuspendió con 300 μL de medio de cultivo

y se adicionó 1 μ L del inhibidor de la caspasa (el cual se marcó con FIT-C, utilizando una dilución 1:20 del reactivo proporcionado en el kit comercial, FITC-DEVD.FMK, FITC-IEDT-FMK, FITC-LEHD-FMK para caspasa 3.8 y 9 respectivamente). Se incubaron 1 hora a una temperatura de 37°C, 5% de CO₂ y una humedad relativa de 80-90% en una incubadora Isoterm. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con 300 μ L de buffer de lavado (wash buffer, que fue proporcionado por la casa comercial). Para finalmente ser resuspendidas en 300 μ L de este mismo para ser analizadas por citometría de flujo. Las células se mantuvieron en hielo hasta su análisis (Valencia, 2012).

Análisis Estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm la desviación estándar de tres mediciones paralelas, se utilizó el software Graph Pad Prism versión 5.0 para Windows. La concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀) fue calculada mediante un análisis de regresión lineal obtenida directamente de las gráficas que mostraron una actividad dosis-dependiente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención del Extracto Metanólico de *Krameria erecta* y sus Fracciones

La especie fue colectada e identificada como *Krameria erecta*, se obtuvieron 1.4 kg de planta y se agregaron 14 L de metanol. El rendimiento obtenido fue de 173.2 g de extracto metanólico crudo que representan un 12.35%. Los pesos y rendimientos de las fracciones se muestran en la Tabla III.

Determinación de la Actividad Antiproliferativa de las Fracciones Obtenidas del Extracto Metanólico de *K. erecta*

Para evaluar la actividad antiproliferativa del extracto metanólico crudo así como de las fracciones de *Krameria erecta* sobre las líneas celulares cancerígenas se utilizaron dos métodos, esto debido a que tanto las fracciones como el extracto metanólico crudo de *K. erecta* son capaces de reducir por sí mismos la sal de MTT, varios estudios reportan la reducción de MTT en ausencia de células y describen que se ve obligada por la presencia de compuestos de tipo flavonoides entre los que se mencionan quercetina y algunas catequinas como el catecol, capaces de reducir el MTT, (Peng et al., 2005; Habtemariam et al., 2006). En un estudio anterior realizado por Fimbres y Sierras en el 2009, se demostró que *K. erecta* posee una gran cantidad de flavonoides, siendo esto una posible explicación para la reducción por parte del extracto metanólico crudo de *K. erecta* y sus fracciones.

Tabla III. Rendimiento y peso en gramos de las fracciones obtenidas del extracto metanólico de *Krameria erecta*.

Solvente	Peso en gramos	Rendimiento
Hexano	5.02	3.30 %
Acetato de Etilo	14.30	9.50 %
Etanol	65.30	43.50 %
Residuo metanólico	35.20	23.50 %

Considerando la referencia de Ortiz en el 2010, donde evaluó la actividad antiproliferativa del extracto metanólico crudo de *K. erecta* sobre la línea celular cancerígena M12.A^k C3F6, reportando una actividad menor a 200 µg/mL, en el presente trabajo se observó que tanto el extracto metanólico crudo así como las fracciones de hexano y acetato de etilo mostraron actividad antiproliferativa, siendo la fracción de hexano la que mostró la mayor actividad (tabla IV), seguido por la fracción de acetato de etilo, el extracto metanólico crudo presentó un valor de IC₅₀ de 47.4 ± 9.4 µg/mL, mientras que la fracción de hexano y acetato de etilo obtuvieron 42.1 ± 3.3 µg/mL y 43.4 ± 6.7 µg/mL, respectivamente.

De igual manera, la línea celular Raw 264.7 también mostró sensibilidad con las fracciones del extracto metanólico crudo de *K. erecta*, específicamente con hexano y acetato de etilo mostrando una actividad antiproliferativa de 35.4 ± 3.7 µg/mL y 64.6 ± 3.9 µg/mL, respectivamente (Tabla IV). Aún y cuando el efecto del extracto metanólico crudo fue menor, las fracciones mantienen la actividad, lo que nos indica que al momento de estar fraccionando, la actividad antiproliferativa se incrementa.

A diferencia de lo observado en las líneas anteriores, HeLa mostró poca sensibilidad al extracto metanólico crudo y sus fracciones; únicamente la fracción de hexano presentó una actividad inhibitoria de 67.0 ± 25.5 µg/mL (Tabla IV).

En la línea no cancerígena de tejido conjuntivo normal de ratón L-929 la actividad antiproliferativa observada en el extracto metanólico, las fracciones de hexano y acetato de etilo fue mayor a 200 µg/mL y mayor a 400 µg/mL en las fracciones etanol y residuo metanólico (Tabla IV), evidenciando claramente el efecto diferencial del extracto entre líneas celulares cancerosas y no

Tabla IV. Resultados de IC₅₀ del extracto metanólico de *K. erecta* y sus fracciones sobre líneas celulares cancerosas y no cancerosas.

	IC ₅₀ (µg/mL)			
	M12.A ^k C3F6	HeLa	Raw 264.7	L-929
Extracto metanólico crudo	47.42 ± 9.42	197.10 ± 10.97	117.89 ± 6.75	233.96 ± 0.25
Hexano	42.10 ± 3.32	67.00 ± 25.45	35.35 ± 3.65	217.50 ± 12.02
Acetato de etilo	43.35 ± 6.76	182.33 ± 5.68	64.61 ± 3.97	201.23 ± 12.64
Etanol	246.31 ± 28.83	215.40 ± 2.90	>400.00	>400.00
Residuo metanólico	242.78 ± 11.57	365.38 ± 4.83	>400.00	>400.00
Doxorrubicina	0.60 ± 0.01	0.80 ± 0.20	2.30 ± 0.30	> 60.00
5 Fluoracil	1.90 ± 0.60	0.60 ± 0.10	>100.00	>100.00

cancerosas. Las fracciones de etanol y residual no mostraron efecto relevante en ninguna de las líneas celulares (Tabla IV).

Los resultados de los datos de 5-fluoracilo y doxorubicina, drogas utilizadas como controles positivos también se muestran en la tabla IV, donde muestran su potente efecto antiproliferativo frente a las líneas celulares cancerosas, específicamente en M12.A^k C3F6 y HeLa.

Tomando en cuenta como referencia el Instituto Nacional del Cáncer de los EUA que considera un extracto activo a los que muestran IC₅₀ menor a 30 µg/mL en el extracto metanólico crudo, refiriéndose, a que la actividad de los extractos se considera alta si es ≤30 µg/mL, media si se encuentra entre 31–60 µg/mL y baja si está entre 61–99 µg/mL (Moo-Puc et al., 2009) en este trabajo se considera una actividad antiproliferativa media del extracto metanólico crudo de *K. erecta* y de sus dos primeras fracciones.

En un estudio similar realizado por Rascón en el 2009, se comprobó también la actividad antiproliferativa de *Krameria grayii*, una planta perteneciente a la misma familia que *K. erecta*, sobre la línea celular M12.A^k C3F6, en este reporte, se encontró que la IC₅₀ fue menor a 200 µg/mL.

A pesar de la poca información que existe sobre las actividades biológicas de *K. erecta*, podemos comparar un estudio realizado por Arroyo et al., en el 2005, donde probaron extracto acuoso de *Krameria lappacea*, una planta perteneciente a la familia *Kramereaceae*, con características muy semejantes, donde se evaluó su efecto antiproliferativo frente a líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) encontrando una IC₅₀ de 61.1 µg/mL, de cáncer de pulmón (H460) con 62.0 µg/mL y de sistema nervioso central (SF268) con una de 71.2 µg/mL, a pesar de ser líneas cancerígenas distintas, los resultados de la actividad del extracto metanólico de *Krameria erecta* y los presentados por Arroyo et al., son similares; a su vez, ellos comprobaron un efecto de sinergia al

mezclar *Krameria lappacea* con otra planta llamada *Annona muricata*, obteniendo una disminución de la actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares anteriormente mencionadas.

Fraccionamiento Biodirigido del Extracto Metanólico de *K. erecta*.

Cromatografía en Placa Fina

Se realizó cromatografía en capa fina de las dos fracciones con actividad antiproliferativa para determinar la mejor mezcla de disolventes para la separación de los compuestos. Para la fracción de hexano se logró con hexano – acetato de etilo en proporción 7:3 y de la fracción de acetato de etilo se logró la mejor separación con una mezcla de acetato de etilo y hexano en una proporción 7:3, que se utilizó posteriormente para la caracterización por cromatografía en columna.

Cromatografía en Columna

Se tomó la fracción de acetato de etilo como la fracción antiproliferativa activa para este procedimiento debido a la mayor cantidad en rendimiento y a la poca solubilidad que presentó la fracción de hexano durante todos los experimentos.

El fraccionamiento por cromatografía en columna se realizó mediante las condiciones de fraccionamiento realizado por Arroyo et al., en el 2005, las mezclas de disolventes que se utilizaron se presentan en la tabla V. Se obtuvieron un total de 229 fracciones y se agruparon aquellas fracciones que mostraron un perfil químico de compuestos similares de acuerdo al número de bandas observadas por cromatografía en placa fina, al final se logró obtener un

Tabla V. Especificaciones de subfracciones cromatográficas de la fracción de acetato de etilo de *Krameria erecta*.

Especificaciones de fracciones cromatográficas de la fracción de acetato de etilo de <i>Krameria erecta</i>		
Fracción	Disolvente en la columna	Peso en mg
F1 (1-3)	Hexano 100%	
F2 (4-6)	Hexano:Acetato de etilo 1:1	116.40
F3(7-8)	Hexano:Acetato de etilo 1:1	113.20
F4 (9-12)	Hexano:Acetato de etilo 1:1	97.90
F5 (13-15)	Hexano:Acetato de etilo 1:1	54.70
F6 (16-18)	Hexano:Acetato de etilo 1:1	56.90
F7 (19-24)	Hexano:Acetato de etilo 1:1	90.10
F8 (25-26)	Hexano:Acetato de etilo 1:1	38.40
F9 (27-28)	Hexano:Acetato de etilo 1:1	78.20
F10 (29-33)	Hexano:Acetato de etilo 1:1	177.90
F11 (34-38)	Hexano:Acetato de etilo 1:1	90.70
F12 (39-53)	Hexano:Acetato de etilo 1:1	193.40
F13 (54-64)	Hexano:Acetato de etilo 1:1	227.10
F14 (62-63)	Acetato de etilo:Hexano 7:3	21.60
F15 (64-68)	Acetato de etilo:Hexano 7:3	200.90
F16 (69-70)	Acetato de etilo:Hexano 7:3	96.50
F17 (71-73)	Acetato de etilo:Hexano 7:3	158.10
F18 (74-84)	Acetato de etilo:Hexano 7:3	300.20

F19 (84 -87)	Acetato de etilo:Hexano 7:3	27.10
F20 (88-91)	Acetato de etilo:Hexano 7:3	44.50
F21 (92-96)	Acetato de etilo:Hexano 7:3	41.30
F22 (97-104)	Acetato de etilo:Hexano 9:1	191.40
F23 (105-106)	Acetato de etilo 100%	15.80
F24 (107-113)	Acetato de etilo 100%	143.70
F25 (114-117)	Acetato de etilo 100%	55.80
F26 (118-19)	Acetato de etilo:Metanol 9:1	28.30
F27 (120)	Acetato de etilo:Metanol 9:1	168.50
F29 (121- 136)	Acetato de etilo:Metanol 9:1	280.80
F30 (137- 144)	Acetato de etilo:Metanol 9:1	17.40
F31 (145- 153)	Acetato de etilo:Metanol 9:1	16.90
F32 (154-161)	Acetato de etilo: Metanol 7:3	62.90
F33 (162-165)	Acetato de etilo:Metanol 7:3	4.10
F34 (166-177)	Acetato de etilo:Metanol 1:1	161.80
F35 (178- 205)	Metanol 100%	107.90
F36 (206-219)	Metanol: agua 9:1	13.60
F37 (220-229)	Agua	212.70

total de 37 fracciones, el rendimiento de recuperación de la columna del 72.14%. Los pesos de las fracciones obtenidas se muestran en la tabla V.

Actividad Antiproliferativa de Fracciones Cromatográficas

Se realizó un tamizado de las 37 fracciones cromatográficas obtenidas por la separación en columna, frente a las línea cancerosa M12.A^k C3F6, con el fin de determinar las fracciones con mayor actividad antiproliferativa y continuar con el aislamiento de un posible compuesto activo. Tomando en cuenta la actividad citotóxica de la fracción de acetato de etilo en las líneas celulares entre 100 y 50 $\mu\text{g/mL}$, se probó una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ de fracción bajo el mismo protocolo de cuenta de viabilidad de células con azul de tripano.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7, encontramos que de las 37 fracciones probadas, las fracciones 2 a la 13 (F2-F13) muestran prácticamente un 100% de citotoxicidad, mientras que de la fracción 14 a la 26 (F14-F26) se observó una actividad antiproliferativa importante, alcanzando todas el valor de IC_{50} y por último de la fracción 24 a la 37 (F24-F37) no se observó actividad antiproliferativa. Considerando estos resultados, se evaluaron las fracciones F2 a la F13, a concentraciones de 50 a 6.25 $\mu\text{g/mL}$ frente a las tres líneas celulares cancerosas y la línea celular no cancerosa. Los resultados con la línea M12.A^k C3F6 mostraron concentraciones de IC_{50} similares para la mayoría de las fracciones, encontrándose en un rango de IC_{50} entre 12.5 a 6.25 $\mu\text{g/mL}$, solamente la fracción F3 mostró un valor ligeramente más elevado con $16.5 \pm 1.5 \mu\text{g/mL}$, sin embargo, al momento de probar las otras líneas celulares cancerosas Raw 264.7 y HeLa, se identificó a la fracción F3 con una actividad citotóxica de $32.3 \pm 6.0 \mu\text{g/mL}$ y $34.1 \pm 8.8 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

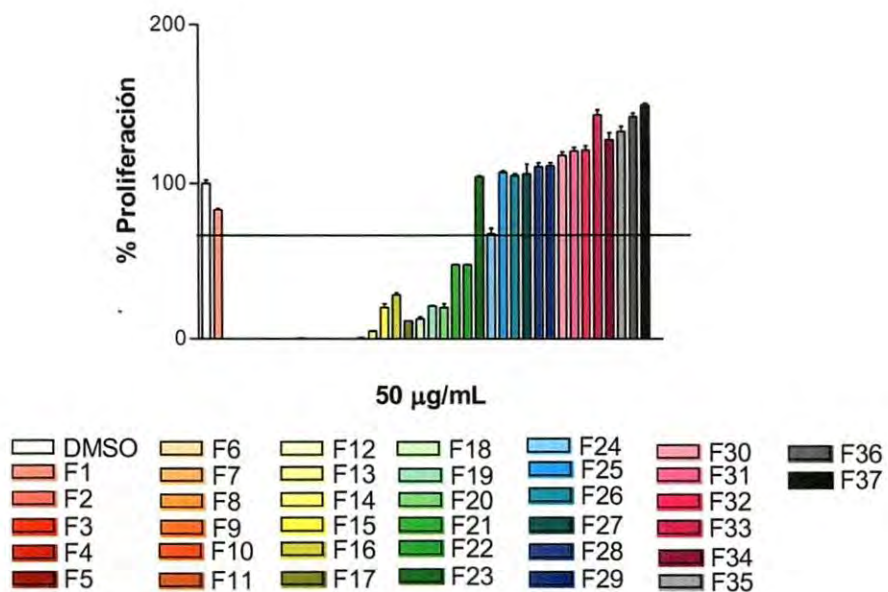


Figura 7. Tamizaje de actividad antiproliferativa de fracciones cromatográficas. Evaluación de la actividad antiproliferativa de las distintas fracciones cromatográficas obtenidas de la fracción de acetato de etilo frente a la línea celular cancerígena M12.A^k C3F6 a 50 µg/mL. El control utilizado como 100% de proliferación fue DMSO.

La fracción F3 fue, después de la F2, la de mayor actividad frente a estas dos líneas celulares, además de manera particular la fracción F3 también mostró una débil citotoxicidad frente a la línea L-929. A las 24 horas de agregar el extracto se realizaron observaciones morfológicas de las células. Las figuras 8, 9, 10 y 11 muestran microfotografías de la línea celular M12.A^k C3F6 en presencia de las fracciones cromatográficas activas a 50 y 25 µg/mL, así como de su respectivo control sin extracto, en éstas, se observa una disminución en la proliferación celular, pérdida de tamaño y de contacto con células vecinas, hay cuerpos apoptóticos además de condensación del material celular, compactación de la cromatina y del núcleo, observándose células huecas, características que presentan células que entran en un proceso de apoptosis (Elinos-Báez et al., 2001). Las demás fracciones aún y cuando mostraron actividad citotóxica en las líneas celulares cancerosas, también mostraron actividad frente a la línea control L-929 (Tabla VI).

Como se mencionó previamente, en una investigación realizada por Arroyo et al., en el 2005, se reportó la actividad antiproliferativa de *K. lappacea* y el efecto sinérgico con el extracto acuoso de la planta *Annona muricata*, en una relación 1:1 (%p:p), estos investigadores primeramente identificaron algunos grupos de compuestos presentes en la mezcla acuosa, esto con pruebas específicas para cada tipo de compuesto, encontrando que la mezcla contenía una gran cantidad de compuestos fenólicos de tipo flavonoides, taninos (catequinas) además de saponinas y terpenoides; compuestos comunes en especies del género *Krameria* (Arroyo et., al 2005; Fimbres y Sierras, 2009), también fraccionaron el extracto acuoso de ambas plantas por cromatografía en columna bajo condiciones similares al presente trabajo.

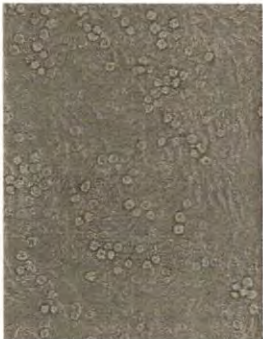








Fracción	M12.A ^k C3F6 Normal	50 µg/mL	25 µg/mL
Fracción 2			
Fracción 3			
Fracción 4			

Figura 8. Características morfológicas de la línea celular M12.A^k.C3F6 frente a diferentes concentraciones de las subfracciones cromatográficas 2, 3 y 4 de *Krameria erecta*.










Fracción	M12.A ^k C3F6 Normal	50 µg/mL	25 µg/mL
Fracción 5			
Fracción 6			
Fracción 7			

Figura 9. Características morfológicas de la línea celular M12.A^k.C3F6 frente a diferentes concentraciones de las subfracciones cromatográficas 5, 6 y 7 de *Krameria erecta*.


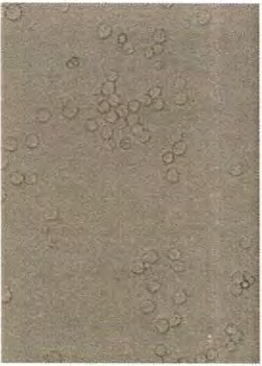







Fracción	M12.A ^k C3F6 Normal	50 µg/mL	25 µg/mL
Fracción 8			
Fracción 9			
Fracción 10			

Figura 10. Características morfológicas de la línea celular M12.A^k.C3F6 frente a diferentes concentraciones de las subfracciones cromatográficas 8, 9 y 10 de *Krameria erecta*.

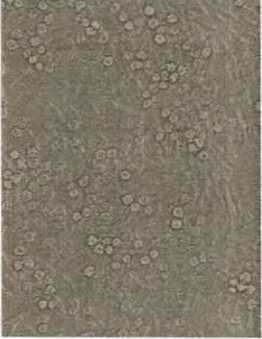








Fracción	M12.A ^k C3F6 Normal	50 µg/mL	25 µg/mL
Fracción 11			
Fracción 12			
Fracción 13			

Figura 11. Características morfológicas de la línea celular M12.A^k.C3F6 frente a diferentes concentraciones de las subfracciones cromatográficas 11, 12 y 13 de *Krameria erecta*.

Tabla VI. Actividad antiproliferativa de las subfracciones activas de la fracción de acetato de etilo de *Krameria erecta*.

Fracción	IC ₅₀ (µg/mL)*			
	M12.A ^k C3F6	HeLa	Raw 264,7	L929
F2	7.79 ± 0.36	27.47 ± 6.18	27.13 ± 0.16	29.89 ± 048
F3	16.53 ± 1.45	34.11 ± 8.76	32.28 ± 6.03	47.70 ± 1.16
F4	11.72 ± 2.81	52.79 ± 6.10	38.41 ± 0.07	41.39 ± 8.49
F5	9.80 ± 0.72	46.09 ± 4.01	33.84 ± 4.36	31.7 ± 3.64
F6	10.81 ± 2.48	58.43 ± 11.62	48.01 ± 1.41	45.10 ± 6.65
F7	11.15 ± 2.65	45.82 ± 7.04	34.34 ± 4.80	50.83 ± 7.67

F8	10.31 ± 2.90	61.15 ± 11.29	50.57 ± 2.00	64.56 ± 13.59
F9	8.30 ± 1.46	51.54 ± 5.45	35.45 ± 0.08	41.20 ± 8.42
F10	9.17 ± 4.65	40.04 ± 4.16	31.27 ± 4.57	21.40 ± 0.42
F11	10.27 ± 1.88	49.60 ± 7.55	47.98 ± 0.51	44.60 ± 0.09
F12	10.45 ± 2.14	55.93 ± 2.48	49.28 ± 1.20	35.70 ± 6.84
F13	10.54 ± 2.27	75.08 ± 0.82	51.48 ± 9.55	48.65 ± 2.19

*En la tabla se muestran los valores promedios de tres repeticiones ± desviación estándar.

Tabla VI. Continuación

Aquí encontraron que solamente la fracción 2 obtenida de la unión de fracciones 7 a la 11 fue la que mantuvo una actividad antiproliferativa con una IC_{50} de 1.6 $\mu\text{g/mL}$ para la línea de cáncer de mama MCF-7, una IC_{50} de 1.4 $\mu\text{g/mL}$ para la línea H- 460 de cáncer de pulmón y una IC_{50} de 1.4 $\mu\text{g/mL}$ para la línea celular de cáncer del sistema nervioso central SF268, es decir de las primeras fracciones obtenidas de la columna, ya que fue producto de la mezcla de diclorometano (CH_2Cl_2), un disolvente de polaridad media como el acetato de etilo y el primero utilizado en este fraccionamiento; a su vez, se analizaron los tipos de compuestos presentes en esta fracción 7-11 y se encontraron que los compuestos tipo saponinas y terpenoides, compuestos de naturaleza no polar, como se sugiere en el presente trabajo, la actividad en estas especies está dada por los compuestos de tipo no polar.

Fraccionamiento de la Fracción Cromatográfica Activa F3 por Cromatografía en Placa Fina

Para el subfraccionamiento de la fracción activa F3, se utilizó una cromatografía en placa fina, como eluyentes se utilizó una mezcla de hexano:acetato de etilo 7:3, se observaron una serie de seis bandas de distintos colores (subfracciones), indicando la presencia de seis distintos grupos de compuestos (Figura 12). Se obtuvieron los extractos de las subfracciones obtenidas de la fracción activa F3, se tomaron las bandas obtenidas en la cromatografía con ayuda de una espátula; además del punto de origen y por último la placa completa. Los pesos de las subfracciones obtenidas se muestran en la tabla VII.

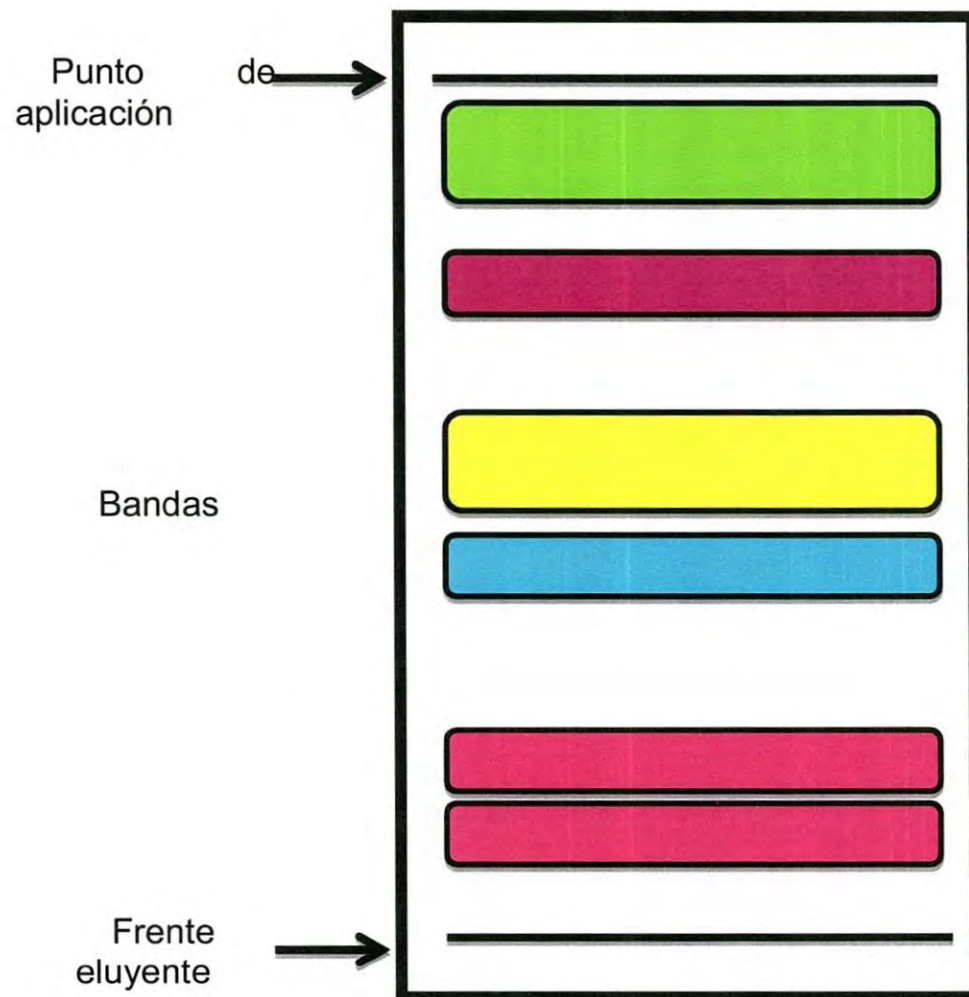


Figura 12. Cromatografía en placa fina realizada en la fracción activa F3. Se muestra el punto de origen, los seis colores de bandas observadas con el revelado de lámpara UV y el punto del frente eluyente.

Tabla VII. Pesos de los extractos de las subfracciones de la fracción activa F3 obtenidos por la cromatografía en placa fina.

Subfracción de la fracción activa F3	Peso (mg)
SubF3- F1	30.0
SubF3- F2	4.40
SubF3- F3	3.0
SubF3- F4	7.0
SubF3- F5	8.0
SubF3- F6	2.0
F3 Origen	13.6
Placa completa	13.0

Determinación de la Actividad Antiproliferativa de las Subfracciones Obtenidas de la Fracción Activa F3

Se determinó la actividad antiproliferativa de las subfracciones obtenidas de la fracción activa F3 frente a la línea celular M12.A^k C3F6 a una concentración de 25 µg/mL. En la figura 13 se muestran los resultados, la subfracción F3-F2 mostró una actividad antiproliferativa cercana al 100%, además se observó que otras subfracciones mostraron actividad IC₅₀. El efecto citotóxico de la subfracción F3-F2 fue evaluado a una concentración menor (25 a 1.5 µg/mL), los resultados se muestran en la figura 14, la actividad antiproliferativa calculada para esta subfracción fue de 5.5 ± 1.8 µg/mL.

Es probable que los compuestos presentes en la subfracción F3-F2 sean de tipo terpenoides o saponinas, lo anterior debido a que los estudios demuestran que las especies de *Krameria* son ricas en compuestos de tipo fenólico como flavonoides (Fimbres y Sierras, 2009), taninos especialmente catequinas, y también contienen lignanos y terpenos (Domínguez et al., 1987; Domínguez et al., 1993; Samia et al., 2001), a muchos de estos compuestos se les ha atribuido actividad antiproliferativa (Morris et al., 2007; Dholwani et al., 2008; Suk Lee et al., 2004).

De los compuestos que son no polares o de polaridad media se encuentran los terpenos que han sido evaluados constantemente sobre actividad antiproliferativa, en un estudio realizado en el 2002 se encontró que el ácido kaureonico, un diterpeno aislado de la resina de *Copaifera langsdorfii* demostró inhibir *in vitro* el crecimiento de células leucémicas, de cáncer de mama y de cáncer de colon (Costa-Lotufo et al., 2003); los lignanos a su vez tienen efectos anticancerígenos, y esto se ha demostrado con estudios realizados con linaza, una potente fuente de lignanos mostrando efectos antiproliferativos en cáncer

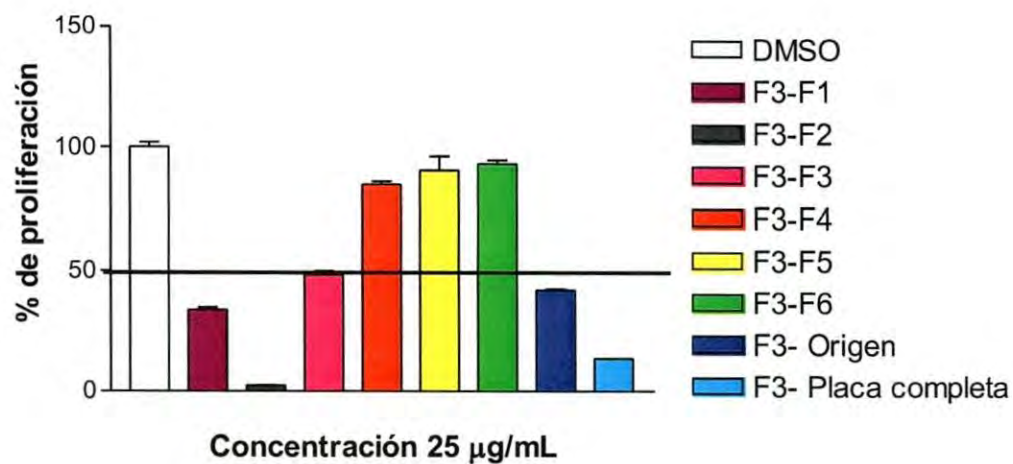


Figura 13. Evaluación de las subfracciones de la fracción activa F3 a 25 µg/mL concentración. En la gráfica se observa el % de proliferación, contra las concentraciones de Subfracción, observando una clara actividad de la subfracción F3-F2. Resultados realizados por triplicado.

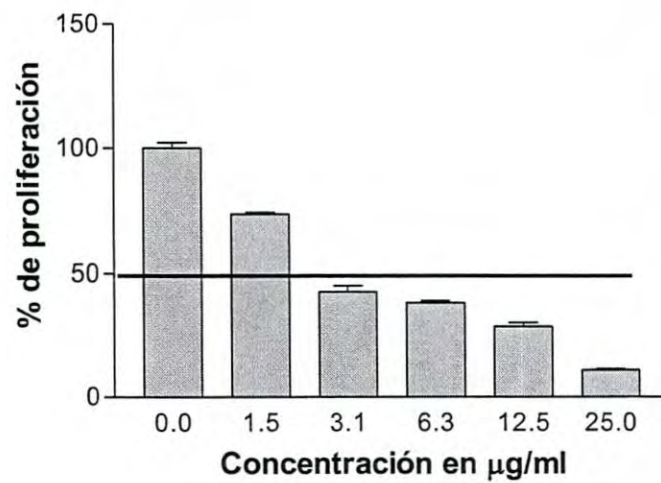


Figura 14. Actividad antiproliferativa de la subfracci3n activa F3-F2. Gr3fica de efecto antiproliferativo de la subfracci3n F3-F2 contra la l3nea celular M12.A^k C3F6, se observa el % de proliferaci3n vs la concentraci3n de extracto de 25.0 a 1.5 µg/ml. Experimento realizado por duplicado.

de mama y cáncer de próstata, explicando el efecto exclusivamente a estos compuestos. Hay estudios que también describen al lignano podofilotoxina, que se encuentra en el rizoma del podófilo (*Podophyllum peltatum*) y es la precursora de 2 sustancias (etopósido y tenipósido) y son empleadas en terapia antitumoral (Cragg, 1994).

A pesar de que no existen muchos reportes del efecto antiproliferativo de especies del género *Krameria*, la medicina tradicional herbolaria atribuye a estas especies propiedades medicinales en el tratamiento contra distintos tipos de cáncer, *K. erecta* está considerada en la medicina tradicional de Sonora como una planta que ayuda en el tratamiento de cáncer de lengua, intestinos y estómago, sin embargo no existen estudios ni experimentos acerca de esta actividad biológica. También otra especie de este género *K. cystioides* es utilizada en Tamaulipas contra el cáncer de estómago e intestino (Achenbach et al., 1987) y por último los estudios realizados en Perú donde se observa como *K. lappacea* actúa contra cáncer de mama, de pulmón y de sistema nervioso central (Arroyo et al., 2005).

Evaluación del Mecanismo de Inducción de Muerte Celular Mediado por Apoptosis

Efecto de *Krameria erecta* Sobre el Potencial de Membrana Mitocondrial

La muerte apoptótica puede ser desencadenada por diferentes señales intra y extra celulares. Las primeras son, en muchos casos, originadas por estrés biológico, el cual provoca la liberación del citocromo C de la mitocondria que logra una pérdida o disminución del potencial de membrana mitocondrial, desestabilizando la membrana externa de la mitocondria y así activando la vía intrínseca, mientras que algunas señales extracelulares desencadenan en

proceso apoptótico al unirse a su ligando presente en la membrana plasmática de la célula blanco activando la vía extrínseca (Sánchez-Torres et al., 2003). Por lo tanto, la disminución del potencial de membrana mitocondrial está asociada con eventos tempranos de la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Valencia, 2012).

Para determinar la pérdida del potencial de membrana mitocondrial se realizó una tinción con el colorante catiónico JC-1, se probó en células cancerígenas M12.A^k C3F6 tratadas previamente; el JC-1 en células sanas se acumula en las mitocondrias en forma de JC- agregados que emiten una fluorescencia roja, mientras que cuando las células pierden el potencial de membrana mitocondrial, los agregados se liberan al citosol emitiendo una fluorescencia verde. En la figura 15 se muestra la relación de intensidad de la fluorescencia roja/verde para las células que han sido tratados con el extracto, la subfracción F3-F2, el control negativo DMSO y el control positivo CAPE a las 48 horas de exposición, se observa que la subfracción F3-F2 muestra un cambio significativo en la relación de fluorescencia cuando se encuentra a la concentración de 20 µg/mL, mientras que el extracto metanólico crudo no muestra un cambio importante, se observa también que el control positivo CAPE muestra la inducción de apoptosis por la despolarización de la membrana mitocondrial a través de la disminución de la relación de fluorescencia de JC-1 (roja/verde), este resultado nos indica una pérdida de potencial de membrana mitocondrial como un evento temprano de apoptosis de las células cuando son tratadas con la subfracción F3-F2..

Inducción de Apoptosis por Activación de la Vía Dependiente de Caspasas

Las señales apoptóticas, tanto intra como extracelulares, convergen para activar a las caspasas. La condensación de la cromatina, la fragmentación del

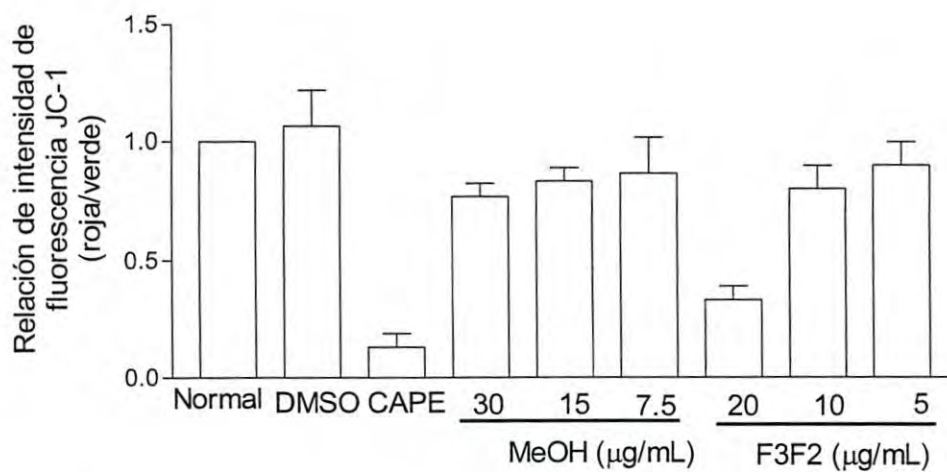


Figura 15. Disminución del potencial de membrana mitocondrial. Células M12.A^k C3F6, tratadas con extracto metanólico crudo, subfracción F3-F2 y los controles positivos y negativos, CAPE y DMSO respectivamente a distintas concentraciones, representada por la disminución de la relación de intensidad de fluorescencia de JC-1 (roja/verde). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Todos los valores representan el promedio de tres experimentos \pm desviación estándar.

ADN, la rotura de la membrana nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos son consecuencias directas de la actividad de caspasas efectoras, como la caspasa 3. Las caspasas en las células vivas existen como zimógenos inactivos que se activan por rotura proteolítica mediante las dos vías alternativas.

Se han descrito dos vías principales de la apoptosis, la vía intrínseca o mitocondrial que activa inicialmente a la caspasa 9 y la vía extrínseca mediada por receptores tales como Fas y el factor de necrosis tumoral (TNF) activando la caspasa 8 (Sánchez et al., 2003; Wong, 2011). Las vías apoptóticas, tanto intracelulares como extracelulares, convergen para activar a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 (Sánchez-Torres et al., 2003).

Con la finalidad de determinar si en la actividad antiproliferativa del extracto de *K. erecta* está involucrada la activación de alguna caspasa, se probó su activación en células M12.A^k C3F6, la figura 16 muestra la activación de las caspasas 3, 8 y 9 después de 24 horas, observando que tal activación es escasa, para ambos extractos, aproximadamente del 25%.

Resultados anteriores han mostrado la activación de las caspasas 3 y 9 cuando son tratadas con un conocido inductor de apoptosis CAPE (7.5 μ M) al tiempo de 12 horas en un 80% de activación bajo condiciones similares, funcionando como un control positivo de activación (Valencia, 2012). Estudios a su vez han demostrado la activación de vías apoptóticas por extractos de plantas con actividad antiproliferativa (Estanislao et al., 2010; Thangaiyan et al., 2003), esto aunado a la presencia de cambios morfológicos en las células característicos de apoptosis, indican la importancia de determinar si el efecto antiproliferativo está ligado a estas vías apoptóticas para el caso de *K. erecta*.

De manera general, con los resultados obtenidos podemos describir que la actividad antiproliferativa del extracto de *K. erecta* pareciera no estar o estar poco relacionada con la activación de las vías de apoptosis mediadas por

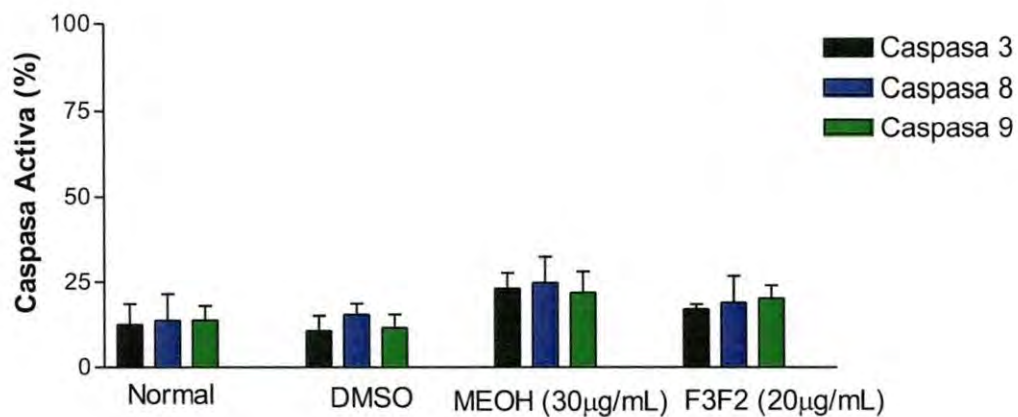


Figura 16. Activación de las caspasas 3, 8 y 9. Células M12.A^k C3F6 a una concentración de extracto crudo de 30 µg/mL y de fracción activa F3-F2 fue de 20 µg/mL. Se utilizó DMSO como control negativo. Los resultados son representativos de por lo menos tres experimentos independientes. Se representa el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar.

caspasas, a pesar de que se observaron cambios morfológicos característicos de células apoptóticas, sin embargo podemos destacar que se observa un evento temprano de apoptosis a las 24 horas, es decir, se encontró una pérdida en el potencial de membrana mitocondrial a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ de la fracción activa F3-F2, lo que nos indicaría una posible activación de la vía intrínseca, incluso ese dato se podría relacionar con la escasa activación de la caspasa 9 (Figura 12), aún así se observa una activación indistinta para la caspasa 8. Sin embargo, para poder confirmar, son necesarios estudios más específicos donde se evalué la activación y/o expresión de otras moléculas involucradas en la muerte celular mediada por apoptosis.

En resumen, el conocimiento de la diversidad química de muchas especies es hasta el momento limitado a nivel mundial, ya que se calcula que se conoce la estructura química de alrededor de 100 mil metabolitos secundarios y podría haber al menos un millón de ellos en todas las especies que faltan por estudiar, sin embargo el conocimiento que se tiene en la actualidad de las propiedades de los fitoquímicos ha contribuido enormemente a resolver problemas de salud ya que una alta proporción de los medicamentos que se utilizan son derivados de plantas.

CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de *K. erecta* tiene actividad antiproliferativa media frente a las líneas celulares cancerígenas.
- La fracción de hexano y acetato de etilo poseen mayor actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares cancerosas.
- La subfracción F3 de la fracción de acetato de etilo demostró ser la más activa frente a las líneas celulares.
- La subfracción F3-F2 mostró importante actividad antiproliferativa.
- El posible mecanismo apoptótico fue la vía intrínseca o mitocondrial por observarse un cambio en la despolarización de la membrana de la fracción activa F3-F2 en células M12.A^k C3F6.

BIBLIOGRAFÍA

- Achenbach H., Groob J., Domínguez X.A., Cano J., Verde S.J., Brussolo L.D.C., Muroz G., Salgado F. And Lopez L. (1987). Lignans, neolignans and norneolignans from *krameria cystisoides*. *Phym&mimy*, Vol. 26, No. 4, pág. 1159-1166.
- Achenbach H., Groob J., Domínguez X.A., Verde S. J., Salgado F. (1987). Ramosissin and other methoxylated Nor- neolignans from *Krameria ramosissima*. *Phytochemistry*, Vol. 26, No. 7, pág. 2041-2043.
- Achenbach H., Utz W., Domínguez X.A. (1993).” Neolignans and nor-neolignans from *krameria paucifolia*”. *Phytochemistry*, Vol. 34, No. 3, pág. 835-837.
- Achenbach H., Utz W., Lozano B., Guajardo T.E.M., Moreno S. (1996) Lignans and neolignans from *krameria parvifolia*. *Phytochemistry*, Vol. 43, No. 5, pág. 1093 1095.
- Achenbach H., Utz W., Sanchez V.H., Guajardo T.E.M., Verde S.J., Domínguez X.A. (1995). Neolignans, nor-neolignans and other compounds from roots of *krameria grayii*. *Phytochemistry*, vol. 39, No. 2 pág. 413-415.
- Alday, J., Espinoza, I. (2008). “Evaluación de la actividad Antimicrobiana y Antioxidante de Fracciones obtenidas del Extracto metanólico de *Ambrosia confertiflora*”. Tesis profesional. Universidad de Sonora
- Araujo D. D. (1998) *Manual de fitoterapia*. México D.F.
- Arroyo A. J., Prashad M.G., Vásquez B.Y., Li P.E., Tomas C.G. (2005) Actividad citotóxica in vitro de las fracciones de la mezcla de *Annona muricata* mas *Krameria lappacea* sobre células cancerosas de la glándula mamaria, pulmón y del sistema nervioso central. *Rev Peru Med Exp Salud pública* 22(4).

- Becerra, J. (2011) "Aislamiento y Caracterización Química de Compuestos con Actividad Antiproliferativa del extracto metanólico de *Argemone ochroleuca*". Tesis profesional. Universidad de Sonora.
- Burgués J.P., Pontones J.L, Vera C.D., Jiménez J.F. y Ozonas M. (2005) Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urol Esp*; 29 (9): 846-859
- Carini M., Aldimi G., Orioli M., Facino M.F. (2002). Antioxidant and photoprotective activity of a lipophilic extract containing neolignans from *Krameria trianda* roots. *Plant Med*: 68: 193-197.
- Castro-Lotufo, V., Jimenez, P., Wilke, D., Kalyne, L., Cunha, G., Silveira E., Canuto, K., Viana, G., Moraes, M., Odorico, M., Pessoa, C. (2003). Antiproliferative effects of Several Compounds Isolated from *Amburana cearensis*. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* 676-680.
- Castro S.L. 2006. Evaluación de la Actividad Citotóxica de Extractos y de Fracciones se *Iseritia laevis* Empleando líneas celulares Derivadas de Tumores. Puntificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C.
- Cragg, G., Newman, D., Snader K. (1994). Natural Products in Drug Discovery and Develoment. *Journal of Natural Products*. 60:52-60.
- Croteau R., Kutchan T. M., Lewis N. G. (2000). Biochemistry and molecular biology of plants. American society of plant physiologists. Rockville, Maryland, United States. Chapter 24.
- Demirtas I., Sahin A., Ayhan B., Tekin S., and Telci I.. (2009) Antiproliferative Effects of the Methanolic Extracts of *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *Linearis*. *Rec. Nat. Prod.* 3:2 104-109.

- Díaz J., Domínguez G., (2010). Vías de reparación del AND. Nuevos blancos en la terapia contra el cáncer. *Revistas de especialidades medico-quirúrgicas*. 15(4):221-227
- Dholwani, K., Saluja, A., Gupta, A., Shah, D. (2008). A review on plant-derived natural products and their analogs with anti-tumor activity. *Indian J Pharmacol* Vol. 40, No. 2. Pág 49-58.
- Dominguez, X., Romboldt, C., Verde, S., Achenbach, H. and Groo J. (1987). Hermosillo, an 8,3'-neolignan from *krameria sonorae*. *Phytochemistry*, Vol. 26. No. 6, pp. 1821-1823.
- Dominguez X.A., Sanchez V.H., Espinoza C.G., Verde S.J., Achenbach H., Utz W. (1993). Lignans and nor-neolignans from *krameria interior*. *Phytochemistry*, Vol. 29, No. 8, pág. 2651-2653.
- Duke, M.V., Paul, R.N., Elsohly, H.N., Sturtz, G. y Duke, S.O. (1994). Localization of artemisinin and artemisitene in foliar tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua* L. *Int. J. Plant Sci.* 155:365-372.
- Elinos-Báez C.M., Maldonado V., Meléndez J., (2003), Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gaceta Médica de México*. Vol. 139, No. 5. Pág. 493-499.
- Espinoza C.,G., (1990). Estudio químico de *Krameria interior* y *Aristolochia brevipes*. Tesis de posgrado. Monterrey N.L.
- Estanislao C., Ordaz C., Perez D., San Matín E.,Gómez M. (2010). Tesis: "efecto antitumoral de diferentes extractos del tallo de *Parmentiera edulis* en una línea celular de cáncer de mama". Instituto Politécnico Nacional.
- Estudillo, R., Hinojosa García, A. (1988). Catálogo de plantas medicinales sonorenses. Ed. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. 130 pp.

- Fatope, M.O., Audu, O. T., Takeda, Y., Zeng, L., Shi, G., Shimada, H., y McLaughlin, J.L. (1996). Bioactive ent-kaurene diterpenoids from *Annona senegalensis*. *J. Nat. Prod.* 59:301-303.
- Fimbres R., Sierras D., (2009) Evaluación de la Actividad Antioxidante, Contenido de Fenoles Totales y Flavonoides de Nueve Extractos de Metanólicos de Plantas Medicinales Sonorenses. Tesis Profesional de licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo Sonora.
- García R. H. (1982). Enciclopedia de Plantas Medicinales Mexicanas. Ed.Posada S. A. México. pp. 640
- García C., Martínez A., Ortega J.L., Castro F. (2010) Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Revista Química Viva* - Número 2, año 9
- Gershenzon, J. y Kreis, W. (1999). Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, sterols, cardiac glycosides and steroid saponins. En M. Wink (ed), *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, Annual Plant Reviews, vol. 2, CRC Press LLC. pp. 222-299.
- Habtemariam S. (1995) Catechols and quercetin reduce MTT through iron ions- A possible artefact in cell viability assays. *PhytotherRes* 9: 603-5.
- Harborne J. B.,. *Phytochemical methods*. 3ra edición. Science paperbacks. New York NY.
- Hernández J., Gooycolea F.M., Quintero J., Acosta A., Castañeda M., Domínguez Zaida., Robles R., Vázquez-Moreno L., Velázquez E. F., Astiazaran H., Lugo E., Velázquez C. (2007) Sonoran propolis:Chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Med* ;73:1469-1474.
- Instituto Nacional del Cáncer, 2006.

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2011.
- Johnson, D., Moreno, S., Lopez, R. (1996) Compendio Fitoquímico de la medicina tradicional herbolaria de Sonora. Universidad de Sonora. 184-187.
- Kohn, L. K.; Pizão, P. E.; Foglio, M. A.; Antônio, M. A.; Amaral, M. C. E.; Bittric, V.; Carvalho, J. E. Antiproliferative activity of crude extract and fractions obtained from *Aspidosperma tomentosum* Mart. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.8, n.esp., p.110-115, 2006.
- Laskaris, G., Bounkhay, M., Theodoridis, G., van der Heijden, R., Verpoorte, R. y Jaziri, M. (1999). Induction of geranylgeranyl diphosphate synthase activity and taxane accumulation in *Taxus baccata* cell cultures after elicitation by methyl jasmonate. *Plant Sci.* 147:1-8.
- Lawen A. (2003). Apoptosis-an introduction *Bioessays*. Vol 25(9):888-96.
- Lee, K. (2004). Current Develoments in the Discovery and Desing of New Drug Candidates from Plants Natural Product Leads. *Journal Natural Products*. 67:273-283.
- Maguna F.P., Romero A.M., - Garro O.A, Okulik N.B. 2006. Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. Facultad de Agroindustrias, UNNE. Resumen: E-057.
- Martínez M. A. (2005). Flavonoides. Medellín.
- McCaskill, D. y Croteau, R. (1998). Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. *TIBTECH* 16:349-355.
- Migueláñez B.C., (2007). Muerte celular. Apoptosis y otras formas alternativas de muerte celular.
- Moo-Puc, R., Robledo, D., Freile-Pelegrin, Y. 2009. In vitro cytotoxic and antiproliferative activities of marine macroalgae from Yucatán, Mexico. *Redalyc Ciencias Marinas*, Vol. 35, Núm. 4, pp. 345-358

- Montes-Belmont R., (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología*. Vol 29. Pág. 73-82.
- Morris H.D., 2007. Linaza - Una Recopilación sobre sus Efectos en la Salud y Nutrición. 4ta Edición.
- Newman D., Cragg G., Snader K. (2000). The Influence of Natural Products Upon Drug Discovery. *Natural Products Reports*. 17:215-234.
- Organización Mundial de la Salud (OMS).
- Ortiz C.G., (2010). Evaluación de la actividad antiproliferativa de las plantas *Strutanthus palmeri*, *Krameria erecta* y *Stegnosperma halimifolium* originarias de Sonora sobre las líneas celulares C3F6, L929, Hela y Raw. Tesis de licenciatura. Hermosillo Sonora.
- Peng L., Wang B., Ren P., (2005). Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells.
- Rascón, L. (2009). "Evaluación del Efecto Antiproliferativo de los Extractos Metanólicos de *Acalypha californica*, *Asclepias subulata* y *Krameria grayi* en líneas celulares M12.A^kC3F6 y L-929". Tesis profesional. Universidad de Sonora.
- Ruiz O. M. (1985) Tratado Elemental de Botánica. Editorial ECLALSA, Salvador Alvarado 105. México D.F.
- Samia A. S., De Castro J.C.M., Da Silva T. G., Da-cunhaa E.V.L, Barbosa F. J., Silva S. M. (2001). Kramentosan, a New Trinorlignan from the Roots of *Krameria tomentosa*. *Natural Product Research*, 15: 5, 323 — 329.
- Sánchez-Torres L.E., Diosdado F., (2003). Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Téc Pecú México*, vol. 41(1), 49-62.
- Schreiber D. (2004). Aportes para el desarrollo del sector de plantas medicinales y aromáticas en Uruguay, Montevideo.

- Simpson B.B., Salywon A., (1999). *Flora Neotropica*. 49: 1-109.
- Sociedad Americana de Cáncer.
- Suk Lee, J., Kim, J., Uck Yu Y., and Choong Kim Y., (2004) Inhibition of Phospholipase Cy1 and Cancer Cell Proliferation by Lignans and Flavans from *Machilus thunbergii*. *Arch Pharm Res* Vol 27, No 10, 1043-1047.
- Taiz, Lincoln y Zeiger E. (2006). *Secondary Metabolites and Plant Defense*. In: *Plant Physiology*, Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc. Chapter 13.
- Thangaiyan, R., Raveendran, P., Alamo, A., Melnick, S., ; Escalon, E. (2003). Novel drug amooranin induces apoptosis through caspase activity in human breast carcinoma cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. 80(3):321-30.
- Valencia, D. 2012. Evaluación de propoleos de Ures Sonora como material bioactivo /efecto de la temporalización sobre su composición química y sus actividades biológicas. Tesis de Doctorado. Departamento de investigación en polímeros y materiales. Universidad de Sonora.
- Vermerris, W., Nicholson, R. (2006). *Phenolic compound biochemistry*. Ed. Springer.
- Waizel J. (2006) *Las plantas medicinales y las ciencias. Una visión multidisciplinaria*. México D.F Instituto politécnico Nacional.
- Wong R., (2011) Apoptosis en cáncer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30:87.
- Yetman D., Van Devender T. R. (2002). *Mayo Ethnobotany: Land, History, and traditional Knowledge in Northwest México*. University of California