



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA EN MEDICINA**

Título de tesis:

***“Síntesis y evaluación del efecto antiproliferativo de nuevos
amidoesteroides a partir de Diosgenina y extractos de
plantas medicinales, sobre líneas celulares HeLa, MCF-7 Y
MDA-MB-231”***

Para obtener el grado de:

Licenciado en Medicina

Presenta:

Alejandra Ortiz González

Directores de Tesis:

D.C. María Guadalupe Hernández Linares.

Director experto

D. C. Maura Cárdenas García

Director metodológico

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. ANTECEDENTES	5
3.1 ANTECEDENTES GENERALES	5
3.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	8
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
4. HIPÓTESIS.....	16
6. OBJETIVOS.....	16
6.1 OBJETIVOS GENERALES	16
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
8. RESULTADOS	32
9. DISCUSIÓN.....	51
10. CONCLUSIONES.....	60
11. BIBLIOGRAFÍA.....	62

1. RESUMEN

El cáncer de mama y cervicouterino, son considerados problemas de salud mundialmente, siendo las primeras causas de muerte en mujeres por tumoraciones malignas. A pesar de contar con diferentes tratamientos, las personas siguen acudiendo a la Medicina Tradicional empleando especies vegetales como la hoja de guanábana (*Annona muricata*) y la cancerina (*Hippocratea excelsa*), sin efectos comprobados, ni normatividad como remedios para el cáncer.

En este trabajo de tesis, se comprobó el efecto antiproliferativo de los extractos de estas dos plantas sobre líneas celulares de cáncer de mama y cervicouterino. Obteniendo que el extracto acuoso de *Hippocratea excelsa*, presenta un efecto antiproliferativo en las líneas celulares de cáncer de mama, logrando reportar una disminución de la proliferación al 52.2 % en MDA-MB-231 y 46.8 % en MCF-7 a una concentración de 0.00550 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, mientras que el extracto acuoso de *Annona muricata* únicamente disminuye el 50 % en MCF-7 a una CI_{50} de 0.00682 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y presenta un efecto proliferativo en la línea celular HeLa aumentando la proliferación hasta un 120%. En los extractos etanólicos, se logró el efecto antiproliferativo con el extracto de *Annona muricata* en MDA-MB-231 a una CI_{50} de 0.00682 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Sugiriendo un importante efecto antiproliferativo de estos extractos en el cáncer de mama, lo que puede ofrecer a futuro un probable tratamiento coadyuvante. Al mismo tiempo que se corroboró que el uso indiscriminado de plantas sin la valoración de su efecto puede causar efectos contrarios como el caso del extracto de guanábana sobre el cáncer cervicouterino.

Por otro lado, la síntesis de nuevos compuestos a partir de principios activos obtenidos de productos naturales, como la Diosgenina, aumenta las opciones de nuevas terapias con mayor bioseguridad y menores efectos negativos. En este trabajo se obtuvo la amida de acetato de Diosgenin 5-7ona, la cual mostró una buena acción antiproliferativa sobre las células de cáncer de mama triple negativo. Dejando a futuro la opción de realizar modificaciones en esta estructura con el fin de lograr una terapia más efectiva contra el cáncer.

2. INTRODUCCIÓN

México es un país privilegiado en cuanto a biodiversidad de especies vegetales, donde solo se ha explorado cerca del 5 % de las plantas empleadas en la Medicina Tradicional. Por lo que se busca aumentar el conocimiento en el campo de las plantas de uso medicinal en el país y en el Estado de Puebla, al corroborar sus efectos y valorar así el potencial farmacológico que los compuestos pueden llegar a tener, específicamente como anticancerígenos.

Dentro de las plantas empleadas en la medicina tradicional se encuentra el barbasco, del cual se extrae la Diosgenina, sapogenina esteroidal y principal precursor en la producción de esteroides sintéticos. En los últimos años, varios estudios han evidenciado la potencial acción anticancerígena de la Diosgenina, dando paso al desarrollo de nuevos fármacos destinados a combatir la proliferación de células cancerosas. Sin embargo, muchos de los compuestos obtenidos por síntesis química no tienen el efecto esperado en la clínica debido a la complejidad o estadio de la enfermedad, por lo que valorar la creación de nuevos compuestos modificando las estructuras principales, por diferentes rutas de síntesis, puede mejorar su bioseguridad y especificidad. Otras plantas empleadas en la Medicina Tradicional Mexicana y menos estudiadas son la cancerina y la hoja de guanábana, las cuales son vendidas de manera indiscriminada, para calmar distintas afecciones incluyendo la promesa de curar el cáncer.

Lo que se buscó en este estudio es confirmar si estas plantas y el nuevo producto obtenido a partir de un compuesto ya conocido, tienen un efecto antiproliferativo específicamente para el cáncer de mama y cervicouterino, al mismo tiempo que se brinda una concientización sobre el alentar un consumo seguro de productos naturales.

3. ANTECEDENTES

3.1 ANTECEDENTES GENERALES

CÁNCER

El cáncer es una enfermedad provocada por un grupo de células que se multiplican sin control y de manera autónoma, invadiendo localmente y a distancia otros tejidos ⁽¹⁾.

En el 2018, se estima que la carga del cáncer ascendió a 18 millones de casos nuevos y 9.6 millones de muertes ⁽²⁾. Debido a los cambios en el crecimiento poblacional y el envejecimiento, la OMS estima que para el 2030 los casos nuevos sobrepasarán los 20 millones anuales. Sin embargo, esos números podrían reducirse significativamente, ya que se calcula que entre el 30% y el 50% de los cánceres son prevenibles mediante la adopción de hábitos saludables, vacunación y diagnósticos y tratamientos oportunos ⁽³⁾.

CÁNCER EN MÉXICO

En México la magnitud de los efectos del cáncer en la salud del país no es muy diferente al panorama mundial, posicionando al cáncer como la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Con un descenso de 14 de cada 100 mexicanos y la expectativa de vida de quienes la padecen es de alrededor de 63 años. En la población mexicana, al menos el 30 % de las personas que tienen cáncer es debido al estilo de vida que incluye hábitos no deseados como es: tabaquismo, alcohol, sedentarismo, consumo de alimentos calóricos, bebidas azucaradas y falta de ejercicio. Para los hombres mexicanos, los cánceres más mortales son: el cáncer de próstata, de pulmón, colorrectal, de hígado y gástrico, mientras que para las mujeres mexicanas son: el cáncer de mama, el cervicouterino, de hígado, colorrectal y ovario ⁽⁴⁾. Teniendo los primeros lugares

dentro de la población femenina, el cáncer de mama, con 20 mil casos y el cervicouterino con 14 mil ⁽⁵⁾.

CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es considerado como uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. En nuestro país actualmente el carcinoma mamario es la neoplasia maligna invasora más común y la causa más frecuente de muerte por enfermedad maligna en la mujer, constituyendo el 20 a 25% de todos los casos de cáncer en la mujer ⁽⁶⁾.

El estudio histopatológico de los tumores proporciona gran cuantía de información que permite predecir el comportamiento biológico del tumor, ayudando a determinar la terapia sistémica adecuada, según el subtipo ⁽⁷⁾. La base fundamental del tratamiento es la cirugía, la cual, según la evaluación de los caracteres clinicopatológicos puede complementarse con distintas terapias coadyuvantes (radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia). Existe un grupo de pacientes en las que, a pesar de la terapia, la enfermedad presentará un curso ominoso, con recidiva precoz y pobre sobrevida libre de enfermedad y sobrevida total. Las razones de esta mala evolución permanecen sin explicaciones precisas que permitan plantear terapias adecuadas para estas pacientes ⁽⁸⁾.

CÁNCER CERVICOUTERINO

El cáncer cérvicouterino es la segunda causa de mortalidad por neoplasias malignas en la mujer en México considerado un problema de salud pública al producir hasta 11 muertes por día y se presenta principalmente en la población de nivel socioeconómico bajo y frecuentemente se encuentra en estadios avanzados al momento del diagnóstico ⁽⁹⁾.

La infección por VPH es la principal causa asociada a la presencia de este cáncer. Se ha atribuido como principal causa de mortalidad la inoportunidad en el

diagnóstico, entre cuyos factores se identifican, entre otros, las barreras de accesibilidad a la atención médica, los aspectos sociales y culturales que impiden la detección oportuna y la solicitud de demanda a los servicios ante los primeros síntomas de la enfermedad ⁽¹⁰⁾.

El tratamiento del carcinoma cervicouterino depende de la etapa clínica. Las modalidades terapéuticas han sido cirugía, la radioterapia y el tratamiento combinado con radioterapia más quimioterapia ⁽¹¹⁾.

MEDICINA TRADICIONAL

La medicina herbolaria ha estado al lado del ser humano con la finalidad de curar sus dolencias desde tiempos antiguos, esta se define como el uso extractivo de plantas medicinales o sus derivados con fines terapéuticos para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades a través de su empleo en la Atención Primaria de Salud ⁽¹²⁾.

Un elevado porcentaje de la población mundial utiliza la medicina herbolaria como principal remedio medicinal. La atención primaria de salud de hasta un 80% de la población de los países en desarrollo se basa en la medicina tradicional, por tradición cultural o porque no existen otras opciones ⁽¹³⁾.

MEDICINA TRADICIONAL EN MÉXICO

La herbolaria ha sido un recurso fundamental de atención en ciudades y regiones de México; sin embargo, a pesar de contar con esta amplia riqueza farmacológica, numerosas propiedades curativas son aún desconocidas. En México se han descrito poco más de 25 mil especies de plantas lo que equivale aproximadamente a 9.1% de las especies descritas en el mundo y de esas el 5% son de uso medicinal distribuidas en los diferentes estados de las cuales solo se ha realizado la validación química, farmacológica y biomédica en un 5% de las

especies. De ahí la necesidad de incrementar el conocimiento sobre los principios activos y efectos que las plantas pueden causar con estudios científicos integrales en beneficio para la población ⁽¹²⁾⁽¹⁴⁾.

3.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

ESTEROIDES A PARTIR DE DIOSGENINA

Los alcaloides esteroidales son estructuras con actividad biológica notable. Estos productos y/o sus metabolitos están presentes en los organismos vivos realizando funciones altamente especializadas, y estos han sido utilizados aprovechando su potencial biomédico, un ejemplo de esto es la Diosgenina ⁽¹⁵⁾.

La Diosgenina es la sapogenina esteroidal que más se explota industrialmente en el mundo; posee un espirocetal en el C-22, conformando los anillos E y F. Se aísla de la Dioscorea (planta), especialmente de las especies *D. tokoro*, *D. floribunda*, *D. deltoidea* y *D. composita*, esta última encontrada por Marker (Fig. 1), también conocida como barbasco, contiene aproximadamente el 8% de Diosgenina y en ciertas temporadas del año el contenido en el tubérculo puede llegar al 9% ⁽¹⁶⁾.

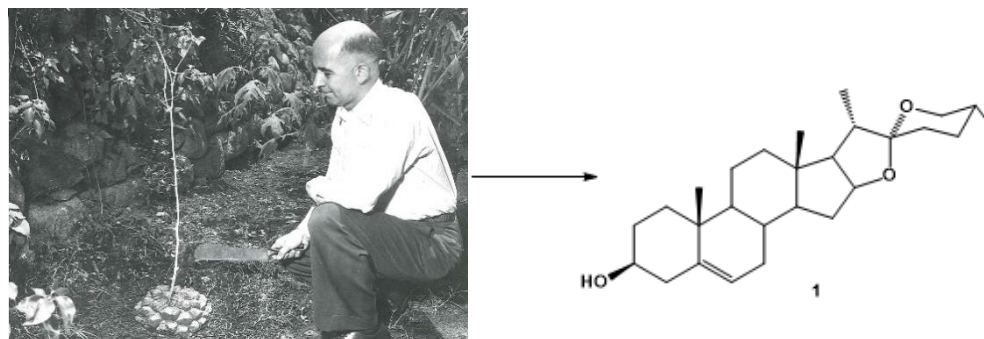


Figura 1. Marker y Diosgenina.

ESTEROIDES CONTRA EL CÁNCER Y AMIDOESTEROIDES

Existen diversos enfoques para el tratamiento del cáncer, pero la forma más eficaz que se ha observado en los últimos días para el tratamiento del cáncer hormona-dependiente, es privar a las células cancerosas de los estrógenos mediante la inhibición de su biosíntesis, esto es posible lograrlo al inhibir la enzima aromatasa, que es clave en la síntesis de estrógenos ⁽¹⁷⁾.

La enzima clave en la síntesis de estradiol es la aromatasa, que en realidad cataliza tres hidroxilaciones (Figura 2): para convertir la testosterona en estradiol: dos reacciones de hidroxilación del C-19, que consume nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida (NADPH), para dar la forma hidroxilada y aldehídica; y la aromatización, que consume nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada (NADH) y aromatiza el anillo A. La última reacción, consistente en la reducción del grupo cetónico en C-3 ocurre en ausencia de la 3-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa, que cataliza esta reacción en la síntesis otros esteroides ⁽¹⁸⁾. Entre los diferentes inhibidores esteroideos está el Formestano y los derivados 6-Hidroxiimino-4-en-3-onas ^(19,20).

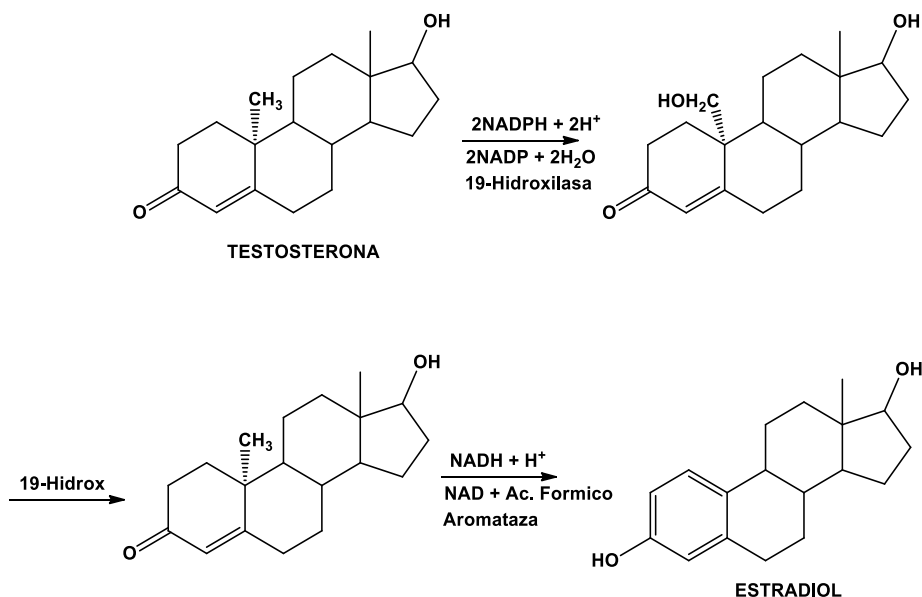


Figura 2. Reacción de conversión de testosterona a estradiol.

Los amidoesteroides son derivados de gran importancia a nivel farmacológico debido a la presencia de un heteroátomo en su estructura. En 1960, Jacobs publicó la primera síntesis de derivados 6-azaesteroidales a partir del colesterol, para esta fecha ya se habían sintetizado una gran variedad de azaesteroides tales como 2-aza, 3-aza, 4-aza, 7-aza, 12-aza, 13-aza, 15-aza, 16-aza y 17-azaesteroides, pero aún no había reportes de derivados 6-azaesteroidales.

Se ha demostrado que una gran variedad de esteroides ejerce actividad antiproliferativa ⁽²¹⁾, entre ellos se reportan estudios recientes, que la hecogenina presenta este tipo de actividad en células de cáncer cervicouterino HeLa, CaSKi y ViBo, las cuales ejercen su efecto antiproliferativo en un rango de concentraciones bajas, que van de 29 a 45 µg/ml ⁽²²⁾.

Las modificaciones en la Diosgenina ejercen un efecto anticancerígeno contra una amplia variedad de células tumorales, incluyendo cáncer de mama y leucemia. Los derivados de Diosgenina, con funciones oxima y dioxima en los C-23 y C-3, C-6, han sido analizados en las respectivas líneas celulares in vitro, han manifestado recientemente resultados que muestran ser capaces de inhibir la proliferación de células de cáncer cévicouterino CaSKi, HeLa, y ViBo, con IC50 de: 21.92, 19.21 y 39 µg/ml respectivamente en el caso de la dioxima, mientras que para la oxima las IC50 son: 5.57, 5.32 y 13.76 µg/ml, los cuales son resultados muy alentadores ⁽²³⁾.

Recientemente, se han publicado trabajos de grupos de investigación enfocados a la obtención de nuevos agentes terapéuticos contra el cáncer, entre los que destacan los esteroides citotóxicos, donde mediante diversas modificaciones a las estructuras esteroidales por inserción de heteroátomos, se han obtenido nuevos derivados prometedores en la lucha contra diversos tipos de cáncer, entre los que destacan las oximas esteroidales y diversos esteroides nitrogenados B ⁽²⁴⁾.

EI ESTUDIO DE LAS PLANTAS MEDICINALES

Las hierbas son organismos muy complejos, y al analizarlos se puede apreciar que pueden contener docenas de constituyentes que pueden ser útiles para elaborar preparaciones medicinales o fitomedicamentos ⁽²⁵⁾.

Para el estudio de las plantas medicinales, la metodología a seguir comprende las siguientes etapas ⁽²⁶⁾.

- Estudios, Etnobotánico y Etnofarmacológico, basados en investigación bibliográfica exhaustiva, para conocimiento del uso tradicional y los efectos de las plantas dotadas con propiedades medicinales.
- Estudio de Actividad Biológica: Comprobación científica del uso terapéutico por ensayos que involucran evaluación in vitro o in vivo.
- Estudio Fitoquímico: por medio de un ensayo biodirigido, permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en la planta a partir del cual puede orientarse el fraccionamiento de los extractos.
- Estudios de Toxicidad y Citotoxicidad: evaluación sobre organismos o células del posible efecto tóxico de los extractos de plantas.
- Desarrollo de un producto fitoterapéutico: Formular con los extractos o compuestos activos un fitofármaco para su evaluación clínica.

PLANTAS MEDICINALES CONTRA EL CÁNCER

En el caso del cáncer, el descubrimiento de fármacos antineoplásicos a partir de productos naturales comenzó en los años cincuenta, cuando se estudió la vincapervinca (*Catharanthus roseus*) la cual era usada en muchas culturas para el tratamiento de la diabetes, con el fin de encontrar productos antihiperglucemiantes naturales y se descubrió que los alcaloides que contenía y sus derivados semisintéticos tenían efectos anticancerígenos ⁽²⁷⁾.

Dentro de la medicina tradicional mexicana se ha reportado el uso de varias plantas para tratar el cáncer, de las cuales solo algunas han sido estudiadas como el Agave en cáncer cervicouterino, la *Annona chirimola* para cáncer de pulmón y *Quercus spp* para cáncer gástrico, sin embargo, aún hay muchas especies por estudiar ⁽²⁸⁾.

- ***Hippocratea excelsa* Kunth / Cancerina**

La cancerina (Figura 3), es una planta nativa, perteneciente a la familia Celastraceae. Trepadora, leñosa, que se encuentra en la selva baja y en bosques semihúmedos, colectándose en los estados de Puebla, Morelos y Guerrero. En la medicina tradicional se considera útil para el tratamiento de diversas enfermedades: como hemorragia, infección uterina, infecciones de la piel, piojos, gastritis, úlceras y diferentes tipos de cáncer (de mama, estómago, pulmón e hígado) ⁽²⁹⁾.

Se han realizado estudios de cancerina mostrando efectividad anticancerígena en líneas de cáncer gástrico HCT-15, en extractos etanólico y metanólico con una dosis letal 50 de 2.4 µg/ml y 1.9 µg/ml respectivamente ⁽³⁰⁾.



Figura 3. Corteza de *Hippocratea excelsa* / Cancerina

- ***Annona Muricata* L. / Guanábana**

Especie nativa de Mesoamérica, es un arbusto perennifolio de 3 a 8 m de altura, Con hojas obovadas, de 6 a 12 cm de largo por 2.5 a 5 cm de ancho, glabras y un tronco ramificado cerca de su base, su fruto es carnoso verde-oscuro, con una pulpa blanca algodonosa y jugosa (Figura 4). Dentro de sus usos medicinales es utilizada para tratar fiebre, dolor, enfermedades respiratorias y de la piel, parásitos internos y externos, infecciones bacterianas, hipertensión, inflamación, diabetes y cáncer ⁽³¹⁾.

Estudios en literaturas indican que su composición química presenta; alcaloides, flavonoides y acetogeninas, los cuales pueden brindarle propiedades antitumorales, mostrando en estudios recientes concentraciones inhibitorias 50 de 35.58µg/ml para las líneas celulares MCF-7 en la fracción hidroalcohólica ⁽³²⁾.



Figura 4. Partes aéreas de *Annona muricata* L:
a) arbusto, b) hojas, c) flor, d) fruto, e) semillas

Los productos de origen natural puros se caracterizan por su composición química variada y por consiguiente es necesario someterlos a procesos de extracción, separación y purificación, para así evitar impurezas o contaminaciones ⁽³³⁾. Las técnicas de extracción se realizan para aislar los principios activos del material vegetal. La extracción con disolventes consiste en colocar en contacto las

partes de la planta con un disolvente capaz de solubilizar los principios activos, obteniendo un extracto que posteriormente se puede concentrar eliminando el disolvente ⁽³⁴⁾.

MODELOS *IN VITRO*

Los modelos *in vitro* son realizados en dispositivos de laboratorio utilizando tejidos, células o moléculas provenientes de las especies animales, han sido fundamentales para el estudio de procesos biológicos cuya finalidad ha sido recrear el microambiente *in vivo* para extrapolar los resultados de un experimento a un contexto biológico. En el modelo *in vitro*, se puede explicar la forma en la que se produce el mecanismo de un fenómeno y de alguna manera brindar información de cómo hacer manipulable o controlable el fenómeno natural observado. Este modelo se caracteriza por el uso de cultivos y co-cultivos celulares (líneas celulares), en el cual, las condiciones fisicoquímicas y fisiológicas del ambiente se controlan de forma artificial, con la finalidad de simular el ambiente *in vivo* ⁽³⁵⁾.

LINEAS CELULARES

-MCF-7. Correspondiente a cáncer de mama, con morfología en masa. Expresa receptores a estrógenos (ER) y progesterona (PR), correspondientes a un tipo de cáncer luminal A, el cual no es agresivo y responde a terapias ya establecidas. La línea MCF7 conserva varias características del epitelio mamario diferenciado, incluida la capacidad de procesar el estradiol a través de los receptores de estrógeno citoplásmicos y la capacidad de formar cúpulas. Las células expresan el oncogén WNT7B. El crecimiento de las células MCF7 es inhibido por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa) ⁽³⁶⁾.

-MDA-MB-231. Se caracteriza por su morfología de tipo estrellada, sin expresión a receptores ER, PR, ni HER2 y mostrando un tipo de cáncer bajo en claudina permitiendo así su metástasis hacia sitios críticos ⁽³⁶⁾.

-HeLa. Es una línea de cáncer cervicouterino, es la línea celular más antigua conocida y utilizada por los seres humanos, contiene el virus del papiloma humano (VPH) subtipo 18, morfológicamente es de tipo estrellada-alargada, y de crecimiento rápido ⁽³⁷⁾.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es una de las diez principales causas de mortalidad a nivel mundial y en México el cáncer de mama y el cáncer cervicouterino son las principales causas de defunción en mujeres. A pesar de que existen diferentes tratamientos que detienen el crecimiento de las células cancerígenas dependiendo del estadio, estos presentan efectos colaterales y el costo es elevado.

Uno de los tratamientos es la terapia hormonal sobre la cual se han desarrollado ensayos clínicos para la obtención de nuevos azaesteroides, los cuales han demostrado tener propiedades que permiten inhibir el cáncer, disminuyendo los efectos secundarios a través de nuevas vías de síntesis y modificaciones estructurales. En la literatura se han encontrado rutas de reacción que involucran alrededor de veintiséis etapas para la obtención de derivados 6-azaesteroidales, y por consecuencia los rendimientos globales son bajos. A diferencia de estos reportes, la ruta que se propone en este trabajo permite esperar mayores rendimientos globales que los reportados hasta el momento, disminuyendo el tiempo para la obtención del producto final y la purificación, así como los costos lo cual es fundamental en cualquier proceso.

La curación del cáncer a través de hierbas o plantas tiene vigencia y se presenta en nuestro país, al saber que las hierbas poseen efectos terapéuticos, aunque podemos encontrar actualmente un número cada vez más elevado de trabajos de investigación que han demostrado el valor del uso tradicional de las hierbas enteras, se sabe muy poco respecto al efecto de las dos especies seleccionadas. Como resultado, los conocimientos presentan escasa relevancia y poca información al

estudio de los remedios elaborados con plantas para tratar el cáncer. La investigación de las propiedades medicinales de una planta es una labor compleja, que involucra diversas disciplinas que van desde los informes etnográficos de los etnólogos hasta el análisis de laboratorio de químicos, farmacólogos y médicos, donde este trabajo pretende impactar y profundizar. La obtención de extractos de plantas medicinales usadas en la medicina tradicional para evaluar su actividad biológica es una tarea imprescindible en el quehacer científico en el área de la salud, misma que será abordada con interés y aprovechando la amplia experiencia en el área del tutor.

¿Existen diferencias en el efecto antiproliferativo de los nuevos amidoesteroides sintetizados a partir de Diosgenina y los extractos de plantas medicinales utilizados en la Medicina Tradicional Mexicana, sobre las líneas celulares *HeLa*, *MCF-7* Y *MDA-MB-231*?

5. HIPÓTESIS

Los nuevos derivados amidoesteroidales, así como los extractos de plantas utilizadas frecuentemente en la medicina tradicional de la región mixteca del estado de Puebla tienen un efecto antiproliferativo sobre el crecimiento en líneas celulares de cáncer cervicouterino y mamario, *HeLa*, *MCF-7* Y *MDA-MB-231*.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL.

Sintetizar y evaluar el efecto antiproliferativo de nuevos amidoesteroides obtenidos a partir de Diosgenina y extractos de plantas medicinales usadas en la medicina tradicional sobre líneas celulares *HeLa*, *MCF-7* y *MDA-MB-231*

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Fase 1: Realizar modificaciones de forma selectiva en el anillo B de Diosgenina, a través de metodologías optimizadas.
- Caracterizar los productos obtenidos mediante técnicas espectroscópicas y propiedades físicas.
- Recolectar y secar las plantas para realizar los extractos; *Hippocratea excelsa* Kunth y *Annona muricata* L.
- Evaluar los compuestos presentes en cada planta por medio de las pruebas fitoquímicas.
- Fase 2: Realizar los extractos en etanol y agua de *Hippocratea excelsa* Kunth con la concentración de 2.5g / 250 ml y de *Annona muricata* L. a 3.1g / 250 ml.
- FASE 3: Evaluar la actividad antiproliferativa sobre líneas celulares HeLa, MCF-7 y MDA-MB-231 del nuevo amidoesteroide sintetizado.
- Evaluar la actividad antiproliferativa de los extractos acuosos y etanólicos de cancerina y guanábana sobre la línea HeLa, MCF-7 y MDA-MB-231.
- Comparar el efecto antiproliferativo entre los extractos obtenidos de las plantas.
- Analizar el efecto del amidoesteroide sobre las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 y HeLa.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

FASE 1. SÍNTESIS DEL AMIDOESTEROIDE, AMIDA DEL ACETATO DE DIOSGENIN-5-EN-7-ONA

En una primera etapa del desarrollo experimental, se obtuvo el amidoesteroide mediante reacciones directas, caracterizando en cada etapa los productos obtenidos y registrando los rendimientos de cada una de las reacciones, con base en metodologías consultadas en la bibliografía ⁽⁹⁾ para este tipo de

reacciones, sin optimización alguna. Con la finalidad de evaluar la importancia de la posición del grupo amido en el esteroide con relación a su actividad biológica, se realizó la siguiente ruta de reacción.

PURIFICACIÓN DE DIOSGENINA

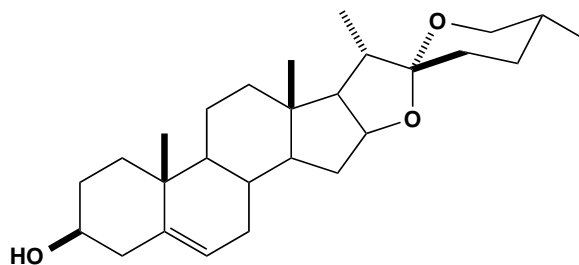


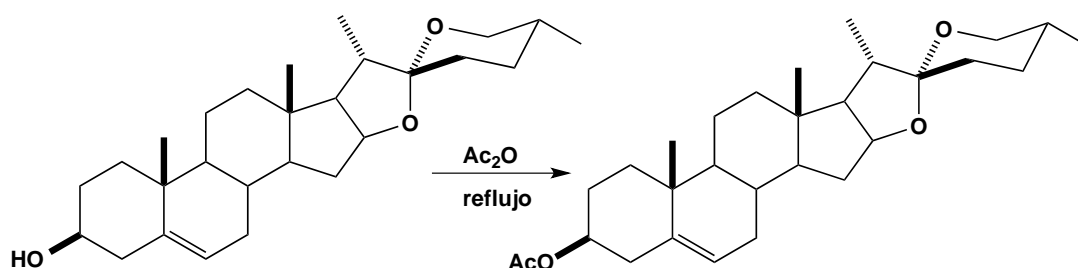
Figura 5: Diosgenina

Preparación del compuesto (Diosgenina 92%): Se colocaron 2g de Diosgenina pura al 92% en un matraz previamente pesado y seco, al cual posteriormente se agregó CH_2Cl_2 hasta disolver, de esta se tomó una muestra sobre un vial para tener una referencia posterior al realizar las placas cromatográficas. A continuación, se añadieron 4 cucharadas de gel de sílice hasta obtener un gel y se colocó en el rotavapor a velocidad máxima hasta obtener un polvo el cual se vierte en la columna sobre una parte de aproximadamente de 6cm de gel de sílice, y se cubre con un algodón en la parte superior. Una vez colocado todo, se humedeció con Hexano y se comenzó a bajar columna (figura 6) con el sistema Hexano – Acetato 9:1. Verificando cada frasco por medio de placas cromatográficas las cuales se realizaron colocando por un lado la referencia tomada anteriormente y por el otro una gota de la muestra las placas se corren con sistema 7:3 y son reveladas para observar la presencia de impurezas y del producto puro deseado. Por medio de presión positiva se recuperó el producto purificado presente en los frascos con sistema positivos a este en las placas. La columna terminó cuando ya no se observó presencia de producto en las placas y en este momento se realizó el secado de la columna.



Figura 6: Columna cromatográfica y Diosgenina purificada

ACETILACIÓN DE DIOSGENINA POR REFLUJO Y PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO



Esquema 1: Reacción de Acetilación de Diosgenina

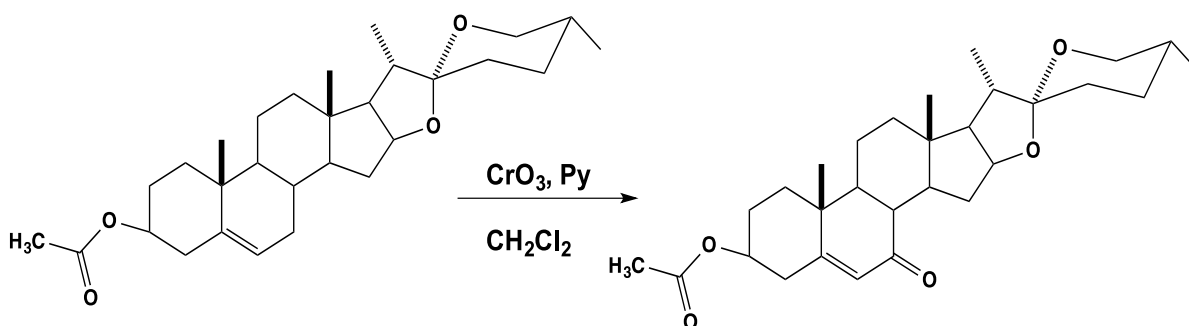
Se tomaron 2 g de Diosgenina pura y se disolvieron en 10 ml de anhídrido acético, se colocó la mezcla de reacción a reflujo durante una hora, verificando la presencia de agitación y temperatura en la manta de calentamiento, al pasar el tiempo la mezcla se observó completamente líquida. Posteriormente a temperatura manejable, se vertió el contenido en un matraz con agua fría esperando la presencia de precipitación de un sólido de color blanco. El sólido se filtró en un embudo de buchner al vacío y se lavó con una solución de Bicarbonato de sodio al 10%, una vez listo se secó completamente el sólido y se revisó por cromatografía en capa

fina. Posterior a esto se realiza columna de purificación para la obtención de Acetato de Diosgenina puro (figura 7).



Figura 7: Acetato de Diosgenina purificado

OXIDACIÓN DE ACETATO DE DIOSGENINA Y PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO



Esquema 2: Reacción de Oxidación de Acetato de Diosgenina

Paso 1: Preparación el reactivo de Collins. Se disolvieron 9.5 g de Trióxido de Cromo en 40 ml de Cloruro de metileno y se introdujo a un baño de 0°C. Posteriormente se agregó lentamente durante un tiempo de 10 minutos 15ml de Piridina, lo cual se realizó en la campana de extracción, una vez agregada se dejó el matraz en agitación a temperatura ambiente por 20 minutos.

Paso 2. Al reactivo de Collins se le agregó una solución de 1.5 g de Acetato de Diosgenina puro (figura 8) disuelto en 15 ml de cloruro de metileno, llevando la reacción en agitación a temperatura ambiente durante 12 horas.



Figura 8: Adición de Acetato al reactivo de Collins

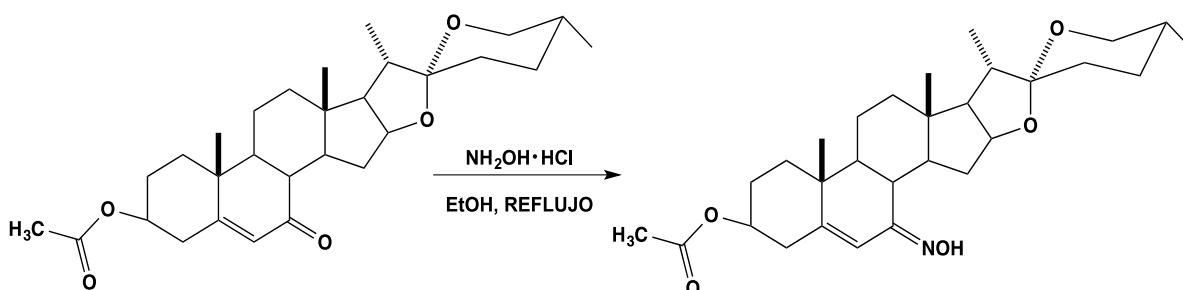
Pasado el tiempo necesario el crudo de reacción se extrajo con CH_2Cl_2 y se pasó por una columna con gel de sílice para retirar el oxidante. La solución fue lavada con agua destilada y neutralizada con una solución de ácido clorhídrico al 15%, y se deja en agitación por 30 minutos. El crudo de reacción fue separado y secado con sulfato anhidro para eliminar el agua presente y evaporado en rotavapor. De lo obtenido se tomó una placa de cromatografía, para proceder a la purificación en una columna de cromatografía con gel de sílice, comenzando con sistema 95:5.

Todas las soluciones en las cuales ha quedado Trióxido de cromo se inactivaron con metanol hasta notar un cambio de coloración a verde para que así ser desechadas adecuadamente. Posterior al proceso se realizó la purificación en columna del Acetato de diosgenin-5-en-7-ona (figura 9).



Figura 9: Acetato de diosgenin-5-en-7-ona en crudo

REACCIÓN DE CONDENSACIÓN, OBTENCIÓN DE LA OXIMA DEL ACETATO DE DIOSGENIN-5-EN-7-ONA



Esquema 3: Reacción de Condensación

Se colocaron 500mg de Acetato de diosgenin-5-en-7-ona, 100mg de Hidroxilamina y 100 mg de Acetato de potasio, diluidos en 30 ml de etanol en un matraz redondo y se pone la reacción a reflujo hasta observar la desaparición de la materia prima, se ha calculado un promedio de 3 a 4 horas. Una vez terminada la reacción se continua la agitación y se apaga la manta de calentamiento esperando a que este enfríe para proceder a destilar el alcohol, obtenido un sólido el cual se

disuelve en cloruro de metileno y se lava con agua por duplicado. Posteriormente se lavó con solución de salmuera y otra vez con agua para que por último la fase orgánica se seque con sulfato. Una vez listo se filtró y se concentró a presión reducida. Al producto obtenido se le realizó placa de cromatografía (figura 10) y se procede a realizar su purificación por columna. De su purificación por columna se comprueba por resonancia magnética si es correspondiente a la Oxima de acetato de diosgenin-5-en-5,7-diona.

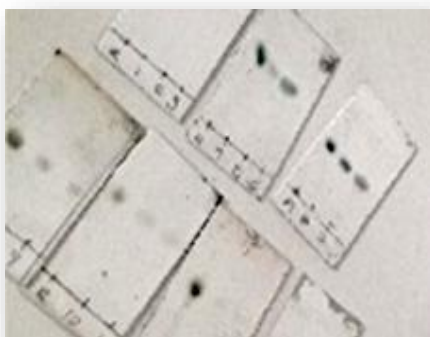
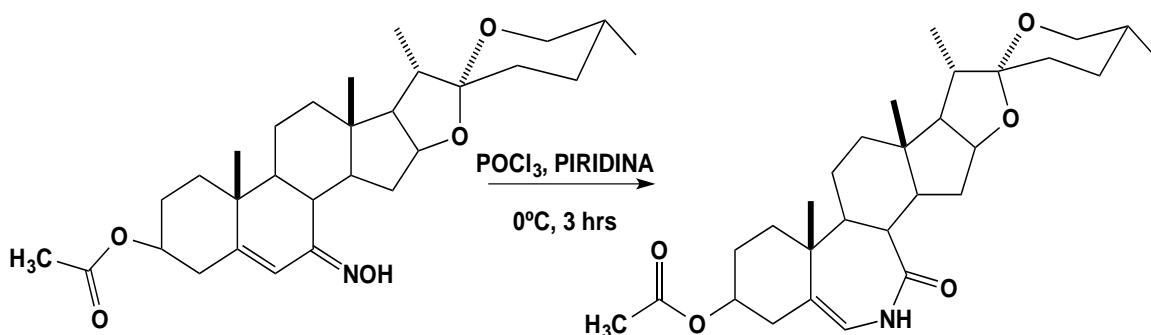


Figura 10: Acetato de diosgenin-5-en-7-ona en crudo

REACCIÓN DE REAREGLO DE BECKMANN, OBTENCIÓN DE LA AMIDA DEL ACETATO DE DIOSGENIN-5-EN-7-ONA



Esquema 4: Reacción de Reareglo de Beckmann

En un matraz de balón de 250 ml provisto de barra magnética de agitación, se disuelven .420g de la oxima en 10 ml de piridina, mientras se prende el recirculador para que comience a bajar la temperatura. Se agita hasta que el sólido se diluye y se enfría aproximadamente a -15°C con ayuda del recirculador. Manteniendo la agitación se agregó gota a gota una mezcla de cloruro de fosforilo (POCl_3) 1.85ml y piridina 5.6ml. Una vez terminado el goteo se mantuvo la temperatura por 10 minutos y posteriormente se llevó a 0°C .

Se dejó en agitación por 3 horas. Verificando cada 30 minutos que la temperatura se siga manteniendo igual. Una vez transcurrido el tiempo la mezcla de reacción fue vertida en un vaso de precipitado provisto de agitación magnética, conteniendo ácido clorhídrico HCl concentrado 13.22ml, y hielo finamente picado, se dejó en agitación durante 15 minutos. La fase orgánica fue extraída con cloruro de metileno (CH_2Cl_2), y lavada tres veces con una solución al 10% de HCl (figura 11). Posteriormente se hicieron lavados con agua destilada. Para finalizar se pasó por sulfato de sodio Na_2SO_4 para eliminar el agua y se concentró al rotavapor a sequedad.



Figura 11: Lavado y separación de fases

Al final se elabora una placa cromatográfica la cual revela dos manchas las cuales clasificamos como mancha alta y baja, comprobando por resonancia

magnética que la llamada mancha baja es la Amida de acetato de diosgenin-5-en-7-ona (figura 12).



Figura 12: Placa cromatográfica del compuesto final

- **FASE 2. ELABORACIÓN DE EXTRACTOS**

CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA

Una vez listo el material vegetal se procedió a la realización del análisis fitoquímico de la corteza de cancerina y la hoja pulverizada de guanábana con el fin de determinar los compuestos principales contenidos.

Flavonoides. Prueba de Shinoda, 1mg de la muestra se agregó a etanol y se agitó para realizar un pequeño extracto, en otro tubo se adicionaron 20 gotas del extracto de etanol con la planta, una viruta de magnesio y 5 gotas de ácido clorhídrico. Si se detectó un cambio de coloración naranja, rojo, rosa, violeta se dice que la prueba es positiva.

Esteroides y triterpenos. Prueba de Liebmman- Buchard, en un tubo de ensayo se adicionó 1.5 mg de muestra vegetal en cloroformo, más el reactivo preparado con 1ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo. Considerando positiva la prueba

a esteroides en el cambio de coloración a tonalidades azules o verde y coloraciones violetas es positivo a triterpenos.

Alcaloides. Prueba de Dragendorff, se agregaron 2 mg de la muestra en etanol y se colocan unas gotas sobre otro tubo de ensayo para posteriormente se agregó el reactivo de Dragendorff. La prueba es positiva al dar precipitados de color rojo, naranja o marrón.

Colesteroles. En 1 g de planta en el tubo de ensaye, se adicionaron 3 ml de cloroformo para posteriormente adicionar el mismo volumen de ácido sulfúrico. Entendiendo que una coloración rojiza característica en la capa clorofórmica es positiva.

Oxidrilos Fenólicos. Prueba de Cloruro férrico, se tomaron 2 mg de la muestra y se colocaron en 1ml de etanol, posteriormente se adicionaron 6 gotas de una solución de sulfato férrico al 5 %. Si al paso de unos minutos se observó un precipitado de color azul, verde o rojo se dice que la prueba es positiva.

Insaturaciones. Prueba de Permanganato de potasio, 1mg de la muestra se situó en un tubo de ensaye más etanol, posteriormente se añadieron 2 gotas de permanganato de potasio al 2 % en agua y se agitó. Si al paso de unos minutos se observa decoloración o un precipitado de color café se dice que la prueba es positiva.

Cumarinas. Prueba de Hidróxido de sodio, se colocó gramo de la muestra en un tubo de ensaye, agregando posteriormente 6 gotas de hidróxido de sodio acuoso al 10 %. Mostrando una coloración amarilla, si el color desaparece al acidular con 5 gotas de ácido clorhídrico, se dice que es positivo.

Lactonas. Se ocuparon 2 mg del material vegetal, agregando 6 gotas de hidróxido de sodio alcohólico al 10 % y agitar, si se observa el cambio de coloración a amarillo o anaranjado y posteriormente al agregar 5 gotas de ácido clorhídrico el color desaparece, se dice que la prueba es positiva.

Saponinas. Prueba de espuma, a una porción de la corteza en un tubo se añadió agua hirviendo, agitando por 3 a 5 minutos. Si se observó la aparición de espuma, la prueba es positiva.



Figura 13: Pruebas fitoquímicas de *Annona muricata* e *Hipocratea excelsa*

EXTRACCIÓN DE MATERIAL VEGETAL PARA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Para la extracción del material vegetal, se realizará mediante el uso de extracción a reflujo, mediante un equipo Soxhlet, que es de material de vidrio, que se utiliza para la extracción de compuestos contenidos en un sólido, a través de un solvente afín. Este método es aplicable en muestras de alimentos en general, ya que la técnica se basa en la extracción de grasas de una muestra orgánica. El aparato de Soxhlet fue creado en 1879 por el químico alemán Franz Von Soxhlet (figura 14). La metodología del equipo Soxhlet se basa en la extracción de grasa de la muestra mediante el tratamiento con solvente en dicho equipo. La duración del tiempo de extracción depende del tipo de muestra que se analice, pero la mayoría requieren hasta 3-4 horas. La extracción por Soxhlet tiene las siguientes etapas:

1. Colocación del solvente en un matraz de balón.
2. Ebullición del solvente que se evapora hasta un condensador a reflujo.
3. El condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior.
4. Ascenso del nivel del solvente cubriendo el cartucho hasta que llegue al punto en que se produce el quiebre, que hace un efecto sifón que devuelve el solvente con el material extraído al balón.

5. Se vuelve a producir este proceso la cantidad de veces necesaria para que la muestra quede agotada. Lo extraído se va concentrando en el matraz balón del solvente.

Con la finalidad de analizar la importancia del tipo de extracción y los principios activos que estos presentan, se procederá a realizar extracción diferencial con 2 diferentes solventes; Etanol, como solvente no polar con una constante dieléctrica de 24 y agua como solvente polar con una constante dieléctrica de 82. Los extractos que se obtendrán serán: 125ml de extracto acuoso y etanólico de Cancerina a una concentración 2.5g / 250 ml y 125ml de extracto acuoso y etanólico de Hoja de guanábana a una concentración 3.1g / 250 ml



Figura 14: Proceso de extracción Soxhlet

- **FASE 3**

PRUEBAS IN VITRO, PROLIFERACIÓN CELULAR

Preparación: Se realizó la proliferación de células MDA, MCF-7 (Ca de mama) y Hela (CaCu) en cajas t-75 como medio de cultivo primario, estas células crecen en medio de cultivo específico como lo son D-Mem y RPMI respectivamente. Diariamente se visualizan al microscopio dichas células, hasta lograr visualizar su confluencia (estado en donde obtenemos las características fisiológicas, bioquímicas y genéticas naturales de dicha línea celular)

Día 1 de conteo: Una vez obtenida la confluencia, visualizada en el microscopio, se procede a contar mediante cámara de Neubauer. Para dicho proceso primero se tripsinizaron las células, con la finalidad de inhibir su adhesión. Se colocan 4 ml de tripsina al 1x, por cada caja T-75 y se introduce a la incubadora por 3 min, posteriormente se corrobora la separación de las células al microscopio, de no estar completada se procede a percutir la caja suavemente.

Una vez garantizada la separación total de dichas células se inhibe la tripsina con el medio correspondiente a la línea celular colocando el doble de volumen inicial (8 ml). Se vacía el contenido total a un tubo Falcon de 15 ml y se centrifuga a 1500 rpm por 10 min. Una vez obtenido el pellet, se elimina el sobrenadante y se adiciona 5 ml de medio suplementado y se resuspende. En un tubo Eppendorf se agregan 45 μ l de PBS al 1x + 45 μ l de azul de Tripan + 10 μ l de la solución obtenida en el Falcon anterior.

De dicha mezcla se obtienen 10 μ l y se colocan en la cámara de Neubauer cubierta por su respectivo cubreobjetos y se visualiza al microscopio. Al conteo obtenemos los siguientes resultados 600,000 células por ml de MDA y 1,740,000 células por campo de HeLa. Una vez obtenido el resultado, se agrega el volumen

correspondiente a 5,000 células por pozo y se completa el volumen hasta obtener 200mcl por pozo.

Adendum: Para este experimento se probaron 4 extractos, por lo que se utiliza 1 línea por cada uno con su respectivo duplicado, por lo que se utilizan las 8 líneas de una caja de 96 pocillos (figura 15) y se utilizan todas las columnas para ampliar el margen de concentraciones.



Figura 15: Microplaca de 96 pozos

Día 2, adhesión de nocivo:

Pasadas las 24 horas del paso anterior, se procedió a visualizar las células al microscopio, las cuales se observaron adheridas y de características normales. Una vez corroboradas dichas características y la viabilidad celular, se retira el volumen por pozo (200 μ l) por pipeta. Y se adicionan la concentración de extracto deseada (10' - 110') y se complementa el volumen con medio suplementado de la célula correspondiente.

Día 3 "XTT":

24 horas posteriores, se retira todo el volumen y se agregan 50 μ l de XTT (se elabora una solución de 5 ml del frasco proliferador y 100 μ l del activador) y se agregan 100 μ l de medio suplementado de cada línea celular (Tabla 1). Se ingresa a la incubadora y se esperan 4 horas para leer en lector de ELISA a 500nm y 600nm.

Todas las células se incuban a 37°C y 5% de CO₂, son de tipo adherente y con distintos tiempos de duplicación, el cual determina la frecuencia con la que se cambia el medio (Tabla 2).

Tabla 1: Suplemento del medio de cultivo según la línea celular.

Línea celular	Medio	SFB	L-Glut	Antibiótico
MCF-7	MEM	10%	1%	0.5%
MDA-MB-231	DMEM	10%	-	0.5%
HeLa	RPMI-1640	10%	-	0.5%

SFR: suero fetal bovino

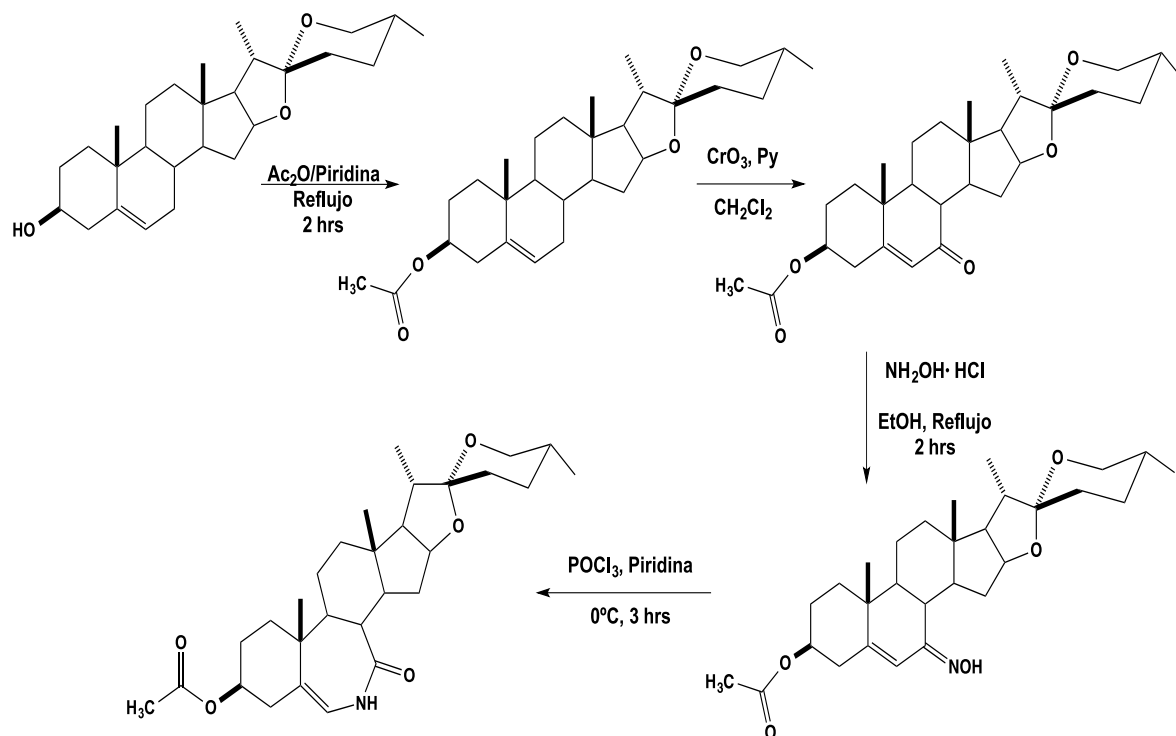
Tabla 2: Tiempo de duplicación y cambio de medio en función a la línea celular.

Línea celular	Tiempo de duplicación	Cambio de medio
MCF-7	38 horas	Cada 2 días
MDA-MB-231	38 horas	Cada 2 días
HeLa	24 horas	Cada día

8. RESULTADOS

SÍNTESIS ORGÁNICA

La Síntesis Orgánica realizada a través de Diosgenina diguió un análisis retrosintético, con 4 reacciones en total.



Esquema 5: Análisis retrosintético

En donde los productos obtenidos de la síntesis a partir de Diosgenina y comprobados por RMN fueron los siguientes: Acetato de Diosgenina, Acetato de diosgenin 5-en-7-ona, Oxima de acetato de diosgenin-5-en-7-ona y la Amida (25R)-3β-acetoxi-7-aza-B-homo-5-espirosten-8-ona

1. Caracterización de Diosgenina

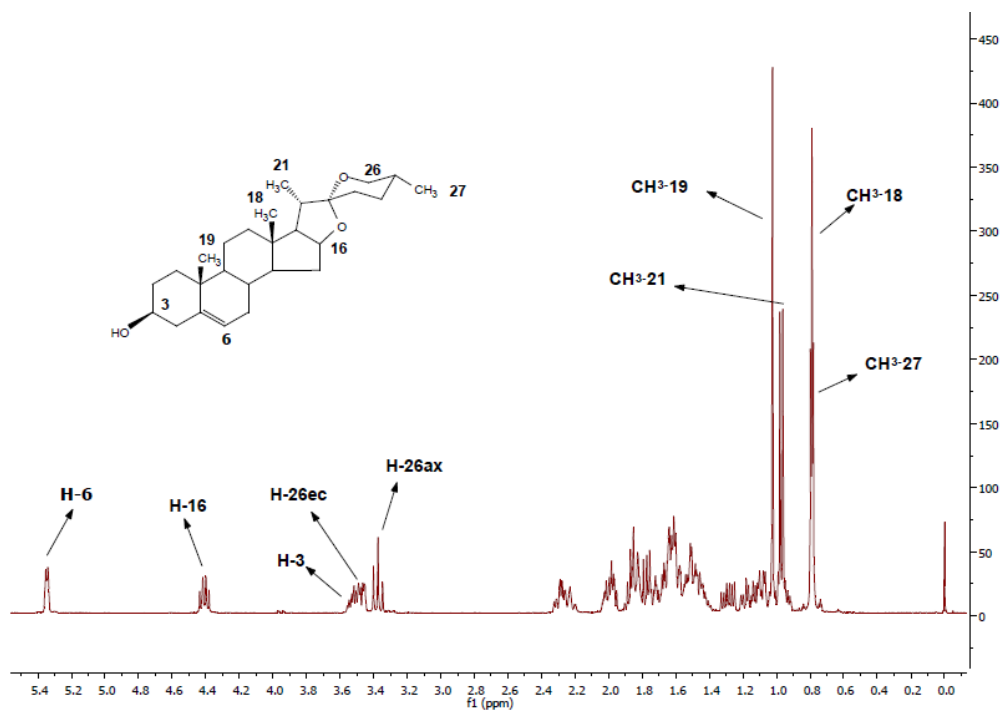


Figura 16: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H de Diosgenina

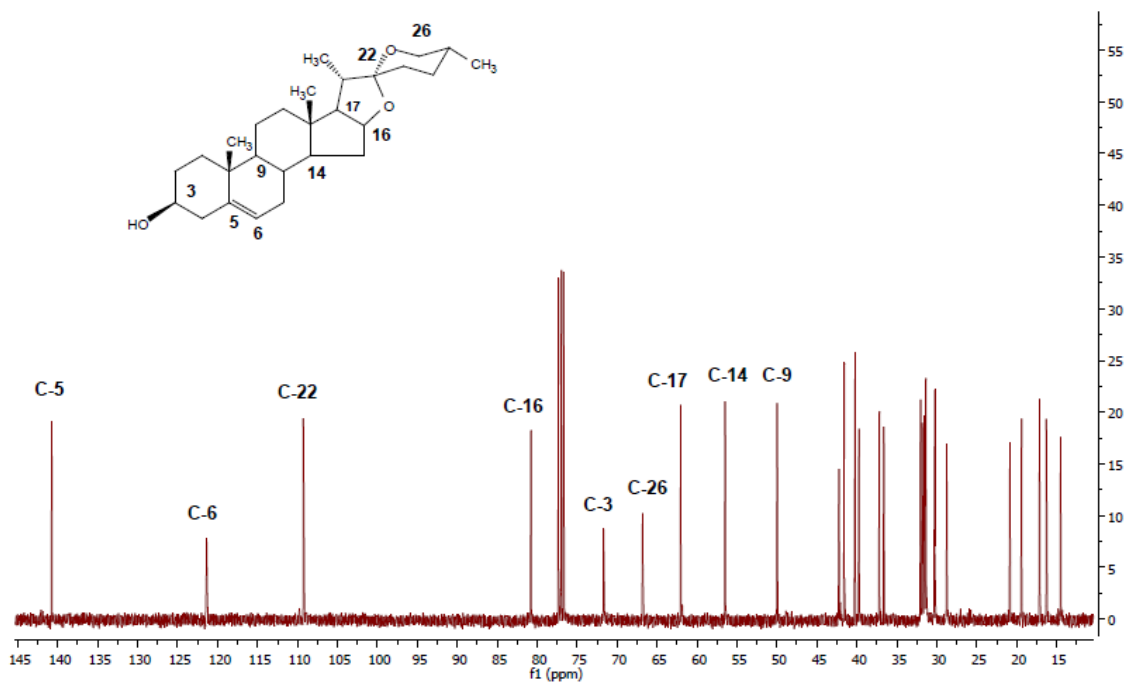


Figura 17: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹³C de Diosgenina

2. Caracterización del acetato de Diosgenina.

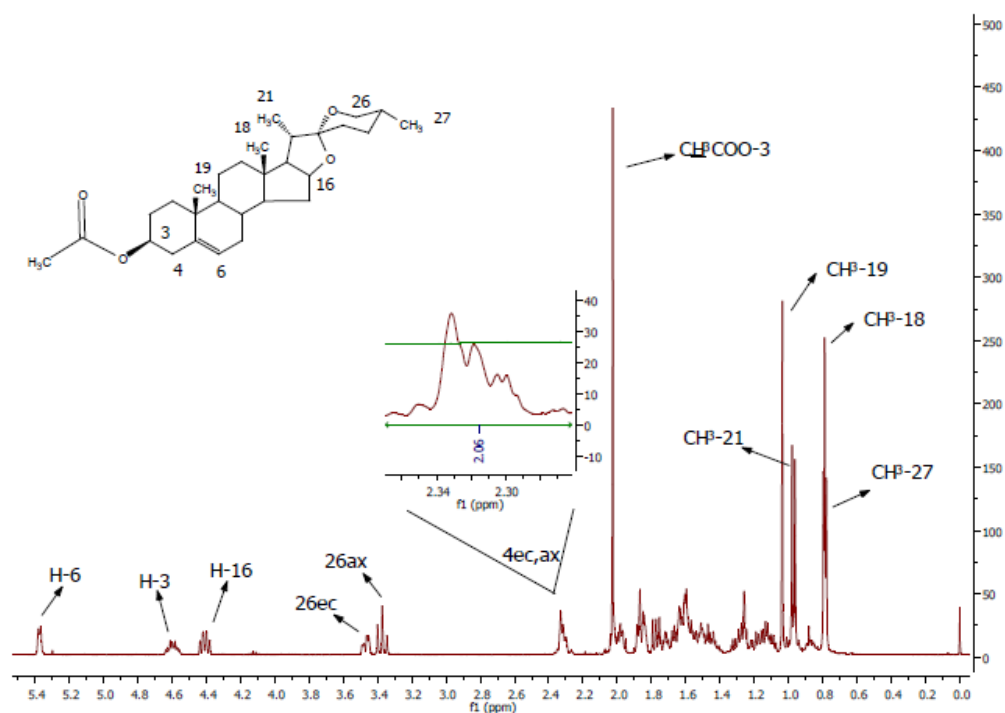


Figura 18: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H de acetato de Diosgenina

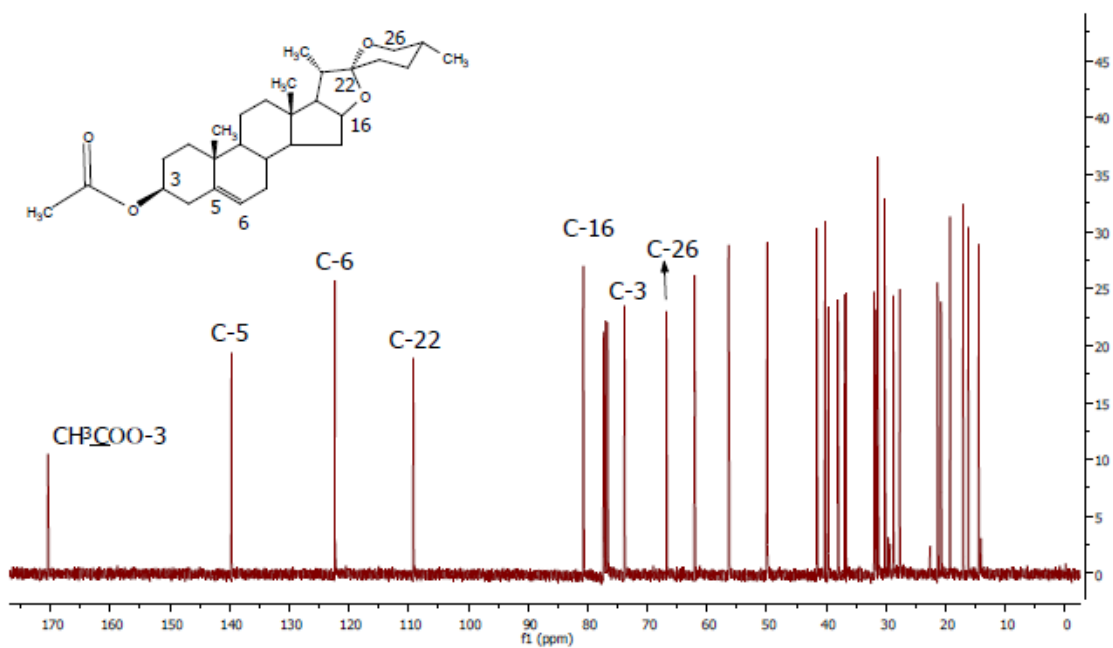


Figura 19: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹³C de acetato de Diosgenina

3. Caracterización del Acetato de 5-en-7-ona.

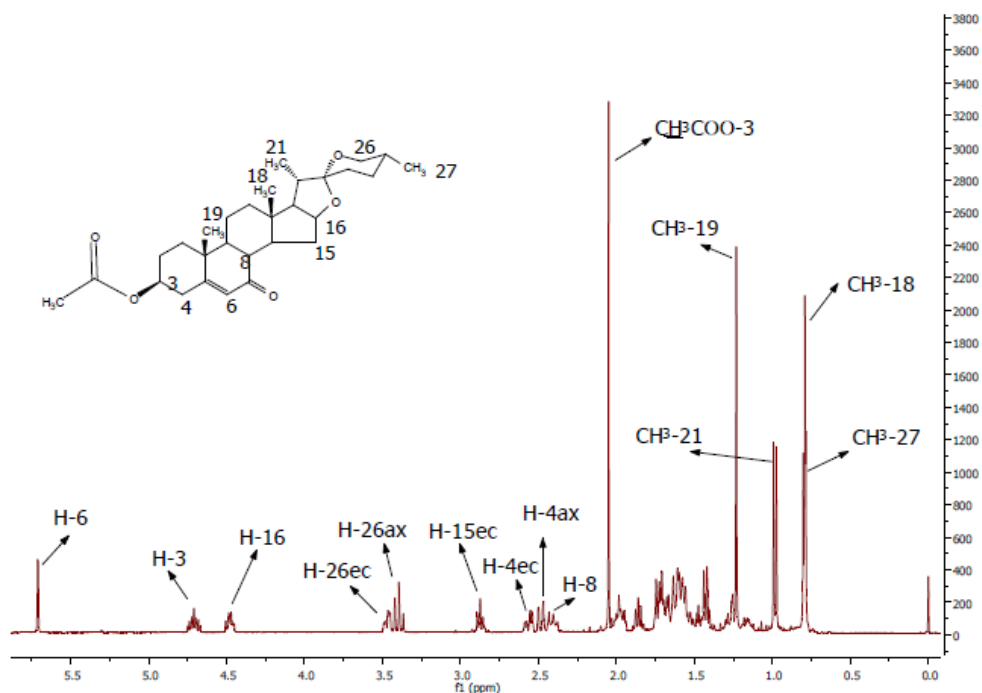


Figura 20: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H de Acetato de 5-en-7-ona

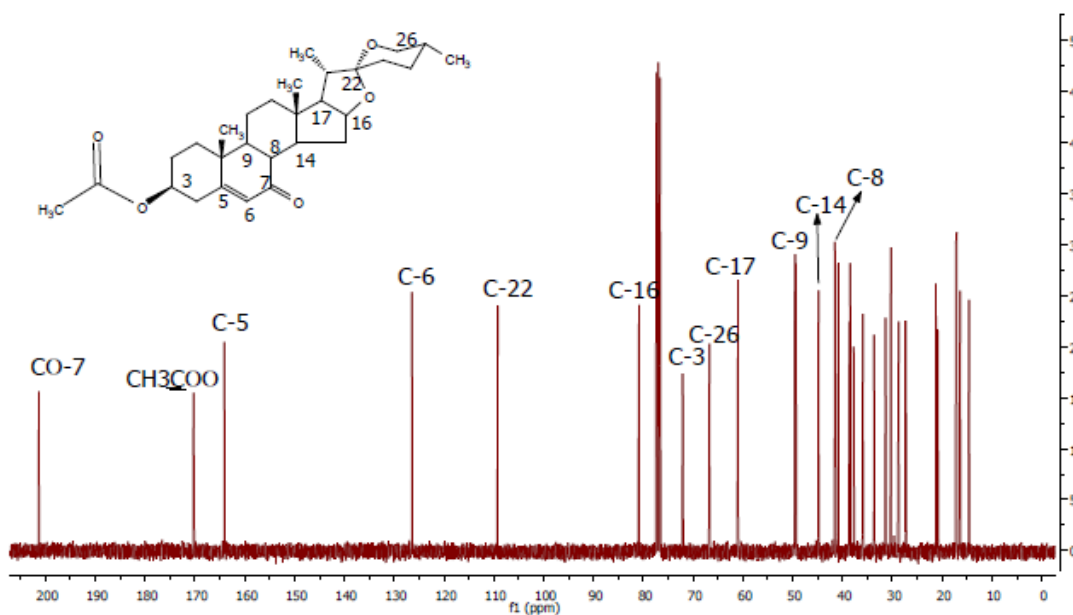


Figura 21: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹³C de Acetato de 5-en-7-ona

4. Caracterización de la oxima del acetato de (25*R*, 7*E*)-hidroximinoespirost-5-eno.

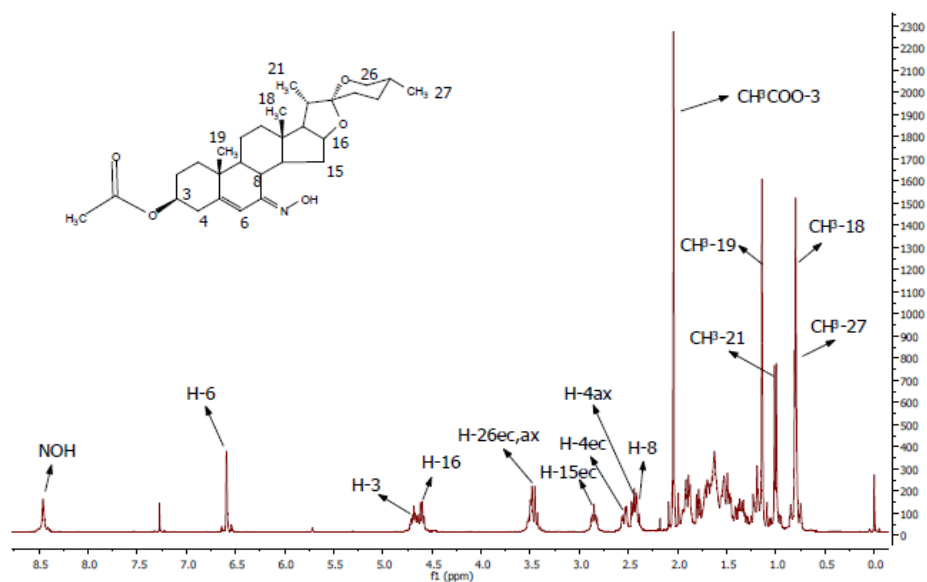


Figura 22: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H de Oxima de Acetato

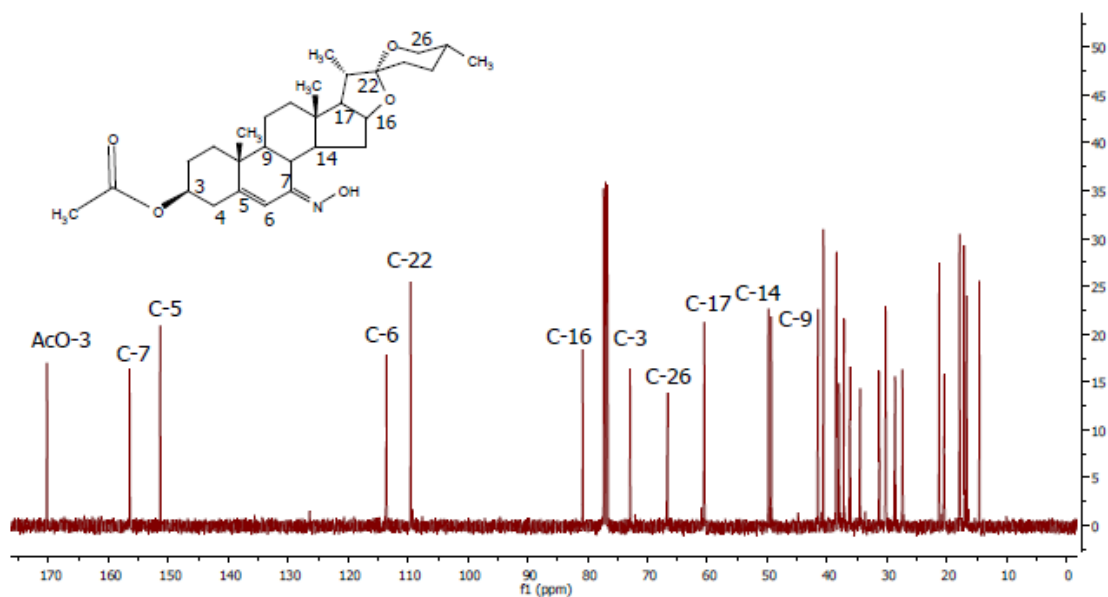


Figura 23: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹³C de Oxima de Acetato

5. Caracterización de la Amida del acetato de diosgenin-5-en-5,7-diona.

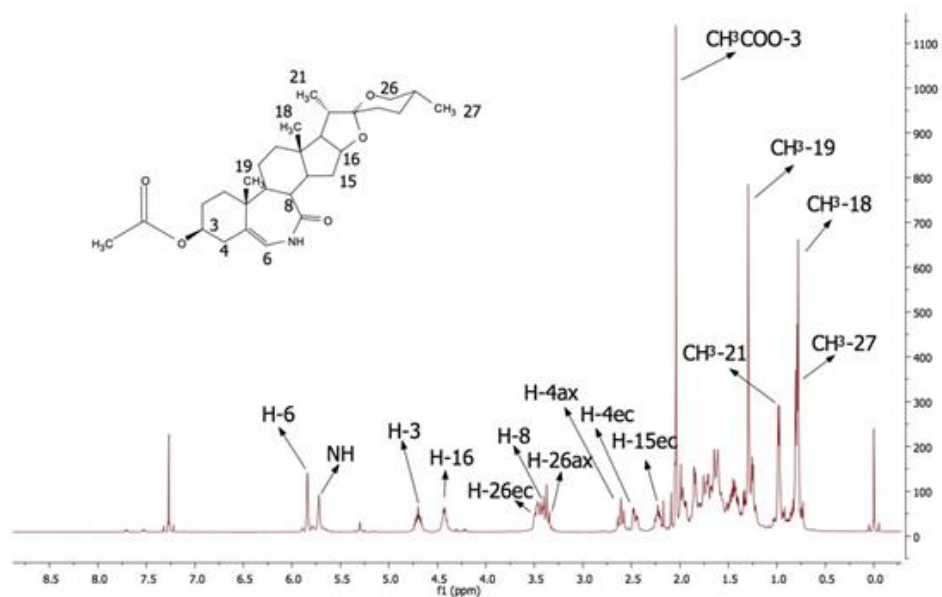


Figura 24: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H de Amida del acetato de diosgenin-5-en-5,7-diona.

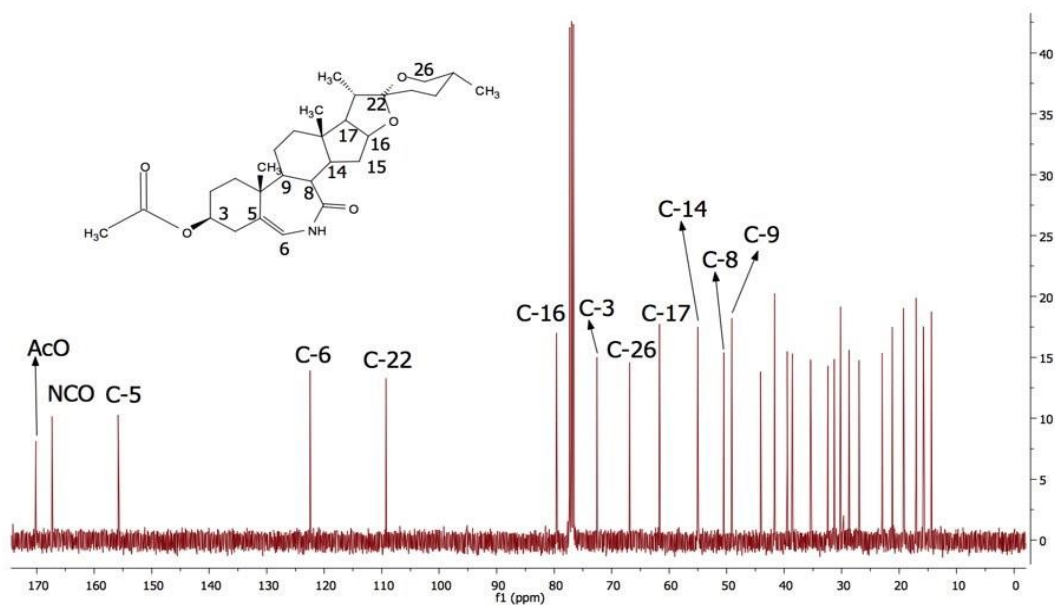


Figura 25: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C de Amida del acetato de diosgenin-5-en-5,7-diona.

EVALUACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE SÍNTESIS OBTENIDOS SOBRE LINEAS CELULARES (OXIMA, AMIDA).

- Evaluación de la oxima del acetato de (25R, 7E)-hidroximinoespirost-5-eno sobre la línea celular HeLa

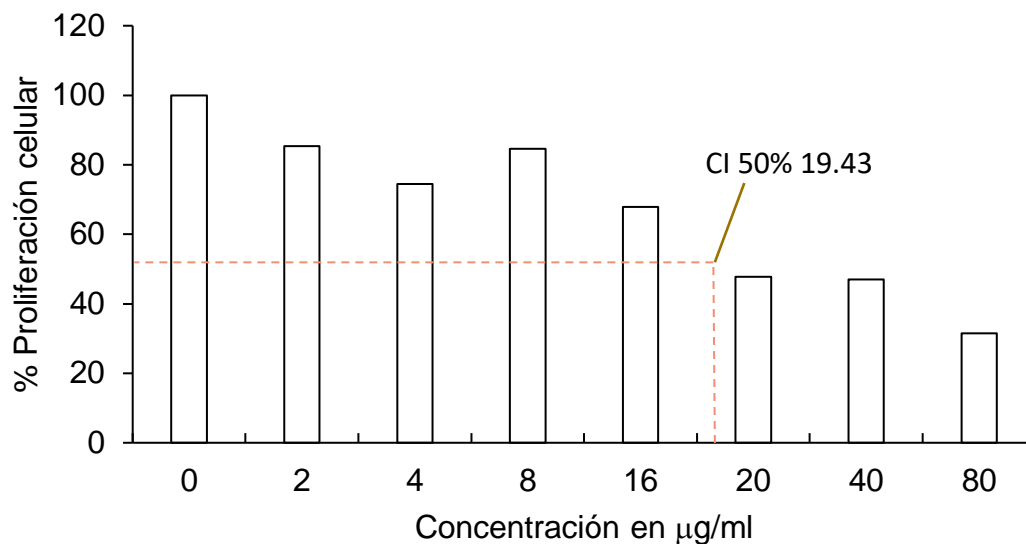


Figura 26: Curva dosis respuesta de la oxima sobre HeLa

- Evaluación de la Amida del acetato de diosgenin-5-en-5,7-diona, sobre la línea celular MDA-MB-231

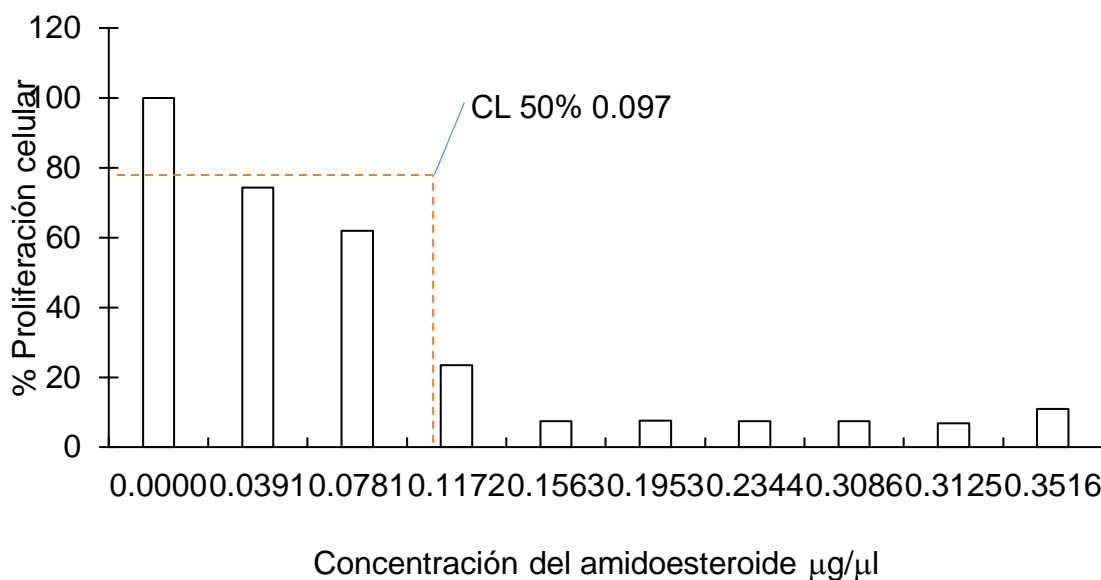


Figura 27: Curva dosis respuesta de la amida sobre la línea MDA-MB-231

PRUEBAS FITOQUÍMICAS

Las pruebas fitoquímicas, se realizaron sobre las especies seleccionadas, específicamente en las hojas de *Annona muricata* y la corteza de *Hippocratea excelsa* previamente secadas.

Tabla 3: Análisis fitoquímico

Compuesto	Especie vegetal	
	<i>Hippocratea excelsa</i>	<i>Annona muricata</i>
Alcaloides	Negativo	Positivo
Colesterol	Abundante	Mínimo
Cumarinas	Positivo	Negativo
Esteroides	Positivo	Positivo
Flavonoides	Negativo	Positivo
Insaturaciones	Positivo	Negativo
Lactonas	Negativo	Negativo
Óxidos fenólicos	Positivo	Negativo
Saponinas	Positivo	Positivo
Terpenos	Positivo	Positivo

Teniendo un panorama de las propiedades de cada planta. En el caso de *Annona muricata* se infiere que por la presencia de los compuestos ya mencionados posee un efecto, antitumoral, analgésico, antiinflamatorio, al igual que *Hippocratea excelsa*.

Por lo que se procedió a realizar diferentes extractos con diversos disolventes, para poder probar si se ejercía un efecto antiproliferativo, y en que dosis.

RESULTADOS DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS

Las concentraciones utilizadas para realizar los extractos se basaron en el conocimiento recomendado por las personas que ejercen la Medicina Tradicional

en la comunidad, con el fin de verificar si estas dosis y preparaciones tienen el efecto deseado sobre el consumidor.

Mediante el método de extracción Soxhlet, se obtuvieron 4 extractos diferentes (figura 28), 2 por cada especie. Utilizando un disolvente acuoso y un orgánico como lo es el etanol, para posteriormente realizar la verificación de efectividad sobre cultivos celulares de cáncer de mama y cervicouterino.

1. 125 ml de extracto acuoso de cancerina concentración 2.5g / 250 ml.
2. 125 ml de extracto etanólico de cancerina concentración 2.5g / 250 ml.
3. 125 ml de extracto etanólico de hoja de guanábana concentración 3.1g / 250 ml.
4. 125 ml de extracto acuoso de hoja de guanábana concentración 3.1g / 250 ml.



Figura 28: Extractos acuosos y etanolicos

EVALUACIÓN DE EXTRACTOS SOBRE LINEAS CELULARES HELA, MDA-MB-231 Y MCF-7

La proliferación celular se midió mediante el KIT XTT de Roche sembrando 4×10^4 células en placas de 96 pozos y midiendo la absorbancia a 450 nm y como referencia a 650 nm. Obteniendo diferentes lecturas para cada uno de los extractos.

Extracto acuoso de *Hippocratea excelsa*.

El extracto acuoso de *Hippocratea excelsa* es el que mostró mejor efecto antiproliferativo sobre las líneas celulares de cáncer de mama, logrando reportar una disminución del 50% de la población celular en MDA-MB-231 y el 46.8% en MCF-7 ambas a una CI_{50} de $0.00550 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Fig. 29, 30). En cambio, para la línea HeLa solo se alcanzó una disminución del 65.9% a esa misma concentración (Fig. 31).

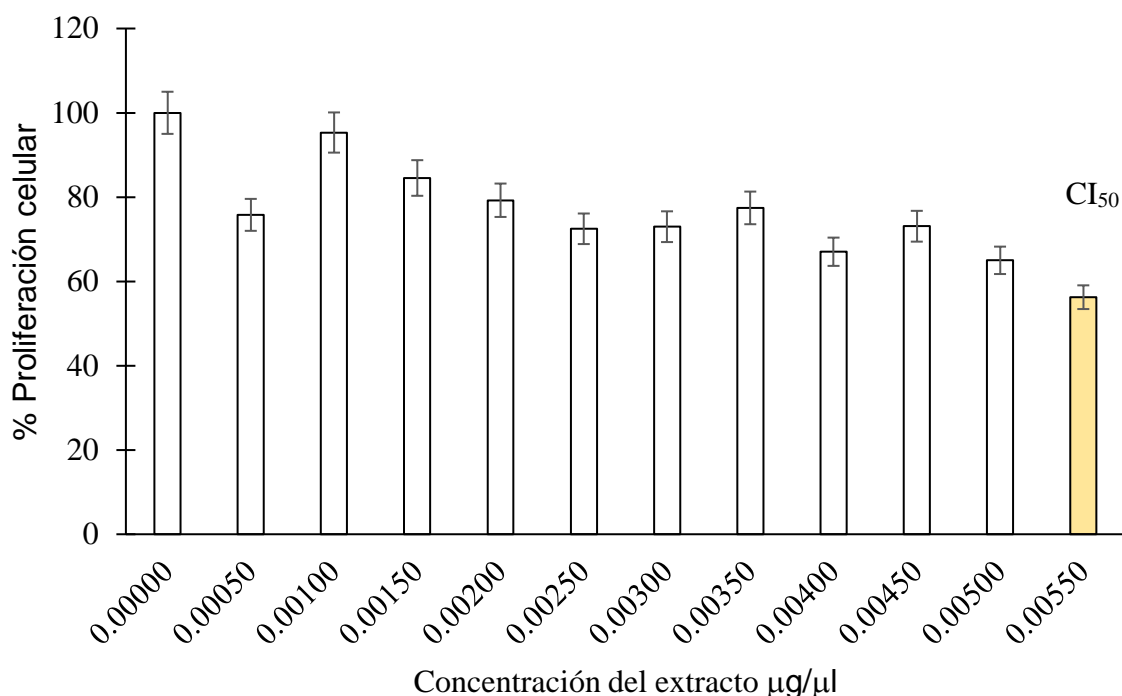


Figura 29: Curva dosis respuesta del extracto acuoso de *Hippocratea excelsa* en la línea celular de cáncer de mama triple negativo, MDA-MB-23.

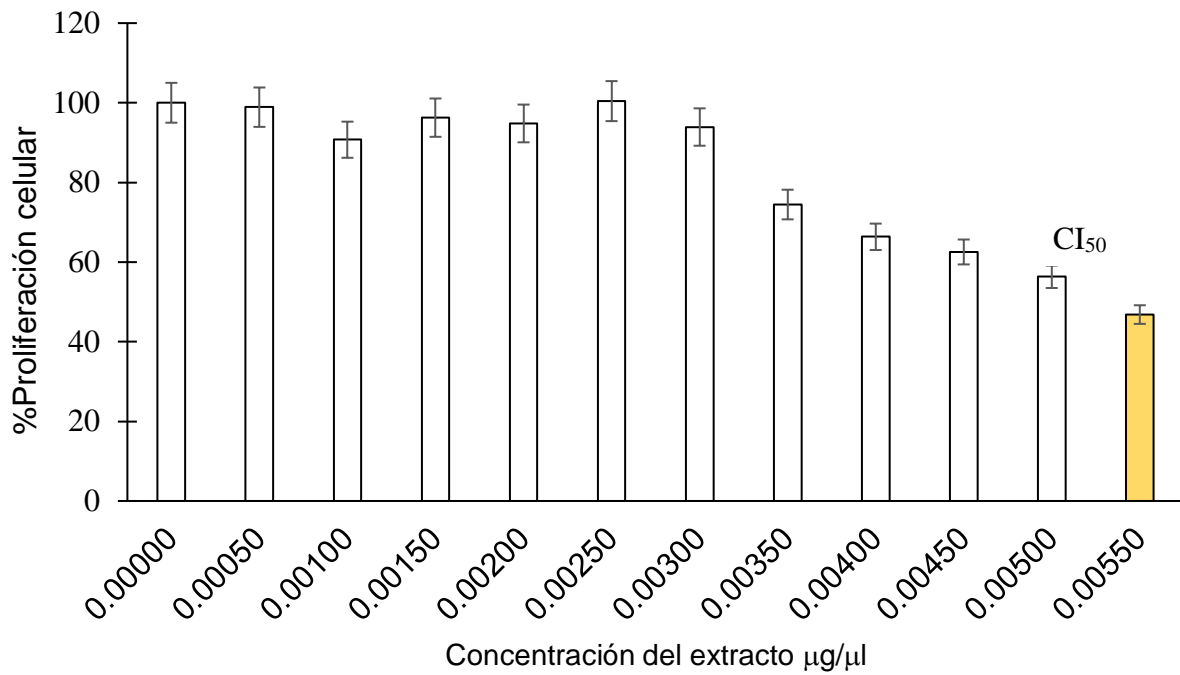


Figura 30: Curva dosis respuesta del extracto acuoso de *Hippocratea excelsa* en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

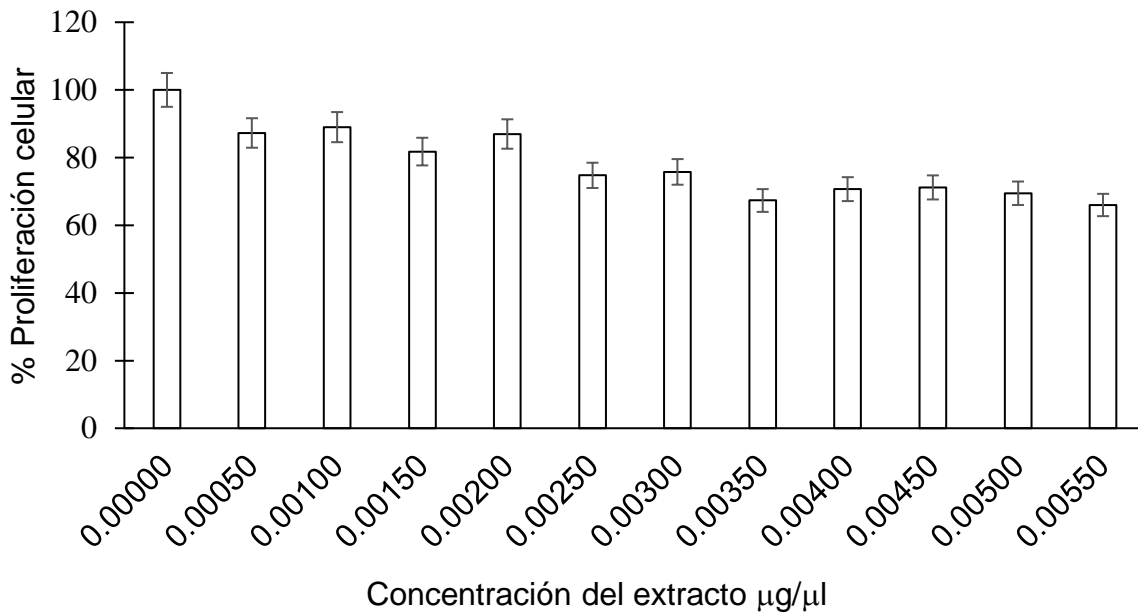


Figura 31: Curva dosis respuesta del extracto acuoso de *Hippocratea excelsa* en la línea celular de cáncer cervicouterino, HeLa.

Extracto etanólico de *Hippocratea excelsa*.

El extracto etanólico sobre las líneas celulares mostró la disminución de la población al 60.2% en las tres líneas celulares (Fig. 32,33,34) a la máxima concentración alcanzada en este ensayo, que fue de 0.00550 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

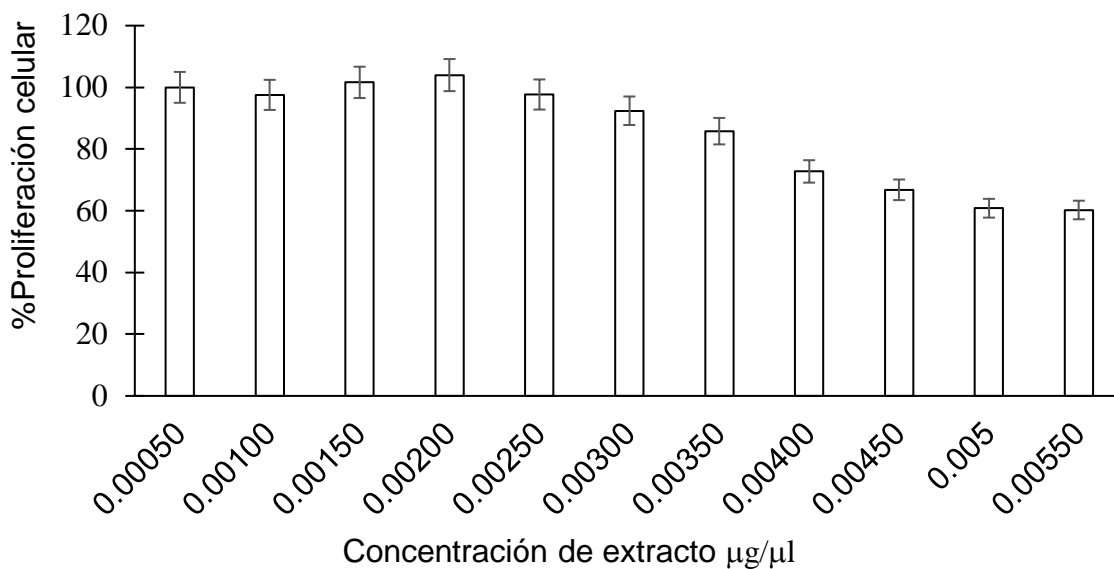


Figura 32: Curva dosis respuesta del extracto etanólico de *Hippocratea excelsa* en la línea celular de cáncer de mama triple negativo, MDA-MB-231

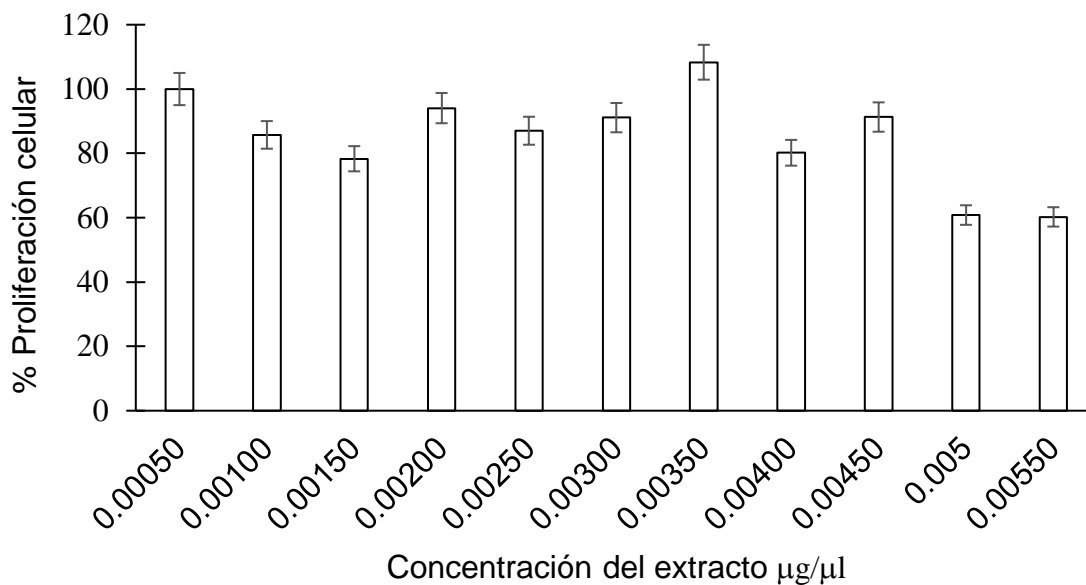


Figura 33: Curva dosis respuesta del extracto etanólico de *Hippocratea excelsa* en la línea celular de cáncer de mama luminal A, MCF-7.

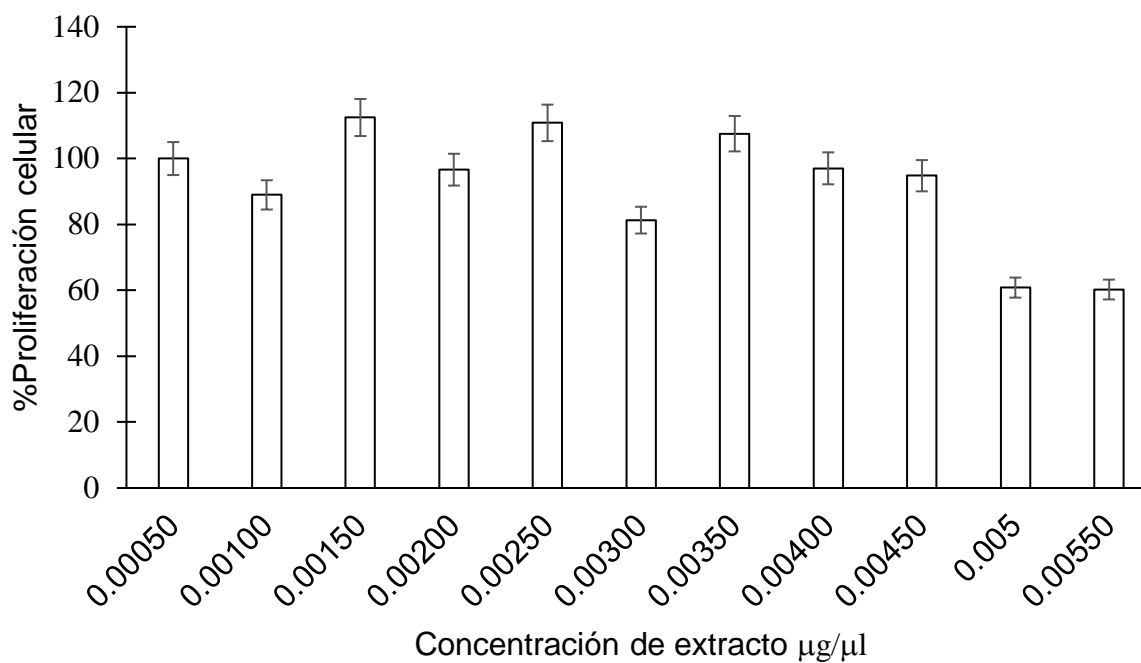


Figura 34: Curva dosis respuesta del extracto etanólico de *Hippocratea excelsa* en la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa.

Extracto acuoso de *Annona muricata*.

El extracto acuoso de *Annona muricata* mostró un comportamiento diferente al extracto de *Hippocratea excelsa*, con un efecto antiproliferativo únicamente sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7 con una CI_{50} de $0.00682 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Fig. 35) disminuyendo el 50 % de la población celular y para la línea MDA-MB-231 no se reporta una CI_{50} , ya que solo se logró disminuir hasta el 86.6 % de proliferación (Fig. 36).

Sin embargo, se observó un efecto contrario al aplicar el extracto sobre la línea celular HeLa, de cáncer cervicouterino, al ayudar el aumento de la proliferación celular hasta un 20 % más del valor inicial (Fig. 37).

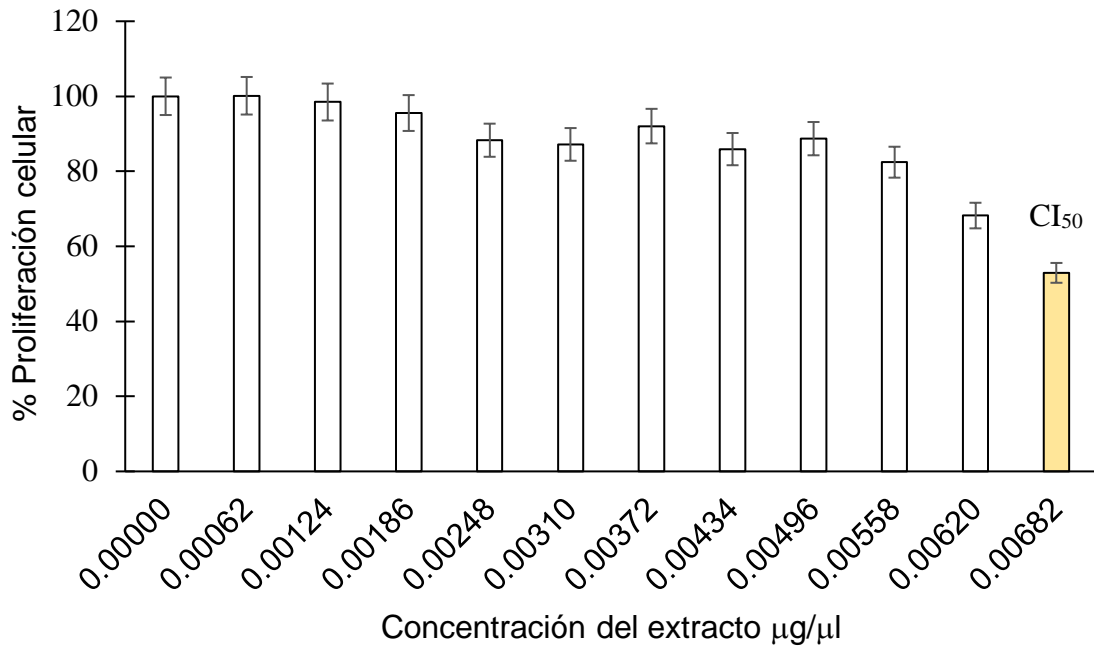


Figura 35: Curva dosis respuesta del extracto acuoso de hoja de guanábana en la línea celular de cáncer de mama luminal A, MCF-7

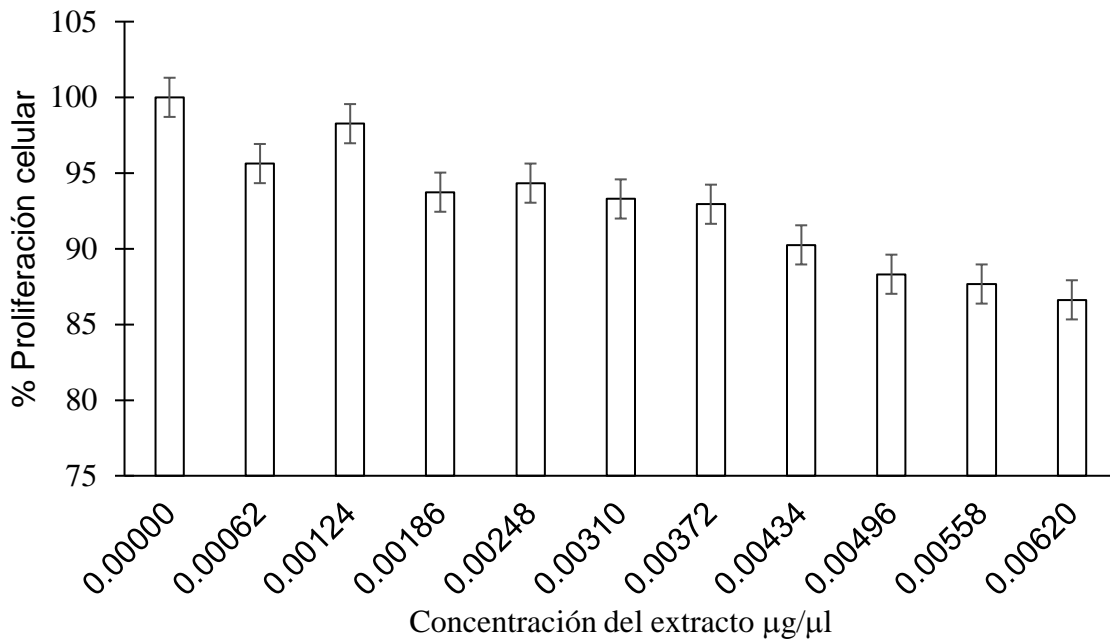


Figura 36: Curva dosis respuesta del extracto acuoso de Annona muricata en MDA-MB-231

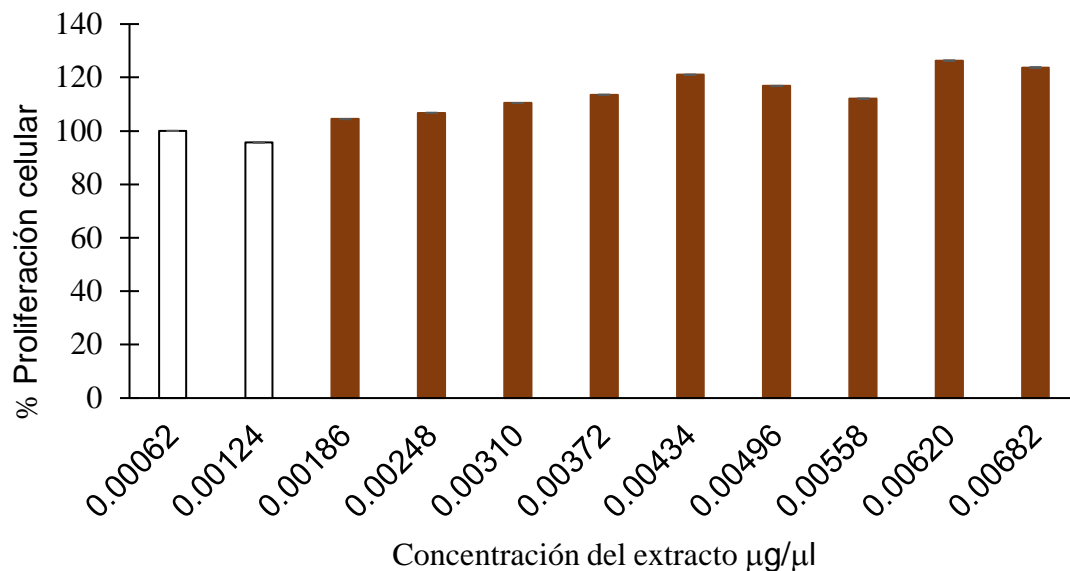


Figura 37: Curva dosis respuesta del extracto acuoso de *Annona muricata* en la línea celular de cáncer cervicouterino, HeLa

Extracto etanólico de *Annona muricata*.

El extracto etanólico sobre las líneas celulares únicamente mostró la disminución de la población a un 50 % en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 (Fig. 38) a una concentración de 0.00682 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Mientras que para MCF-7 (Fig. 39) y HeLa (Fig. 40) no se logró alcanzar una disminución significativa.

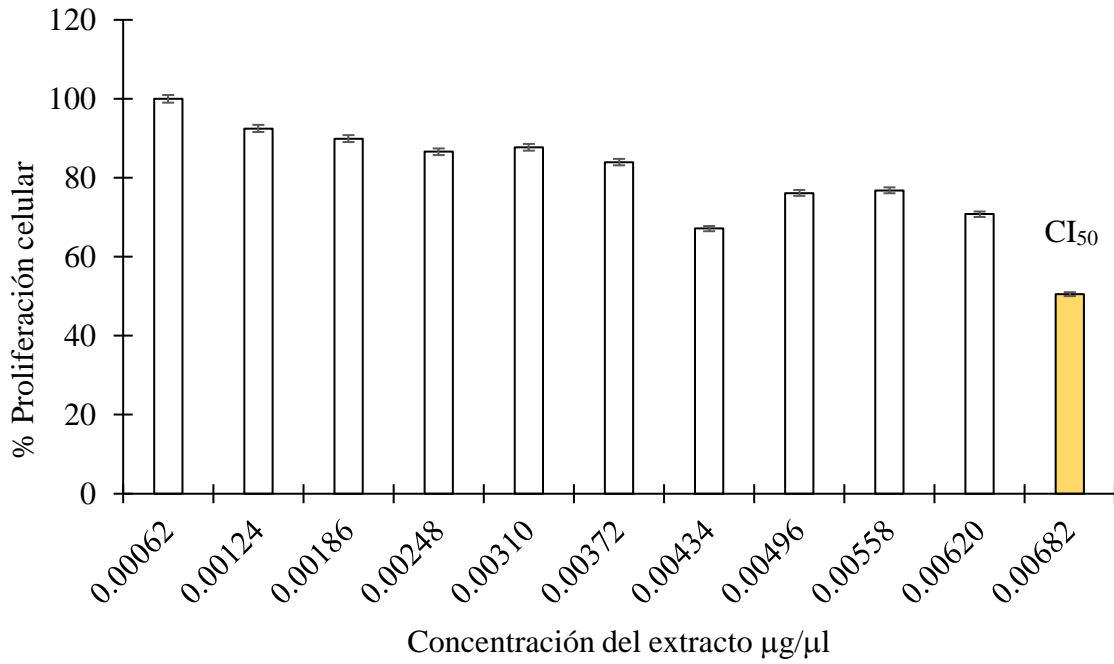


Figura 38: Curva dosis respuesta del extracto etanólico de *Annona muricata* en MDA-MB-231

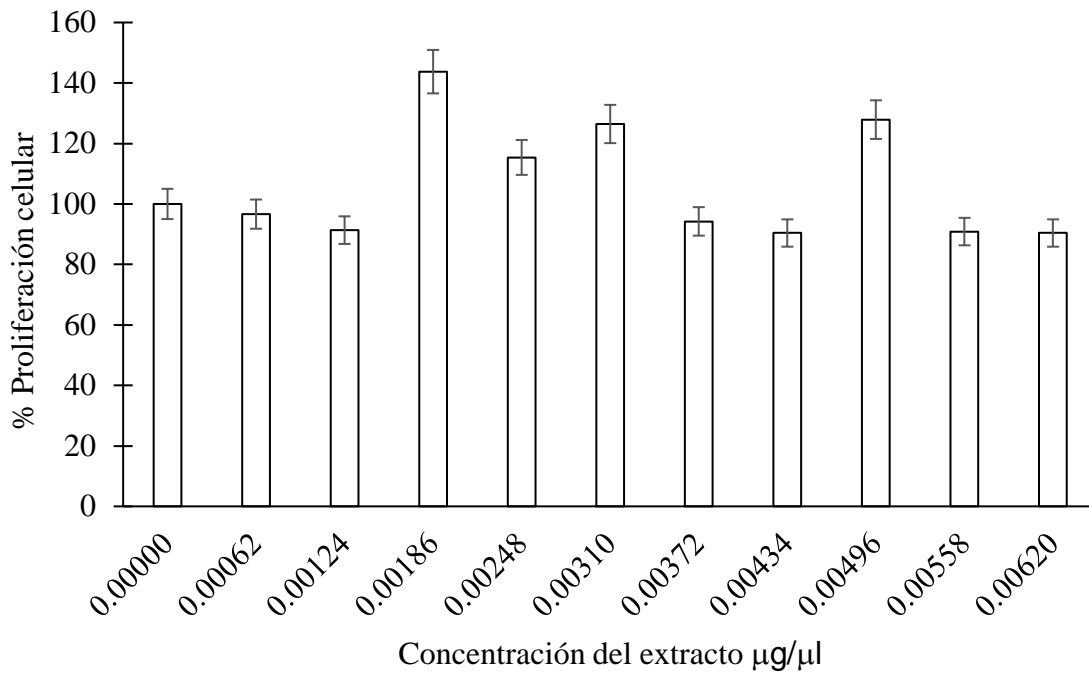


Figura 39: Curva dosis respuesta del extracto etanólico de *Annona muricata* sobre MCF-7

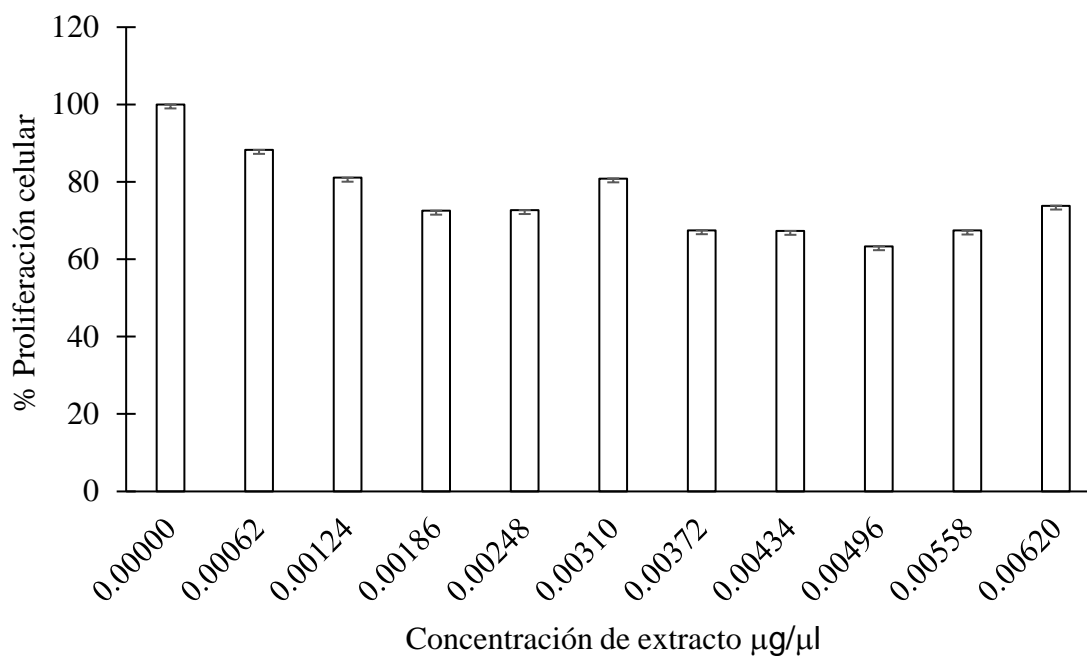


Figura 40: Curva dosis respuesta del extracto etanólico de *Annona muricata* sobre HeLa

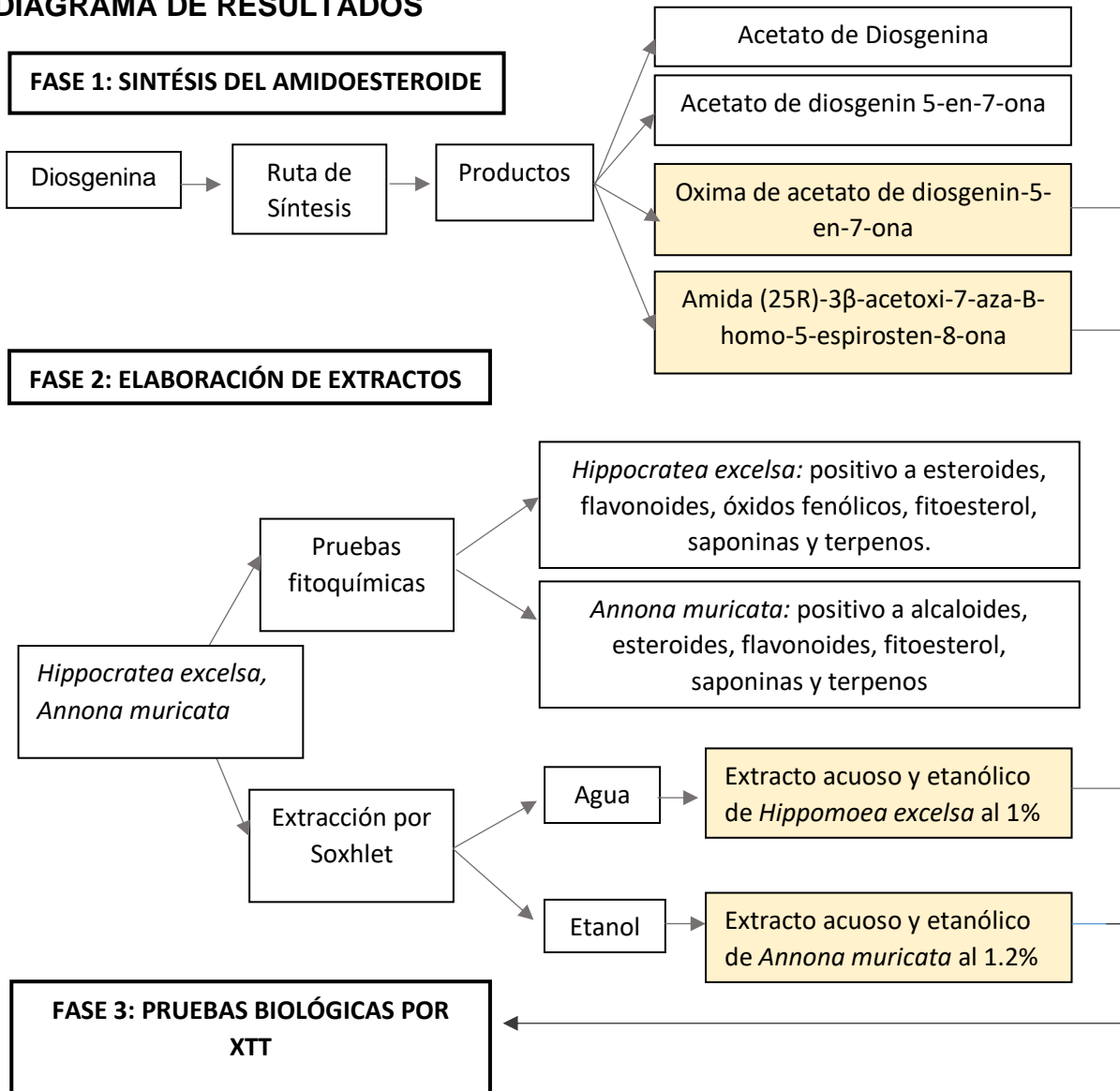
Los resultados de las gráficas son resumidos en la Tabla 4, al mismo tiempo que se realizó una prueba ANOVA para determinar cual de los extractos es el que mostro mejor acción. Obteniendo valores significativos los cuales indican que el extracto acuoso de ambas especies tiene el mejor efecto antiproliferativo sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.

Tabla: 4. Efecto antiproliferativo de los extractos

Extracto		CI ₅₀ sobre líneas celulares		
		MCF-7	MDA-MB 231	HeLa
<i>Hippocratea excelsa</i>	Acuoso	CI ₅₀ : 0.0055 mg/ml	CI ₅₀ : 0.0055 mg/ml	NA
	Etanólico	NA	NA	NA
<i>Annona muricata</i>	Acuoso	CI ₅₀ : 0.00682 mg/ml	NA	EP
	Etanólico	NA	CI ₅₀ : 0.00682 mg/ml	NA

CI₅₀: concentración inhibitoria, NA: No alcanzo la CI₅₀., EP: efecto proliferativo.

DIAGRAMA DE RESULTADOS



Tratamiento	CI ₅₀ (µg/µl)		
	MCF-7	MDA-MB 231	HeLa
Extracto acuoso de <i>Hippocratea</i>	0.0055	0.0055	NA
Extracto etanólico de <i>Hippocratea</i>	NA	NA	NA
Extracto acuoso de <i>Hippocratea</i>	0.00682	NA	EP
Extracto etanólico de <i>Hippocratea</i>	NA	0.00682	NA
Oxima de acetato de diosgenin-5-en-7-ona	-----	-----	0.019
Amida (25R)-3β-acetoxi-7-aza-B-homo-5-espirosten-8-ona	-----	0.097	-----

Diagrama de flujo para Fase 3:

Oxima → HeLa, MDA-MB-231, MCF-7

Amida → HeLa, MDA-MB-231, MCF-7

Extractos de *Hippocratea excelsa* y *Annona muricata* → HeLa, MDA-MB-231, MCF-7

9. DISCUSIÓN

1. Caracterización de la Diosgenina.

La técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) es sin duda la herramienta más poderosa en la elucidación estructural de las moléculas orgánicas, debido a esto, en la caracterización de los compuestos obtenidos se les dará una especial atención a los espectros de RMN, no obstante, para la elucidación inequívoca se emplearon otras técnicas espectroscópicas y físicas que se describen en la parte experimental y cuyos espectros se encuentran en el apéndice.

La Diosgenina se elucidó a través de sus espectros de RMN para observar y entender de mejor forma las modificaciones realizadas. A continuación, se describen los datos más relevantes de los espectros de RMN en una y dos dimensiones. Los datos que arroja el espectro de ^1H dan una idea muy clara acerca de la estructura de las moléculas, sin embargo, la gran mayoría de las veces se tiene que recurrir al experimento de ^{13}C y técnicas bidimensionales de correlación homonuclear y heteronuclear.

Una de las informaciones más importantes que ofrece el espectro de ^1H es el número de señales, indica el número de protones diferentes que hay en la molécula. El desplazamiento químico también es muy importante, da información del ambiente químico y magnético que rodea a cada protón. La integración de las señales, la multiplicidad y las constantes de acoplamiento complementan la información pues dan la proporción, la vecindad y la conformación de la molécula.

Para el caso de la Diosgenina, con fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_3$, de los cuarenta y dos protones que se tienen, treinta y cuatro son diferentes por lo que se esperan treinta y cuatro señales en el espectro de protón, dado que la mayoría de las señales caen en un rango muy pequeño (entre una y dos ppm), solo con este experimento es casi imposible asignar todas las señales de la estructura. Sin

embargo, es posible distinguir a los protones más característicos, es decir, aquellos que se encuentran cerca de grupos electronegativos y que se desplazan a campos bajos (a la izquierda del espectro) y aquellos que, aunque caen en el área congestionada (campos altos) se pueden diferenciar debido a su multiplicidad o integración como en el caso de los protones de metilo.

En el espectro de ^1H se observa la señal del protón vinílico H-6 en 5.34 ppm. En 4.41 ppm se observa la señal de H-16 como una señal *ddd* con $J_{16-17} = J_{16-15ax} = J_{16-15ec} = 7.6$ Hz. En 3.51 ppm se observa una señal múltiple que se asignó al protón base de oxígeno H-3. Los protones diastereotópicos H-26 ecuatorial y axial se encuentran en 3.46 y 3.37 ppm; el protón H-26 ecuatorial tiene una multiplicidad *ddd* con una $J_{gem} = 10.8$ Hz, una $J_{26ec-25ax} = 4.4$ y por último una $J = 2.4$ Hz debido al acoplamiento en *W* con el protón H-24 ecuatorial. Para el caso de H-26 axial, se observa una señal *dd* con $J_{gem} = J_{26ax-25ax} = 10.8$ Hz, que al tener el mismo valor se observa como un triplete.

Con respecto al espectro de ^{13}C , se mostraron las 27 señales de carbonos de la molécula. Las señales de los carbonos vinílicos C-5 y C-6 se observan en 140.8 y 121.4 ppm. El desplazamiento en 109.3 ppm es muy característico para carbonos espirocetálicos. Las señales de los carbonos base de oxígeno de C-3, C-16 y C-26 se observaron en 71.7, 80.8 y 66.8 ppm respectivamente.

2. Caracterización del acetato de Diosgenina.

La esterificación se llevó a cabo por calentamiento de la Diosgenina a reflujo de anhídrido acético y dimetil amino piridino por 1 hora. En el espectro de ^1H se observó que las señales correspondientes a H-6 y H-16 no presentan cambios considerables respecto a la Diosgenina. Por el contrario, en 4.59 ppm se observó una señal múltiple que se asignó al protón base de oxígeno H-3, que a diferencia del espectro de Diosgenina, esta señal se observa desplazada a campos bajos debido a la desprotección que el grupo acetato ejerce sobre este protón.

Los protones diastereotópicos H-26 ecuatorial y axial presentan un desplazamiento similar que en la Diosgenina encontrándose en 3.47 y 3.37 ppm

respectivamente. De la misma manera, en 2.31 ppm se observó una señal múltiple ancha que integra para dos protones, asignándose a los protones 4 ecuatorial y 4 axial. También se observó una señal simple en 2.03 ppm característica de protones metílicos alfa a grupos carbonilo, correspondientes al metilo del acetato. Las señales simples hacia 1.04 y 0.79 ppm se asignaron a los protones de los metilos 19 y 18 respectivamente. Hacia campos altos aparecen dos señales dobles en 0.97 y 0.78 ppm con constantes de acoplamiento de 6.8 y 6.4 Hz que se asignaron a los protones de los metilos 21 y 27 respectivamente.

Por su parte, en el espectro de ^{13}C , se mostraron las 29 señales que corresponden con el número de carbonos de la molécula. En 170.2 ppm destaca una señal característica del carbonilo de grupo éster. Las señales de los carbonos vinílicos C-5 y C-6 aparecen en 139.5 y 122.2 ppm. El carbono espirocetálico 22 se mostró hacia 109.1 ppm. Las señales de los carbonos base de oxígeno de C-3, C-16 y C-26 se observaron a campos bajos hacia 73.8, 80.7 y 66.8 ppm respectivamente.

3. Caracterización del Acetato de 5-en-7-ona.

La reacción de oxidación alílica se logró primeramente preparando el reactivo de Collins disolviendo CrO_3 en CH_2Cl_2 a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y posteriormente agregando lentamente piridina. Una vez listo el reactivo, se agregó acetato de Diosgenina disuelto en CH_2Cl_2 y se dejó la reacción en agitación por 12 horas. Mediante CCF se observó que la materia prima se encontraba en menor proporción que el producto esperado obtenido en un 71 % de rendimiento.

En el espectro de ^1H , se observó a campos bajos una señal simple ancha en 5.71 ppm que se asignó al protón H-6. Los protones H-3 y H-16 se desplazaron hacia 4.71 y 4.48 ppm mientras que los protones diastereotópicos H-26_{ec} y H-26_{ax} no presentan cambios en su desplazamiento. Los cambios más significativos con referencia al espectro de la materia prima fueron la presencia de cuatro señales a campos bajos; una señal múltiple que integra para un protón en 2.88 ppm que se

asignó al protón H-15_{ec}; una señal *ddd* que integra para un protón en 2.56 ppm asignada a H-4_{ec} cuyas constantes de acoplamiento fueron $J_{gem}=14$, $J_{4ec-3ax}=7.2$ y $J_{4ec-2ec}=2$ Hz, una señal *dd* que integra para un protón en 2.49 ppm con $J_{gem}=11.2$ y $J_{4ax-3}=1.6$ Hz asignada al protón H-4_{ax} y una señal múltiple en 2.41 ppm que se asignó al protón α al grupo carbonilo H-8. Los desplazamientos a campos bajos de estos protones se explican debido al apantallamiento que ejerce el grupo carbonilo y del doble enlace. Hacia 2.05 ppm se pudo observar una señal simple que se asignó al metilo del grupo acetato en C-3. A campos altos se mostraron las señales simples hacia 1.23 y 0.79 ppm que se asignaron a los protones de los metilos 19 y 18 respectivamente. De la misma manera, las dos señales dobles en 0.98 y 0.79 ppm con constantes de acoplamiento de 6.8 y 6.4 Hz se asignaron a los protones de los metilos 21 y 27 respectivamente.

En el espectro de ^{13}C se observaron 29 señales que corresponden al número de carbonos de la molécula. La señal en 201.4 se asignó a C-7, ya que el desplazamiento químico es característico de cetonas α,β -insaturadas. En 170.3 ppm se observó una señal que fue asignada al carbonilo del grupo acetato. Por otro lado, las señales en 164.0 y 126.4 ppm se asignaron a los carbonos vinílicos C-5 y C-6. El desplazamiento del carbono espirocetálico no presenta cambios significativos apareciendo en 109.2 ppm, mientras que los carbonos base de oxígeno C-16, C-3 y C-26 se desplazan hacia 80.9, 72.1 y 66.7 ppm respectivamente.

4. Caracterización de la oxima del acetato de (25R, 7E)-hidroximinoespirost-5-eno.

La formación de la oxima a partir de la enona se llevó a cabo con $NH_2OH.HCl$ a reflujo de una solución de etanol y acetato de sodio por dos horas. Los mejores resultados fueron utilizando 1 eq. de la oxima por 1.5 eq. de $NH_2OH.HCl$. La caracterización mostró la presencia de una sola oxima que se obtuvo en un rendimiento del 71 %.

En el espectro de ^1H se observaron dos señales simples anchas en 8.46 y 6.59 ppm que corresponden al protón del hidroxilo de la oxima y al protón H-6 con respecto al espectro de ^1H de la materia prima. Los protones base de oxígeno 3 y 16 presentaron ligeros cambios en su desplazamiento y aparecieron en 4.68 y 4.61 ppm mientras que los protones diastereotópicos 26 $_{ec}$ y 26 $_{ax}$ se desplazaron hacia 3.50 y 3.45 ppm respectivamente apareciendo como una señal que integra para dos protones como se aprecia en la figura 52. El protón 15 $_{ec}$ se vio afectado por el grupo hidroxilo de la oxima, y apareció como una señal múltiple integrando para un protón hacia 2.85 ppm. Un ligero cambio se presentó en el desplazamiento de los protones 4 $_{ec}$, 4 $_{ax}$ y 8 los cuales se ven como señales múltiples hacia 2.54, 2.45 y 2.42 ppm. La señal simple hacia 2.04 ppm corresponde al metilo del grupo acetato, mientras que a campos altos se mostraron las señales simples hacia 1.14 y 0.80 ppm que se asignaron a los protones de los metilos 19 y 18 respectivamente. Las dos señales dobles en 1.01 y 0.80 ppm con constantes de acoplamiento de 7.2 y 5.6 Hz se asignaron a los protones de los metilos 21 y 27.

En el espectro de ^{13}C se apreciaron las 29 señales correspondientes al número de carbonos de la molécula. Primeramente, la señal que correspondía a la enona en C-7 dejó de observarse y se notó una señal en 156.5 ppm característico de oximas, la cual fue asignada al carbono de la oxima en C-7. En 170.3 ppm aparece una señal que fue asignada al carbonilo del grupo acetato en C-3 mientras que los carbonos vinílicos C-5 y C-6 se muestran en 151.4 y 113.6 ppm. El carbono espirocetálico no presentó cambios en su desplazamiento mostrándose hacia 109.5 ppm. Los carbonos base de oxígeno se apreciaron en 80.8 y 72.9 ppm respectivamente.

5. Caracterización del (25*R*)-3[®]-acetoxi-7-aza-B-homo-5-espirosten-7-ona.

En el espectro de ^1H se observó una señal simple en 5.84 ppm correspondiente al protón vinílico H-6 y una señal simple ancha en 5.72 ppm que se asignó al protón de la enamida. De los protones base de oxígeno, el H-3 no presenta cambios y apareció en 4.69 ppm mientras que el protón H-16 presentó ligeros cambios en su

desplazamiento y se mostró en 4.43 ppm. Los protones diastereotópicos 26_{ec} y 26_{ax} se desplazaron hacia 3.47 y 3.37 ppm y el protón H-8 se vio más afectado por el grupo carbonilo de la enamida, por lo cual fue desplazado hasta 3.42 ppm. Los protones 4_{ax} y 4_{ec} se mostraron como una señal dd con $J_{gem}=J_{4ax-3}=11.6$ Hz en 2.60 ppm y una señal múltiple en 2.46 ppm respectivamente. El protón 15_{ec} se vio ligeramente afectado por el carbonilo de la enamida y se desplazó como una señal múltiple hacia 2.23 ppm. El metilo del grupo acetato en C-3 se mostró en 2.04 ppm y los metilos 19 y 18 como señales simples en 1.29 y 0.78 ppm. Los metilos 21 y 27 se mostraron como señales dobles en 0.98 y 0.79 ppm con $J_{21-20}=6.0$ Hz y $J_{27-25}=6.0$ Hz respectivamente.

En el espectro de ¹³C se apreciaron 29 señales correspondientes al número de carbonos de la molécula. La señal correspondiente a la oxima en C-7 ya no se observó y se mostró una nueva señal en 167.4 ppm que se asignó al carbonilo de la enamida. En 170.2 ppm permaneció la señal asignada al carbonilo del grupo acetato en C-3 mientras que los carbonos vinílicos C-5 y C-6 presentaron ligeros cambios y se mostraron en 155.8 y 122.4 ppm. El carbono espirocetálico se desplazó hacia 109.3 ppm mientras que los carbonos base de oxígeno se apreciaron en 79.6 y 72.5 ppm respectivamente.

- **Evaluación de la Amida del acetato de diosgenin-5-en-5,7-diona, sobre la línea celular MDA-MB-231**

Una vez obtenido el amidoesteroide, se procedió a evaluar, su actividad sobre la línea celular MDA-MB-231, esperando como resultado una inhibición del crecimiento celular como se ha observado en diversos compuestos modificados a partir de Diosgenina. Obteniendo un resultado positivo al efecto antiproliferativo, ya que se observa que el compuesto amidoesteroideo sintetizado, ejerce un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular en la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama triple negativo, con una CI_{50} a los 0.097 μ g/ μ l.

Siendo una posible opción de estudio para tratamiento del cáncer de mama no hormonodependiente, el cual muestra mayor mortalidad dentro de la población mexicana y menor esperanza de vida (menos de 4 años) posterior a su diagnóstico.

- **Pruebas fitoquímicas**

Las pruebas fitoquímicas realizadas a las especies de plantas seleccionadas, muestran la presencia de compuestos como son alcaloides, esteroides, flavonoides, saponinas, terpenos y un mínimo de colesterol para la Hoja de Guanabána (*Annona Muricata*) y cumarinas, esteroides, compuestos insaturados, óxidos fenólicos, saponinas y abundante colesterol para la cancerina (*Hippocratea Excelsa*).

La presencia de alcaloides, los cuales son metabolitos secundarios producidos por las plantas, brinda regulación del crecimiento y protección contra plagas o depredadores a las plantas. Químicamente van desde compuestos muy sencillos como la conina, hasta compuestos de estructuras pentacíclicas. Dentro de la actividad biológica de los alcaloides de origen vegetal en el ser humano, se mencionan, un efecto analgésico, anestésico, psicotrópico o antitumoral.

Los esteroides, que son alcoholes secundarios policíclicos con estructura de ciclopentanofenantreno, controlan el proceso de crecimiento y desarrollo de las especies vegetales así como su diferenciación celular. Su efecto fisiológico en seres humanos involucra modificación en la actividad hormonal.

Las saponinas como glicósidos de alcoholes tanto terpenoides como esteroides con una cadena espiroacetal, son solubles en agua y alcohol y se conocen como agentes espumantes. Tienen un efecto antimicrobiano, antifúngico e incluso participan en la inhibición del tamaño de tumores en vegetales.

Los flavonoides, son polifenoles naturales, de los cuales se han descrito propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes, antihemorrágicas, vasodilatadoras, antineoplásicas, antivirales, antibacterianas, antialérgicas y hepatoprotectoras.

Los terpenos, son un metabolito secundario, insolubles en agua, los cuales participan en la síntesis de las vitaminas A, K, E y brindan coloración y aroma. Estos compuestos son el principal compuesto en los aceites esenciales, a los cuales se les atribuye su efecto terapéutico.

Teniendo así un panorama de las posibles propiedades para *Annona muricata* e *Hippocratea excelsa*, infiriendo que por la presencia de los compuestos verificados por las pruebas fitoquímicas, pueden poseer un efecto, antitumoral, analgésico y antiinflamatorio.

- **Pruebas biológicas de los extractos obtenidos de *Hippocratea excelsa* y *Annona muricata***

La actividad biológica de los extractos de *Hippocratea excelsa* y *Annona muricata* muestra un efecto antiproliferativo dependiendo de la dosis empleada y el tipo de línea celular probada.

En los extractos acuosos, el extracto acuoso de *Hippocratea excelsa* presentó un efecto antiproliferativo en ambas las líneas celulares de cáncer de mama, por un lado la línea MCF-7, la cual es un modelo de estudio perfecto para el cáncer de mama Luminal, el cual tiene la característica de expresar receptores de estrógenos y progesterona y por otra parte la línea MDA-MB-231 que no muestra expresión a estos receptores. Sugiriendo así que el efecto del extracto de *Hippocratea* no es específico sobre estos receptores y que puede deberse ser por diversos mecanismos. Cuestion la cual no ocurrió con *Annona muricata*, en donde el extracto acuoso tuvo efecto antiproliferativo sobre MCF-7 sugiriendo una mejor

disposición a los receptores de estrógenos y progesterona. Sin embargo, en cáncer cervicouterino, tuvo un efecto contrario al deseado, causando un aumento en la proliferación celular, a partir de una concentración de 0.00186 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, logrando aumentar hasta un 120% la proliferación celular

El extracto etanólico de *Hippocratea* mostró disminuir el porcentaje de proliferación celular en todas las líneas, sin embargo a las concentraciones manejadas en el ensayo no se alcanzó reducir la población al 50 %, por lo que se sugiere realizar un ensayo más adelante con mayores concentraciones, para comprobar el efecto. Sin embargo en la línea celular de cancer cervicouterino, HeLa, se logró un mejor resultado con respecto al extracto acuoso. Mientras que el extracto etanólico de *Annona* tuvo efecto sobre la línea celular MDA-MB-231 a una CI_{50} de 0.00682 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

El efecto sinérgico de los compuestos identificados en las pruebas fitoquímicas, da una idea de como el conjunto de los principios activos brindan una propiedad característica, pero con diversos mecanismos de acción a los extractos vegetales.

10. CONCLUSIONES

Se ha considerado el uso medicinal que se les da a las plantas dentro de la medicina tradicional mexicana, principalmente para su uso en el cáncer cervicouterino y mamario, lo que ha provocado que en los últimos años el consumo de plantas medicinales vaya en aumento, empleándose como sustitutos o en combinación de terapias prescritas por los médicos, sin considerar que no se cuenta con estudios sistemáticos que evalúen su efecto y seguridad.

Dos especies empleadas en la medicina Tradicional Mexicana contra el cáncer son *Hippocratea excelsa* y *Annona muricata*, de las cuales no hay dosis, ni indicaciones de preparación establecidas para su uso adecuado, simplemente las personas las preparan tal y como un conocido les ha recomendado o como leen en foros de internet.

Los resultados de este estudio comprobados estadísticamente mediante una prueba ANOVA comprueban significativamente que el disolvente empleado para la elaboración de los extractos influye en la actividad que este va a presentar, debido a la extracción de principios con diversas polaridades que ejercen un efecto diferente sobre las células. Obteniendo así que los extractos preparados en agua muestran buenos resultados antiproliferativos sobre las líneas de cáncer de mama.

La concentración empleada del extracto también es un factor del cual depende el efecto. *Hippocratea excelsa* tiene un efecto antiproliferativo sobre líneas celulares de cáncer de mama luminal A y triple negativo cuando aplica en una concentración de 0.00550 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y en agua como disolvente, efecto similar presenta la misma preparación a una concentración de 0.00682 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ *Annona muricata* para el cáncer luminal A. Aunque también *Annona* mostro un efecto antiproliferativo sobre el cáncer triple negativo, pero en su preparación con etanol a 0.00682 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

El empleo de *Annona muricata* en preparación etanólica, para el tratamiento de cáncer cervicouterino queda completamente contraindicado, debido a que causa

un efecto contrario, aumentando la proliferación de las células. Entendiendo así que como cualquier medicamento, las plantas también pueden provocar efectos no deseados, reacciones adversas, intoxicaciones e interacciones con otras sustancias.

A pesar de encontrar el efecto antiproliferativo de estas especies en cáncer de mama como se sugiere dentro de la Medicina Tradicional, se deben realizar más ensayos con respecto a su acción para sugerir su empleo como coadyuvantes, de manera normada y segura por parte de la población. Considerando entonces que es necesario establecer igualmente un control médico estricto con las plantas medicinales como se realiza con los medicamentos de patente, ya que pueden servir como remedios o venenos, dependiendo de las dosis, la oportunidad, la vía de administración, la constitución del sujeto tratado, entre otros factores.

En cuanto a la síntesis de compuestos con actividad cancerígena en el laboratorio a partir de materia prima de origen vegetal, es una gran labor y requiere de esfuerzo y colaboración de grupos multidisciplinarios para lograr entender desde la obtención del producto vegetal, la síntesis o semi-síntesis orgánica y la aplicación en cultivos celulares. Realizando modificaciones en los productos de síntesis a partir de Diosgenina, se podrá mejorar las estructuras y haciendo específica su actividad anticancerígena y así lograr en un futuro una terapia más efectiva contra el cáncer con mínimos efectos secundarios.

Como perspectivas a futuro resultado de este trabajo se tiene por parte del área de síntesis; proponer alguna modificación que haga al amidoesteroide soluble en agua y realizar modificaciones en la técnica de síntesis con el fin de mejorar el rendimiento final en las últimas dos reacciones. Y a partir de los extractos vegetales, realizar estudios para otros tipos de cánceres e identificar el principio activo, con el fin de probar su acción aislada en cada línea celular y realizar la síntesis de un compuesto con estructura similar y efecto anticancerígeno específico.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Nagai H, Kim YH. Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns [Internet]. Vol. 9, Journal of Thoracic Disease. AME Publishing Company; 2017 [citado el 23 de septiembre de 2020]. p. 448–51. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5394024/>
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin [Internet]. el 1 de noviembre de 2018 [citado el 23 de septiembre de 2020];68(6):394–424. Disponible en: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21492>
3. Organización Mundial de la Salud. Nota descriptiva: “Cáncer”. [Internet] México: Permanyer, 2018. [Citado el 19 de abril 2019]. Disponible en <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>)
4. Reynoso Noverón N, Torres-Domínguez JA. Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. Rev Latinoam Med Conduct / Lat Am J Behav Med [Internet]. 2018 [citado el 1 de septiembre de 2020];8(1):9. Disponible en: <http://www.revistas.unam.mx/index.php/rlmc/article/view/65111>
5. Secretaria de Salud. Cáncer, tercera causa de muerte en México. [Internet]. México, 2017. [Citado el 30 de abril 2019] Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>
6. Secretaria de Salud. Diagnóstico y tratamiento del Cáncer de Mama en Segundo y Tercer nivel de Atención.[Internet] México, 2009 [citada el 16 de Abril de 2019] Disponible en: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/232_IMS_S_09_Ca_Mama_2oN/EyR_IMSS_232_09.pdf
7. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review [Internet]. Vol. 321, JAMA - Journal of the American Medical Association. American Medical

- Association; 2019 [citado el 23 de septiembre de 2020]. p. 288–300.
Disponible en: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2721183>
8. Zepeda-Castilla EJ, Recinos-Money E, Cuéllar-Hubbe M, Robles-Vidal CD, Maafs-Molina E. Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cir Cir* [Internet]. el 18 de enero de 2008 [citado el 22 de septiembre de 2020];76(1):87–93. Disponible en: <http://revistas.uach.cl/index.php/cuadcir/article/view/2588>
 9. Secretaria de Salud. Diagnóstico y tratamiento del Cáncer Cérvicouterino, México. [Internet] México, 2010. [Citado el 20 de mayo de 2019] Disponible en: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/433_GPC_Ca_cérvicouterino/GER_Cxncer_cérvicouterino.pdf, citado el 16 de abril de 2019
 10. Hernández-Hernández DM, Apresa-García T, Patlán-Pérez RM. Panorama epidemiológico del cáncer cervicouterino. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2015; 53 (S2):154-161.
 11. Vázquez Macías C, García Silva MM, Torres Medina E, Figueroa Sandoval JF. Experiencia del Instituto Regional de Tratamiento del Cáncer en el manejo del cáncer cervicouterino con radioterapia. *Gac Mex Oncol* [Internet]. el 1 de julio de 2016 [citado el 22 de septiembre de 2020];15(4):207–11. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-articulo-experiencia-del-instituto-regional-tratamiento-S1665920116300566>
 12. González-Rodríguez R., Cardentey García J. La medicina herbolaria como terapéutica en un consultorio. *Rev Ciencias Médicas* [Internet] 2016 [citado el 24 de abril de 2019]; 20 (2): 20-27. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S15613194201600020006&lng=es
 13. Organización Mundial de la Salud. Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. [Internet] OMS, 2004. [citado el 24 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>

14. Jiménez-Sierra CL, Torres-Orozco R, Corcuera Martínez BP, Río D. Biodiversidad Una alerta.
15. Panico R, Powell W, Richer J. A guide to IUPAC nomenclature of organic compounds. Oxford Blackwell Scientific Publications: Oxford, Boston; 1993.
16. Del Rio-Torres R. Síntesis selectiva de nuevas estructuras esteroideas a partir de Diosgenina y Colesterol. Tesis Doctoral. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla. Puebla. 2005
17. Cole P.A, Robinson C.H. Mechanism and inhibition of cytochrome P-450 aromatase. *Journal of Medicinal Chemistry*.1990; 33 (11): 2933-2942.
18. Chumsri S, Howes T, Bao T, Sabnis G, Brodie A. Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;125:13–22.
19. Yadav M. R, Sabale P. M., Giridhar R, Zimmer C, Haupenthal J, Hartmann R. W. Síntesis y actividad fisiológica de compuestos aromáticos (hetero) ciclosteroides [Internet] 2011. [Citado el 3 de abril de 2019] Disponible en: <http://www.oalib.com/paper/4685398#.XQP17o5MTIU>
20. Holland HL, Kumaresan S, Tan L, Njar VCO. Synthesis of 6-hydroximino-3-oxo steroids, A new class of aromatase inhibitor. *J Chem Soc Perkin*.1992; 1:585-587
21. Jacobs TL, Brownfield R. The Introduction of Oxygen and Nitrogen into the B Ring of the Steroid Nucleus. *J. Am. Los Angeles California: Chem Soc*;1960. p. 4033-4039.
22. Sanchez-Sanchez MAF. Formation of the steroidal 3 β -hydroxy-6-oxo-moiety. Synthesis and cytotoxicity of glucolaxogenin. *Arkivoc* [Internet]. el 22 de diciembre de 2009 [citado el 22 de septiembre de 2020];2009(13):170. Disponible en: <http://hdl.handle.net/2027/spo.5550190.0010.d15>
23. González-Conchillos HD. Evaluación de la actividad antiproliferativa y citotóxica de los compuestos oxima de la 23-Acetildiosgenina y Dioxima de la Diosgenin-3,6-Diona en células provenientes de cáncer cérvicouterino. Tesis Profesional. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Laboratorio de biología molecular del cáncer, UMIEZ. México D.F. 2014.

24. Griffin RW. Química orgánica moderna. Barcelona: Editorial Reverté, s.a., 1981, p. 494.
25. Bermúdez A, Oliveira-Miranda MA, Velázquez D. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. 2005. 30(8): 453-459. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33910703>
26. Verde-Star MJ, García-González S, Rivas Morales C. Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. OmniaScience Monographs. España.2016:1-40. <https://doi.org/10.3926/oms.313>
27. Loraine S, Mendoza JA. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. México. 2010; 41 (4) :18-27.
28. Ojeda Pérez P. Efecto antiproliferativo y citotóxico del extracto acuoso del Agave pitzometl en células tumorales de cáncer cervicouterino HeLa. México: Universidad Nacional Autónoma de México;2014.
29. García- Jiménez A. Manejo social de la cancerina (hippocratea), planta medicinal de la selva baja caducifolia en la cuenca del río papagayo, Guerrero, México. [internet]. 2009 [citado 20 mayo 2019] Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/322816152>
30. Alonso AJ, Villarreal ML, Salazar LA, Gomez M, Dominguez F, Garcia A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. J Ethnopharmacol. 2010; 133: 945 - 972.
31. Jiménez- Zurita J, et al, editores. Tópicos del manejo poscosecha del fruto de guanábana. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas; 2017; 8 (5): 1155-1167.
32. Dueñas Cely D. et al. Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad citotóxica de un extracto de hojas de Annona muricata (Guanábana) frente a las líneas celulares MCF-7, 4T1, B16 y 3T3. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Bogotá; 2019.

33. Evans D, Evans WC, Trease E, Pharmacognosy. 16th ed. St. Louis: Elsevier Health Sciences UK; 2014
34. Mohrig J, Noring C, Schatz P. Techniques in organic chemistry. 2a edición. New York: W.H. Freeman and Company; 2006.
35. Fina BL, Lombarte M, Rigalli A. Investigación de un fenómeno natural: ¿Estudios in vivo, in vitro o in silico?, Actualizaciones en Osteología, Argentina 2000. 2013; 9 (3): 20-33
36. Harrell JC, Pfefferle AD, Zalles N, et al. Endothelial-like properties of claudin-low breast cancer cells promote tumor vascular permeability and metastasis. Clin Exp Metastasis. 2014;31(1):33–45.
37. Holliday DL, Speirs, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. [internet]. 2011 [citado 29 abril 2019] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21884641>

