



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**VARIACIÓN ESTACIONAL Y ACTIVIDAD
ANTIPROLIFERATIVA DE TRITERPENOS DE TIPO
LUPANO OBTENIDOS DEL EXTRACTO METANÓLICO
DE *Phoradendron wattii***

Tesis que presenta

ÁNGEL GABRIEL RIVAS AGUAYO

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS
(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2022

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Ángel Gabriel Rivas Aguayo** titulado “**Variación estacional y actividad antiproliferativa de triterpenos de tipo lupano obtenidos del extracto metanólico de *Phoradendron wattii***” fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** así como en la Unidad de Investigación Médica Yucatán perteneciente a la **Unidad Médica de Alta Especialidad del Instituto Mexicano del Seguro Social** bajo la dirección del **Dr. Sergio R. Peraza Sánchez** y la codirección de la **Dra. Rosa E. Moo Puc**, respectivamente, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Maestría del Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 24 de junio de 2022.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



ÁNGEL GABRIEL RIVAS AGUAYO

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. así como en la Unidad de Investigación Médica Yucatán perteneciente a la Unidad Médica de Alta Especialidad del Instituto Mexicano del Seguro Social y forma parte del proyecto de Ciencia Básica Conacyt titulado A1-S-10616 “Triterpenos tipo lupano: evaluación biológica y su potencial para el tratamiento de leucemias”, bajo la dirección del Dr. Sergio R. Peraza Sánchez y la Dra. Rosa E. Moo Puc, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo financiero a través del proyecto de Ciencia Básica A1-S-10616 “Triterpenos tipo lupano: evaluación biológica y su potencial para el tratamiento de leucemias” del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (SEP-CONACYT) y por la beca mensual otorgada.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), en especial a la Unidad de Biotecnología y al Laboratorio de Química de Productos Naturales, así como a la Unidad de Investigación Médica Yucatán de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), por las facilidades para la realización de este proyecto.

A mis directores de tesis, la Dra. Rosa E. Moo Puc y el Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, por su valiosa guía, aportaciones y consejos para la realización y culminación del trabajo de tesis.

Al M. en C. Luis W. Torres Tapia, por su valiosa ayuda y consejos brindados en las técnicas cromatográficas en la presente tesis.

A los integrantes de mi comité tutorial y H. sínodo, el Dr. Jairo Ricardo Villanueva Toledo, la Dra. María Marcela Gamboa Angulo y la Dra. Renata Lourdes Bárbara Rivera Madrid, por los consejos y críticas constructivas que ofrecieron para mejorar el escrito presente.

A mis amigos y colegas científicos, por sus discusiones, aprendizajes y amistad: Ashanty Calderón, Lía Valencia, Mario Noh, Lisandro Mendoza, Silvia Cab y Neptis Estrada.

A mis amigos por todo su apoyo y consejos: Carlos Torres, Brando Martínez, Genaro Chalé, Ema Uribe, Sandra Cortés y Yitzen Chalé.

DEDICATORIA

A mis padres, Francisco Javier Rivas Lizarraga y Marina Lizet Aguayo León, por su amor incondicional, consejos, apoyo y el haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye éste.

“Lo esencial es invisible a los ojos”

INDICE

RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1. Cáncer.....	3
1.1.1 Leucemia.....	4
1.1.2 Tratamientos contra la leucemia.....	5
1.2 Productos naturales.....	6
1.2.1 Metabolitos secundarios con actividad biológica.....	6
1.2.2 Anticancerígenos aislados de plantas.....	8
1.2.3 Terpenos y su actividad anticancerígena.....	8
1.3 Flora de la Península de Yucatán.....	9
1.3.1 Género <i>Phoradendron</i> y su actividad anticancerígena.....	10
1.3.2 <i>Phoradendron wattii</i>	11
1.4 Variación estacional de metabolitos secundarios en las plantas.....	13
JUSTIFICACIÓN.....	14
HIPOTESIS.....	15
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	15
ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL.....	16
CAPITULO II.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.1 Procedimientos generales.....	18
2.2 Sitio de colecta.....	18
2.3 Pretratamiento del material vegetal.....	18
2.4 Obtención de los extractos metanólicos.....	19
2.5 Análisis cromatográfico.....	19
2.6 Cultivo celular.....	20
2.7 Obtención de las células monocíticas de sangre periférica.....	20
2.8 Estandarización de los bioensayos.....	20
2.9 Análisis estadístico.....	21
2.10 Análisis de componentes principales.....	21
CAPÍTULO III.....	23
RESULTADOS.....	23

3.1	Espécimen objeto de estudio.....	23
3.2	Material vegetal de <i>P. wattii</i>	24
3.3	Obtención de los extractos metanólicos	25
3.4	Identificación de los tiempos de retención de los estándares	26
3.5	Identificación de los metabolitos presentes en las diferentes colectas de <i>P. wattii</i>	28
3.6	Variación estacional de los triterpenos de <i>P. wattii</i>	29
3.7	Relación entre la variación de triterpenos y las condiciones climatológicas.....	35
3.8	Estandarización de los bioensayos	36
3.9	Actividad antiproliferativa de los extractos metanólicos de <i>P. wattii</i>	38
3.10	Efecto antiproliferativo de los extractos metanólicos de <i>P. wattii</i> en CMSP	40
3.11	Análisis de componente principales	42
CAPITULO IV		46
DISCUSIÓN.....		46
4.1	Variación estacional de los extractos de <i>Phoradendron wattii</i>	46
4.2	Actividad biológica de los extractos de <i>P. wattii</i>	49
4.3	Discusión general.....	52
CAPITULO V		54
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS		54
5.1	Conclusiones.....	54
5.2	Perspectivas.....	54
ANEXOS		55
Anexo I. Rendimientos del pretratamiento del material vegetal y la obtención de los extractos metanólicos.....		55
Anexo II. Cromatogramas de CLAE-FR de los estándares utilizados		57
Anexo III. Cromatogramas de CLAE-FR de los extractos metanólicos de las diferentes colectas de <i>P. wattii</i>		60
Anexo IV. Curvas estándar de los compuestos identificados.....		64
Anexo V. Condiciones climáticas de Sierra Papacal.....		65
Anexo VI. Resultados de la citometría de flujo para la estandarización de las condiciones del bioensayo		66
Anexo VII. Actividad antiproliferativa de los extractos metanólicos de <i>P. wattii</i> en la línea celular K-562.....		69
Anexo VIII. Efecto antiproliferativo de los extractos metanólicos de <i>P. wattii</i> en células monocíticas de sangre periférica humana.		82
BIBLIOGRAFÍA.....		84

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 <i>Phoradendron wattii</i> Krug & Urb	12
Figura 1.2 Compuestos aislados en <i>P. wattii</i>	13
Figura 1.3 Diagrama general de la estrategia experimental.....	17
Figura 3.1 Ejemplar de <i>Phoradendron wattii</i> utilizado en este estudio.	23
Figura 3.2 Diferentes tejidos de <i>P. wattii</i>	24
Figura 3.3 Incidencia de los diferentes tejidos de <i>P. wattii</i> a través del año.....	25
Figura 3.4 Extractos metanólicos crudos de <i>P. wattii</i> . 1) Flores y frutos (F/F), 2) tallos y 3) hojas. A) verano, B) otoño, C) invierno y D) primavera.	26
Figura 3.5 Cromatograma de CLAE-FR de la mezcla de estándares. Mezcla de estándares utilizados (Azul). 1) Betulina, 2) Ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico, 3) Ácido 3 α ,23-dihidroxilup-20(29)-en-28-oico, 4) Ácido 3- <i>epi</i> -betulínico, 5) Ácido betulínico, 6) Ácido betulónico, 7) Ácido 3 α ,23- <i>O</i> -isopropilidenil-3 α ,23 dihidroxilup-20(29)-28-oico, 8) 28- <i>O</i> -acetilbetulona, 9) Lupenona, El) Cafeína. Inyección de metanol (rojo).	27
Figura 3.6 Cromatograma obtenido por CLAE-FR de los extractos metanólicos de <i>P. wattii</i> ..	29
Figura 3.7. Complejidad de los extractos metanólicos de las diferentes colectas de <i>P wattii</i> ...	29
Figura 3.8 Variación estacional de betulina en <i>P. wattii</i>	31
Figura 3.9 Variación estacional de ácido betulínico en <i>P. wattii</i>	31
Figura 3.10. Variación estacional de ácido betulónico en <i>P. wattii</i>	32
Figura 3.11 Variación estacional del ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico en <i>P. wattii</i>	32
Figura 3.12 Variación estacional de lupenona en <i>P. wattii</i>	33
Figura 3.13 Variación estacional de triterpenos de tipo lupano en <i>P. wattii</i>	34
Figura 3.14 Correlaciones de la temperatura con el total de triterpenos.....	35
Figura 3.15 Correlaciones de las diferentes variables con el total de triterpenos.	36
Figura 3.16 Estandarización de las condiciones de los bioensayos utilizando citometría de flujo	37
Figura 3.17 Efecto antiproliferativo de los extractos de verano <i>P. wattii</i> en la línea celular K-562 utilizando citometría de flujo.....	38
Figura 3.18 Efecto antiproliferativo de los diferentes extractos de <i>P. wattii</i> en la línea celular K-562 utilizando citometría de flujo.	39
Figura 3.19 Efecto antiproliferativo de los extractos de primavera <i>P. wattii</i> en la línea celular K-562 utilizando citometría de flujo.	40
Figura 3.20 Efecto antiproliferativo de los extractos de <i>P. wattii</i> en CMSP utilizando citometría de flujo.....	41
Figura 3.21 Proporción de varianza explicada como la proporción de varianza acumulada por cada componente principal.	43
Figura 3.22 Plano bidireccional del análisis de componentes principales.....	43

Figura 3.23 Plano bidireccional de los vectores del análisis de componentes principales. Grupos de las estaciones de verano (V), otoño (O), invierno (I) y primavera (P) y las flores y frutos (F), tallos (T) y hojas (H) de las diferentes muestras de <i>P. wattii</i> . Variables de	44
Figura 3.24 Plano tridimensional del análisis de componentes principales.....	45
Figura A2.1 Cromatograma de CLAE-FR de la cafeína.	57
Figura A2.2 Cromatograma de CLAE-FR de la betulina.....	57
Figura A2.3 Cromatograma de CLAE-FR del ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico.	57
Figura A2.4 Cromatograma de CLAE-FR del ácido 3 α ,23-dihidroxilup-20(29)-en-28-oico.	58
Figura A2.5 Cromatograma de CLAE-FR del ácido 3-epi-betulínico.....	58
Figura A2.6 Cromatogramade CLAE-FR del ácido betulínico.	58
Figura A2.7 Cromatograma de CLAE-FR del ácido betulónico	59
Figura A2.8 Cromatograma de CLAE-FR de 28-O-acetilbetulona.	59
Figura A2.9 Cromatograma de CLAE-FR de lupenona	59
Figura A3.1 Cromatograma de CLAE-FR metanólico de F/F de la colecta de julio 2020 de <i>P. wattii</i>	60
Figura A3.2 Cromatograma de CLAE-FR del extracto metanólico de tallos de la colecta de julio 2020 de <i>P. wattii</i>	60
Figura A3.4 Cromatograma de CLAE-FR del extracto metanólico de F/F de la colecta de octubre 2020 de <i>P. wattii</i> . Mezcla de estándares (azul). Metanol (rojo). Repeticiones de la muestra (negro).....	61
Figura A3.5 Cromatograma de CLAE-FR del extracto metanólico de F/F de la colecta de enero 2021 de <i>P. wattii</i>	61
Figura A3.6 Cromatograma de CLAE-FR del extracto metanólico de tallos de la colecta de enero 2021 de <i>P. wattii</i>	61
Figura A3.7 Cromatogramade CLAE-FR del extracto metanólico de hojas de enero 2021 de <i>P. wattii</i>	62
Figura A3.8 Cromatograma de CLAE-FR del extracto metanólico de F/F de abril 2021 de <i>P. wattii</i>	62
Figura A3.9 Cromatogramao de CLAE-FR del extracto metanólico de tallos de abril 2021 de <i>P. wattii</i>	62
Figura A3.10 Cromatograma de CLAE-FR del extracto metanólico de hojas de abril 2021 de <i>P. wattii</i>	63
Figura A4.1. Curvas estándar de los metabolitos analizados.....	64
Figura A5.1. Condiciones climatológicas registradas.	65
Figura A6.1 Interferencia del extracto en el bioensayo de actividad antiproliferativa.	67
Figura A6.2 Efecto de la concentración del DMSO en el bioensayo de actividad antiproliferativa.	68

Figura A7.1 Actividad antiproliferativa de los extractos de primavera de <i>P. wattii</i> . Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de flores y frutos de primavera obtenido de <i>P. wattii</i>	70
Figura A7.2 Actividad antiproliferativa de los extractos de primavera de <i>P. wattii</i> . Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de tallos de primavera obtenido de <i>P. wattii</i>	71
Figura A7.3 Actividad antiproliferativa de los extractos de primavera de <i>P. wattii</i> . Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de hojas de primavera obtenido de <i>P. wattii</i>	72
Figura A7.4 Actividad antiproliferativa de los extractos de invierno de <i>P. wattii</i> . Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de flores y frutos de invierno obtenido de <i>P. wattii</i>	73
Figura A7.5 Actividad antiproliferativa de los extractos de invierno de <i>P. wattii</i> . Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de tallos de invierno obtenido de <i>P. wattii</i>	74
Figura A7.6 Actividad antiproliferativa de los extractos de invierno de <i>P. wattii</i> . Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de hojas de invierno obtenido de <i>P. wattii</i>	75
Figura A7.7 Actividad antiproliferativa de los extractos de otoño de <i>P. wattii</i> . Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de flores y fruto de otoño obtenido de <i>P. wattii</i>	76
Figura A7.8 Actividad antiproliferativa de los extractos de otoño de <i>P. wattii</i> . Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de tallos de otoño obtenido de <i>P. wattii</i>	77
Figura A7.9 Actividad antiproliferativa de los extractos de otoño de <i>P. wattii</i> . Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de hojas de otoño obtenido de <i>P. wattii</i>	78
Figura A7.10 Actividad antiproliferativa de los extractos de verano de <i>P. wattii</i> . Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de flores y frutos de verano obtenido de <i>P. wattii</i>	79
Figura A7.11 Actividad antiproliferativa de los extractos de verano de <i>P. wattii</i> . Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de tallos de verano obtenido de <i>P. wattii</i>	80
Figura A7.12 Actividad antiproliferativa de los extractos de verano de <i>P. wattii</i> . Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de hojas de verano obtenido de <i>P. wattii</i>	81
Figura A8.1 Actividad antiproliferativa de los extractos de <i>P. wattii</i> en CMSP (1). Células monocíticas de sangre periférica humana (CMSP) durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con los extractos metanólicos de hojas de diferentes estaciones obtenido de <i>P. wattii</i>	82
Figura A8.2. Actividad antiproliferativa de los extractos de <i>P. wattii</i> en CMSP (2). Células monocíticas de sangre periférica humana (CMSP) durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con los extractos metanólicos de diferentes estaciones obtenido de <i>P. wattii</i>	83

ABREVIATURAS

μM	Micromolar
AA	Actividad antioxidante
ABI	Ácido betulínico
ABO	Ácido betulónico
ACS	Asociación Nacional del Cáncer (por sus siglas en inglés)
BE	Betulina
CLAE-FR	Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica humana
CTT	Concentración total de triterpenos
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol (por sus siglas en inglés)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EI	Estándar interno
GCO	Observatorio Nacional del Cáncer (por sus siglas en inglés)
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50 (por sus siglas en inglés)
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IPP	Pirofosfato de isopentenilo (por sus siglas en inglés)
IS	Índice de selectividad
LL	Precipitación
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLC	Leucemia linfoblástica crónica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
LU	Periodo de luz
LUP	Lupenona
MSNM	Metros sobre el nivel del mar
MVS	Material vegetal seco
OMS	Organización Mundial de la Salud
OX	Ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico
PBS	Amortiguador de fosfatos (por sus siglas en inglés)
PCA	Análisis de componentes principales (por sus siglas en inglés)
T	Temperatura
t_R	Tiempo de retención

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Actividad anticancerígena de terpenos en líneas celulares de leucemia.....	9
Tabla 3.1. Rendimientos del pretratamiento del material vegetal y obtención del extracto metanólico de <i>P. wattii</i>	26
Tabla 3.2 Tiempos de retención (t_R) de los estándares utilizados.....	28
Tabla 3.3 Ecuaciones de las regresiones lineales de las curvas estándar.....	30
Tabla 3.4 Variación estacional de triterpenos de tipo lupano de <i>P. wattii</i>	34
Tabla 3.5 Efecto antiproliferativo e índice de selectividad de los diferentes extractos de <i>P. wattii</i>	42
Tabla A1.1 Rendimiento del pretratamiento del material vegetal.....	55
Tabla A1.2. Rendimiento de la obtención del extracto metanólico.....	56

RESUMEN

Phoradendron wattii es una planta nativa de la península de Yucatán que promete ser una fuente de metabolitos novedosos con actividad antiproliferativa. Sin embargo, no se ha estudiado el perfil bioquímico de estos metabolitos y su variación debido al cambio de las condiciones climáticas. El objetivo de este proyecto es el de evaluar la variación estacional y la actividad antiproliferativa de triterpenos de tipo lupano, obtenidos del extracto metanólico de *Phoradendron wattii*. Se realizó la colecta del material vegetal durante las distintas estaciones del año distinguiendo entre los tejidos de las flores y frutos (F/F), tallos y hojas de la planta, obteniéndose extractos metanólicos de cada una de las colectas. Se realizó cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en cada uno de los extractos metanólicos y se comprobó su actividad antiproliferativa ante una línea celular de leucemia mieloide crónica (K-562). El contenido total de una mezcla de cinco triterpenos de tipo lupano alcanzó su mayor concentración en las estaciones de otoño y primavera (32.94 ± 0.79 mg/g y 31.82 ± 2.34 mg/g, respectivamente) y su valor más bajo en invierno (17.13 ± 0.41 mg/g). De igual manera, se demostró la mayor actividad antiproliferativa contra las células de leucemia linfocítica (K-562) con el extracto de las hojas en verano. Los resultados indican que la colecta de *P. wattii* durante las estaciones de otoño y primavera es más eficiente para la obtención de triterpenos de tipo lupano.

ABSTRACT

Phoradendron wattii is a plant native to the Yucatan Peninsula that promises to be a source of novel metabolites with antiproliferative activity. However, the biochemical profile of these metabolites and their variation due to climatic conditions have not been studied. The objective of this project is to evaluate the seasonal variation and the antiproliferative activity of lupane-type triterpenes, obtained from the methanolic extracts of *Phoradendron wattii*. The plant material was collected during the different seasons of the year, distinguishing between the tissues of the flowers and fruits (F/F), stems, and leaves of the plant, obtaining methanolic extracts from each one of the collections. High performance liquid chromatography was performed on each of the methanolic extracts and their antiproliferative activity against a chronic myeloid leukemia cell line (K-562) was verified. A total of five lupane-type triterpenes were identified and the mixture reached its highest concentration in the autumn and spring seasons (32.94 ± 0.79 mg/g and 31.82 ± 2.34 mg/g, respectively) and its lowest value in winter (17.13 ± 0.41 mg/g). The highest antiproliferative activity against lymphocytic leukemia cells (K-562) was achieved with the summer leaf extract. The results indicate that the collection of *P. wattii* during the autumn and spring seasons gives the highest yield of lupane-type triterpenes.

INTRODUCCIÓN

Cáncer es el nombre común que recibe un conjunto de enfermedades relacionadas en las que se observa un proceso descontrolado en la división de las células del cuerpo. Su característica principal es la rápida creación de células anormales que crecen y se reproducen más allá de sus límites usuales, invadiendo otros tejidos y esparciéndose hacia otros órganos, en un proceso llamado metástasis. El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel global, siendo responsable por un estimado de 9.6 millones de muertes en 2020 según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). En cuanto a México, según datos del Observatorio Global del Cáncer (GCO, por sus siglas en inglés) se registraron en 2020 más de 80 mil muertes al igual que 190 mil nuevos casos, siendo los cánceres de seno, de próstata, el colorrectal, cérvicouterino y tumores hematopoyéticos los que presentan mayor incidencia en la población. Los tumores hematopoyéticos, los cuales incluyen a las leucemias, son el tipo de cáncer más común en niños y adolescentes, representando casi uno de cada tres cánceres y de ellos el 75% de casos de leucemia en niños y adolescentes son debidos a leucemia linfoblástica aguda según la asociación americana del cáncer.

Las leucemias son un tipo de cáncer que representan un grupo de neoplasias hematológicas caracterizadas por un crecimiento autónomo y desmedido de formas inmaduras de leucocitos (Santoyo *et al.*, 2016). Estas tienen especial interés debido a que poseen una incidencia bastante elevada sobre todo en las poblaciones jóvenes (ACS, 2020). Usualmente se utilizan una o más combinaciones de tratamientos, entre los que se destacan la radioterapia y la quimioterapia. Sin embargo, estos tratamientos pueden tener graves efectos secundarios e incluso se ha observado resistencia de varios tipos de leucemias y de cánceres en general a los fármacos utilizados tradicionalmente en la quimioterapia (Fahad-Ullah, 2008; Feeney *et al.*, 2007; Borowski *et al.*, 2005; Partridge *et al.*, 2001).

Por lo anterior, es evidente la búsqueda de nuevos fármacos más seguros y eficaces para su utilización en el tratamiento de leucemias. Por otro lado, los productos naturales son producidos por los seres vivos, denominados también como metabolitos secundarios, los cuales presentan varias actividades biológicas. Estos metabolitos han sido estudiados por años y se ha evaluado su actividad farmacológica sobre las células de cáncer y algunos de ellos son usados ampliamente en la clínica (Amaral *et al.*, 2019; Iqbal *et al.*, 2017; Korkinaa y Kostyuk, 2012).

En estudios previos realizados en la Unidad de Investigación Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en colaboración con el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), demostraron que los extractos de *Phoradendron wattii*, una planta nativa de la península de Yucatán sintetiza terpenos novedosos con actividad citotóxica frente a líneas celulares cancerígenas tumorales y no tumorales (Valencia-Chan *et al.*, 2017; Caamal-Fuentes, 2011).

Por lo anterior, *P. wattii* se presenta como un objeto de estudio ideal para fines de explotación biotecnológica. Así, es importante conocer el patrón de síntesis de los compuestos en la planta con fines aplicativos. Se sabe que la producción de metabolitos secundarios en las plantas está determinada por factores biológicos y ambientales, por lo que en este estudio se propone evaluar la variación estacional y la actividad antiproliferativa de los extractos metanólicos de *Phoradendron wattii*.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. Cáncer

Cáncer es el término común que recibe un conjunto de enfermedades relacionadas en las que se observa un proceso descontrolado en la división de las células del cuerpo, también denominado neoplasias. El crecimiento descontrolado forma una masa anormal de tejido cuyo crecimiento excede del de los tejidos normales, es desorganizado y persiste del mismo modo excesivo aun después de finalizar el estímulo que le dio origen. La masa anormal carece de finalidad, hace presa del huésped y es prácticamente autónoma. Puede comenzar de manera localizada y diseminarse a otros tejidos circundantes y, en general, conduce a la muerte del paciente si éste no recibe tratamiento adecuado. Se conocen más de cien tipos diferentes de cáncer, siendo los más comunes los de piel, de pulmón, de mama y colorrectal (Observatorio Nacional del Cáncer, 2018). El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel global, siendo responsable en 2018 por un estimado de 9.6 millones de muertes según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). De igual manera, el cáncer ha tenido un gran impacto económico en los países, reportándose en 2010 costos de 1.16 trillones de dólares (Stewart y Wild, 2014).

En cuanto a México, según datos del Observatorio Global del Cáncer (GCO, por sus siglas en inglés) se registraron en 2020 más de 80 mil muertes al igual que 190 mil nuevos casos, siendo los cánceres de mama, de próstata, el colorrectal, de tiroides y cérvicouterino los que presentan mayor incidencia en la población. En Yucatán, según datos del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) y de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud en 2020, los principales cánceres fueron de pulmón, colorrectal, de próstata, de mama y cérvicouterino.

Otros tipos de cáncer que han cobrado un gran interés debido a su mortalidad y al sector de la población que afectan, son los que se originan en los tejidos hematopoyéticos. Denominados cánceres hematológicos, se forman en la médula ósea o en las células del sistema inmunitario.

También denominados cáncer de la sangre, se incluyen las leucemias, linfomas y mielomas múltiples.

1.1.1 Leucemia

Las leucemias son un grupo de neoplasias hematológicas caracterizadas por un crecimiento autónomo y desmedido de formas inmaduras de leucocitos (blastos) provenientes de una clona maligna que terminan por volverse la estirpe predominante en la médula ósea, con la consecuente disminución del resto de las series hematopoyéticas (Santoyo *et al.*, 2016).

Según la ACS, se puede clasificar a las leucemias de dos maneras diferentes: en función de la rapidez con la que se produce y empeora la enfermedad (agudas y crónicas) y en función de las células afectadas (mieloides y linfoides), dando lugar a cuatro tipos principales:

- Leucemia mieloide aguda (LMA): Afecta a las células mieloides y se desarrolla con rapidez. Se presenta generalmente en personas a partir de los 65 años. Puede afectar, aunque en menor proporción, a niños y adolescentes.
- Leucemia mieloide crónica (LMC): Afecta a las células mieloides y, al principio, se desarrolla con lentitud. Más de la mitad de los pacientes tiene entre 65 años o más, y sólo afecta a un pequeño porcentaje de niños y adolescentes.
- Leucemia linfoblástica aguda (LLA): Afecta a las células linfoides y se desarrolla con rapidez. Se presenta fundamentalmente en niños y adolescentes.
- Leucemia linfocítica crónica (LLC): Afecta a las células linfoides y se desarrolla con lentitud. La mayoría de los pacientes tiene más de 65 años. Esta enfermedad casi nunca afecta a niños o a adolescentes.

La leucemia es el cáncer más común en niños y adolescentes, representando casi uno de cada tres cánceres hematológicos. El 75% de los casos de leucemia en niños y adolescentes son debidos a la LLA, según la Asociación Americana del Cáncer (ACS, 2020). Según el INEGI, durante 2020, la leucemia fue la principal causa de muerte en la población con menos de 15 años (51% en hombres y 56% en mujeres) y en los jóvenes de 15 a 29 años (33% en hombres y 32% en mujeres).

Debido a su incidencia y mortalidad, se vuelve particularmente importante el estudio de los cánceres de los órganos hematopoyéticos. En especial, las leucemias que abarcan la gran mayoría de este tipo de neoplasias. Como se describió anteriormente, existe una gran variedad de leucemias, por lo que es muy importante la aplicación del tratamiento adecuado que maximice la probabilidad de recuperación del paciente.

1.1.2 Tratamientos contra la leucemia

La aplicación de tratamientos adecuados para la leucemia ha permitido mejorar la calidad de vida de los pacientes y reducir la mortalidad de la enfermedad (Siegel *et al.*, 2012). Actualmente se utiliza una combinación de distintos tratamientos, dependiendo del tipo y el grado de avance de la leucemia, dependiendo también de las condiciones generales de salud del paciente. Los tratamientos más comúnmente utilizados para la afección de esta patología se describen a continuación:

Terapia de radiación: También llamada radioterapia, es un tratamiento en el cual se usa altas dosis de radiación que daña el ADN de las células al punto que inhibe su proliferación. Es un tratamiento local, por lo que sólo tiene efecto si las células malignas se encuentran localizadas dentro del campo irradiado, y los resultados suelen observarse después de un periodo de tiempo (Hernández y Ríos, 1999). La radioterapia puede ocasionar serios efectos secundarios, como problemas cutáneos, fatiga, náuseas, diarrea, dificultad para respirar, rigidez, menor recuento y actividad del esperma, alteración del ciclo menstrual y, en casos muy raros, un nuevo tipo de cáncer, entre otras afecciones (Instituto Nacional del Cáncer, 2020).

Quimioterapia: Es un tipo de tratamiento en el que se usa uno o más tipos de medicamentos o drogas anti-cáncer. Los agentes quimioterapéuticos tradicionales son sustancias citotóxicas cuyo fin es provocar una alteración celular, ya sea en la disrupción de la síntesis de ácidos nucleicos, división celular o síntesis de proteínas. Las desventajas de este tratamiento es la falta de selectividad, ya que actúa también contra las células sanas (Baguley, 2002). Por lo anterior, los pacientes sometidos a la quimioterapia sufren de múltiples efectos secundarios a corto, mediano y largo plazo (Monsuez *et al.*, 2010; Feeney *et al.*, 2007; Partridge *et al.*, 2001). De igual manera, se ha observado una disminución de la efectividad de los agentes quimioterapéuticos tradicionales en distintos tipos de leucemias y cánceres (Zhang *et al.*, 2019;

Chen *et al.*, 2018; Lage *et al.*, 2010; Pillozzi *et al.*, 2010; Fahad-Ullah, 2008; Borowski *et al.*, 2005; Gottesman, 2002; Liscovitch y Lavie, 2002).

Debido a las grandes desventajas de los tratamientos previamente mencionados, se hace evidente la necesidad de buscar nuevas alternativas para combatir esta enfermedad. Una de las alternativas es la búsqueda de nuevos agentes que sean más eficaces y seguros. En ese sentido, los productos naturales representan una opción excelente debido a su gran potencial de actividad biológica y por la gran diversidad estructural de sus compuestos.

1.2 Productos naturales

Los compuestos químicos producidos por los seres vivos, los cuales poseen un efecto farmacológico o biológico, se reconocen como productos naturales y por más de 40 años han servido para tratar distintas enfermedades. El uso de estos productos provenientes de plantas, hongos y microorganismos ha ayudado a casi doblar la esperanza de vida durante el siglo XX. También denominados metabolitos secundarios, su diversidad química está dada por factores biológicos y geográficos por lo que existe una infinidad de compuestos con diversas aplicaciones como antibióticos, antiinflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos, entre otras (Vajira, 2013; Demain y Vaishnav, 2011; Desai *et al.*, 2008).

Por otra parte, las plantas históricamente han probado su valor como fuente de nuevas moléculas con potencial terapéutico y actualmente aún representan una alternativa importante para la identificación y obtención de nuevas medicinas.

1.2.1 Metabolitos secundarios con actividad biológica

A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de su energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en los procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, a los cuales se les denominan metabolitos secundarios (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Estos compuestos le confieren una ventaja adaptativa, cumpliendo funciones de defensa contra predadores y patógenos, actuando como agentes alelopáticos o para atraer a polinizadores y dispersores de semillas (Croteau *et al.*, 2000).

Otra particularidad de estos compuestos es que presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Al igual, sólo se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a una determinada familia de plantas, a un género, una especie e, incluso, ser tejido-específicos dentro del mismo organismo (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Existe un sin número de metabolitos producidos por plantas, los cuales pueden ser clasificados de acuerdo con su clase química, grupos funcionales y origen biosintético. Generalmente pueden ser agrupados en cuatro clases principales (Gunatilaka, 2012):

1. Compuestos fenólicos y sus derivados. Son compuestos cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo. Los más de 8,000 compuestos fenólicos conocidos se sintetizan por la ruta del ácido shikímico o por la del mevalonato/acetato. Ejemplos de ellos son cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
2. Glicósidos. Moléculas compuestas por un glúcido (generalmente un monosacárido) y un compuesto no glucídico (aglicona). Desempeñan numerosos papeles importantes en los organismos vivos y muchas plantas los almacenan en forma de glicósidos inactivos para hidrolizarlos al requerirse. De gran importancia médica, algunos ejemplos de estos compuestos son las saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
3. Alcaloides. Estos son compuestos nitrogenados, se conocen alrededor de 12,000 alcaloides, sintetizados principalmente a partir de aminoácidos. Los alcaloides presentan una gran diversidad de estructuras químicas. Son fisiológicamente activos en los animales, aun en bajas concentraciones, por lo que tiene muchos usos en medicina. Ejemplos conocidos son la cocaína, la morfina, la atropina, la colchicina, la quinina, y la estriquina.
4. Terpenoides. Compuestos derivados del isopreno (IPP) formados en la ruta del ácido mevalónico. Aparecen en muchos tipos de plantas y tienen una actividad biológica importante. Se encuentran entre las moléculas más diversas, con alrededor de 25,000 metabolitos secundarios reportados. Entre ellos se encuentran los aceites esenciales, hormonas y pigmentos.

1.2.2 Anticancerígenos aislados de plantas

El conocimiento tradicional de las plantas, sus mezclas y decocciones en las aplicaciones médicas y del cuidado de la salud ha sido de mucha ayuda en el descubrimiento de medicinas viables y compuestos con gran potencial provenientes de las plantas. Se ha estimado que más del 57% de los medicamentos tienen su origen en productos naturales, la gran mayoría proveniente de plantas (Challinor y Bode, 2015).

Como se mencionó antes, muchas plantas producen una infinidad de productos naturales, entre los que podemos encontrar los alcaloides, flavonoides, lignanos, saponinas, terpenos, vitaminas, minerales, glicósidos, gomas, aceites y demás productos del metabolismo primario y secundario, los cuales juegan un papel significativo como agentes anticancerígenos. Por ejemplo, la vincristina y la vinblástina provenientes de *Catharanthus roseus*, la podofilotoxina de *Podophyllum peltatum* y el paclitaxel de *Taxus brevifolia* se encuentran entre los anticancerígenos más vendidos a nivel mundial actualmente (Atanasov *et al.*, 2015; Vajira, 2013).

Entre los diferentes tipos de metabolitos secundarios producidos por las plantas podemos denotar a los terpenos, los cuales, debido a su gran variedad estructural y diferentes actividades biológicas, los vuelven moléculas de especial interés para su estudio y aplicación en distintas áreas.

1.2.3 Terpenos y su actividad anticancerígena

Los terpenos son una vasta y diversa clase de compuestos orgánicos derivados del isopreno. Se conocen más de 40,000 diferentes tipos y han sido aislados y caracterizados de distintas familias de plantas. A pesar de que todavía no se conocen a profundidad todas las funciones biológicas, ecológicas y farmacológicas que poseen, se ha reportado que tienen una variedad de funciones en el reino vegetal y en la salud humana. Se ha descrito que en las plantas los terpenos juegan un rol importante como reguladores de crecimiento, como compuestos señalizadores, como defensa contra patógenos y herbívoros, al igual que como componentes de los aceites esenciales (Gunatilaka, 2012).

De la misma manera, en lo que corresponde al potencial terapéutico y al uso de estos compuestos como nuevos fármacos, se ha reportado un gran número de terpenos con

actividad anticancerígena, modulando la actividad de factores regulatorios, vías de señalización, enzimas y proteínas para inhibir el crecimiento, proliferación, invasión, metástasis y angiogénesis en diferentes líneas celulares cancerígenas (Twiley y Lall, 2018).

Huang *et al.* (2020) junto con Sobral *et al.* (2014) realizaron una amplia revisión de varios terpenos y terpenoides, su actividad anticancerígena y su mecanismo de acción, entre los cuales podemos resumir la inducción de apoptosis, arresto del ciclo celular, generación de especies reactivas de oxígeno, inhibición de la angiogénesis, entre otras. Actualmente, se utiliza una gran variedad de fármacos derivados de los terpenos, siendo el mayor ejemplo el paclitaxel, el cual es empleado especialmente en el tratamiento de cáncer de pulmón, ovario, mama y formas avanzadas del sarcoma de Kaposi. De igual manera, se ha comprobado la actividad anticancerígena de distintos tipos de terpenos en diferentes líneas celulares de leucemia (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Actividad anticancerígena de terpenos en líneas celulares de leucemia.

Terpeno	Línea celular*	IC ₅₀ (μM)
Carvona	HL-60	15.60
	K-562	0.11
Carveol	K-562	0.11
Eugenol	K-562	0.24
	CEM	0.09
Carvacrol	CEM	0.04
	K-562	0.06
Ácido carnósico	HL-60	5.70
Carnosol	HL-60	5.30

* Líneas celulares de leucemia humana: leucemia promielocítica aguda (HL-60), leucemia mielógena crónica (K-562) y leucemia linfoblástica aguda (CEM). Concentración inhibitoria 50 (IC₅₀). Modificado de Twiley y Lall, 2018.

1.3 Flora de la Península de Yucatán

La flora mexicana se encuentra entre las cinco más ricas en el mundo en términos de diversidad y de la complejidad de sus metabolitos, incluyendo terpenos, péptidos, flavonoides, alcaloides, entre otros. Se estima que la flora mexicana comprende un rango entre 25,000 y 34,000 especies, con el registro de más de 3,000 especies medicinales conocidas usadas desde los tiempos prehispánicos (Gómez *et al.*, 2017; Martínez *et al.*, 2017).

En el sureste mexicano, la península de Yucatán está compuesta por los estados de Campeche, Quintana Roo y Yucatán. Esta región natural posee una única geología, geomorfología, paisaje y biota que históricamente influenció y formó lo que ahora es conocida como la cultura Maya. Además de estas únicas características junto con una precipitación anual, con marcadas estaciones secas y húmedas y el particular sistema de drenaje compuesto por placas de piedra caliza, promovieron el desarrollo de una flora nativa distintiva. La biodiversidad de la flora yucateca incluye aproximadamente 2,300 especies de plantas con flores, con 115 especies de plantas endémicas y alrededor de 800 son utilizadas como parte de la medicina tradicional maya (Hernández *et al.*, 2019; Fernández *et al.*, 2012).

Se han realizado múltiples estudios para la búsqueda de compuestos con actividad biológica en la flora de la península yucateca. Entre los distintos metabolitos, se han aislado diterpenos y triterpenos, incluyendo saponinas triterpenoidales, esteroides y terpenoides con esqueletos novedosos (Hernández *et al.*, 2019).

En estudios anteriores llevados a cabo en conjunto con el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) y la Unidad de Investigación Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, se evaluaron 21 plantas utilizadas en la medicina tradicional maya de la península de Yucatán para el tratamiento de sintomatología sugerente a cáncer. Diez especies mostraron tener una actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares cancerígenas. Entre ellas, *Phoradendron wattii* reportó una actividad citotóxica promisoriosa.

1.3.1 Género *Phoradendron* y su actividad anticancerígena

En México, el género *Phoradendron* tiene una amplia distribución geográfica. Las plantas de este género son comúnmente conocidas como “corpo”, “muérdago”, “yerba pajarito”, entre otros. Pertenece a la familia Santalaceae y consta de 300 especies a nivel mundial, de las cuales 234 se encuentran presentes en el continente americano. En México se encuentran en casi todos los estados de la República, con 57 especies, con una distribución que va desde el nivel del mar hasta los 3,000 msnm (Vázquez-Collazo *et al.*, 2006; Kuijt, 2003).

Las especies del género *Phoradendron* son principalmente arbustos erectos o colgantes, de varios metros de longitud y hemiparásitos de dicotiledóneas. Poseen ramas redondeadas, glabras y de color verde, amarillo o verde amarillento; las hojas son opuestas de color verde o

amarillentas, lanceoladas u oblongas; sus flores son pequeñas y unisexuales (Vázquez-Collazo *et al.*, 2006; García-Regalado, 1998).

Estas plantas han sido utilizadas en diferentes partes del mundo como medicina tradicional contra diversas enfermedades (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Varela *et al.*, 2004; Gonzales *et al.*, 2000). Asimismo, los extractos de varias especies de *Phoradendron* han mostrado tener actividad anticancerígena. También existen reportes sobre el aislamiento de diversos tipos de metabolitos. Así, del extracto de *P. reichenbachianum* se reportó la presencia de escualeno, trilinoleato de glicerol, α -germanicol, lupeol, β -sitosterol, betulonaldehído, betulinaldehído, β -sitosteril glucopiranosido, ácido morónico, ácido morólico y ácido 3,4-seco-olean-18-en-3,28-dioco, siendo los mayores constituyentes los ácidos morónico (21.02%) y morólico (0.53%) (López *et al.*, 2013). El ácido morónico mostró actividad citotóxica frente a diversas líneas cancerígenas, con IC_{50} de 7.9 μ M, 8.6 μ M y 11.7 μ M sobre adenocarcinoma colorrectal humano (HCT-15), carcinoma de piel (UISO) y carcinoma nasofaríngeo humano (KB), respectivamente (Ramírez *et al.*, 2011; Ríos *et al.*, 2001). En lo que respecta al lupeol, éste se ha evaluado frente a diversas líneas celulares de cáncer: melanoma (MEL-2, CC_{50} = 39.4 μ M; B16 2F2, CI_{50} = 38.0 μ M), leucemia (HL60, CC_{50} = 9.9 μ M; U937, CC_{50} = 16.8 μ M) y neuroblastoma (NB-1, CC_{50} = 19.7 μ M) (Hata *et al.*, 2003; 2002; Setzer y Setzer, 2003).

1.3.2 *Phoradendron wattii*

Phoradendron wattii Krug & Urb. (Figura 1.1) es una planta nativa del estado de Yucatán, distribuida en el centro del estado que pertenece a la familia Santalaceae. Sinonónimo de *Phoradendron vernicosum* Greenm. y comúnmente conocida como “caballero” en español, y como *k'awis k'k'ew* o *ya'ax k'ew* en maya (Herbario CICY, 2010); es utilizada en la medicina tradicional maya para el tratamiento de abscesos (Arellano *et al.*, 2003). Esta especie se encuentra distribuida en Centroamérica, las Antillas y en la República Mexicana en los estados de Chiapas, Colima, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Veracruz y Yucatán, en este último principalmente en el centro (Alvarado-Cárdenas, 2010).

Es un arbusto, con tallos de ramificación erecta, glabros y con hojas de color verde y lustrosas, lanceoladas-ovaladas o elípticas, y frutos ovoides, de ruguloso a verrugoso, de color blanco a amarillo, los cuales contienen varias semillas incrustadas. Sus flores son discretas, de color amarillo verdoso de 1-3 mm de diámetro. Es una planta hemiparásita, provista de clorofila lo cual le permite realizar la fotosíntesis, pero necesita obtener de su huésped agua y sales por

medio de su haustorio, en donde sólo el xilema entra en contacto con el hospedero (Valencia-Chan, 2018; Alvarado-Cárdenas, 2010; Arellano-Rodríguez *et al.*, 2003).

En estudios anteriores llevados a cabo en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) junto con la Unidad de Investigación Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), se logró el aislamiento y elucidación estructural de metabolitos obtenidos partir del extracto de las partes aéreas de *P. vernicosum* (sinonimia de *P. wattii*). Se lograron aislar 20 metabolitos, de los cuales tres resultaron ser novedosos triterpenos de tipo lupano no reportados con anterioridad: ácido 3 α ,24-dihidroxi-20(29)-en-28-oico (**9**), ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico (**10**) y ácido 3 α ,23-O-isopropilidenil-3 α ,23-dihidroxi-20(29)-en-28-oico (**11**) (Figura 1.2) (Valencia-Chan *et al.*, 2017).

Adicionalmente, estos tres compuestos fueron evaluados contra dos líneas celulares de leucemia mieloide aguda (HL-60) y crónica (K-562). El ácido 3 α ,24-dihidroxi-20(29)-en-28-oico tuvo una actividad antiproliferativa en la línea celular K-562 a una concentración de 50 μ g/mL, mientras que con el ácido 3 α ,23-O-isopropilidenil-3 α ,23-dihidroxi-20(29)-en-28-oico se observó una viabilidad del 24.4% a 100 μ g/mL en la línea celular K-562 y el ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico presentó arresto en las fases activas del ciclo celular en G2/M para la línea K562 (datos del grupo no publicados). Debido al potencial aplicativo de los compuestos aislados en *P. vernicosum*, es importante conocer el perfil de producción de los metabolitos durante las diferentes épocas estacionales.



Figura 1.1 *Phoradendron wattii* Krug & Urb.

1.4 Variación estacional de metabolitos secundarios en las plantas

A pesar de la existencia de controles genéticos, la expresión génica y genotipos, el contenido total y la proporción relativa de metabolitos secundarios en las plantas pueden variar a través del tiempo y del espacio (variaciones estacionales y diarias, así como distinciones dentro de la misma planta y entre plantas de la misma especie) en diferentes niveles. La cantidad de metabolitos presentes en una planta dada puede ser influenciada por factores biológicos y ambientales, así como procesos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos y evolutivos.

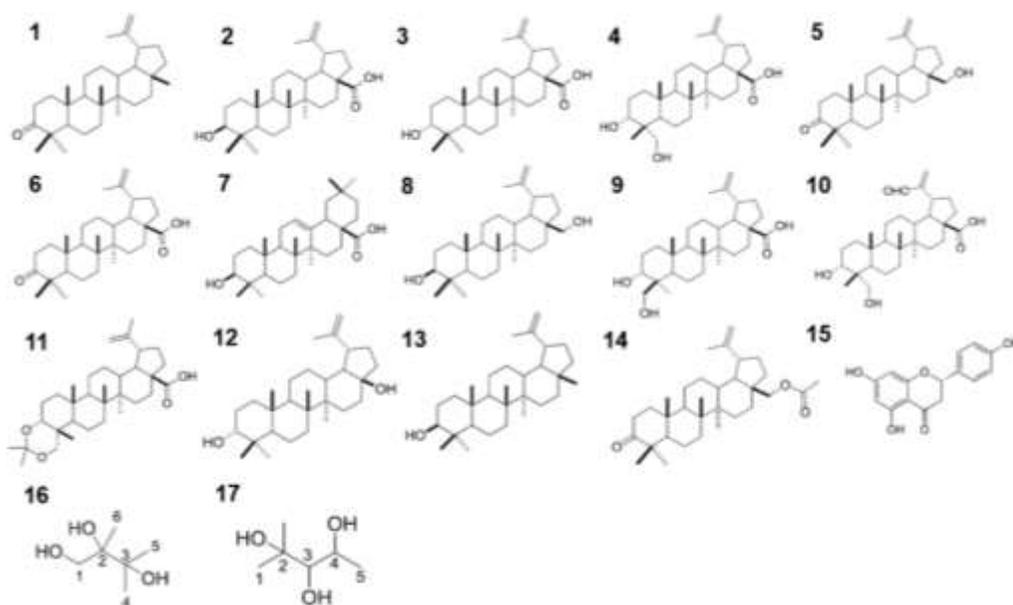


Figura 1.2 Compuestos aislados de *P. wattii*. **1)** Lupenona. **2)** Ácido betulínico. **3)** Ácido 3-*epi*-betulínico. **4)** Ácido 3 α ,23-dihidroxi-lup-20(29)-en-28-oico. **5)** Betulona **6)** Ácido betulónico. **7)** Ácido oleanólico. **8)** Betulina. **9)** Ácido 3 α ,24-dihidroxi-lup-20(29)-en-28-oico. **10)** Ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico. **11)** Ácido 3 α ,23-O-isopropilidenil-3 α ,23-dihidroxi-lup-20(29)-28-oico. **12)** 28-Norlup-20(29)-en-3 α ,17 β -diol. **13)** Lupeol. **14)** 28-O-acetilbetulona. **15)** Naringenina. **16)** 2,3-Dimetilbutano-1,2,3-triol. **17)** 2-Metilpentano-2,3,4-triol.

Las estaciones, el ritmo circadiano, desarrollo de la planta, fenología, temperatura, altitud, disponibilidad de agua, radiación UV, nutrientes, contaminación, estímulos mecánicos y ataques de herbívoros o patógenos son considerados los factores que más afectan la ocurrencia de metabolitos en las plantas (Moore *et al.*, 2014; Gouvea *et al.*, 2012; Valares Masa, 2011).

Llusia *et al.* (2013) estudiaron la producción de terpenos en cuatro especies de plantas (*Thymelaea tinctoria*, *Quercus coccifera*, *Quercus ilex* y *Fagus sylvatica*) durante distintas estaciones, reportando un incremento de hasta 15 veces mayor en la producción de mono y sesquiterpenos durante el verano con respecto a la primavera. De igual manera, se estudió la producción de lupeol en el látex de *Calotropis gigantea* y en *Calotropis procera* durante distintos periodos de tiempo, reportando que la producción de lupeol en *C. gigantea* era mucho mayor durante los meses de agosto-septiembre, mientras que en *C. procera* la mayor producción se daba en los meses de diciembre-enero (Ranade *et al.*, 2018). Así mismo, se reportó el aumento de la concentración de triterpenos y compuestos fenólicos en los meses de enero y febrero (verano, en el hemisferio sur) en *Centella asiática* y sus valores más bajos en el invierno y la primavera (Alqahtani *et al.*, 2015).

De igual manera, la presencia y concentración de los metabolitos secundarios encontrados en una planta pueden variar ampliamente entre sus diferentes tejidos. Comúnmente estas diferencias pueden observarse entre los principales componentes de la planta (raíz, tallos, hojas, flores y frutos). Sin embargo, en los casos más extremos, la acumulación de metabolitos específicos está restringida a un tipo celular en específico. Por ejemplo, los metabolitos de defensa de las plantas son frecuentemente producidos en tejidos especializados como un medio de disminuir reacciones autotóxicas en los tejidos circundantes y/o para maximizar la respuesta ante el ataque de un agresor de una manera espacial específica (Li *et al.*, 2016).

Esta variación deja en evidencia la necesidad de conocer los perfiles de producción de los metabolitos de tipo terpeno en *P. wattii* para poder estimar la mejor época de recolecta de la planta para fines aplicativos.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, con un estimado de 9.95 millones de muertes en 2020, según datos de la OMS. Entre los distintos tipos de cáncer, las leucemias afectan a una gran proporción de la población joven, siendo un 30% de todos los cánceres infantiles (ACS, 2020). A pesar de que hay varios tipos de tratamientos disponibles, no se puede asegurar la eficacia de ellos, además de que la mayoría de éstos poseen efectos secundarios adversos. De igual manera, se ha observado una mayor resistencia de las células cancerígenas ante los agentes quimioterapéuticos tradicionales. Todo esto ha llevado a la

búsqueda de nuevos compuestos antineoplásicos y los productos naturales ofrecen una excelente alternativa para el desarrollo de este tipo de tratamientos.

Las plantas han probado ser una gran fuente de metabolitos secundarios con un amplio espectro de actividades biológicas, incluyendo actividad anticancerígena. Entre los distintos tipos de estos metabolitos, los terpenos representan una fuente de productos naturales de gran interés debido a su gran diversidad estructural y a sus distintas actividades biológicas.

En este sentido, han sido aislados de *P. wattii* metabolitos derivados del lupeol con actividad citotóxica que han mostrado ser efectivos ante líneas celulares de cáncer humano. Es importante resaltar que el perfil de producción de estos compuestos está altamente influenciado por factores abióticos como la temperatura, la radiación UV y la presencia de agua. La península de Yucatán presenta estaciones muy marcadas con la presencia de una temporada seca y una temporada húmeda, denotadas con condiciones atmosféricas muy diferentes. Al ser una planta nativa, se espera que la síntesis de metabolitos de tipo lupeol de *P. wattii* esté influenciada por estas condiciones.

Por lo anteriormente expuesto, en este trabajo se evaluará el efecto de las estaciones en la producción de triterpenos derivados de lupeol con actividad antiproliferativa de *P. wattii* en diferentes líneas de leucemia humana. El objetivo es establecer las bases que nos permitan entender los procesos de producción de metabolitos de la planta, lo que en un futuro pueda llevar hacia la explotación biotecnológica de la planta.

HIPOTESIS

La variación estacional modifica la producción de triterpenos de tipo lupano y la actividad antiproliferativa del extracto metanólico de *Phoradendron wattii*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la variación estacional y la actividad antiproliferativa de triterpenos de tipo lupano, obtenidos del extracto metanólico de *Phoradendron wattii*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Identificar la presencia de triterpenos de tipo lupano en los extractos de los tallos, hojas, flores y frutos de *P. wattii*, obtenidos en diferentes periodos de tiempo por medio de cromatografía líquida de alta resolución.

2. Analizar la variación de triterpenos de tipo lupano en tallos, hojas, flores y frutos de *P. wattii*, obtenidos en diferentes periodos de tiempo por medio de cromatografía líquida de alta resolución.
3. Evaluar el efecto antiproliferativo de los extractos metanólicos de los tallos, hojas, flores y frutos de *P. wattii*, obtenidos en diferentes periodos de tiempo sobre una línea celular de leucemia.
4. Realizar un análisis multivariado para determinar el periodo de mayor producción de metabolitos de *P. wattii*.

ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental de este trabajo inició con la recolección del material vegetal, para ello se distinguió entre tallos, hojas y flores y frutos de *P. wattii*, los cuales fueron recolectados cada tres meses. Para la obtención del extracto, se realizó la maceración del tejido vegetal con metanol. Este extracto metanólico se analizó para determinar la presencia de triterpenos de tipo lupano mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE). Para conocer el potencial antineoplásico de los extractos obtenidos, se evaluó su efecto antiproliferativo contra una línea celular de leucemia humana, así como en una línea normal de células monocíticas humanas. Se realizó un análisis multivariado de los resultados obtenidos para determinar la mejor época de colecta (Figura 1.3).

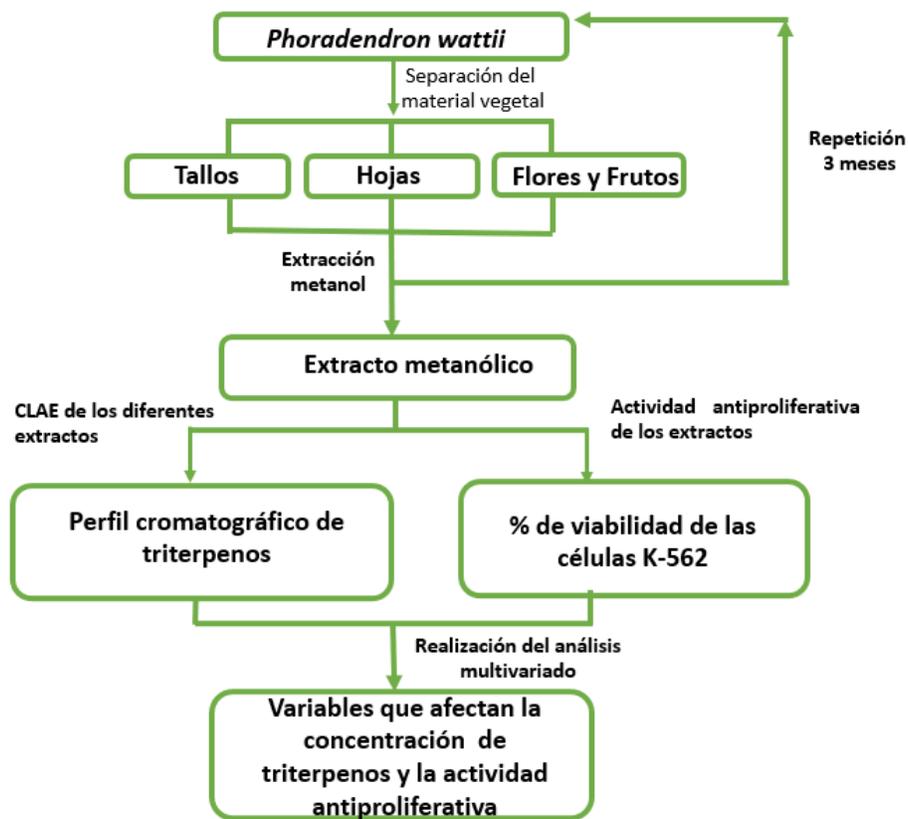


Figura 1.3 Diagrama general de la estrategia experimental.

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Procedimientos generales

Los disolventes usados para los experimentos de extracción fueron de grado industrial, destilados en el laboratorio. Para recuperación de los disolventes se utilizaron evaporadores rotatorios marca Büchi, modelo R-151 de 20 L, y modelo RE-111 de 4 L de capacidad máxima del matraz.

Para los análisis de cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (HPLC, por sus siglas en inglés, o CLAE, en español) se utilizaron disolventes de grado HPLC. Todos los estándares utilizados durante este análisis fueron previamente aislados de estudios anteriores.

2.2 Sitio de colecta

Se realizó el muestreo del material vegetal de *P. wattii* en la carretera Sierra Papacal-Chuburná Puerto. En las coordenadas 21°07'37.3" N, 89°44'36.1" W. La colecta del material vegetal se realizó cada tres meses durante las estaciones de verano y otoño de 2019 e invierno y primavera de 2021. Se realizó la identificación del material vegetal y una muestra representativa se entregó al herbario *U Najil Tikin Xiw* (La Casa de la Hierba Seca) del CICY para su resguardo con el # de voucher 072347.

2.3 Pretratamiento del material vegetal

Para cada una de las colectas, el material vegetal fue separado manualmente en los diferentes órganos. Durante las recolectas se distinguió entre las hojas, los tallos, las flores o los frutos. Debido a que, dependiendo de la época, la planta presentó menor cantidad de flores o de frutos, los cuales individualmente fueron insuficientes para el proceso de extracción utilizado, se decidió juntar estos dos órganos en una sola muestra denominándolos como "F/F"

Para eliminar la mayor cantidad de humedad antes del proceso de extracción, el material vegetal fresco se colocó en charolas para secado a temperatura ambiente en la sombra por 48 h. El proceso de secado continuó en cámaras de secado a 40 °C por 24 h. Una vez secos, los tallos y las hojas fueron triturados utilizando un molino de cuchillas giratorias con una malla No. 10.

2.4 Obtención de los extractos metanólicos

Para la obtención de los extractos metanólicos, se realizó la maceración del material vegetal seco y molido utilizando metanol a temperatura ambiente por 48 h lejos de la luz solar directa. El extracto se filtró utilizando un filtro Whatman No. 10 y se concentró utilizando un evaporador rotatorio (Büchi, modelo RE-111) bajo las siguientes condiciones de presión reducida: 150 mbar, rotación: 50 rpm, baño caliente: 40 °C, temperatura del enfriador: 1 °C. Este proceso se repitió dos veces por cada una de las muestras. Finalmente, todos los extractos fueron secados en su totalidad utilizando una cámara al vacío con gel de sílice y guardados a 4 °C.

2.5 Análisis cromatográfico

Se realizó la cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa en un sistema de cromatografía líquida Dionex Ultimate 3000 acoplado con una bomba cuaternaria, automuestrador y un detector de arreglo de diodos a 210 nm. Se empleó una columna C18 Hypersil Gold (Thermo) (150 mm × 4.6 mm × 5 µm) acoplada con una guarda columna (Zorbax Extend C18, Agilent, 4.6 mm × 12.6 mm × 5 µm).

Para la preparación de la mezcla de estándares, se prepararon disoluciones madres de 2 mg/mL de cada uno de los estándares y se tomaron 75 µL de cada una para llevar a un volumen total de 1.5 mL con metanol (MeOH), dejando a cada estándar con una concentración final de 0.1 mg/mL. Así mismo, cada uno de los diferentes estándares se inyectó al equipo CLAE para la identificación de su tiempo de retención, utilizando una concentración de 0.708 mg/mL.

Se realizó la corrida utilizando los extractos metanólicos de *P. wattii*. Para la preparación de las muestras se preparó una disolución madre de 5 mg/mL de cada uno de los extractos. De igual manera, se preparó una disolución madre de cafeína disuelta en metanol (1 mg/mL) para ser utilizada como un control interno de corrida. Para la preparación de la disolución de trabajo se tomaron 450 µL de la disolución madre de cada una de las muestras y se le adicionó 76 µL de la disolución de cafeína, llevando a un volumen final de 1,201 µL con metanol, dejando a cada una de las muestras con una concentración final de 1.875 mg/mL del extracto metanólico y 0.06 mg/mL de cafeína. Esto se realizó por triplicado.

El volumen de inyección fue de 20 µL para cada muestra. La fase móvil inicial consistió en agua (A)-MeOH (B) (80:20, v/v) a un flujo de 0.95 mL/min con el siguiente gradiente de elución lineal: inicial de 80% de A; disminución a 30% de A en 5 min; disminución a 15% de A en 5 min;

aumento al 100% de B en 8 min, manteniéndose por 4 min; regreso a condiciones iniciales en 5 min.

Para la cuantificación de los metabolitos identificados, se realizaron curvas estándar. Para ello, se utilizaron distintas concentraciones de cada uno de los estándares (0.0025 a 0.2 mg/mL para la lupenona y de 0.01 a 0.2 mg/mL para el resto de los metabolitos). Las absorbancias obtenidas de cada una de las diferentes concentraciones fueron graficadas y se realizó una regresión lineal para obtener la ecuación de la recta.

2.6 Cultivo celular

Para la elaboración de los bioensayos se utilizó la línea celular de leucemia humana mieloide crónica K-562 (ATCC[®] CCL-243[™]), al igual que células monocíticas de sangre periférica humana (CMSP). Las células K-562 y CMSP se cultivaron y mantuvieron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, Gibco, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina y 2.5 µg/mL de anfotericina B. Las células se mantuvieron en su fase logarítmica y se incubaron en condiciones de cultivo estándar, humedad atmosférica y 5% de CO₂ a 37 °C.

2.7 Obtención de las células monocíticas de sangre periférica

La obtención de células monocíticas de sangre periférica humana se realizó por el método de aislamiento por gradiente de Ficol. Para ello, 4 mL de sangre periférica humana se mezcló con volúmenes iguales de PBS 1X y de Ficol. Posteriormente, se centrifugó a 400 × g por 35 min. Se recuperó la fase correspondiente a las células mononucleares y se colocó en un microtubo de 1.5 mL. Se añadió 500 µL de PBS 1X a la suspensión celular recuperada y se centrifugó 300 × g por 15 min. Se retiró el sobrenadante y se le añadió 1 mL de PBS 1X a la pastilla celular recuperada, resuspendiéndola gradualmente. Se centrifugó a 200 × g por 10 min y se retiró el sobrenadante. La pastilla celular fue resuspendida en 1 mL de medio de cultivo completo y éste fue reservado para los análisis o para su cultivo.

2.8 Estandarización de los bioensayos

Dado que los extractos metanólicos obtenidos tenían una intensa coloración, se decidió realizar pruebas para corroborar que el color no interfiriera con los resultados. Para ello, se decidió

utilizar los extractos metanólicos pertenecientes a las hojas y flores colectadas en primavera. Estos extractos fueron elegidos debido a su intensa coloración. En placas de cultivo de 12 pozos se incubaron 200,000 células/pozo de la línea celular K-562 con medio RPMI, suplementado con 10% de SFB, 1% de la disolución de antibiótico/antimicótico y con 200 µg/mL del extracto correspondiente resuspendido previamente en dimetilsulfóxido (DMSO), para una concentración final del 4% de DMSO en el medio. Se incubó por 48 h en condiciones de atmósfera humedad y 5% de CO₂ a 37 °C. Posterior al tiempo de incubación, las células se centrifugaron (2,000 rpm × 3 min) y se lavaron con 450 µL de buffer de fosfatos (PBS) y se le adicionó 50 µL de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para una concentración final de 500 ng/mL. Para analizar la viabilidad celular, se utilizó un citómetro de flujo (CytoFLEX, Beckman Coulter).

Para la estandarización de la cantidad de DMSO, 200,000 células/pozo de la línea celular K-562 fueron incubadas con medio RPMI, suplementado con 10% de SFB, 1% de la disolución de antibiótico/antimicótico y con distintas concentraciones de DMSO (1.25, 2.5 y 3.75%). Posteriormente, se incubaron bajo las mismas condiciones y se prosiguió analizar la viabilidad celular.

2.9 Análisis estadístico

Los resultados fueron sometidos a un ANOVA de una vía *post hoc* de una prueba de comparación múltiple de Tukey, empleando el paquete estadístico Prisma 8 (GraphPad Software).

2.10 Análisis de componentes principales

Para el análisis de componentes principales (PCA) se utilizó el software gratuito MetaboAnalyst V. 5.0. Lo primero que se realizó fue una matriz conteniendo las variables a evaluar. Se armó una matriz de 13 × 61 conteniendo las variables y los resultados obtenidos. Esta matriz se convirtió a texto libre de formato utilizando el software de Excell de la paquetería de Office y los datos se cargaron en el MetaboAnalyst. Se realizó la normalización de los datos, empleando primeramente un ajuste de normalización utilizando la mediana de cada uno de los grupos de datos. Posteriormente, se realizó una transformación de la información empleando la raíz cuadrada de cada uno de los datos, para finalmente realizar un escalamiento de la información utilizando la mediana para centrar y dividido por la raíz cuadrada de la desviación estándar de

cada una de las variables (Escalamiento de Pareto). Para el análisis de PCA, se utilizó la varianza explicada en 2 y 3 componentes.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Espécimen objeto de estudio

Se decidió trabajar con una sola planta durante toda la duración de este estudio. El ejemplar de *P. wattii* utilizado se encuentra ubicado en la carretera Sierra Papacal-Chuburná Puerto en las coordenadas 21°07'37.3" N, 89°44'36.1" W (Figura 3.1). El espécimen se encuentra en el camellón de la carretera y su hospedero fue identificado como un ejemplar de *Diphysa yucatanensis*, conocido comúnmente como "quiebra hacha" y como *ts' uts' uk* en maya. El clima de Sierra Papacal es tropical cálido, húmedo, con lluvias en verano (de junio a octubre) y una temperatura media mensual de 30 °C. De acuerdo con la clasificación climática de Köppen, su clima es tropical de sabana (Aw) y se encuentra en un ecosistema de selva seca. De acuerdo con la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, en la región centro y norte del estado predominan los suelos someros, con abundante contenido de piedras y frecuentes afloramientos de coraza calcárea.

Se lograron obtener las muestras correspondientes a las estaciones de verano y otoño de 2020 y del invierno y la primavera de 2021. Una muestra del ejemplar fue depositada en el herbario *U Najil Tikin Xiw* del Centro de Investigación Científica de Yucatán, con el número 072347.



Figura 3.1 Ejemplar de *Phoradendron wattii* utilizado en este estudio.

3.2 Material vegetal de *P. wattii*

Para cada uno de los muestreos, el material vegetal fue separado. Se distinguió entre las hojas, los tallos, las flores o los frutos (Figura 3.2). Debido a que dependiendo de la época la planta presentó menor cantidad de flores o de frutos, los cuales individualmente fueron insuficientes para el proceso de extracción utilizado, se decidió juntar estos dos tejidos denominando a los extractos provenientes de esta mezcla como “F/F”. La presencia de hojas, flores o frutos en la planta durante las diferentes épocas de cosecha se presentan en la Figura 3.3, observándose un incremento a partir de enero de los frutos hasta llegar a su máximo entre los meses de junio y julio, para disminuir completamente en el mes de octubre. En lo que respecta a las flores, éstas presentaron un comportamiento opuesto al de los frutos, siendo su máximo en los meses de diciembre y enero para ir disminuyendo conforme se aproxima a los meses más cálidos. Hay que señalar que, aunque sí se observó una marcada disminución de la incidencia de flores, en todos los meses registrados se tuvo la presencia de éstas. En cuanto a las hojas, éstas se mantuvieron constantes durante todo el año sin cambios aparentes.



Figura 3.2 Diferentes tejidos de *P. wattii*. **A)** Sección de la planta con flores. **B)** Sección de la planta con fruto. **C)** Tamaños y morfología de las hojas.

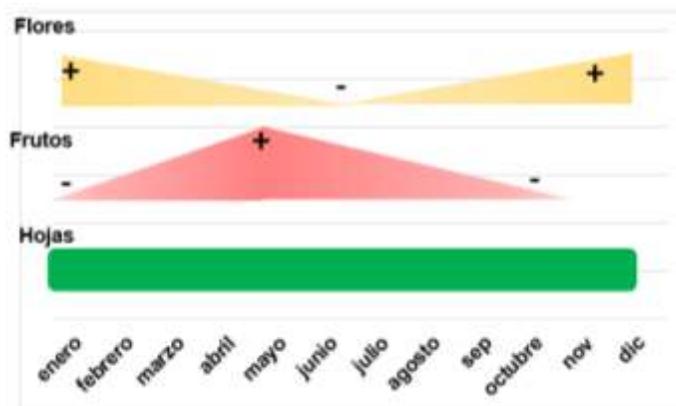


Figura 3.3 Incidencia de los diferentes tejidos de *P. wattii* a través del año.

3.3 Obtención de los extractos metanólicos

Se obtuvieron extractos crudos de un color verde oscuro, espeso y de apariencia lustrosa procedentes de las hojas y los tallos. Mientras que los provenientes de F/F tuvieron una coloración café (Figura 3.4). Durante el pretratamiento del material vegetal, los extractos procedentes de la estación de verano tuvieron el mayor rendimiento en masa con respecto a la masa del material vegetal original seguido de la primavera (95 y 92.6%, respectivamente). Durante esta etapa, los tallos y las hojas fueron los tejidos que más rendimiento tuvieron (92% para ambos). Durante la etapa de obtención del extracto metanólico, los procedentes de las estaciones de primavera y otoño tuvieron el mayor rendimiento en masa con respecto a la masa del material vegetal seco (13.0 y 12.3%, respectivamente) y fueron los extractos obtenidos de las hojas y F/F los que tuvieron mayor rendimiento en esta etapa (13.75 y 11.25%, respectivamente). De manera general, el pretratamiento del material vegetal tiene un rendimiento del 92% y la obtención de extracto metanólico crudo un 12%. Cada una de las masas registradas en las etapas del pretratamiento y de la obtención del extracto metanólico se presentan en el Anexo I.

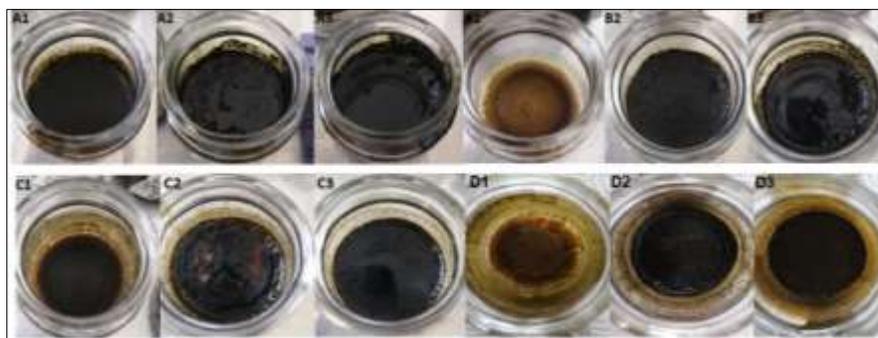


Figura 3.4 Extractos metanólicos crudos de *P. wattii*. 1) Flores y frutos (F/F), 2) tallos y 3) hojas. A) verano, B) otoño, C) invierno y D) primavera.

Tabla 3.1. Rendimientos del pretratamiento del material vegetal y obtención del extracto metanólico de *P. wattii*.

Pretratamiento			Obtención del extracto metanólico		
Colecta	Órgano de la planta	%	Colecta	Órgano	%
Verano			Verano		
	F/F	97		F/F	9
	Tallos	95		Tallos	9
	Hojas	93		Hojas	4
Otoño			Otoño		
	F/F	80		F/F	13
	Tallos	90		Tallos	9
	Hojas	94		Hojas	15
Invierno			Invierno		
	F/F	94		F/F	10
	Tallos	92		Tallos	1
	Hojas	88		Hojas	22
Primavera			Primavera		
	F/F	93		F/F	13
	Tallos	91		Tallos	10
	Hojas	94		Hojas	14
Total		92	Total		11

3.4 Identificación de los tiempos de retención de los estándares

Se logró una buena identificación de las señales provenientes de la mezcla de estándares utilizada. Se emplearon nueve compuestos de tipo lupano previamente aislados de *P. wattii*. Se utilizó lupenona (1), ácido betulínico (2), ácido 3-*epi*-betulínico (3), ácido 3 α ,23-dihidroxi-20(29)-en-28-oico (4), ácido betulónico (6), betulina (8), ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico (10), ácido 3 α ,23-O-isopropilidenil-3 α ,23-dihidroxi-20(29)-28-oico (11), 28-O-acetilbetulona (14) y adicionalmente cafeína como un estándar interno (EI) en cada uno de los

experimentos. Se utilizó una concentración final de 0.1 mg/mL de cada uno de los estándares y el espectro de la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (CLAE-FR) de la mezcla se presenta en la Figura 3.5. Como se puede observar en el cromatograma, el tiempo de retención (t_R) del estándar **10** fue muy cercano a una señal en la línea base producto del cambio de gradiente en los disolventes utilizados. Para su análisis, se sustrajo el área del pico de esta línea base al área obtenida de la señal del estándar **10**. Para los análisis posteriores, se realizó esta misma estrategia para los casos en los que se haya requerido. Para el resto de los estándares se logró obtener los diferentes t_R , los cuales se presentan en la Tabla 3.2. Los cromatogramas para la identificación del t_R de cada uno de los estándares se presentan en el Anexo II.

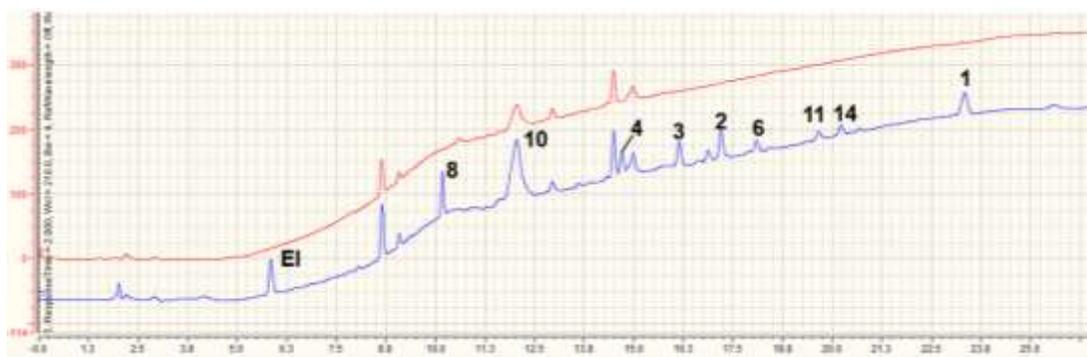


Figura 3.5 Cromatograma de CLAE-FR de la mezcla de estándares. Mezcla de estándares utilizados (azul). lupenona (**1**), ácido betulínico (**2**), ácido 3-*epi*-betulínico (**3**), ácido 3 α ,23-dihidroxilup-20(29)-en-28-oico (**4**), ácido betulínico (**6**), betulina (**8**), ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico (**10**), ácido 3 α ,23-O-isopropilidenil-3 α ,23-dihidroxilup-20(29)-28-oico (**11**), 28-O-acetilbetulona (**14**), estándar interno (**EI**). Inyección de metanol (rojo).

Tabla 3.2 Tiempos de retención (t_R) de los estándares utilizados.

Estándar	t_R (min)
Betulina (8)	10.18
Ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico (10)	12.02
Ácido 3 α ,23-dihidroxi-20(29)-en-28-oico (4)	14.63
Ácido 3- <i>epi</i> -betulínico (3)	16.19
Ácido betulínico (2)	17.22
Ácido betulónico (6)	18.08
Ácido 3 α ,23-O-isopropilidenil-3 α ,23-dihidroxi-20(29)-28-oico (11)	19.63
28-O-Acetilbetulona (14)	20.25
Lupenona (1)	23.33
Cafeína (E1)	5.84

3.5 Identificación de los metabolitos presentes en las diferentes colectas de *P. wattii*

Para la identificación de los diferentes metabolitos en las colectas de *P. wattii* se obtuvieron cromatogramas empleando las mismas condiciones cromatográficas utilizadas en el análisis de los estándares. Se utilizó una concentración final del extracto metanólico de 1.875 mg/mL y 0.06 mg/mL de cafeína disueltos en metanol. En total, se lograron identificar cinco metabolitos en las diferentes muestras obtenidas de los diferentes periodos, siendo betulina (8), ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico (10), ácido betulínico (2), ácido betulónico (6) y lupenona (1) (Figura 3.6). Se encontró una variación en la presencia de los metabolitos en las diferentes épocas de colecta y en los tejidos analizados. En cuanto a la complejidad de los extractos por su fecha de colecta, en los cromatogramas de los extractos de las estaciones de primavera y otoño se identificó el mayor número de metabolitos (cuatro), mientras que en los correspondientes a los extractos de verano y de invierno sólo se pudieron identificar tres. En lo referente al número de compuestos en los extractos por órgano de la planta, a lo largo del año se encontraron los cinco metabolitos identificados en las diferentes muestras de F/F, tallos y hojas de *P. wattii*. La complejidad de cada una de las muestras analizadas se presenta en la Figura 3.7. Los cromatogramas de CLAE-FR obtenidos de cada una de las muestras analizadas se presentan en el anexo III.

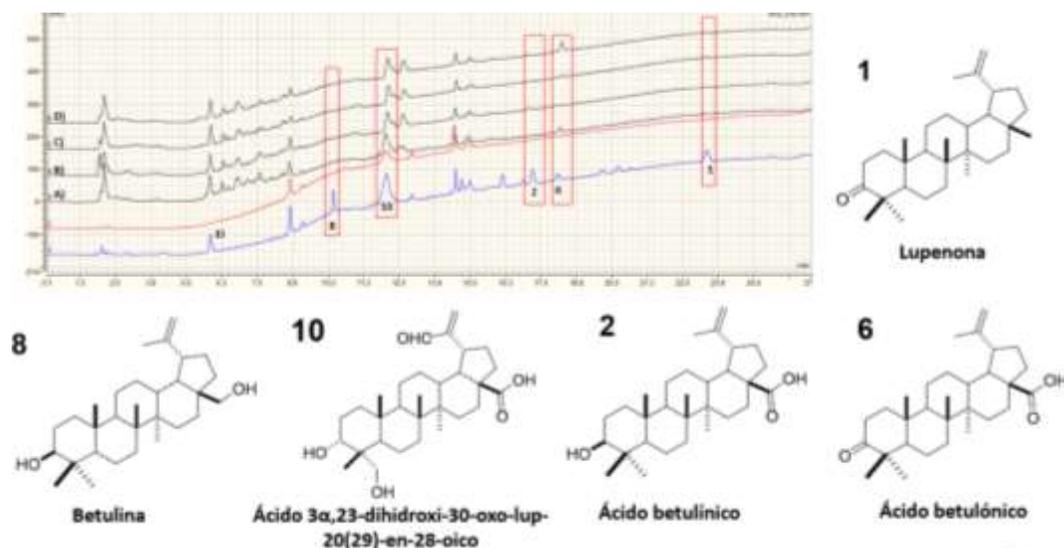


Figura 3.6 Cromatograma obtenido por CLAE-FR de los extractos metanólicos de *P. wattii*. Mezcla de estándares (azul): Betulina (8), Ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico (10), Ácido betulínico (2), Ácido betulónico (6), Lupenona (1), Cafeína (EI). Diferentes colectas de los tallos de *P. wattii* (Negro). **A**) primavera 2021, **B**) verano 2020, **C**) otoño 2020, **D**) invierno 2021. Inyección de metanol (rojo).

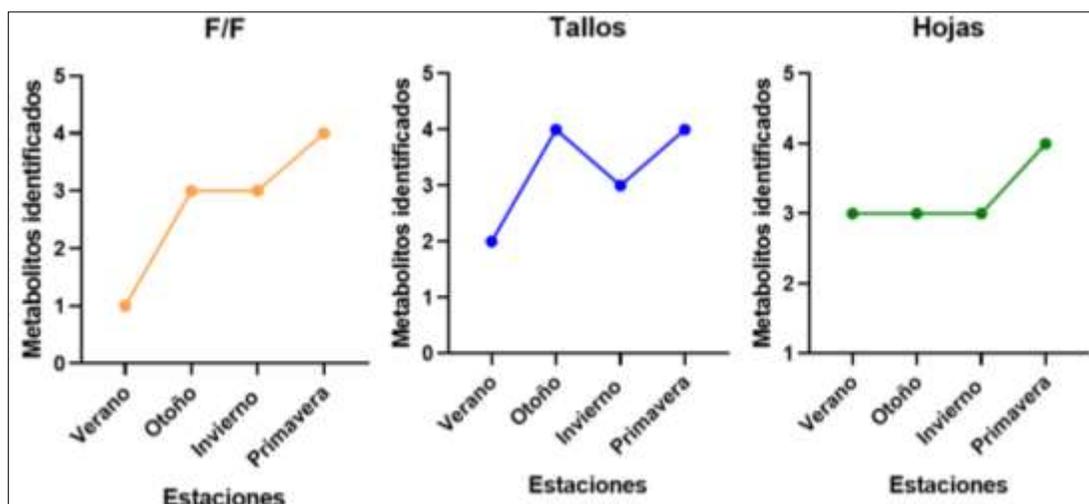


Figura 3.7. Complejidad de los extractos metanólicos de las diferentes colectas de *P. wattii*.

3.6 Variación estacional de los triterpenos de *P. wattii*

Para el análisis de los cinco triterpenos identificados, se realizaron curvas estándar de cada uno para poder obtener una concentración definida. Para ello, se utilizaron distintas concentraciones (0.0025 a 0.2 mg/mL para la lupenona y de 0.01 a 0.2 mg/mL para el resto de

los metabolitos) de cada uno de los estándares. Se lograron las regresiones lineales en el rango de concentraciones estudiadas y las ecuaciones de cada uno se presentan en la Tabla 3.3. Las gráficas de las curvas estándar se presentan en el Anexo IV.

Tabla 3.3 Ecuaciones de las regresiones lineales de las curvas estándar.

Estándar	Ecuación	Valor de r
Betulina (8)	$y = 0.002x + 0.0767$	0.998
Ácido 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico (10)	$y = 188.29x - 4.3299$	0.999
Ácido betulínico (2)	$y = 568.18x - 42.184$	0.999
Ácido betulónico (6)	$y = 37.708x - 0.1969$	0.998
Lupenona (1)	$y = 51.884x - 0.1645$	0.999

Una vez obtenidas las concentraciones correspondientes de cada uno de los triterpenos identificados con la cromatografía, se relacionó con la cantidad de extracto utilizado para los análisis y con los rendimientos de la obtención del extracto metanólico correspondiente con respecto al material vegetal seco (MS) utilizado. De esta manera, se logró obtener la cantidad de cada uno de los metabolitos con respecto a la masa del material vegetal.

En cuanto al contenido individual de cada uno de los triterpenos con respecto a la estación de año, sólo se detectó la presencia de betulina durante la estación de la primavera, sin embargo, la concentración de ésta fue casi igual a la suma total de los demás metabolitos encontrados en esta estación (15.66 ± 1.23 mg/g MS). En lo que respecta al ácido betulínico, se observó un incremento en el otoño con respecto al verano, pero en las estaciones de invierno y primavera no se pudo detectar. El ácido betulónico presentó un comportamiento opuesto al ácido betulínico al tener un incremento durante el invierno y la primavera y no detectarse durante el verano y otoño. Se pudieron registrar durante todas las estaciones medidas del ácido 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico, registrando un aumento del metabolito durante el verano y el otoño y una disminución en el invierno con respecto a la concentración obtenida en la primavera. La lupenona estuvo presente durante todas las estaciones medidas registrando un ligero aumento durante el otoño (Figuras 3.8-3.12). En cuanto a la variación de los metabolitos con respecto al órgano de la planta, se encontró un aumento de la betulina en las flores y frutos (F/F) y en las hojas de la planta. Se registró una mayor concentración de los ácidos betulínico, betulónico y 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico en las hojas durante las estaciones estudiadas y se obtuvo la mayor cantidad de lupenona en los tallos de la planta. De igual manera, se obtuvo el registro de los máximos absolutos de cada uno de los metabolitos, siendo

en las hojas en primavera para la betulina de 8.46 mg/g, en los tallos en verano para el ácido 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico de 7.0 mg/g, hojas en verano para el ácido betulínico de 7.7 mg/g, hojas en invierno para el ácido betulónico de 5.07 mg/g y tallos en otoño para la lupenona de 2.44 mg/g (Tabla 3.4).

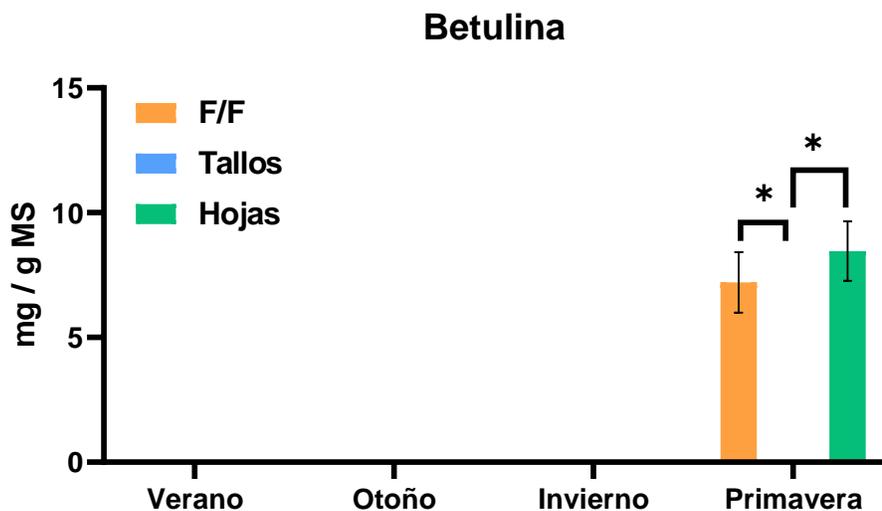


Figura 3.8 Variación estacional de betulina en *P. wattii*. Concentración de betulina por g de material vegetal seco (MS) en las muestras de F/F (flores y frutos), tallos y hojas durante las diferentes colectas de la planta. Para la comparación entre los diferentes órganos se realizó un ANOVA de dos vías *post hoc* de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Los valores seguidos de un asterisco (*) son significativamente diferentes; * $p < 0.001$.

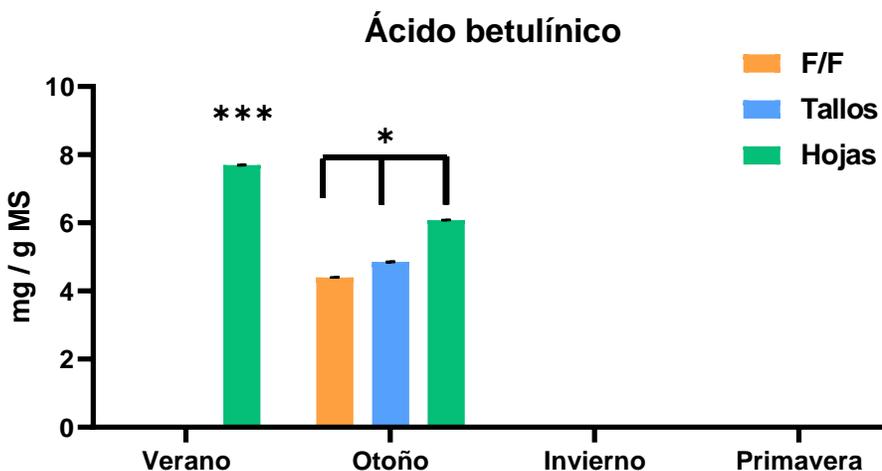


Figura 3.9 Variación estacional de ácido betulínico en *P. wattii*. Concentración de ácido betulínico por g de material vegetal seco (MS) en las muestras de F/F (flores y frutos), tallos y hojas durante las diferentes colectas de la planta. Para la comparación entre los diferentes órganos se realizó un ANOVA de dos vías *post hoc* de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Los valores seguidos de un asterisco (*) son significativamente diferentes; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

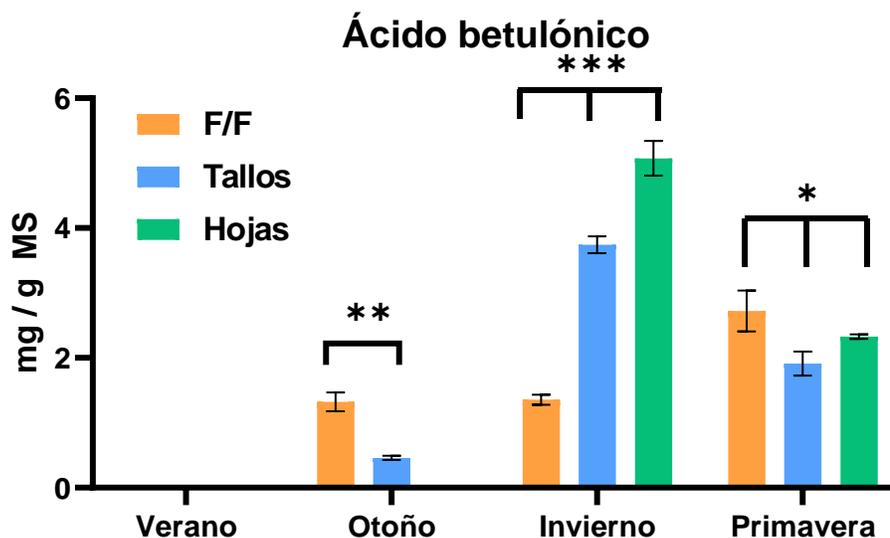


Figura 3.10. Variación estacional de ácido betulónico en *P. wattii*. Concentración de ácido betulónico por g de material vegetal seco (MS) en las muestras de F/F (flores y frutos), tallos y hojas durante las diferentes colectas de la planta. Para la comparación entre los diferentes órganos se realizó un ANOVA de dos vías *post hoc* de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Los valores seguidos de un asterisco (*) son significativamente diferentes; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

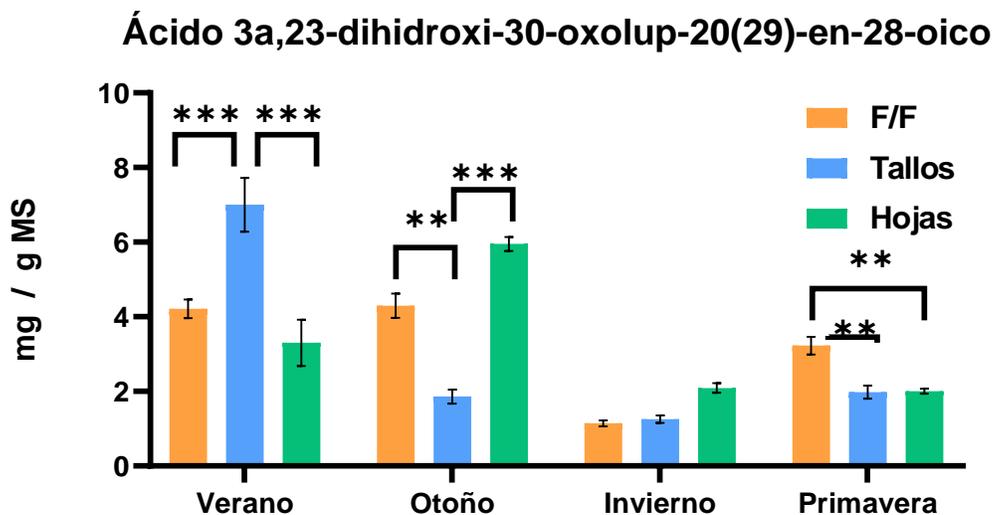


Figura 3.11 Variación estacional del ácido 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico en *P. wattii*. Concentración del ácido 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico por g de material vegetal seco (MS) en las muestras de F/F (flores y frutos), tallos y hojas durante las diferentes colectas de la planta. Para la comparación entre los diferentes órganos se realizó un ANOVA de dos vías *post hoc* de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Los valores seguidos de un asterisco (*) son significativamente diferentes; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

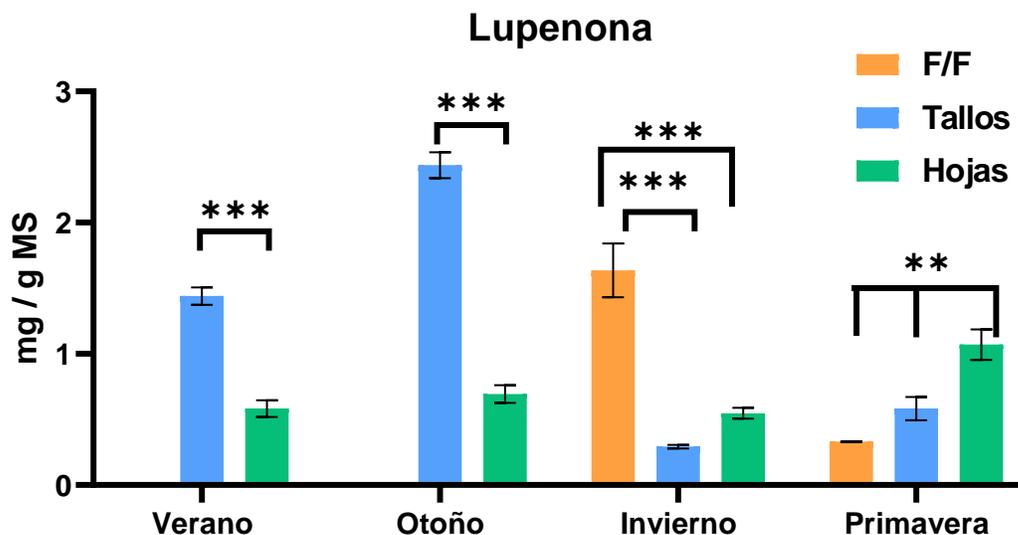


Figura 3.12 Variación estacional de lupenona en *P. wattii*. Concentración de lupenona por g de material vegetal seco (MS) en las muestras de F/F (flores y frutos), tallos y hojas durante las diferentes colectas de la planta. Para la comparación entre los diferentes órganos se realizó un ANOVA de dos vías *post hoc* de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Los valores seguidos de un asterisco (*) son significativamente diferentes; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Los compuestos mayoritarios en las muestras de flores y frutos de las distintas estaciones fueron el ácido 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico y la betulina (40.3 y 22.6%, respectivamente). Los ácidos 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico y betulínico (43.5 y 21.9%, respectivamente) fueron los principales componentes en los tallos durante las distintas estaciones. Y finalmente, los ácidos 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico y betulínico resultaron ser los principales metabolitos identificados en las hojas (29.3 y 30.5%, respectivamente). Contemplando todas las muestras, los metabolitos mayoritarios presentes en la planta fueron los ácidos 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico y betulínico siendo el 36.3 y el 21.8% de los triterpenos obtenidos (Figura 3.13).

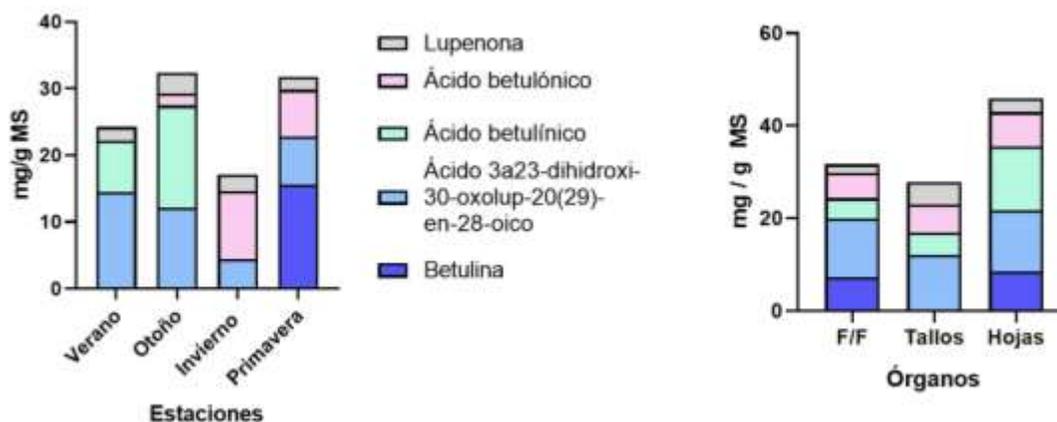


Figura 3.13 Variación estacional de triterpenos de tipo lupano en *P. watti*. Concentración total de los triterpenos de tipo lupano por g de material vegetal seco (MS) durante las diferentes estaciones del año y en los diferentes órganos de *P. watti*. Porcentaje de cada uno de los triterpenos registrados durante todo el año con respecto al total de triterpenos obtenidos.

Tabla 3.4 Variación estacional de triterpenos de tipo lupano de *P. watti*.

	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
F/F (mg/g MS)				
8	ND	ND	ND	7.2 ± 1.21 ^a
10	4.2 ± 0.25 ^a	4.3 ± 0.32 ^a	1.14 ± 0.08 ^b	3.2 ± 0.24 ^c
2	ND	4.4 ± 0.01 ^a	ND	ND
6	ND	1.32 ± 0.14 ^a	1.35 ± 0.07 ^a	2.72 ± 0.31 ^b
1	ND	ND	1.64 ± 0.20 ^a	0.33 ± 0.004 ^b
Tallos (mg/g MS)				
8	ND	ND	ND	0.005 ± 0.0005 ^a
10	7.00 ± 0.72 ^a	1.86 ± 0.18 ^b	1.26 ± 0.09 ^c	1.98 ± 0.17 ^b
2	ND	4.85 ± 0.01 ^a	ND	ND
6	ND	0.46 ± 0.03 ^a	3.74 ± 0.12 ^b	1.91 ± 0.18 ^a
1	1.44 ± 0.06 ^a	2.44 ± 0.09 ^b	0.29 ± 0.01 ^c	0.58 ± 0.08 ^d
Hojas (mg/g MS)				
8	ND	ND	ND	8.46 ± 1.20 ^a
10	3.30 ± 0.62 ^a	5.95 ± 0.19 ^b	2.09 ± 0.13 ^c	2.00 ± 0.06 ^c
2	7.7 ± 0.01 ^a	6.09 ± 0.01 ^b	ND	ND
6	ND	ND	5.07 ± 0.26 ^a	2.33 ± 0.03 ^a
1	0.58 ± 0.06 ^a	0.69 ± 0.06 ^a	0.55 ± 0.04 ^a	1.08 ± 0.11 ^b

La información es presentada como la media ± desviación estándar (DE) (n = 3). Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencia significativa entre diferentes estaciones. Método de Turkey, análisis de varianza (ANOVA) (p < 0.05). ND: no detectado. Betulina (**8**), Ácido 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico (**10**), Ácido betulínico (**2**), Ácido betulónico (**6**), Lupenona (**1**).

3.7 Relación entre la variación de triterpenos y las condiciones climatológicas

Se realizó el registro de las condiciones climatológicas durante las fechas de colecta (Anexo V). Se pudo encontrar una relación entre la variación de los distintos triterpenos y las condiciones climatológicas propias de cada estación. La mayor cantidad de triterpenos se obtuvo durante las estaciones de otoño y primavera. Las cuales corresponden a los meses de octubre y abril, respectivamente. Al comparar las condiciones climatológicas presentes en esas estaciones, se puede observar una relación que indica que bajo condiciones de alta precipitación y una temperatura media se propicia la síntesis de los ácidos 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico, betulínico y la lupenona. Mientras que una elevada temperatura y una escasa precipitación está relacionada con la síntesis de betulina y ácido betulónico. Para poder corroborar la relación de estas variables, se realizó una regresión lineal entre el total de triterpenos con la precipitación, el periodo de luz natural y la temperatura. Los resultados mostraron que la variable medida que más se relaciona con la síntesis de triterpenos es la temperatura, con un valor del coeficiente de correlación de Pearson de 0.77, situándolo en un nivel de correlación alta positiva. La precipitación y el periodo de luz igualmente obtuvieron correlaciones positivas, sin embargo, el nivel de correlación entre estas variables y el contenido total de triterpenos fue menor (media y baja, respectivamente) (Figuras 3.14 y 3.15)

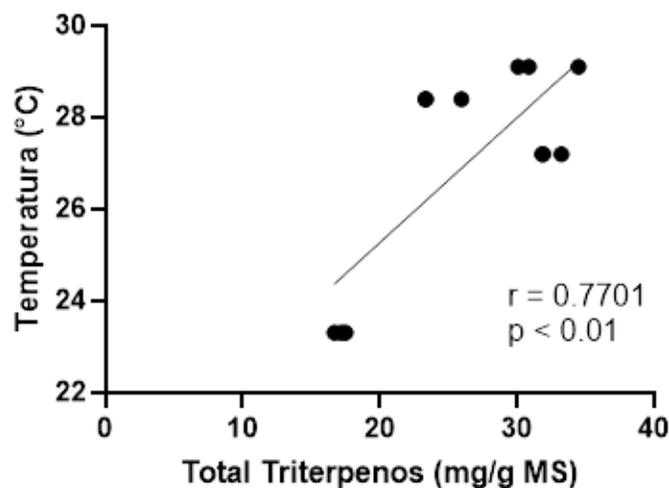


Figura 3.14 Correlaciones de la temperatura con el total de triterpenos. Correlación de Pearson entre la temperatura (°C) y el total de triterpenos obtenidos por g de material seco (MS) de *P. wattii*.

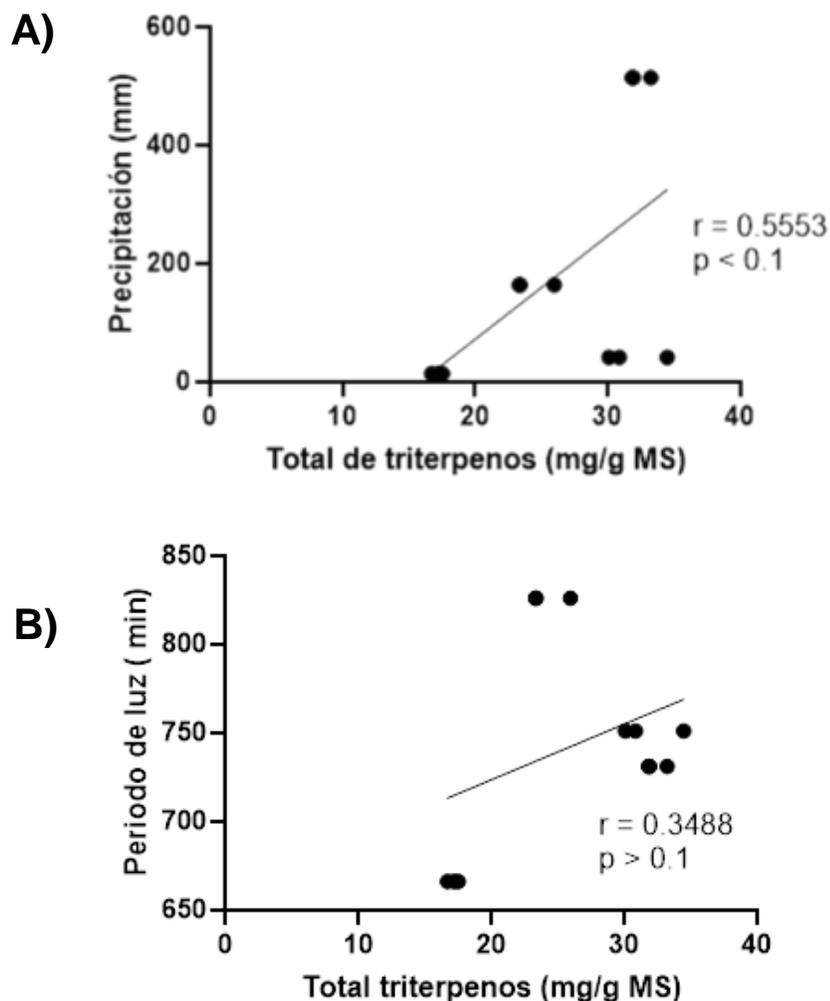


Figura 3.15 Correlaciones de las diferentes variables con el total de triterpenos. Correlación de Pearson entre la **A)** la precipitación (mm) y **B)** el periodo de luz (min) registrados y el total de triterpenos por g de material seco (MS) de *P. wattii*.

3.8 Estandarización de los bioensayos

Se realizaron dos experimentos para estandarizar las condiciones de los bioensayos. Dado que los extractos metanólicos obtenidos tenían una intensa coloración, esta podría ocasionar una interferencia en el análisis de citometría de flujo. Se decidió realizar pruebas para corroborar que el color de los extractos no interfiriera con los resultados. Para ello, se decidió utilizar los extractos metanólicos pertenecientes a las hojas y flores de la primavera. Estos extractos fueron elegidos debido a su intensa coloración. Se empleó la línea celular de leucemia mieloide crónica K-562 y se incubó con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada uno de los extractos por un periodo de 48 h y posteriormente las células fueron incubadas utilizando DAPI y empleando

citometría de flujo. Los resultados mostraron que la coloración del extracto no tuvo un efecto en el análisis por citometría de flujo (Figura 3.16A). Sin embargo, se observó que la concentración de dimetilsulfóxido (DMSO) que se utilizó tenía un efecto en la viabilidad celular. En un segundo experimento, se probaron distintas concentraciones de DMSO en el medio de cultivo (1.25, 2.5 y 3.75%). Los resultados indicaron que una concentración mayor al 1.25% de DMSO en el medio afectaba significativamente la viabilidad celular con respecto del control sin tratamiento (Figura 3.16B). Por lo que para los bioensayos se decidió utilizar una concentración menor a ésta. Los resultados obtenidos de la citometría de flujo de la etapa de estandarización se presentan en el Anexo VI.

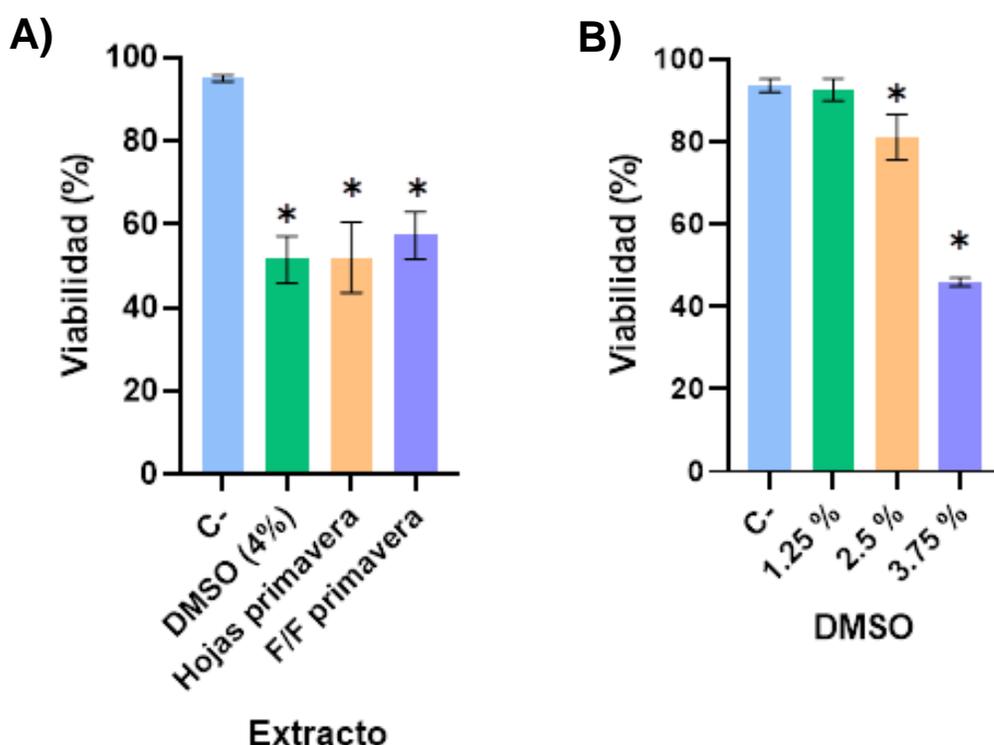


Figura 3.16 Estandarización de las condiciones de los bioensayos utilizando citometría de flujo. Viabilidad celular de la línea de leucemia mieloide crónica K-562. **A)** Interferencia de la coloración del extracto metanólico con el ensayo. **B)** Efecto de la concentración de dimetilsulfóxido (DMSO) en la viabilidad celular de K-562. Para la comparación entre los diferentes tratamientos y el control se realizó un ANOVA de una vía *post hoc* de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Los valores seguidos de asterisco (*) son significativamente diferentes del control sin tratamiento. * $p < 0.05$.

3.9 Actividad antiproliferativa de los extractos metanólicos de *P. wattii*

Para comprobar el efecto antiproliferativo de los extractos obtenidos, se sembró una concentración de 3×10^5 células de la línea K-562 en placas de cultivo celular de 12 pozos. Las células se incubaron con medio enriquecido con distintas concentraciones de los extractos a evaluar (62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$) y se incubaron por 48 h. Los resultados mostraron que sí hubo un efecto de los extractos en la línea K-562. Se encontró una disminución de la viabilidad celular en los extractos de las hojas de todas las estaciones analizadas en las concentraciones de 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$. El extracto de las hojas de verano presentó una disminución de la viabilidad con una concentración mínima de 125 $\mu\text{g/mL}$ y fue éste mismo el que obtuvo la mayor inhibición de la viabilidad celular ($50.85 \pm 4.68\%$). De igual manera, se obtuvo una disminución de la viabilidad celular ($60.99 \pm 3.00\%$) con el extracto de F/F de verano en su máxima concentración (500 $\mu\text{g/mL}$). El resto de los extractos analizados, F/F y los tallos de las distintas estaciones, no presentaron una diferencia significativa con respecto a los controles (Figuras 3.17-3.19). Los resultados obtenidos de la citometría de flujo se presentan en el Anexo VII.

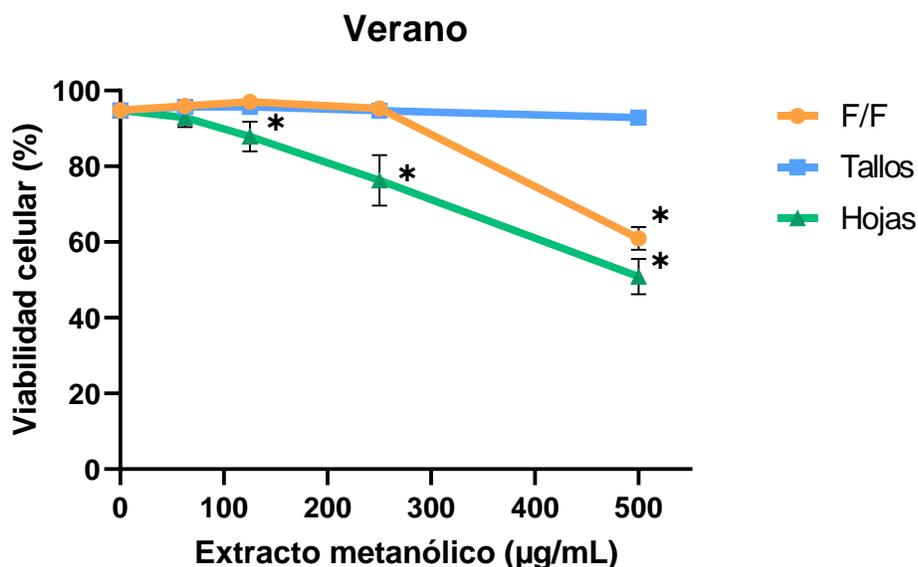


Figura 3.17 Efecto antiproliferativo de los extractos de verano de *P. wattii* en la línea celular K-562 utilizando citometría de flujo. Efecto antiproliferativo de los extractos de verano de las flores y frutos (F/F), tallos y hojas de *P. wattii* en la línea celular de leucemia mieloide crónica (K-562). Para la comparación entre los diferentes extractos se realizó un ANOVA de una vía *post hoc* de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Los valores seguidos de asterisco (*) son significativamente diferentes del control sin tratamiento. * $p < 0.05$.

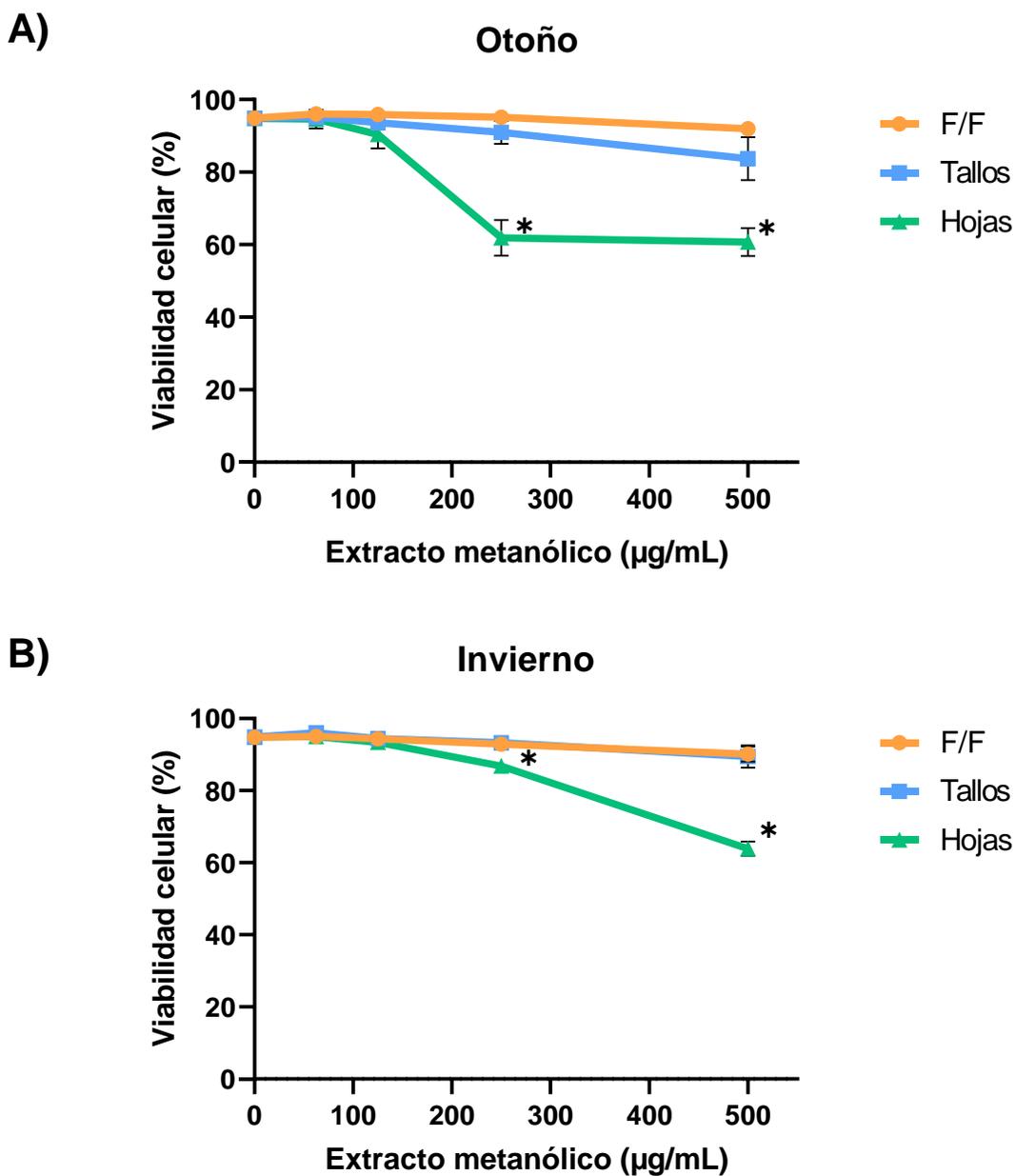


Figura 3.18 Efecto antiproliferativo de los diferentes extractos de *P. wattii* en la línea celular K-562 utilizando citometría de flujo. Efecto antiproliferativo de los extractos de A) otoño, B) invierno de las flores y frutos (F/F), tallos y hojas de *P. wattii* en la línea celular de leucemia mieloide crónica (K-562). Para la comparación entre los diferentes extractos se realizó un ANOVA de una vía *post hoc* de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Los valores seguidos de asterisco (*) son significativamente diferentes del control sin tratamiento. * $p < 0.05$.

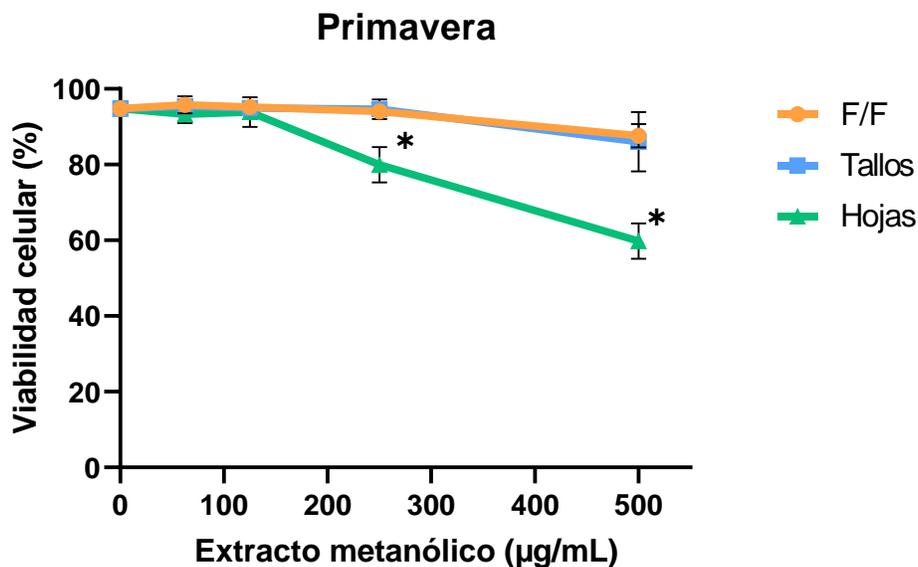


Figura 3.19 Efecto antiproliferativo de los extractos de primavera de *P. wattii* en la línea celular K-562 utilizando citometría de flujo. Efecto antiproliferativo de los extractos de primavera de las flores y frutos (F/F), tallos y hojas de *P. wattii* en la línea celular de leucemia mieloide crónica (K-562). Para la comparación entre los diferentes extractos se realizó un ANOVA de una vía *post hoc* de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Los valores seguidos de asterisco (*) son significativamente diferentes del control sin tratamiento. * $p < 0.05$.

3.10 Efecto antiproliferativo de los extractos metanólicos de *P. wattii* en CMSP

Conociendo el efecto de los extractos metanólicos de *P. wattii* en la línea cancerígena, ahora se comprobó su efecto en células normales. Para ello, se utilizaron células monocíticas de sangre periférica humana (CMSP). Se utilizó la máxima concentración de los extractos (500 µg/mL) de F/F de verano y de las hojas de todas las estaciones, los cuales mostraron tener un efecto en la línea celular cancerígena K-562. Las CMSP fueron incubadas en las mismas condiciones que las K-562. Como se ve en la Figura 3.20, se tuvo un efecto estadísticamente significativo en la viabilidad celular de las CMSP en los extractos de F/F de verano y en las hojas de las estaciones de verano, otoño e invierno, siendo el extracto de las hojas de verano el que obtuvo una mayor disminución de la viabilidad celular de CMSP (91.20%). El extracto de las hojas de primavera no tuvo una diferencia significativa con respecto del control sin tratamiento con una viabilidad celular de 97.53%. Los resultados de las citometrías de flujo de las CMSP se presentan en el Anexo VIII.

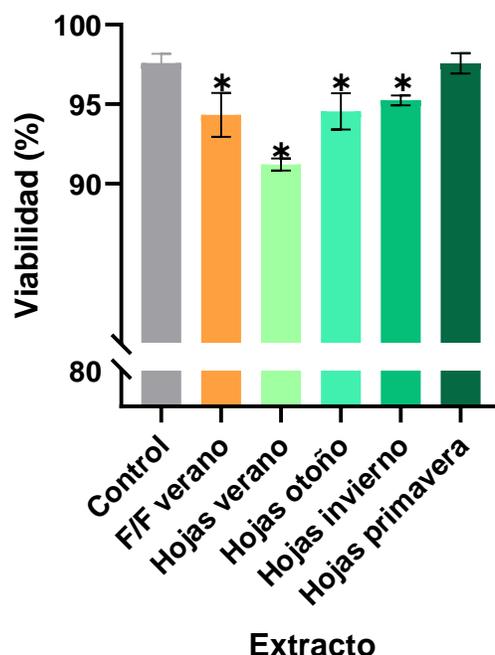


Figura 3.20 Efecto antiproliferativo de los extractos de *P. wattii* en CMSP utilizando citometría de flujo. Efecto antiproliferativo de los extractos de flores y frutos (F/F) y hojas de *P. wattii* (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en células monocíticas de sangre periférica humana (CMSP). Para la comparación entre los diferentes extractos se realizó un ANOVA de una vía *post hoc* de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Los valores seguidos de asterisco (*) son significativamente diferentes del control sin tratamiento. * $p < 0.05$.

Comparando los resultados obtenidos de la viabilidad de los extractos de *P. wattii* contra ambos tipos celulares, se puede observar que el extracto que tuvo la mayor actividad antiproliferativa para ambos casos fue el de las hojas de la estación de verano con una viabilidad de casi el 50% para las K-562 y del 91% para las CMSP (Tabla 3.5). El extracto que obtuvo la menor actividad antiproliferativa fue el de las hojas de invierno con un casi un 64% de viabilidad en el caso de las K-562 y en las CMSP fue el de las hojas de primavera el único extracto que no tuvo diferencia significativa con respecto al control sin tratamiento con una viabilidad del 97%. Se calculó el índice de selectividad (IS) de los extractos al dividir la viabilidad celular de CMSP entre la viabilidad de las células cancerígenas. Los mayores índices lo obtuvieron los extractos provenientes de las hojas de verano y de la primavera con 1.79 y 1.63, respectivamente. El menor IS lo obtuvo el extracto proveniente de las hojas de invierno con un valor de 1.49.

Tabla 3.5 Efecto antiproliferativo e índice de selectividad de los diferentes extractos de *P. wattii*.[†]

Extracto metanólico (500 µg/mL)	Viabilidad (%)	
	K-562	CMSP
F/F verano	60.99 ± 3.00*	94.31 ± 1.19*
Hojas verano	50.85 ± 4.68*	91.21 ± 0.32*
Hojas otoño	60.73 ± 3.81*	94.54 ± 0.98*
Hojas invierno	63.84 ± 2.04*	95.24 ± 0.27*
Hojas primavera	59.78 ± 4.67*	97.56 ± 0.55
Etopósido (IC₅₀ µg/mL)	98.01*	>200

[†] La información es presentada como la media ± desviación estándar (DE) (n = 4). Para la comparación entre los diferentes extractos se realizó un ANOVA de una vía *post hoc* de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Los valores seguidos de asterisco (*) son significativamente diferentes del control sin tratamiento. *p < 0.05. ** IS = % viabilidad del extracto (500 mg/mL) respectivo contra células monocíticas de sangre periférica humana (CMSP)/% viabilidad del extracto (500 mg/mL) respectivo contra la línea células de leucemia mieloide crónica (K-562).

3.11 Análisis de componente principales

Para poder relacionar los resultados de la variación estacional, las condiciones climáticas y la actividad antiproliferativa se decidió hacer un análisis multivariado. Se utilizó el software MetaboAnalyst V. 5.0 y se realizó un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés), ya que este análisis nos permite observar la magnitud de cómo las diferentes variables están relacionadas entre sí. Se realizó una matriz de datos incluyendo la actividad antiproliferativa de las células K-562 (AA); la concentración total de triterpenos (CT); la concentración de cada uno de los triterpenos identificados: betulina (BE), ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico (OX), ácido betulínico (ABI), ácido betulónico (ABO) y lupenona (LUP); las condiciones climáticas; temperatura (T); precipitación (LL); y periodo de luz (LU). Los resultados mostraron que el nivel de varianza con dos componentes en el análisis era de más del 85% y con tres componentes aumentaba hasta el 93% (Figura 3.21). La matriz de datos y la normalización de éstos utilizando el software se presentan en el Anexo IX.

El análisis de PCA nos muestra de una manera gráfica qué tan relacionadas están las variables en un grupo. En el plano, mientras gráficamente estén más cercanas las variables entre sí significa que tienen un nivel de correlación más alto que las que están alejadas de la misma. Analizando los dos primeros componentes (Figura 3.22), al dividir el plano en diferentes cuadrantes se puede observar que las variables BE y ABI tienen la menor relación al estar en

cuadrantes opuestos (IV y II, respectivamente) del resto de las variables agrupadas en el cuadrante I.

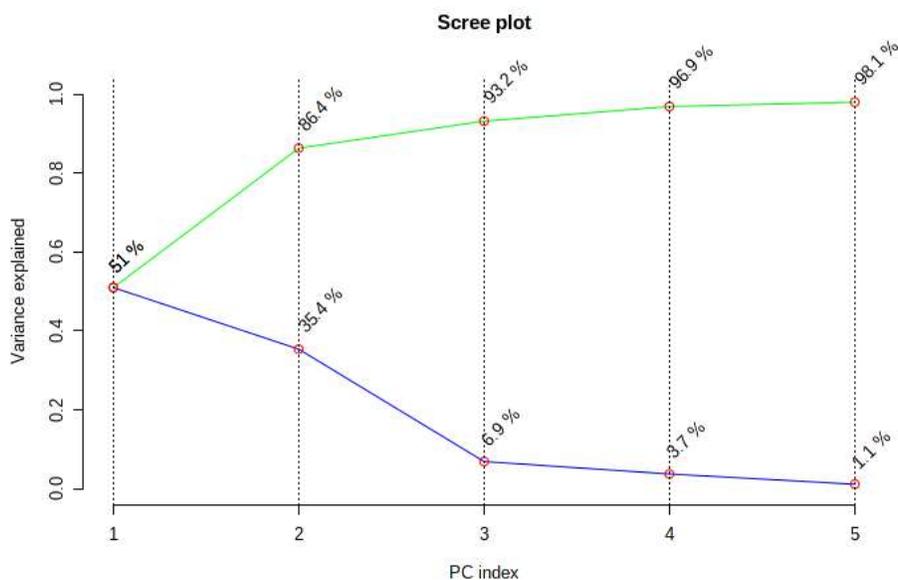


Figura 3.21 Proporción de varianza explicada como la proporción de varianza acumulada por cada componente principal.

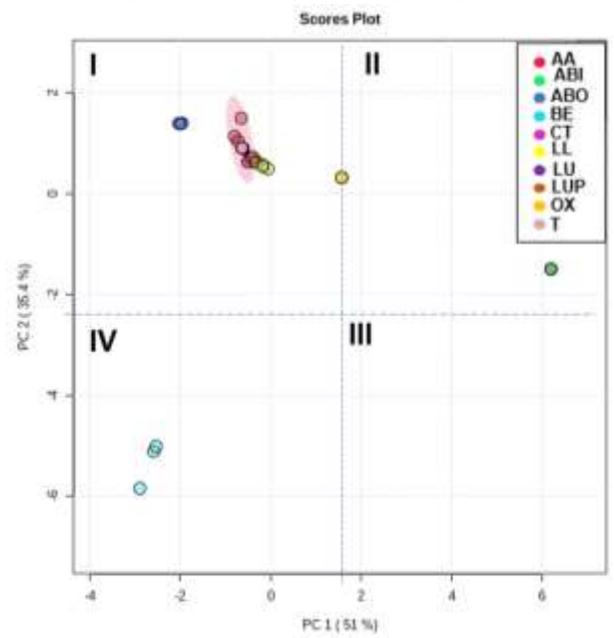


Figura 3.22 Plano bidireccional del análisis de componentes principales. Actividad antiproliferativa de las células K-562 (AA), la concentración total de triterpenos (CT), la concentración de cada uno de los triterpenos identificados; betulina (BE), ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico (OX), ácido betulínico (ABI), ácido betulónico (ABO) y

lupenona (LUP) y las condiciones climáticas: temperatura (T), precipitación (LL) y periodo de luz (LU).

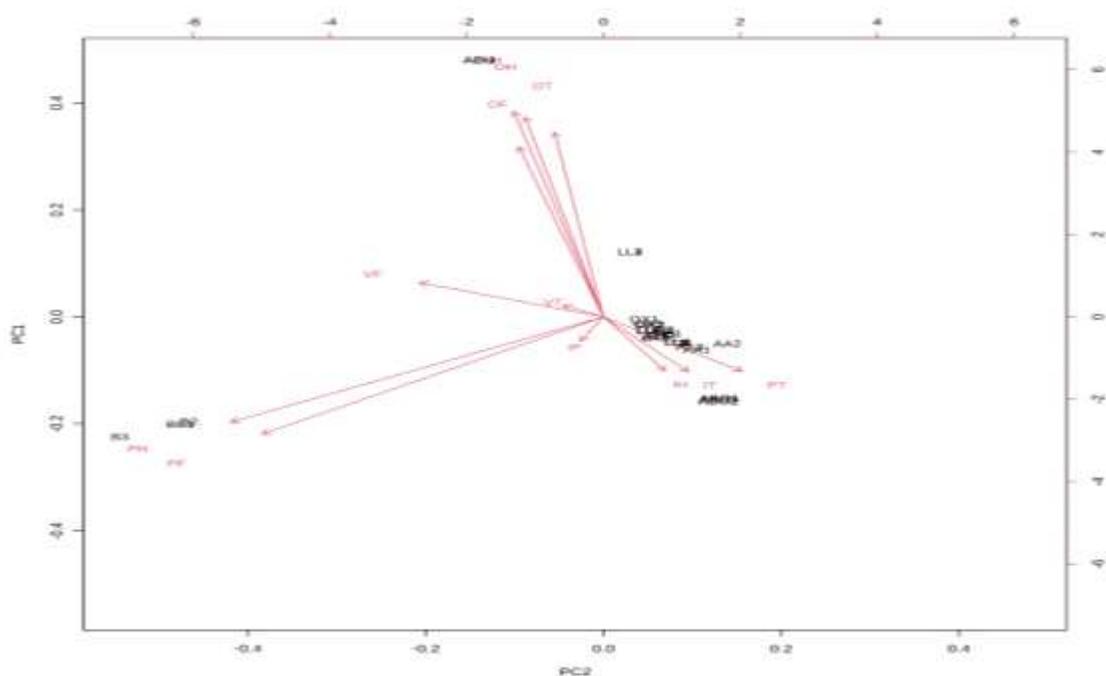


Figura 3.23 Plano bidireccional de los vectores del análisis de componentes principales. Grupos de las estaciones de verano (V), otoño (O), invierno (I) y primavera (P) y las flores y frutos (F), tallos (T) y hojas (H) de las diferentes muestras de *P. wattii*. Variables de actividad antiproliferativa de las células K-562 (AA), la concentración total de triterpenos (CT), la concentración de cada uno de los triterpenos identificados; betulina (BE), ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico (OX), ácido betulínico (ABI), ácido betulínico (ABO) y lupenona (LUP) y las condiciones climáticas: temperatura (T), precipitación (LL) y periodo de luz (LU).

Al continuar examinando el plano de la Figura 3.22, en el cuadrante I se puede observar que existe un grupo muy relacionado de variables entre sí excluyendo a ABO y LL. Al analizar el siguiente plano del análisis, se encontró cuatro distintas agrupaciones de los vectores. El primer grupo fue formado por los vectores que representan a las muestras de las hojas de verano (VH), flores y frutos de otoño (OF), tallos de otoño (OT) y hojas de otoño (OH). El segundo grupo fue formado por los tallos y las flores y frutos del verano (VF y VT, respectivamente). El siguiente grupo fue conformado por las hojas y las flores y frutos de la primavera (PH y PF, respectivamente). El último grupo se formó con las muestras de las hojas y tallos de la primavera (IH e IT, respectivamente) y por los tallos de la primavera. Fue en está

última agrupación donde se relacionó un mayor número de variables. Para analizar con más profundidad estos datos, se incorporó una componente más al PCA. Como podemos ver en la Figura 3.24, las variables que más se relacionaron del grupo fueron AA, T, LU y CT seguidas de LUP y OX. La interpretación de estos resultados nos indica que la actividad antiproliferativa de los extractos de *P. wattii* está altamente relacionada con la temperatura y el periodo de luz al cual fue sometida la planta al igual que a la producción total de triterpenos. De la misma manera, estos resultados indican que de los triterpenos analizados los que más probablemente tengan una influencia en la actividad antiproliferativa de K-562 sean la lupenona y el ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico.

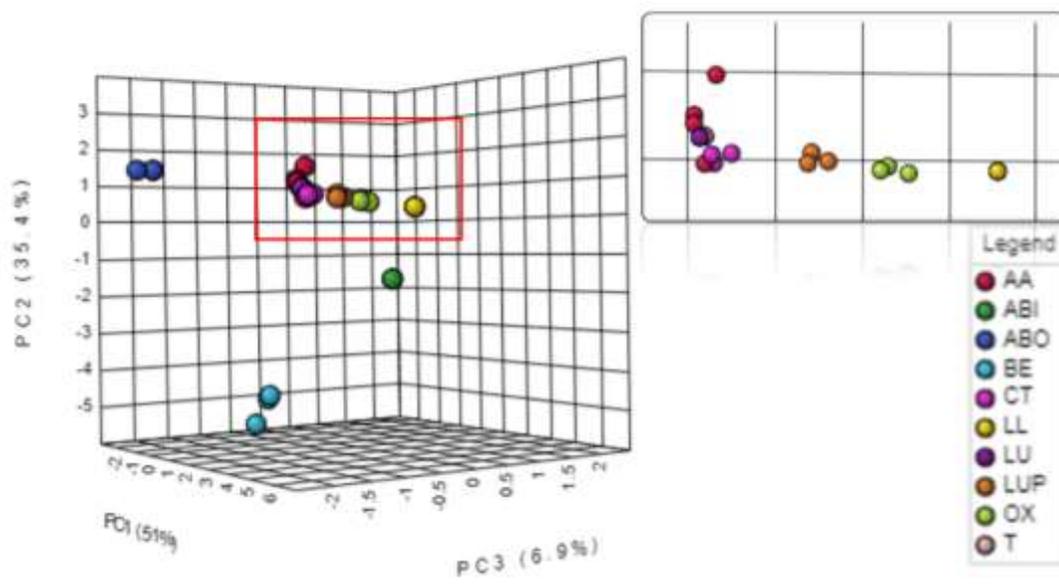


Figura 3.24 Plano tridimensional del análisis de componentes principales. Actividad antiproliferativa de las células K-562 (AA), la concentración total de triterpenos (CT), la concentración de cada uno de los triterpenos identificados: betulina (BE), ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico (OX), ácido betulínico (ABI), ácido betulónico (ABO) y lupenona (LUP) y las condiciones climáticas: temperatura (T), precipitación (LL) y periodo de luz (LU).

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

4.1 Variación estacional de los extractos de *Phoradendron wattii*

A pesar de la existencia de controles genéticos, la expresión génica y genotipos, el contenido total y la proporción relativa de metabolitos secundarios en las plantas pueden variar a través del tiempo y del espacio (variaciones estacionales y diarias, así como distinciones dentro de la misma planta y entre plantas de la misma especie) en diferentes niveles. La cantidad de metabolitos presentes en una planta dada puede ser influenciada por factores biológicos y ambientales, siendo los factores que más afectan la síntesis de metabolitos en las plantas las estaciones, el ritmo circadiano, desarrollo de la planta, fenología, temperatura, altitud, disponibilidad de agua, radiación UV, nutrientes, contaminación, estímulos mecánicos y ataques de herbívoros o patógenos (Moore *et al.*, 2014; Gouvea *et al.*, 2012; Valares-Masa, 2011).

Ante las variaciones del clima, se presenta una serie de cambios metabólicos en las plantas. De manera general, las plantas han desarrollado respuestas que les permiten tolerar diferentes niveles de déficit de agua y temperatura, que van desde un estrés hídrico leve, hasta aquellas que les permiten sobrevivir a temporadas de sequía prolongada. Éstas pueden ser respuestas a nivel morfológico, anatómico, celular y molecular que permiten a las plantas tolerar y adaptarse al estrés. Estas respuestas incluyen modificaciones en el crecimiento, el desarrollo del metabolismo C4 y CAM, cierre de estomas y cambios en la expresión de genes, incluyendo los que codifican proteínas potencialmente protectoras, enzimas clave en la vía de síntesis de osmolitos, enzimas antioxidantes y factores de transcripción que regulan la expresión de genes inducida por el estrés (Moreno, 2009).

Ante el estrés osmótico, aumenta la expresión de sintasas de triterpenos. Nasrollahi *et al.* (2014) reportaron el aumento de los niveles de expresión de la enzima escualeno sintasa debido al estrés hídrico, indicando un aumento en la síntesis de los precursores de triterpenos pentacíclicos y directamente aumentando la concentración de metabolitos secundarios en la planta. De igual manera, se encontró un incremento en los niveles de expresión de la enzima lupeol sintasa y otras enzimas involucradas en la síntesis de triterpenos al igual que el

contenido fitoquímico en *Glycyrrhiza glabra* bajo condiciones de aumento de temperatura y salinidad.

En este estudio, se encontró una variación estacional cualitativa y cuantitativa de la composición de metabolitos de los extractos metanólicos de *P. wattii*. Se presentó una marcada variación en la presencia y concentración de los diferentes triterpenos analizados. Las estaciones con más concentración de triterpenos resultaron ser el otoño y la primavera, aumentando significativamente la síntesis de ácido betulínico, lupenona y del ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico durante la primera estación y de betulina y del ácido betulónico durante la segunda.

Comparando ahora los resultados obtenidos de cada uno de los triterpenos identificados con lo reportado en estudios previos en *P. wattii*, García-Cámara (2013) pudo identificar la presencia de ácido betulínico en *Phoradendron vernicosum* (sinónimo de *P. wattii*) durante el otoño, aunque el rendimiento total y la proporción de éste fue diferente a lo obtenido (0.02 mg/g MS). Valencia-Chan (2018) pudo aislar los cinco triterpenos de tipo lupano presentados en este trabajo durante la estación de otoño, aunque de nuevo las cantidades que se obtuvieron variaron con este estudio.

Por otra parte, se ha investigado el efecto de los periodos de tiempo en la concentración de metabolitos activos en *P. wattii*, encontrándose un incremento en la concentración de betulina durante la canícula (julio) en comparación de las temporadas lluviosa (octubre) y seca (diciembre). De manera opuesta, se encontró una disminución de los ácidos 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico durante la misma estación en comparación con las estaciones seca y lluviosa, mientras que el ácido betulínico, betulónico y la lupenona reportaron un ligero aumento durante la temporada seca (Rangel-Méndez *et al.*, 2021).

En concordancia con el estudio anterior, en este proyecto, la betulina registró un aumento significativo en la primavera, estación con mayor temperatura y menor precipitación (15.66 mg/g MS), además que sólo pudo ser identificada durante este periodo, lo que podría indicar que este compuesto podría estar relacionado a procesos antioxidantes o como un metabolito producido en respuesta al estrés por la sequía. Por otra parte, se tuvo un gran aumento del doble de la concentración del ácido betulínico (15.34 mg/g MS) en la estación de otoño con respecto al verano. Tomando en cuenta que en otoño se registró una gran cantidad de lluvias atípicas, superando en más de cinco veces el promedio estatal, y que el verano es la estación

que históricamente posee la mayor cantidad de precipitación, nos indica que este metabolito es sintetizado en la planta al estar en una situación de abundancia o exceso de agua.

En otros trabajos se ha reportado ampliamente el cambio de las concentraciones de metabolitos secundarios a lo largo de las estaciones del año. Por ejemplo, se encontró variaciones en las concentraciones de diterpenos y de flavonoides en las hojas de *Cistus ladanifer*, presentando un aumento en la concentración de diterpenos durante el invierno, disminuyendo con el aumento de la temperatura, mientras que los flavonoides tuvieron su máximo en verano y disminuyendo junto con la baja en temperatura (Alías *et al.*, 2012). La concentración total de los triterpenos y de asiaticósido mostró un aumento en su concentración en *Centella asiatica* durante los meses de noviembre a abril, correspondiendo a la estación lluviosa y correlacionando este aumento a la cantidad de precipitación (Rahajanirina *et al.*, 2016).

Los resultados de las correlaciones entre la concentración de triterpenos y las condiciones climáticas junto con el análisis del PCA nos indican que, aunque sí hay una relación entre la concentración de estos metabolitos y la precipitación, las variables que más influyen en la síntesis de estos compuestos son la temperatura y la cantidad de luz solar recibida.

La luz solar está entre las señales más importantes para el desarrollo, crecimiento y metabolismo de las plantas. La luz ambiental es percibida por varios receptores controlando la respuesta de aclimatación para limitar o aprovechar los fotones de la luz, creando una red compleja que afecta la actividad fotosintética y la acumulación de varios metabolitos secundarios en las plantas (Neugart *et al.*, 2016; Joshi, 2015). Más de la mitad de la luz solar que llega a la tierra está compuesta por luz visible (400-700 nm) y el resto está compuesto por radiación electromagnética ultravioleta (10-400 nm) e infrarroja (700-1 mm) (Eichhorn-Bilodeau *et al.*, 2019). Se ha reportado que luz de longitudes de onda entre 500-650 nm y la luz ultravioleta pueden aumentar la concentración de carotenoides y flavonoides en varias especies de plantas (Thoma *et al.*, 2020).

Se ha demostrado que la temperatura juega un rol central en el metabolismo y el crecimiento de las plantas. En la planta de tabaco (*Nicotiana tabacum*), el aumento de la temperatura en las condiciones de cultivo se relacionó con una disminución en el crecimiento de las hojas y un aumento en la concentración del anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), disminuyendo de igual medida la concentración de clorofilas y aumentando la concentración de

carotenoides en las hojas de la planta (Yang *et al.*, 2018). De igual manera, la concentración de sesquiterpenos aumentó en el látex de las raíces de *Taraxacum officinale* durante la temporada de verano, correlacionando al aumento de la temperatura como la condición climática que más se relacionaba con el aumento de la concentración de estos metabolitos (Huang *et al.*, 2020).

Actualmente, la información obtenida de la investigación bibliográfica realizada en diversas bases de datos respecto a estudios químicos o biológicos de *P. wattii* es muy limitada, siendo éste el primer trabajo en hacer una distinción en el perfil metabolómico conforme a los diferentes órganos de la planta (F/F, tallos y hojas). En los resultados obtenidos se encontró que durante todo el año están presentes los distintos triterpenos analizados (betulina, ácido 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico, ácido betulínico, ácido betulónico y lupenona) en los diferentes órganos de *P. wattii*. Sin embargo, la distribución de éstos varía ampliamente. La mayor cantidad de triterpenos se encontró en las hojas, siendo los compuestos mayoritarios el ácido betulónico y el 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico (30 ± 3.71 y $29 \pm 1.49\%$, respectivamente), siendo más predominantes durante la primavera y el otoño.

La variación en las concentraciones de distintos metabolitos en diferentes partes de la misma planta está reportada en varias especies. Por ejemplo, la composición de sesquiterpenos en los aceites esenciales de *Lantana camara* varía ampliamente entre los órganos durante diferentes periodos, siendo la concentración de timol más alta durante el periodo de floración y fructificación. Además, se reportó que la concentración de este metabolito fue mayor en los aceites esenciales de los tallos, flores y frutos en comparación de los obtenidos a partir de las hojas (Fatimata *et al.*, 2020). Así mismo, se realizó el estudio fitoquímico de los extractos de las hojas, tallos, flores, frutos verdes y frutos maduros de *Vanilla planifolia* en diferentes condiciones de cultivo. Se encontró que la concentración total de triterpenos y de compuestos fenólicos fue mayor en los frutos verdes y beneficiados en comparación de los demás órganos de la planta. De la misma manera, se realizaron correlaciones con las condiciones climáticas, siendo la más significativa entre la elevación y el contenido de triterpenos (Ibarra-Cantun *et al.*, 2018).

4.2 Actividad biológica de los extractos de *P. wattii*

Se han reportado varias actividades biológicas de los extractos y de los metabolitos obtenidos de las diferentes especies del género *Phoradendron*. Los extractos acuosos de *P. bollanum*

mostraron actividad antimicrobiana y antimicótica al inhibir el crecimiento de *Clavibacter michiganenses* ($IC_{50} = 0.533 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$) y *Fusarium oxysporum* ($IC_{50} = 0.40 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$) (García-García *et al.*, 2021). De los extractos metanólicos y particiones orgánicas de las hojas de *P. piperoides* se reportó actividad antiinflamatoria, antioxidante y antinociceptiva *in vivo* (Vasconcellos *et al.*, 2009). De los extractos metanólicos de partes aéreas de *P. meliae* se reportó la actividad antiviral del coronavirus MHV-A59 ($IC_{50} = 13.0 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$) (Remali y Aizat, 2021).

Las diferentes especies de *Phoradendron* han mostrado una amplia actividad anticancerígena, antitumoral y citotóxica contra un amplio espectro de tipos y de líneas celulares de cáncer. La especie *P. serotinum* mostró un IC_{50} de $28 \mu\text{g/mL}$ y de $1.9 \mu\text{g/mL}$ frente a células tumorales de cáncer de mama MCF-7 y células epiteliales de ratón TC-1, respectivamente (Alonso-Castro *et al.*, 2012; Jacobo-Salcedo *et al.*, 2011). De igual manera, esta misma especie mostró actividad antitumoral en ratones, al administrarse el extracto acuoso, observándose una disminución del tumor TC-1 (Alonso-Castro *et al.*, 2012). Se evaluó la actividad citotóxica de los extractos obtenidos a partir de distintos disolventes procedentes de las hojas de *P. microphyllum* y *P. mucronatum* frente a distintas líneas celulares cancerígenas. Los extractos de hexano y acetato de etilo de *P. microphyllum* inhibieron el crecimiento de la línea celular de carcinoma de pulmón NCI-H292 (72.97%) y de la línea celular de carcinoma HEp-2 (87.53%). Los extractos hexánicos de *P. mucronatum* mostraron de igual manera un efecto inhibitorio en NCI-H292 (83.19%), HEp-2 (93.40%) y el extracto de diclorometano mostró una inhibición del crecimiento de la línea celular de cáncer de mama MCF-7(88.69%) (Bastos *et al.*, 2017).

La información bibliográfica correspondiente a la actividad biológica de la especie *P. wattii* es notablemente más restringida. García-Cámara (2013) reportó que el extracto metanólico procedente de las partes aéreas de *P. vernicosum* posee un $CC_{50} = 10.23 \pm 28.7 \mu\text{g/mL}$ en la línea celular de carcinoma humano KB. Valencia-Chan (2018), por su parte, reportó que el extracto metanólico de partes aéreas de *P. vernicosum* obtenido en otoño no posee actividad citotóxica frente a la línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa). En el estudio de Rangel-Méndez (2021) se evaluó la actividad citotóxica de los extractos de *P. wattii* colectados durante los periodos de lluvia, seco y de canícula de la península de Yucatán obteniendo un CC_{50} de 29 ± 1 , $1,023.3 \pm 1.5$ y $100.7 \pm 1.5 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

En el presente estudio se logró obtener un efecto antiproliferativo a partir de los $125 \mu\text{g/mL}$ en el extracto de las hojas de verano y a partir de $250 \mu\text{g/mL}$ en los extractos de las hojas de las

demás estaciones sobre la línea celular de leucemia mieloide crónica K-562. Aunque estos resultados clasifican a los extractos como no activos de acuerdo con el Instituto Nacional del Cáncer ($IC_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$, activo), a diferencia de los estudios anteriores, los resultados muestran que hay un efecto antiproliferativo de los extractos de las hojas contra las células K-562 durante todo el año. Los metabolitos predominantes en los extractos de las hojas fueron el ácido betulínico, el ácido 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico y la betulina. Adicionalmente, los resultados del PCA revelaron que el ácido 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico y la lupenona podrían ser responsables de la actividad antiproliferativa de los extractos.

El ácido betulínico se ha evaluado frente a numerosas líneas cancerígenas, mostrando una actividad citotóxica frente a las líneas celulares de melanoma (MEL-1, $CC_{50} = 2.4 \mu\text{M}$; MEL-2, $CC_{50} = 4.4 \mu\text{M}$ y MEL-3, $CC_{50} = 10.5 \mu\text{M}$), carcinoma de ovario (A2780, $IC_{50} = 3.9 \mu\text{M}$), leucemia (K-562, $IC_{50} = 21.9 \mu\text{M}$ y U937, $IC_{50} = 10 \mu\text{M}$), carcinoma en cabeza y cuello (HNSCC, $IC_{50} = 17.5 \mu\text{M}$) y células de cáncer de pulmón (H460, $IC_{50} = 3.3 \mu\text{M}$), cáncer de mama (T47D, $IC_{50} = 1.1 \mu\text{g/mL}$ y MCF-7, $IC_{50} = 9.8 \mu\text{g/mL}$), carcinoma de tiroides (FTC238, $IC_{50} = 2.4 \mu\text{g/mL}$), de pancreas (EPP85-181P, $IC_{50} = 7.4 \mu\text{M}$ y EPP85-181RDB, $IC_{50} = 7.9 \text{ Mm}$), por mencionar algunos. Sin embargo, su actividad biológica en contra de las células cancerígenas se ha reportado en más de 50 líneas celulares distintas (Hordyjewsk *et al.*, 2019; Saeed-Mohamed *et al.*, 2018; Abdel-Bar *et al.*, 2009; Fulda, 2008; Kessler *et al.*, 2007). El ácido betulínico ha demostrado inducir la apoptosis mediante la activación de caspasas, cambios en el potencial de membrana mitocondrial, aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno e inhibir la proliferación de topoisomerasas (Hordyjewsk *et al.*, 2019; Fulda, 2008).

En lo que corresponde a la betulina, se ha reportado su actividad en distintas líneas de cáncer: cáncer cervicouterino (HeLa, $CC_{50} = 22.6 \mu\text{M}$), cáncer hepático (HepG2, $CC_{50} = 2059.0 \mu\text{M}$ y SK-HEP-1, $CC_{50} = 131.4 \mu\text{M}$), cáncer de pulmón (A549, $CC_{50} = 35.5 \mu\text{M}$ y NCI-H460, $CC_{50} = 63.5 \mu\text{M}$), cáncer de mama (MCF-7, $CC_{50} = 30.7 \mu\text{M}$ y T47D, $IC_{50} = 2.3 \mu\text{g/mL}$), cáncer de próstata (PC3, $CC_{50} = 83.0 \mu\text{M}$), leucemia (K-562, $CC_{50} = 14.5 \mu\text{M}$; HL60, $CC_{50} = 14.7 \mu\text{M}$; CCRF/CEM, $IC_{50} = 8.3 \mu\text{g/mL}$ y U937, $CC_{50} = 14.2 \mu\text{M}$), melanoma (G31, $CC_{50} = 12.2 \mu\text{M}$ y MEL-28, $CC_{50} = 16.0 \mu\text{M}$), neuroblastoma (GOTO, $CC_{50} = 17.2 \mu\text{M}$ y NB-1, $CC_{50} = 16.0 \mu\text{M}$), meduloblastoma ($IC_{50} = 2.4 \mu\text{g/mL}$), carcinoma (A549, $IC_{50} = 1.96 \mu\text{g/mL}$), adenocarcinoma gástrico (EPG85-257P, $IC_{50} = 8.3 \mu\text{g/mL}$) (Hordyjewsk *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2010; Hata *et al.*, 2003). Diferentes estudios en las líneas celulares A549, Jurkat y Hela tratadas con betulina, indican que ésta está involucrada en la activación de la apoptosis por la vía intrínseca,

mediante la activación secuencial de la caspasa-9, caspasas 3 y 7 y la escisión de polimerasas PARP (Poli ADP ribosa polimerasa) (Hordyjewsk *et al.*, 2019).

Existe muy limitada bibliografía sobre la actividad citotóxica y antiproliferativa de la lupenona, entre las cuales se ha reportado la actividad en la línea celular de cáncer de colon (HT-29, con una $CC_{50} > 70 \mu\text{M}$), cáncer de próstata (PC-3 y LNCaP con una $IC_{50} > 70 \mu\text{M}$), Hela ($IC_{50} = 7.3 \mu\text{M}$), KB ($IC_{50} = 7.2 \mu\text{M}$), MCF-7 ($IC_{50} = 9.1 \mu\text{M}$), A-549 ($IC_{50} = 7.1 \mu\text{M}$) (Castro *et al.*, 2019; Bednarczyk-Cwynar *et al.*, 2016; Ahmad *et al.*, 2015).

En lo referente a los estudios realizado en *P. wattii*, a continuación, se presentan los resultados de la actividad citotóxica de los distintos metabolitos que tuvieron una actividad en cada una de las líneas celulares. García-Cámara (2014) reportó actividad del ácido betulínico en las líneas celulares Hek-293 ($CC_{50} = 80.0 \mu\text{M}$), SiHa ($CC_{50} = 38.8 \mu\text{M}$), KB ($CC_{50} = 15.6 \mu\text{M}$), MCF-7 ($CC_{50} = 56.6 \mu\text{M}$) y Hep-2 ($CC_{50} = 48.2 \mu\text{M}$). Chan-Valencia (2018) reportó la actividad citotóxica de distintos metabolitos de *P. wattii*, como el ácido betulínico: Hela ($CC_{50} = 32.6 \mu\text{M}$), SiHa ($CC_{50} = 28.9 \mu\text{M}$), MCF-7 ($CC_{50} = 49.6 \mu\text{M}$), MDA ($CC_{50} = 94.3 \mu\text{M}$) y Vero ($CC_{50} = 38.1 \mu\text{M}$); betulina: Du-145 ($CC_{50} = 161.8 \mu\text{M}$); ácido 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico: Hela ($CC_{50} = 182.2 \mu\text{M}$), SiHa ($CC_{50} = 92.2 \mu\text{M}$), MDA ($CC_{50} = 105.8 \mu\text{M}$); lupenona: Vero ($CC_{50} > 588.8 \mu\text{M}$). Y, finalmente, los resultados de la actividad citotóxica de los compuestos obtenidos por Rangel-Mendez (2021): ácido betulínico: HeLa ($CC_{50} = 7.12 \mu\text{g/mL}$), Hek-293 ($CC_{50} = 36.54 \mu\text{g/mL}$); ácido 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico: Hela ($CC_{50} = 88.61 \mu\text{g/mL}$) y lupenona: Hela ($CC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$).

Como se puede ver en los resultados anteriores, los tres metabolitos que tuvieron la mayor actividad fueron el ácido betulínico, el ácido 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico y la betulina, los cuales corresponden con los metabolitos mayoritarios en los extractos que obtuvieron la mayor actividad antiproliferativa en el presente trabajo.

4.3 Discusión general

Phoradendron wattii ha demostrado ser una fuente de metabolitos con actividad biológica prometedora contra varias líneas celulares cancerígenas. Sin embargo, al hacer la comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los estudios previos, resulta

evidente que hay una variación entre ellos. En este trabajo se demostró que la variación estacional de las condiciones climáticas juega un papel esencial en la presencia y concentración de los triterpenos pentacíclicos analizados y por lo tanto en la actividad biológica de los diferentes extractos procedentes de estas colectas. Aunque se tuvieron condiciones atípicas durante algunas estaciones incluidas en este estudio, lo cual influyó los resultados obtenidos, si la variación estacional explicara completamente la concentración de triterpenos, entonces en las estaciones con condiciones similares se debería de obtener resultados parecidos, lo cual no ocurrió, por lo que debe de haber otras variables que estén afectando a estos procesos que expliquen estas diferencias. Una de las principales diferencias fue la manera en que se colectó el material.

En este estudio se utilizó un solo ejemplar para todas las colectas, mientras que en los demás se utilizó un conjunto de plantas procedentes de una zona o varias. Esto supone dos explicaciones más a los resultados obtenidos; la primera es que no se alcanzó la cantidad de biomasa total para poder que en conjunto se logre tener una cantidad apreciable del compuesto (aunque se logró detectar 0.005 mg/g MS de betulina). La segunda, y la más interesante, está dada por la misma naturaleza de la planta. Hay que recordar que *P. wattii* es una planta hemiparasita, por lo que está íntimamente relacionada con su huésped. Hay un gran número de estudios que ligan la síntesis de metabolitos del huésped con la síntesis del hospedero. Por ejemplo, en *Viscum album*, una planta hemiparasita de la misma familia del género *Phoradendron*, se reportó que la concentración de triterpenos presentes en la planta varía con el cambio de las condiciones climáticas y además varía con respecto a la especie que parasita (Wójciak-Kosior *et al.*, 2016). Se estudió el contenido total de compuestos fenólicos en *P. californicum*, en sus distintos huéspedes en diferentes zonas geográficas. Se encontró que el contenido de flavonoides era mayor en *P. californicum* y ésto se pudo correlacionar con su huésped, indicando que hay una absorción de estos compuestos desde el hospedero al huésped (Assanga *et al.*, 2020). Aún más, está bien documentado que *P. leucarpum* exhibe una preferencia hacia una pequeña cantidad de especies de huéspedes para parasitar entre un grupo en una localidad donde se presenta un gran número de especies potencialmente huéspedes (Randle *et al.*, 2018). Observando estos reportes en plantas de su misma familia, no es de extrañarse que *P. wattii* pudiera haber adoptado alguna de estas estrategias, explicando de esta manera la variación de los resultados obtenidos.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

1. Se pudo identificar y cuantificar un total de cinco triterpenos: betulina, ácido betulínico, ácido betulónico, ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico y lupenona en los distintos extractos metanólicos de *P. wattii*.
2. La concentración y la presencia de triterpenos pentacíclicos de tipo lupano en los extractos metanólicos de *P. wattii* varían en función de la estación del año y del órgano de la planta del cual fue obtenido, siendo los extractos de las hojas de las estaciones de otoño y primavera los que más rendimiento tuvieron y teniendo como los metabolitos mayoritarios el ácido betulínico, el ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico y la betulina.
3. La temperatura y el periodo de luz fueron las variables climáticas que están más relacionadas con la variación en la síntesis de triterpenos pentacíclicos de tipo lupano en *P. wattii*.
4. Los diferentes extractos obtenidos de *P. wattii* mostraron una actividad antiproliferativa en la línea celular de leucemia mieloide crónica K-562, siendo el extracto procedente de las hojas de la estación de verano el que mayor actividad tuvo. De la misma manera, los extractos tuvieron de un leve a un nulo efecto en la viabilidad de las células normales a la misma concentración utilizada.
5. Las diferencias entre los resultados obtenidos con respecto a los de los estudios previos indican que, además de la variación estacional, hay otras variables que alteran la síntesis y la concentración de triterpenos pentacíclicos en *P. wattii*.

5.2 Perspectivas

1. Continuar con el análisis de los extractos de las estaciones de años futuros para comprobar si hay una tendencia en el perfil fitoquímico de *P. wattii*.
2. Realizar el análisis de la variación estacional utilizando plantas individuales de diferentes locaciones.
3. Realizar el análisis comparativo del perfil fitoquímico de *P. wattii* con respecto a sus diferentes hospederos.

ANEXOS

Anexo I. Rendimientos del pretratamiento del material vegetal y la obtención de los extractos metanólicos

Tabla A1.1 Rendimiento del pretratamiento del material vegetal.

Código	Parte de la planta	Fecha de recolección colecta	Peso del material vegetal (g)			Rendimiento del proceso
			Antes secado	Secado	Secado y molido	%
H1	Frutos	jul-20	11.9	11.3	11.30	95
H2	Tallos	jul-20	26.8	25.2	24.30	91
H3	Hojas	jul-20	56	53.2	51.50	92
G1	Frutos	oct-20	11.4	10	10.00	88
G2	Tallos	oct-20	28.1	24.5	23.30	83
G3	Hojas	oct-20	76.8	72.3	70.00	91
K1	Frutos	ene-21	47.2	46	46	97
K2	Tallos	ene-21	38.7	35.2	33.7	87
K3	Hojas	ene-21	26.3	24.3	23.1	88
N1	Frutos	abr-21	24.5	22.9	22.9	93
N2	Tallos	abr-21	70.8	66.8	64.6	91
N3	Hojas	abr-21	66.7	63.9	62.4	94

Tabla A1.2. Rendimiento de la obtención del extracto metanólico.

Extracto	Parte planta	Mat. Vegetal (g)	Frasco (g)	Extracto líquido y frasco (g)	Extracto y frasco (g)	Extracto (g)	Extracto/Mat. Vegetal (%)
H1	Frutos	11.3	67.8	85.2	69.4	1.6	14
H2	Tallos	24.3	68.7	87.1	72.6	3.9	16
H3	Hojas	51.5	68.9	83.5	78.7	9.8	19
G1	Frutos	10	68.4	82.3	69.5	1.1	11
G2	Tallos	23.3	70.1	95.6	72.9	2.8	12
G3	Hojas	70	70.2	97.8	80.7	10.5	15
K1	Frutos	46	69.8	87.1	71.6	1.8	4
K2	Tallos	33.7	69.2	88.4	71.3	2.1	6
K3	Hojas	23.1	67.85	88.6	70.05	2.2	9
N1	Frutos	22.9	72.6	82.4	75.5	2.9	13
N2	Tallos	64.6	71.5	84.1	77.9	6.4	10
N3	Hojas	62.4	72.5	85.4	81.4	8.9	14

Anexo II. Cromatogramas de CLAE-FR de los estándares utilizados

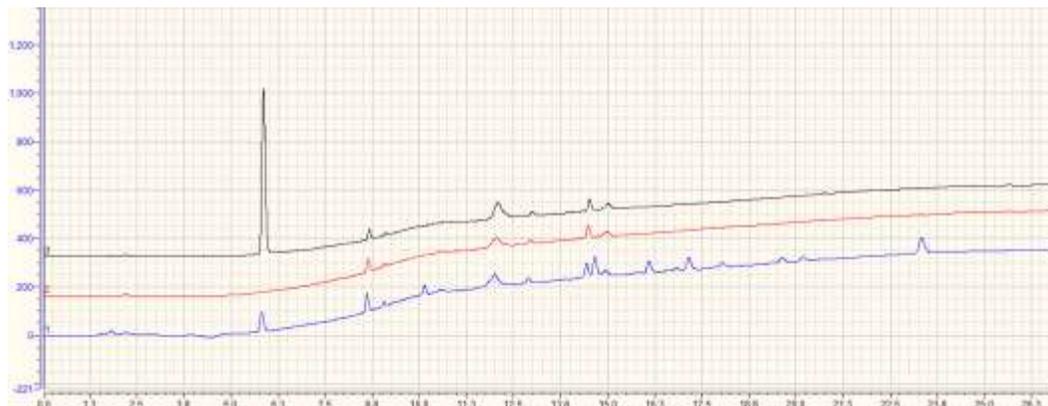


Figura A2.1 Cromatograma de CLAE-FR de la cafeína. Mezcla de estándares (azul). Metanol (rojo). Cafeína 0.7 mg/mL (negro).

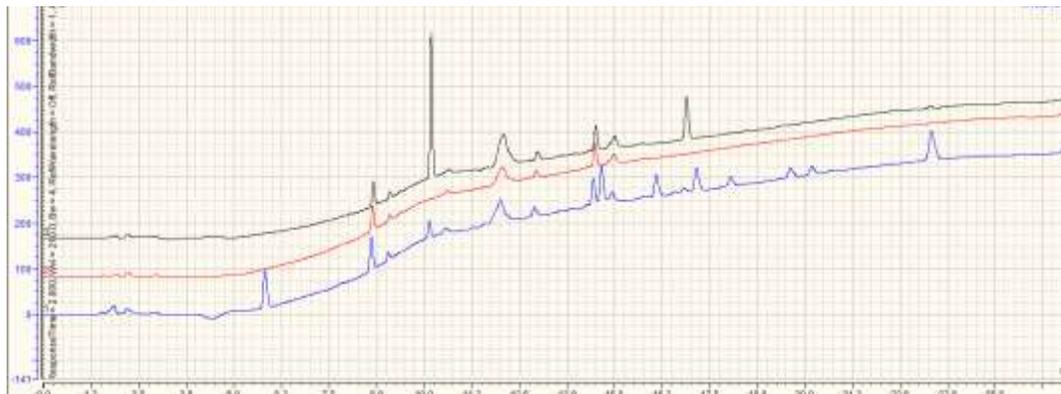


Figura A2.2 Cromatograma de CLAE-FR de la betulina. Mezcla de estándares (azul). Metanol (rojo). Betulina 0.7 mg/mL (negro).

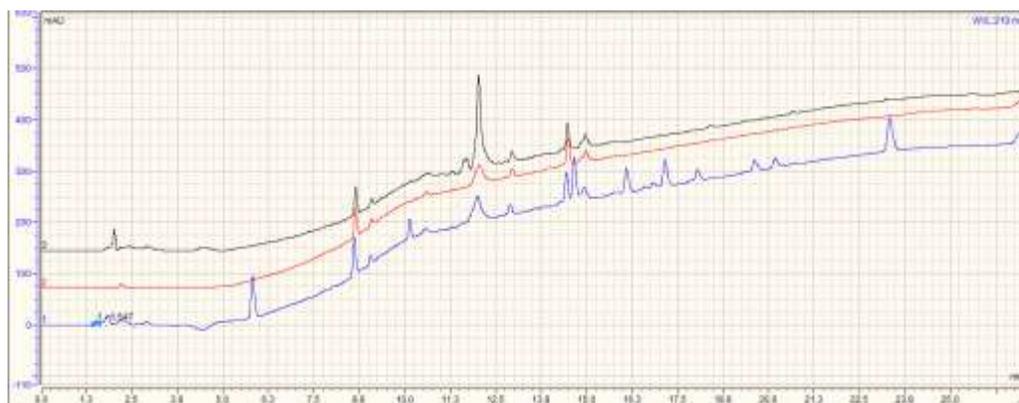


Figura A2.3 Cromatograma de CLAE-FR del ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico. Mezcla de estándares (azul). Metanol (rojo). Ácido 3 α ,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico 0.7 mg/mL (negro).

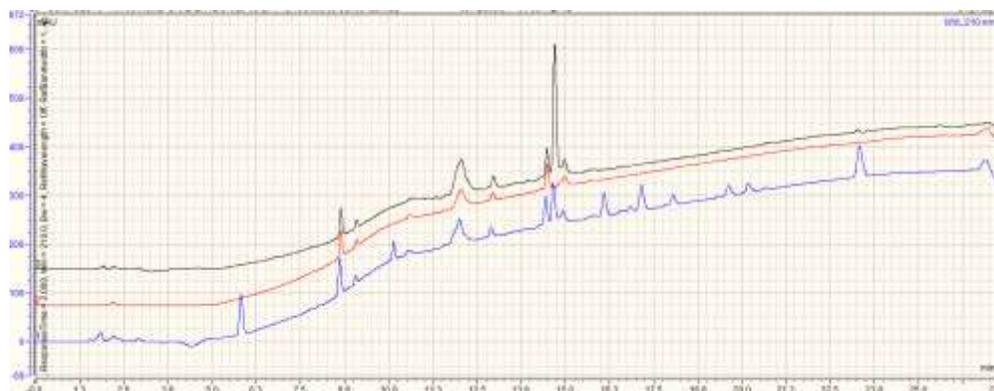


Figura A2.4 Cromatograma de CLAE-FR del ácido 3 α ,23-dihroxilup-20(29)-en-28-oico. Mezcla de estándares (**azul**). Metanol (**rojo**). Ácido 3 α ,23-dihroxilup-20(29)-en-28-oico 0.7 mg/mL (**negro**).

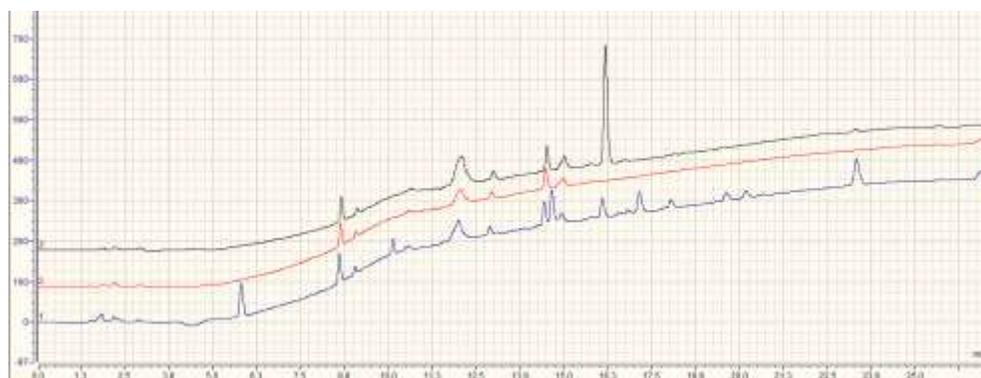


Figura A2.5 Cromatograma de CLAE-FR del ácido 3-*epi*-betulínico. Mezcla de estándares (**azul**). Metanol (**rojo**). Ácido 3-*epi*-betulínico 0.7 mg/mL (**negro**).



Figura A2.6 Cromatograma de CLAE-FR del ácido betulínico. Mezcla de estándares (**azul**). Metanol (**rojo**). Ácido betulínico 0.7 mg/mL (**negro**).

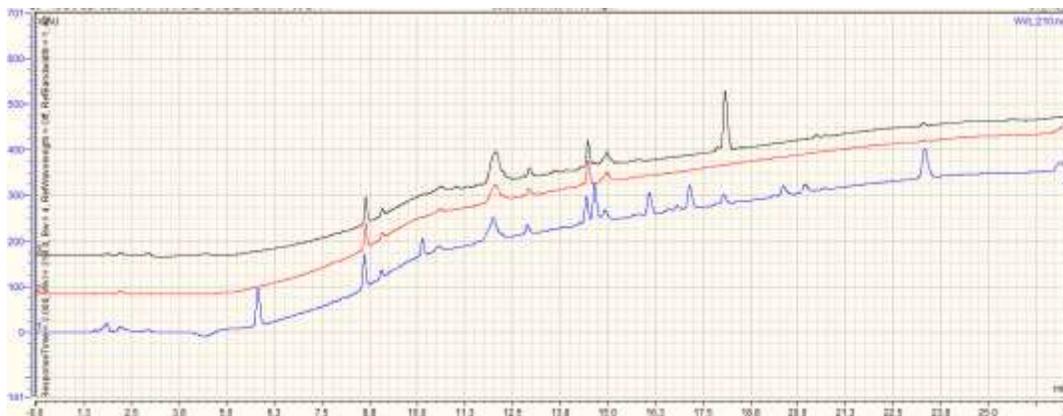


Figura A2.7 Cromatograma de CLAE-FR del ácido betulónico. Mezcla de estándares (azul). Metanol (rojo). Ácido betulónico 0.7 mg/mL (negro).



Figura A2.8 Cromatograma de CLAE-FR de 28-O-acetilbetulona. Mezcla de estándares (azul). Metanol (rojo). 28-O-acetilbetulona. 0.7 mg/mL (negro).

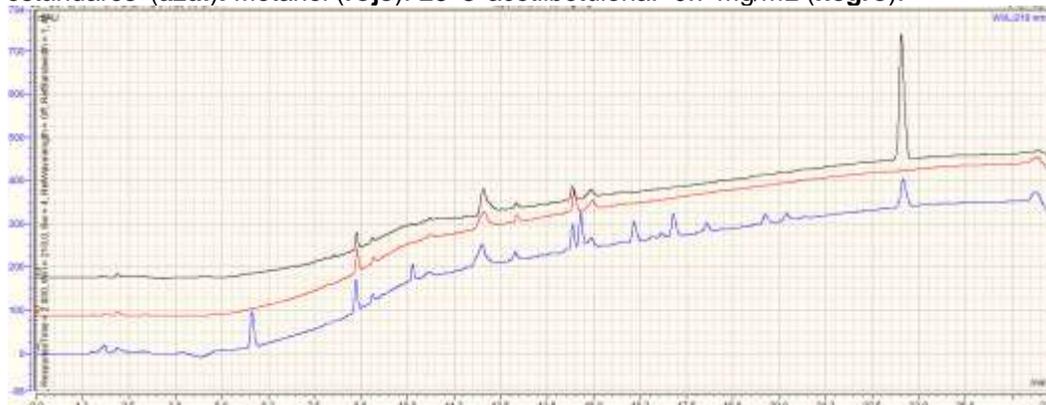


Figura A2.9 Cromatograma de CLAE-FR de lupenona. Mezcla de estándares (azul). Metanol (rojo). Lupenona 0.7 mg/mL (negro).

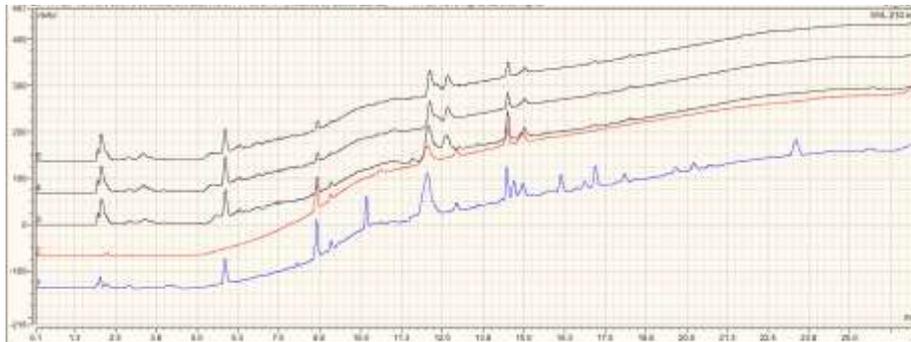
Anexo III. Cromatogramas de CLAE-FR de los extractos metanólicos de las diferentes colectas de *P. wattii*

Figura A3.1 Cromatograma de CLAE-FR metanólico de F/F de la colecta de julio 2020 de *P. wattii*. Mezcla de estándares (**azul**). Metanol (**rojo**). Repeticiones de la muestra (**negro**).

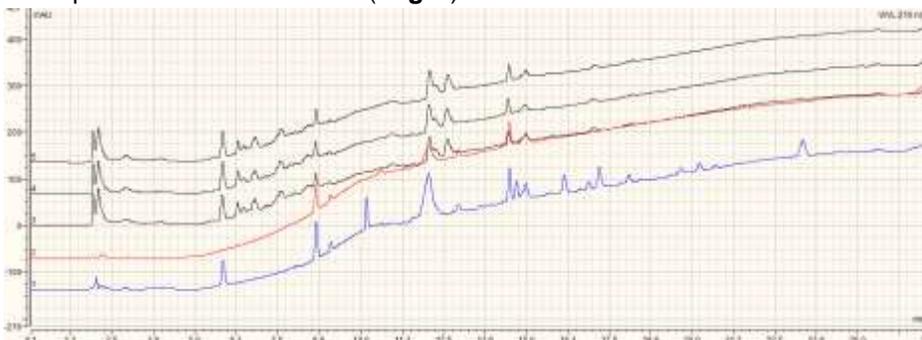


Figura A3.2 Cromatograma de CLAE-FR del extracto metanólico de tallos de la colecta de julio 2020 de *P. wattii*. Mezcla de estándares (**azul**). Metanol (**rojo**). Repeticiones de la muestra (**negro**).

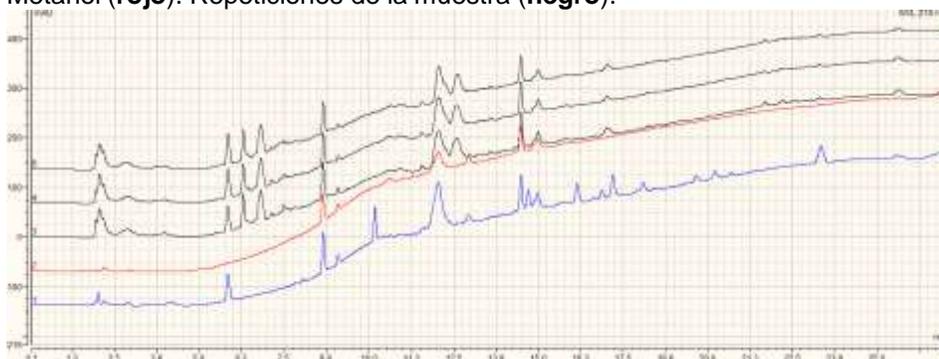


Figura A3.3 Cromatograma de CLAE-FR del extracto metanólico de hojas de la colecta de julio 2020 de *P. wattii*. Mezcla de estándares (**azul**). Metanol (**rojo**). Repeticiones de la muestra (**negro**).

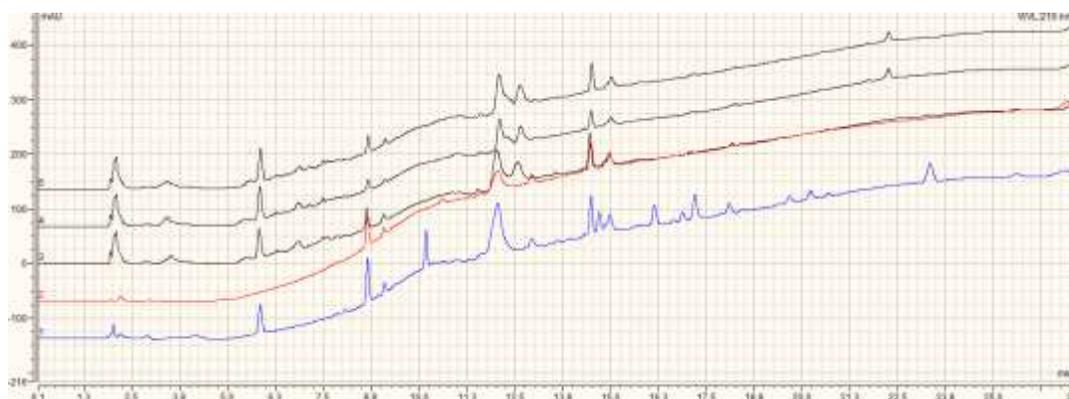


Figura A3.4 Cromatograma de CLAE-FR del extracto metanólico de F/F de la colecta de octubre 2020 de *P. wattii*. Mezcla de estándares (azul). Metanol (rojo). Repeticiones de la muestra (negro).

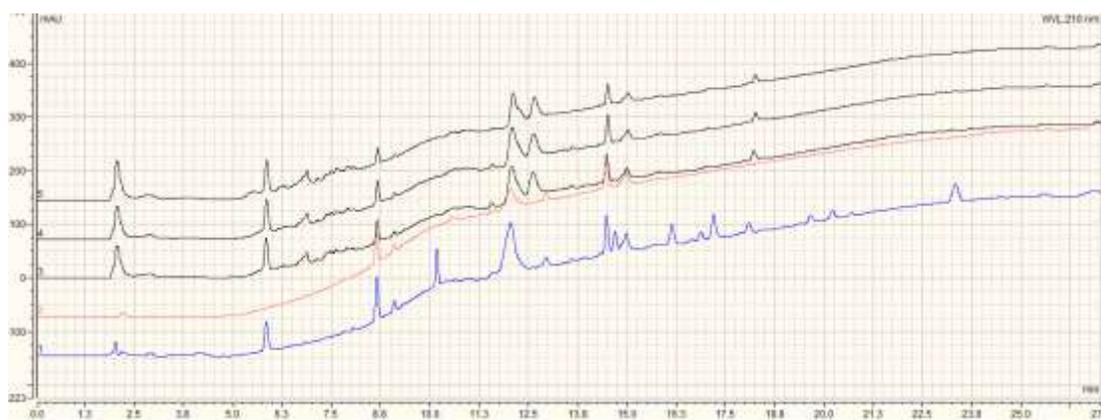


Figura A3.5 Cromatograma de CLAE-FR del extracto metanólico de F/F de la colecta de enero 2021 de *P. wattii*. Mezcla de estándares (azul). Metanol (rojo). Repeticiones de la muestra (negro).

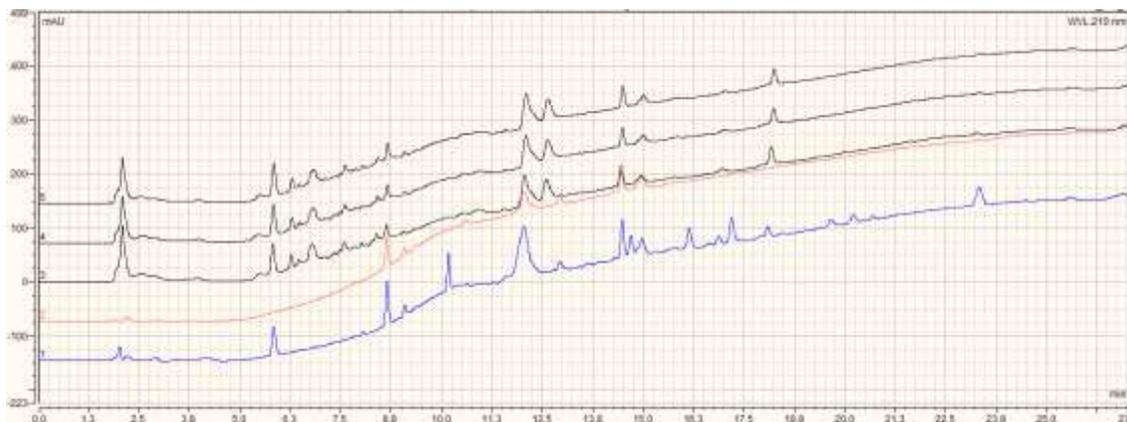


Figura A3.6 Cromatograma de CLAE-FR del extracto metanólico de tallos de la colecta de enero 2021 de *P. wattii*. Mezcla de estándares (azul). Metanol (rojo). Repeticiones de la muestra (negro).

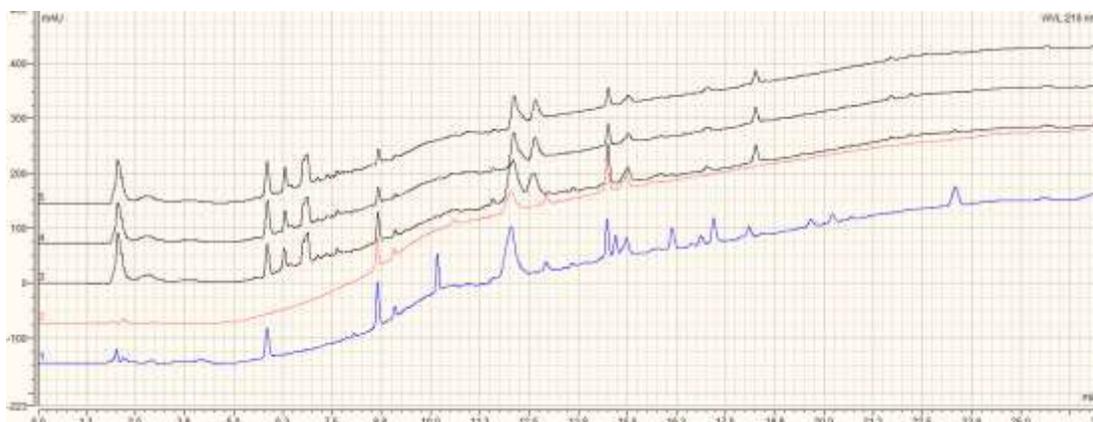


Figura A3.7 Cromatograma de CLAE-FR del extracto metanólico de hojas de enero 2021 de *P. wattii*. Mezcla de estándares (azul). Metanol (rojo). Repeticiones de la muestra (negro).

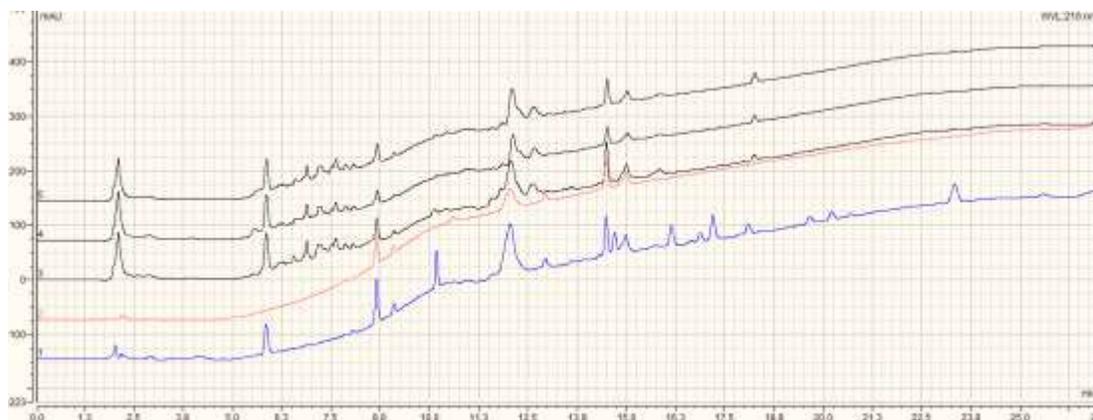


Figura A3.8 Cromatograma de CLAE-FR del extracto metanólico de F/F de abril 2021 de *P. wattii*. Mezcla de estándares (azul). Metanol (rojo). Repeticiones de la muestra.

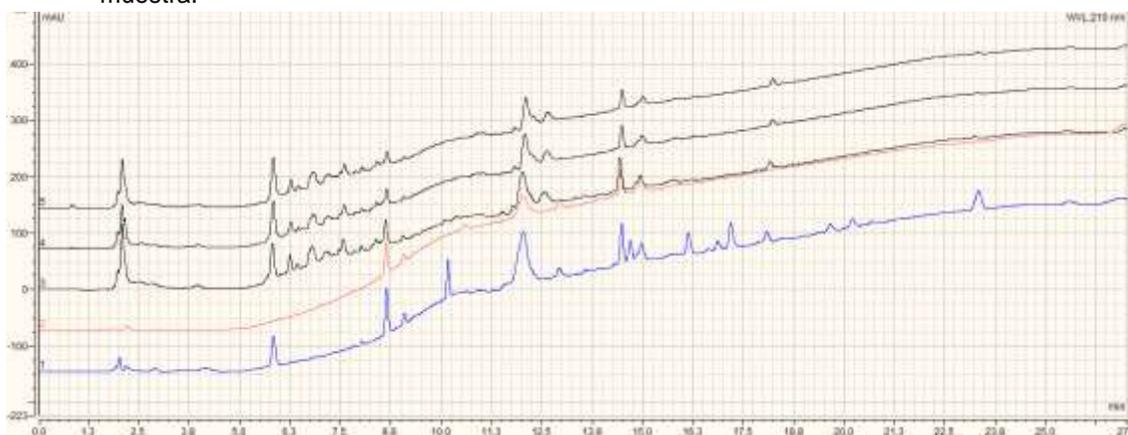


Figura A3.9 Cromatograma de CLAE-FR del extracto metanólico de tallos de abril 2021 de *P. wattii*. Mezcla de estándares (azul). Metanol (rojo). Repeticiones de la muestra (negro).

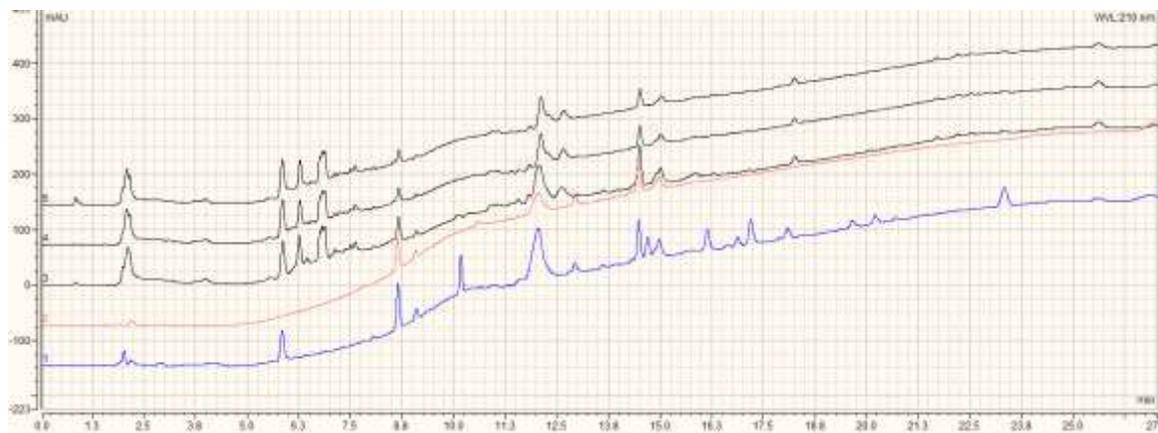


Figura A3.10 Cromatograma de CLAE-FR del extracto metanólico de hojas de abril 2021 de *P. wattii*. Mezcla de estándares (**azul**), Metanol (**rojo**), Repeticiones de la muestra (**negro**).

Anexo IV. Curvas estándar de los compuestos identificados

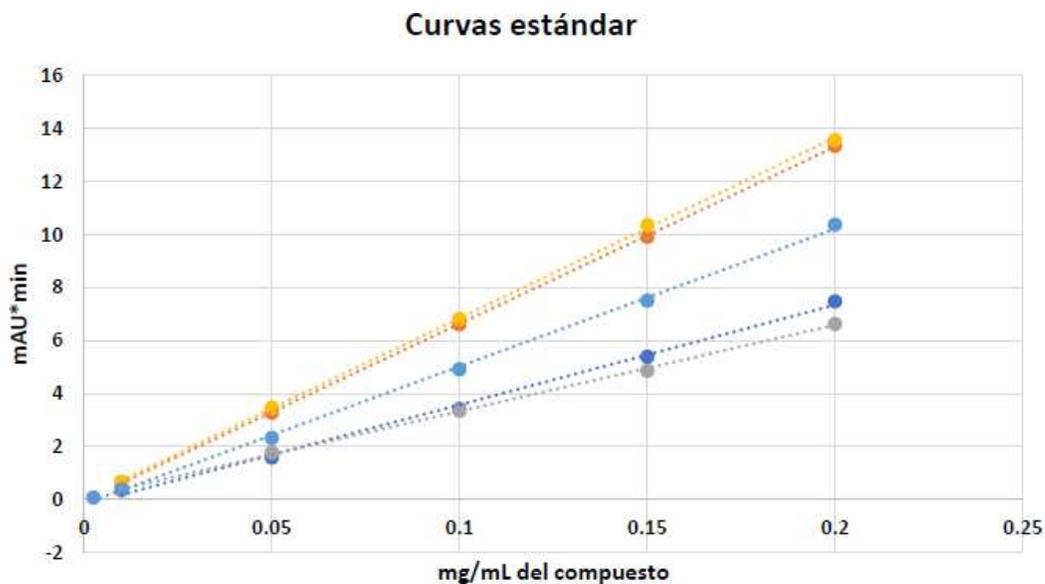


Figura A4.1. Curvas estándar de los metabolitos analizados. Curvas estándar de los diferentes triterpenos analizados. Betulina (gris), ácido betulínico (naranja), ácido betulónico (morado), lupenona (azul) y ácido 3a,23-dihidroxi-30-oxolup-20(29)-en-28-oico (amarillo).

Anexo V. Condiciones climáticas de Sierra Papacal

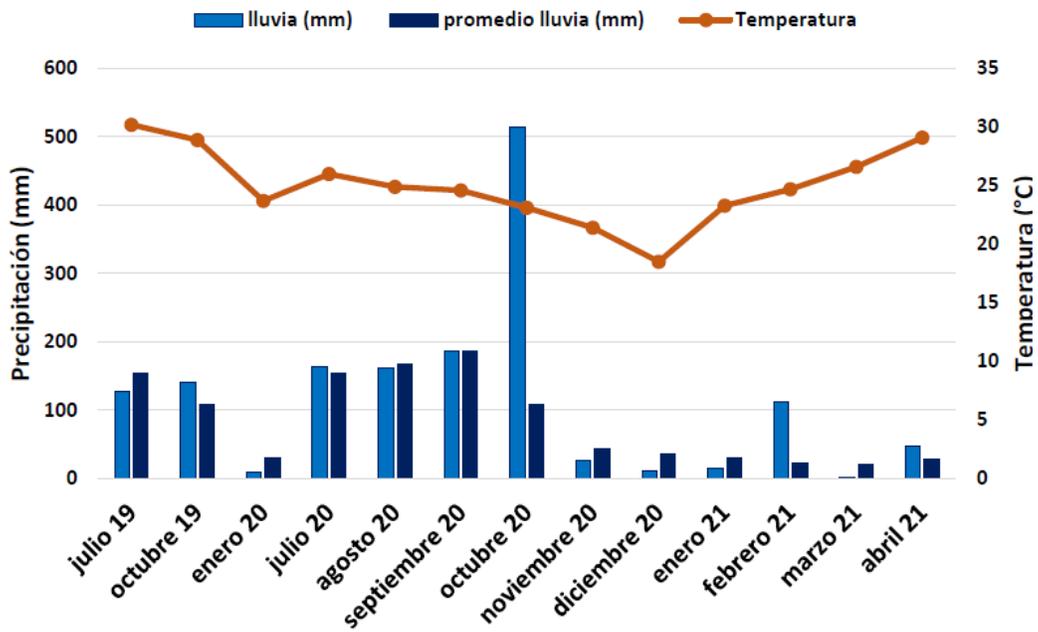
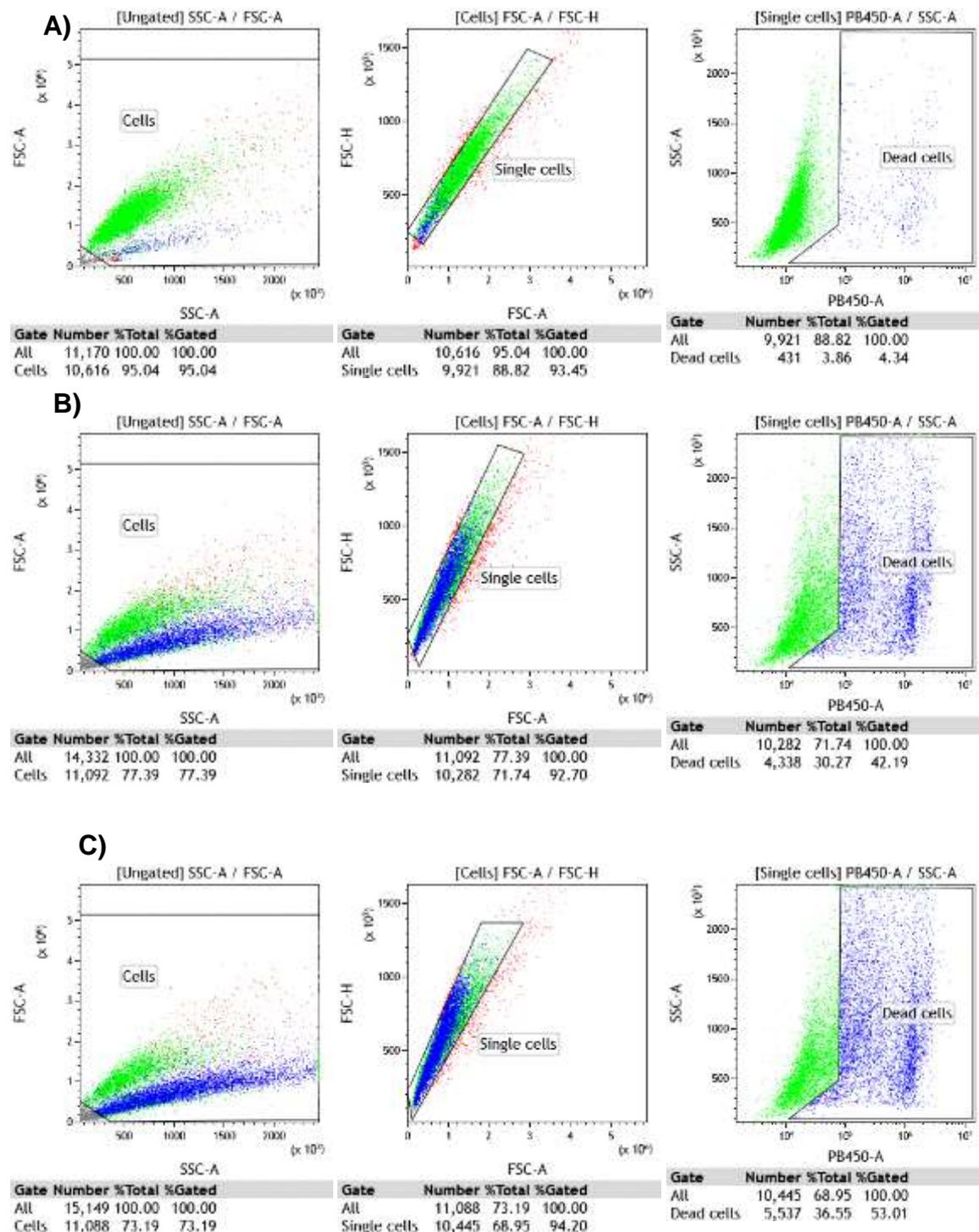


Figura A5.1. Condiciones climatológicas registradas. Condiciones climatológicas registradas en la zona de Sierra-Papacal durante el periodo de estudio.

Anexo VI. Resultados de la citometría de flujo para la estandarización de las condiciones del bioensayo



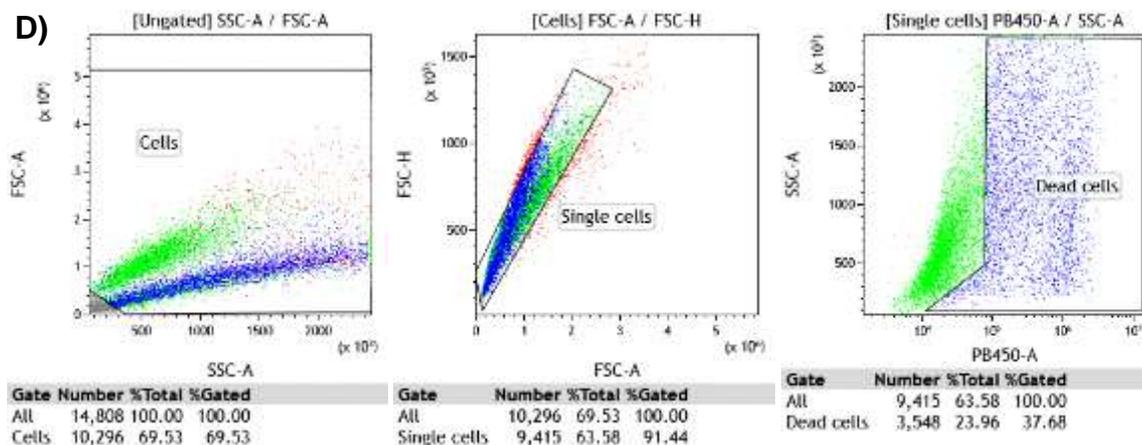


Figura A6.1 Interferencia del extracto en el bioensayo de actividad antiproliferativa. Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo. **A)** Células con DAPI, **B)** Células con DMSO 4%, **C)** Extracto de las hojas de primavera (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y **D)** Extracto de flores y frutos de primavera (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

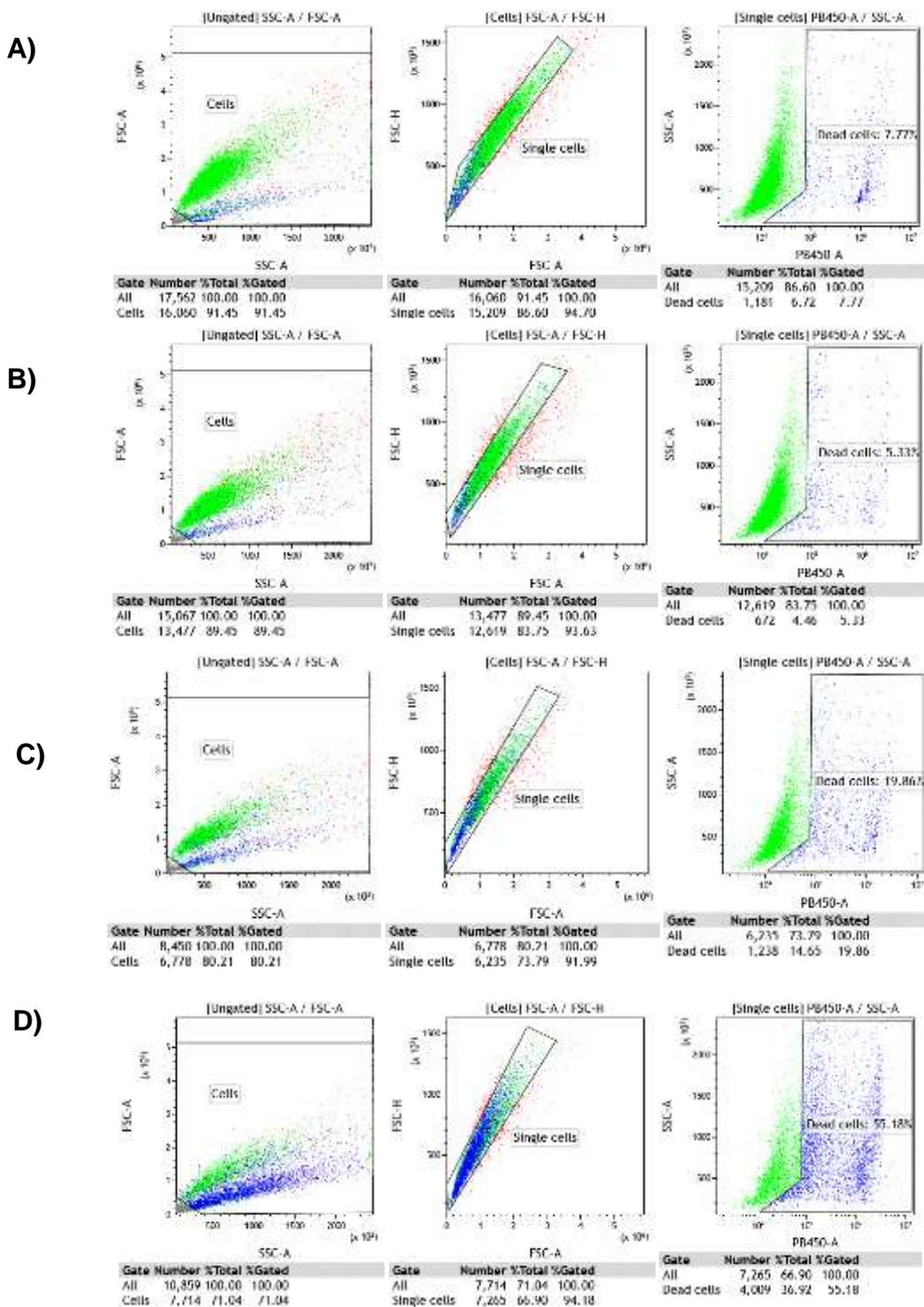
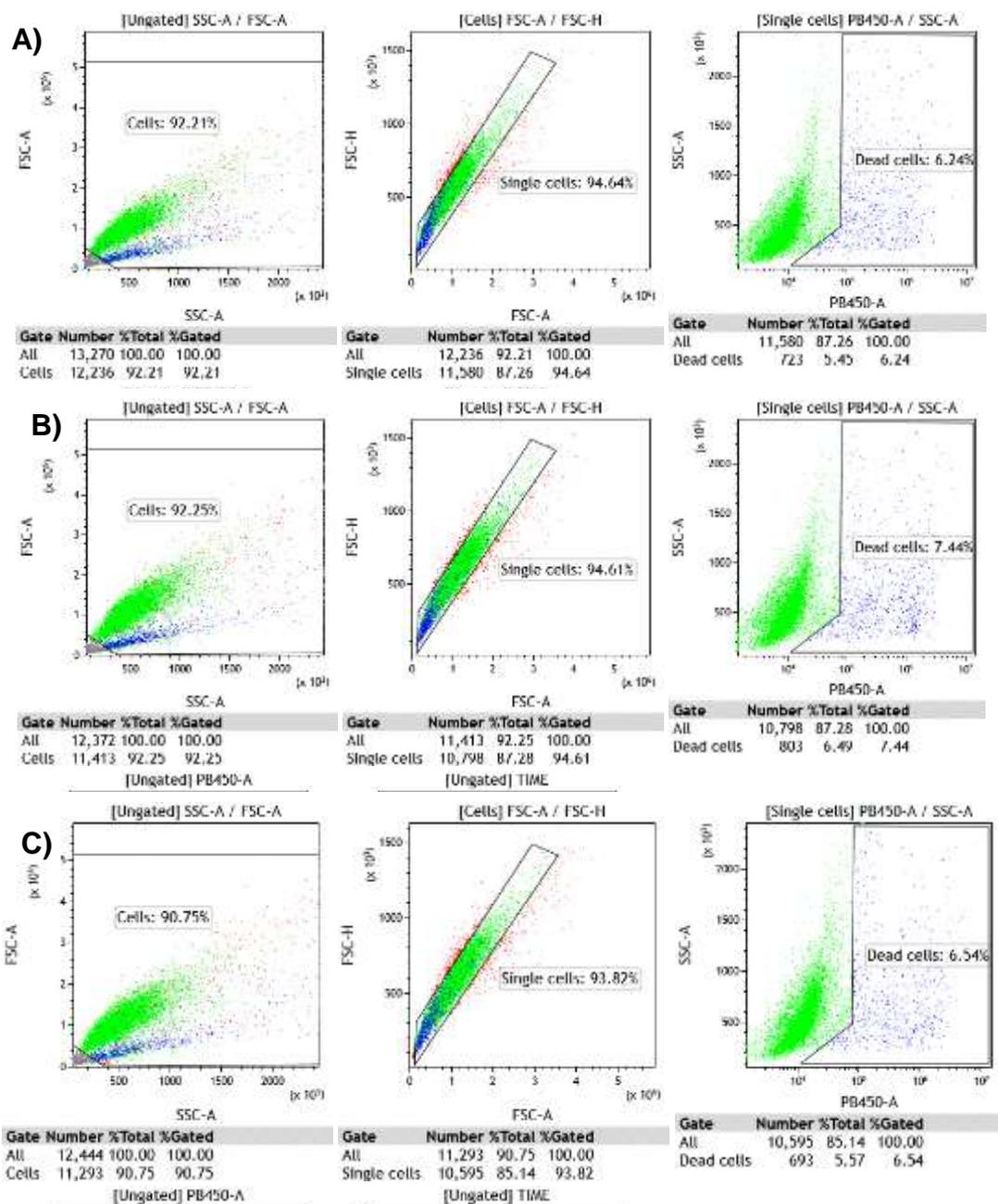


Figura A6.2 Efecto de la concentración del DMSO en el bioensayo de actividad antiproliferativa. Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo. **A)** Células control, **B)** 1.25% DMSO, **C)** 2.5% de DMSO y **D)** 3.75% de DMSO.

Anexo VII. Actividad antiproliferativa de los extractos metanólicos de *P. watti* en la línea celular K-562



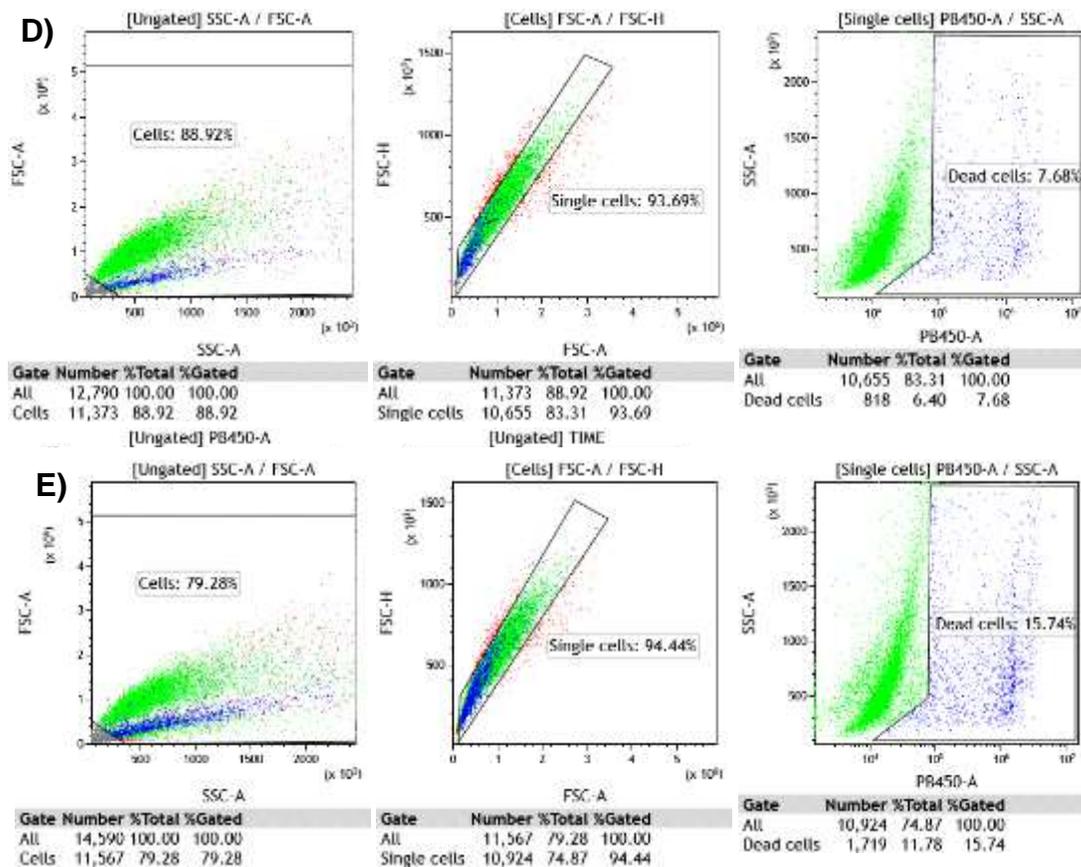


Figura A7.1 Actividad antiproliferativa de los extractos de primavera de *P. watti*. Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de flores y frutos de primavera obtenido de *P. watti*. **A)** Control 1% DMSO, **B)** 62.5 µg/mL, **C)** 125 µg/mL, **C)** 125 µg/mL, **D)** 250 µg/mL, **E)** 500 µg/mL.

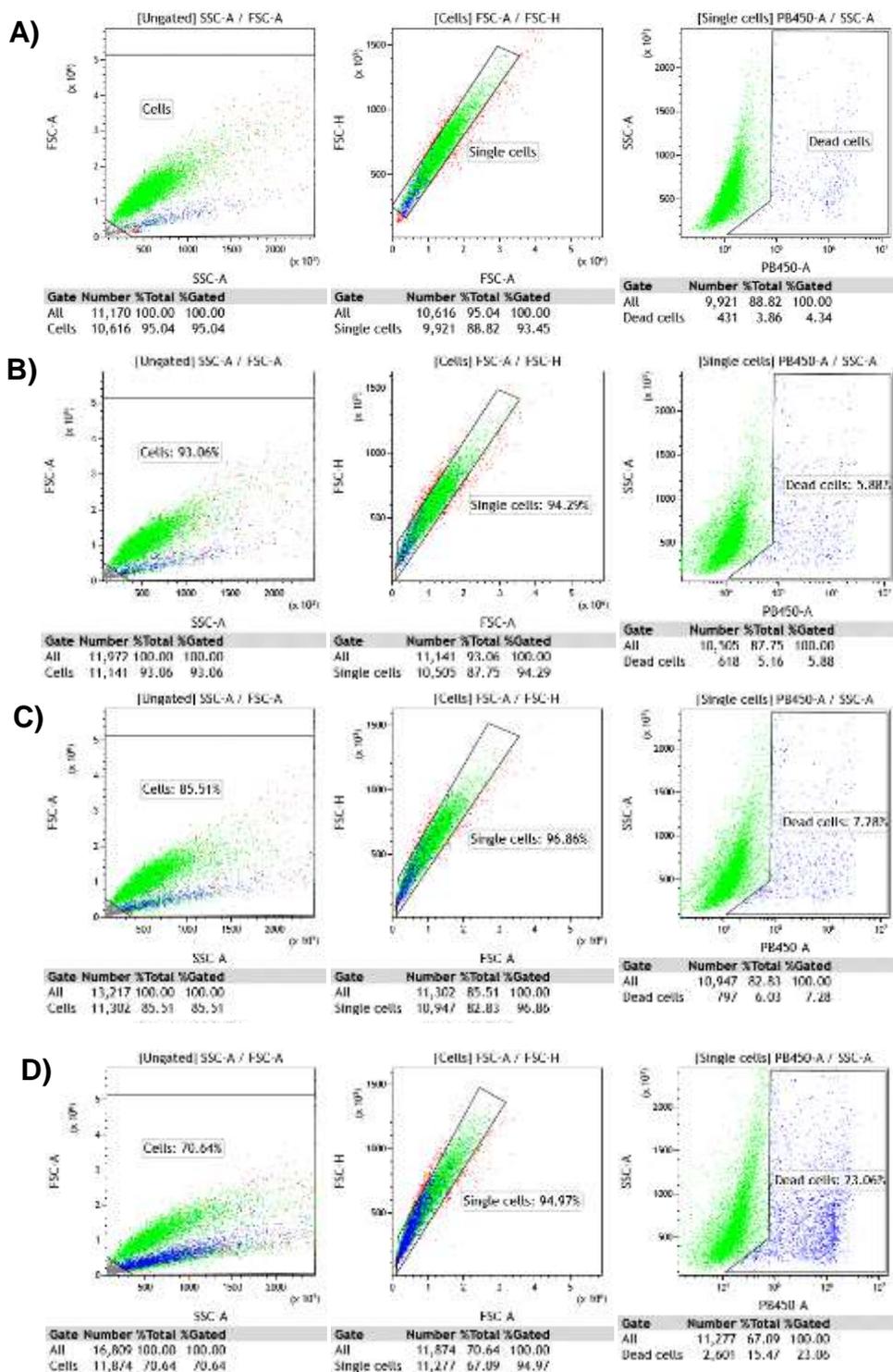


Figura A7.2 Actividad antiproliferativa de los extractos de primavera de *P. watti*. Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de tallos de primavera obtenido de *P. watti*. **A)** 62.5 µg/mL, **B)** 125 µg/mL, **C)** 250 µg/mL, **D)** 500 µg/mL.

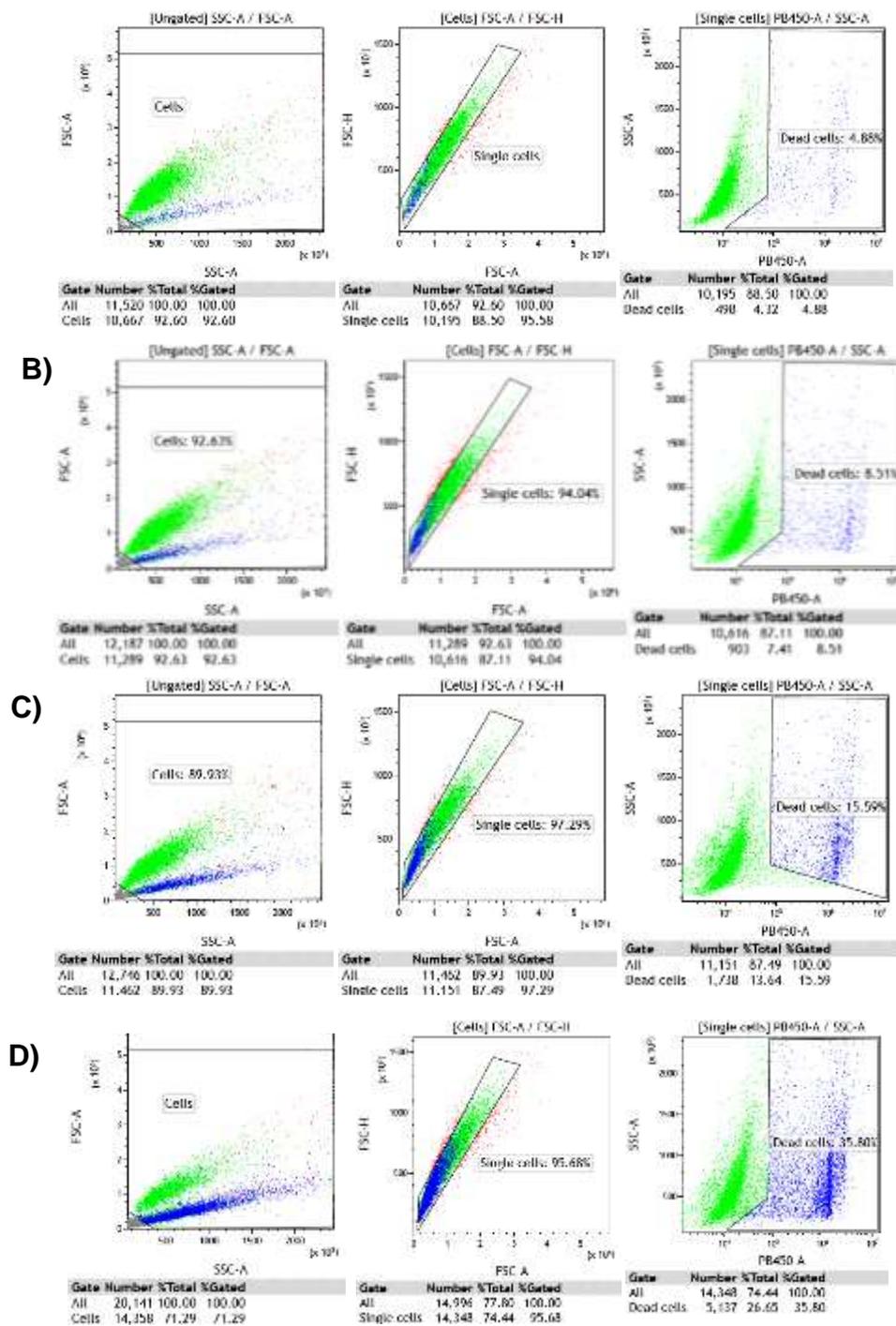


Figura A7.3 Actividad antiproliferativa de los extractos de primavera de *P. watti*. Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de hojas de primavera obtenido de *P. watti*. **A)** 62.5 µg/mL, **B)** 125 µg/mL, **C)** 250 µg/mL, **D)** 500 µg/mL.

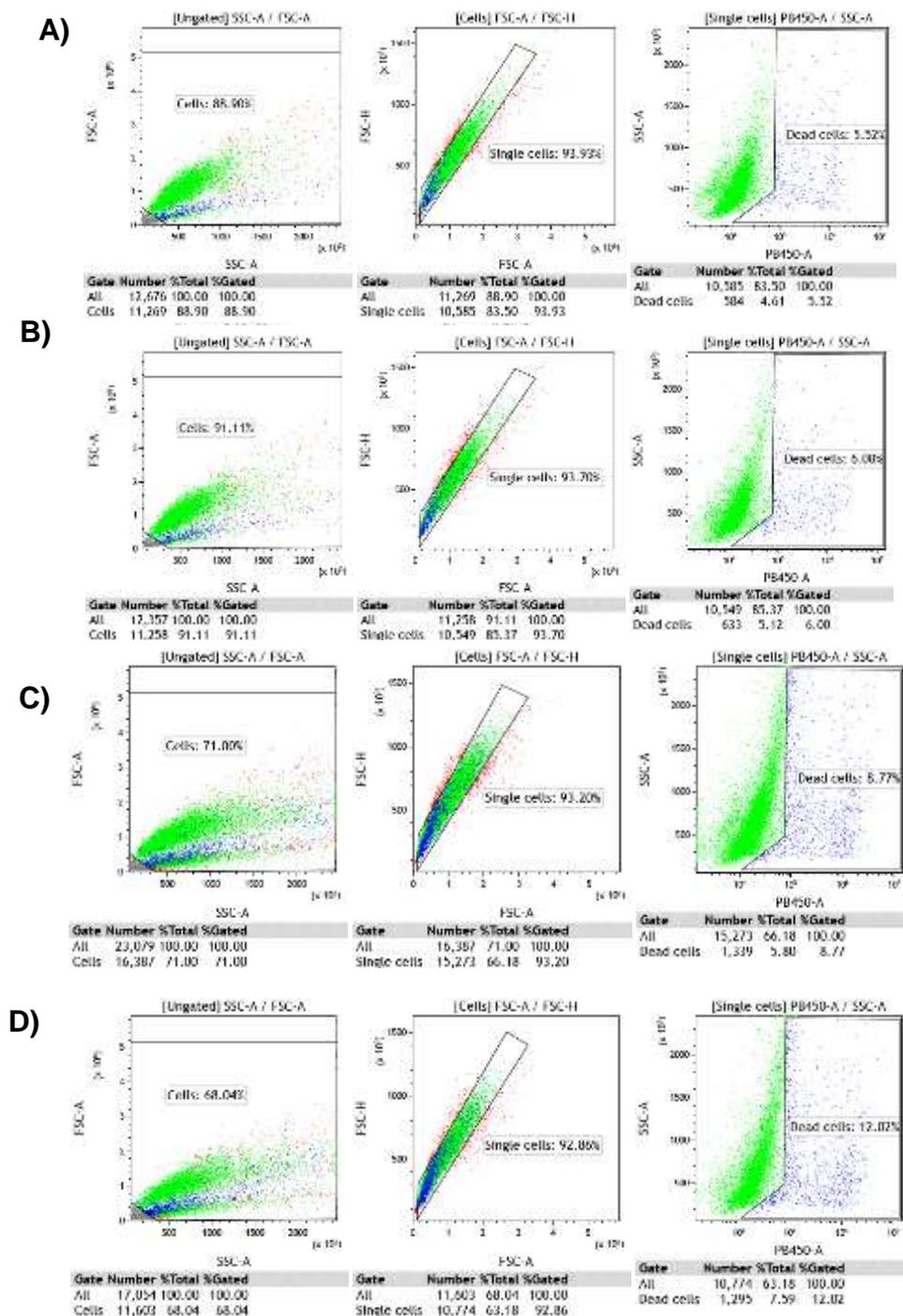


Figura A7.4 Actividad antiproliferativa de los extractos de invierno de *P. watti*. Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de flores y frutos de invierno obtenido de *P. watti*. **A)** 62.5 µg/mL DMSO **B)** 125 µg/mL **C)** 250 µg/mL, **D)** 500 µg/mL

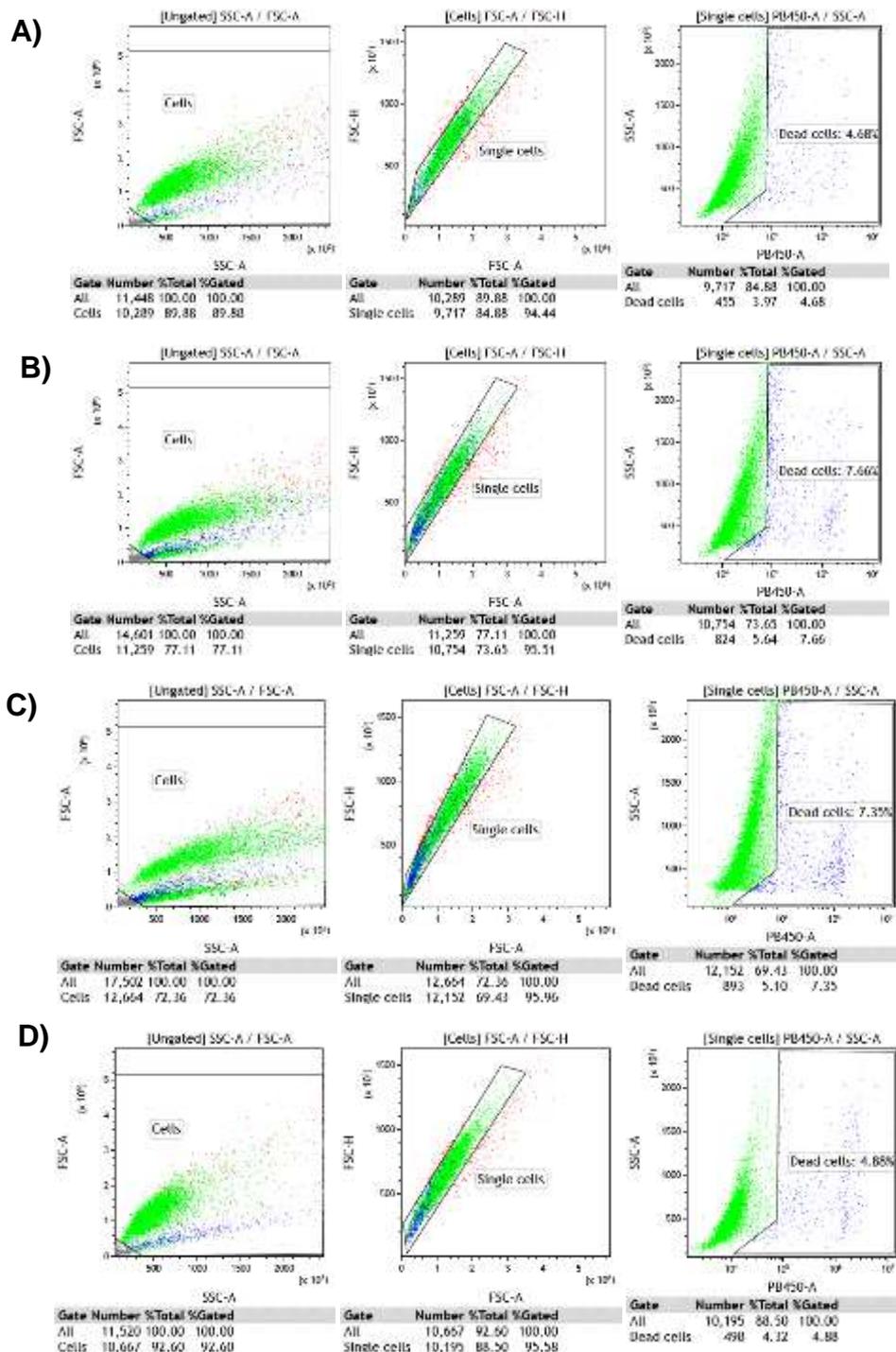


Figura A7.5 Actividad antiproliferativa de los extractos de invierno de *P. watti*. Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de tallos de invierno obtenido de *P. watti*. **A)** 62.5 µg/mL DMSO, **B)** 125 µg/mL, **C)** 250 µg/mL, **D)** 500 µg/mL

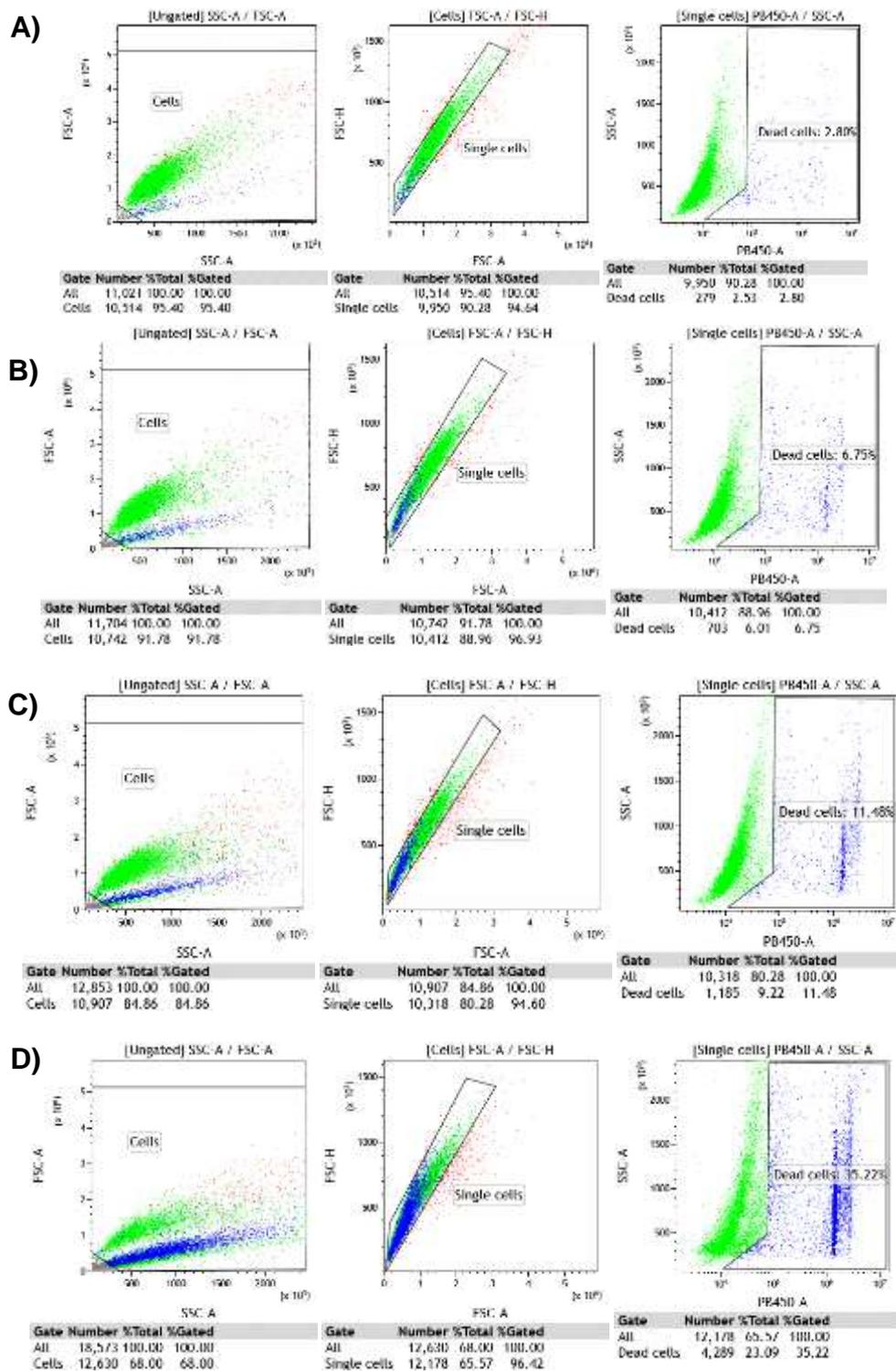


Figura A7.6 Actividad antiproliferativa de los extractos de invierno de *P. watti*. Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de hojas de invierno obtenido de *P. watti*. **A)** 62.5 µg/mL DMSO, **B)** 125 µg/mL, **C)** 250 µg/mL, **D)** 500 µg/mL.

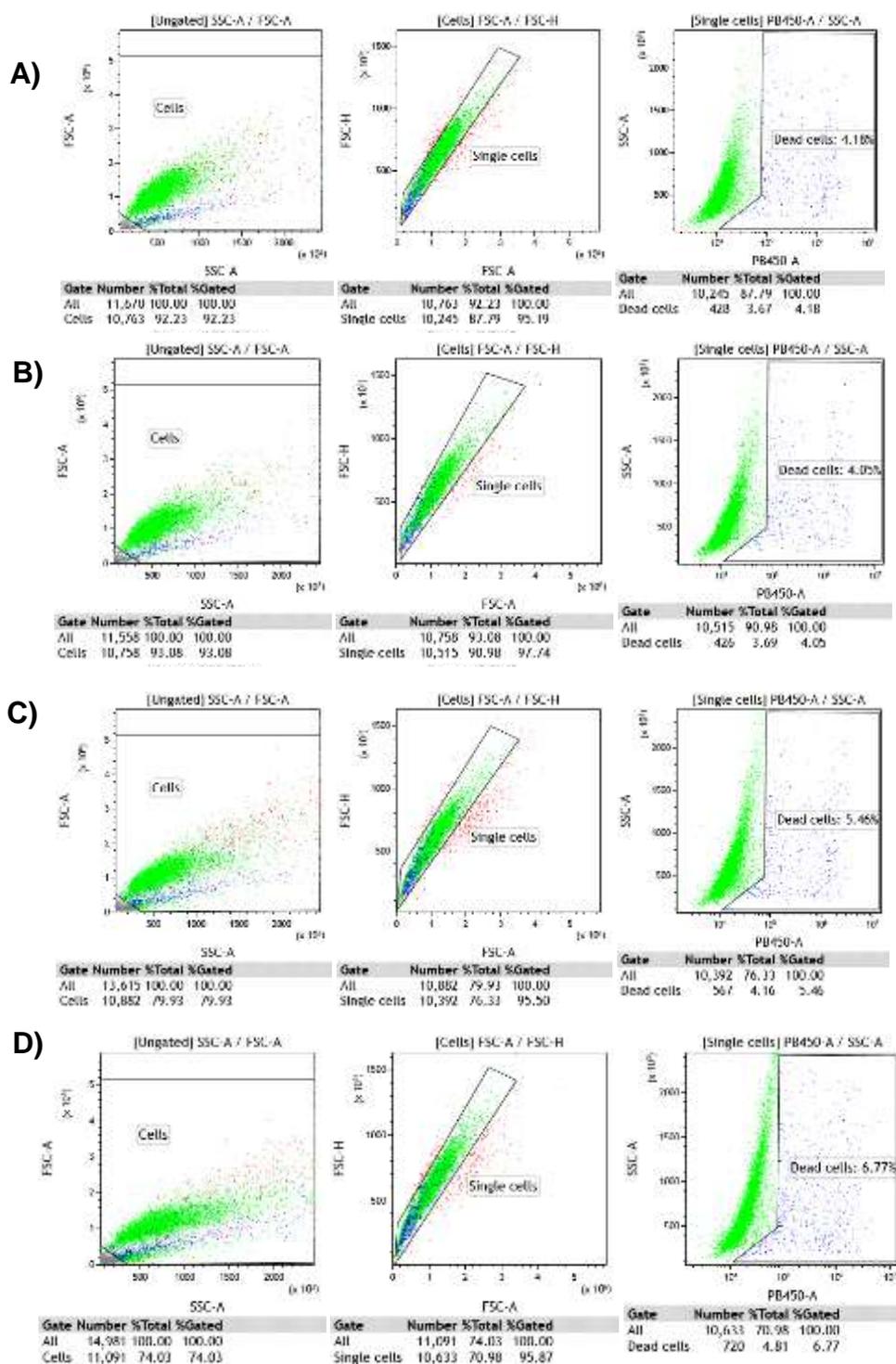


Figura A7.7 Actividad antiproliferativa de los extractos de otoño de *P. watti*. Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de flores y fruto de otoño obtenido de *P. watti*. **A)** 62.5 µg/mL, **B)** 125 µg/mL, **C)** 250 µg/mL, **D)** 500 µg/mL.

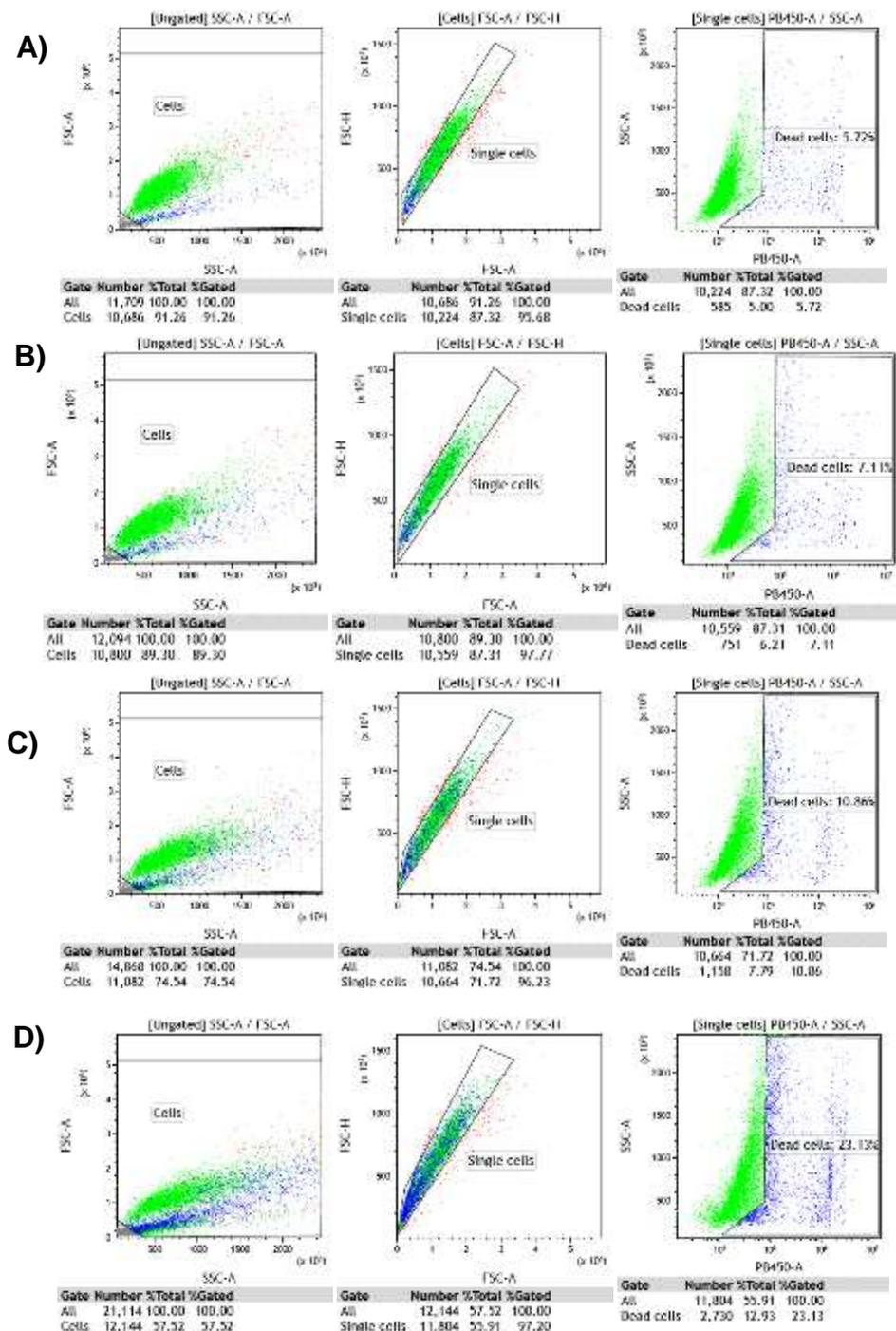


Figura A7.8 Actividad antiproliferativa de los extractos de otoño de *P. watti*. Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de tallos de otoño obtenido de *P. watti*. **A)** 62.5 µg/mL, **B)** 125 µg/mL, **C)** 250 µg/mL, **D)** 500 µg/mL.

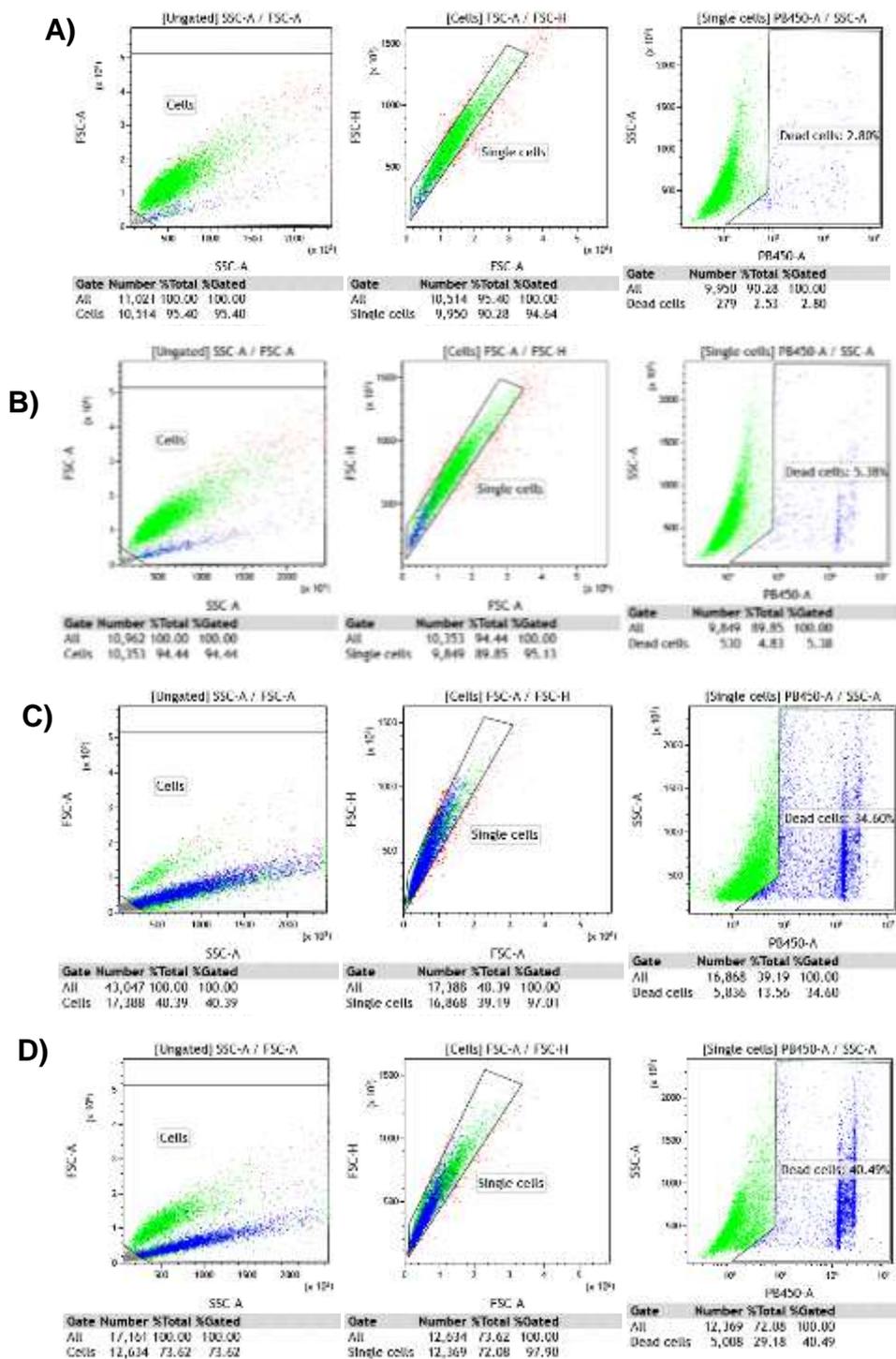


Figura A7.9 Actividad antiproliferativa de los extractos de otoño de *P. watti*. Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de hojas de otoño obtenido de *P. watti*. **A)** 62.5 µg/mL, **B)** 125 µg/mL, **C)** 250 µg/mL, **D)** 500 µg/mL.

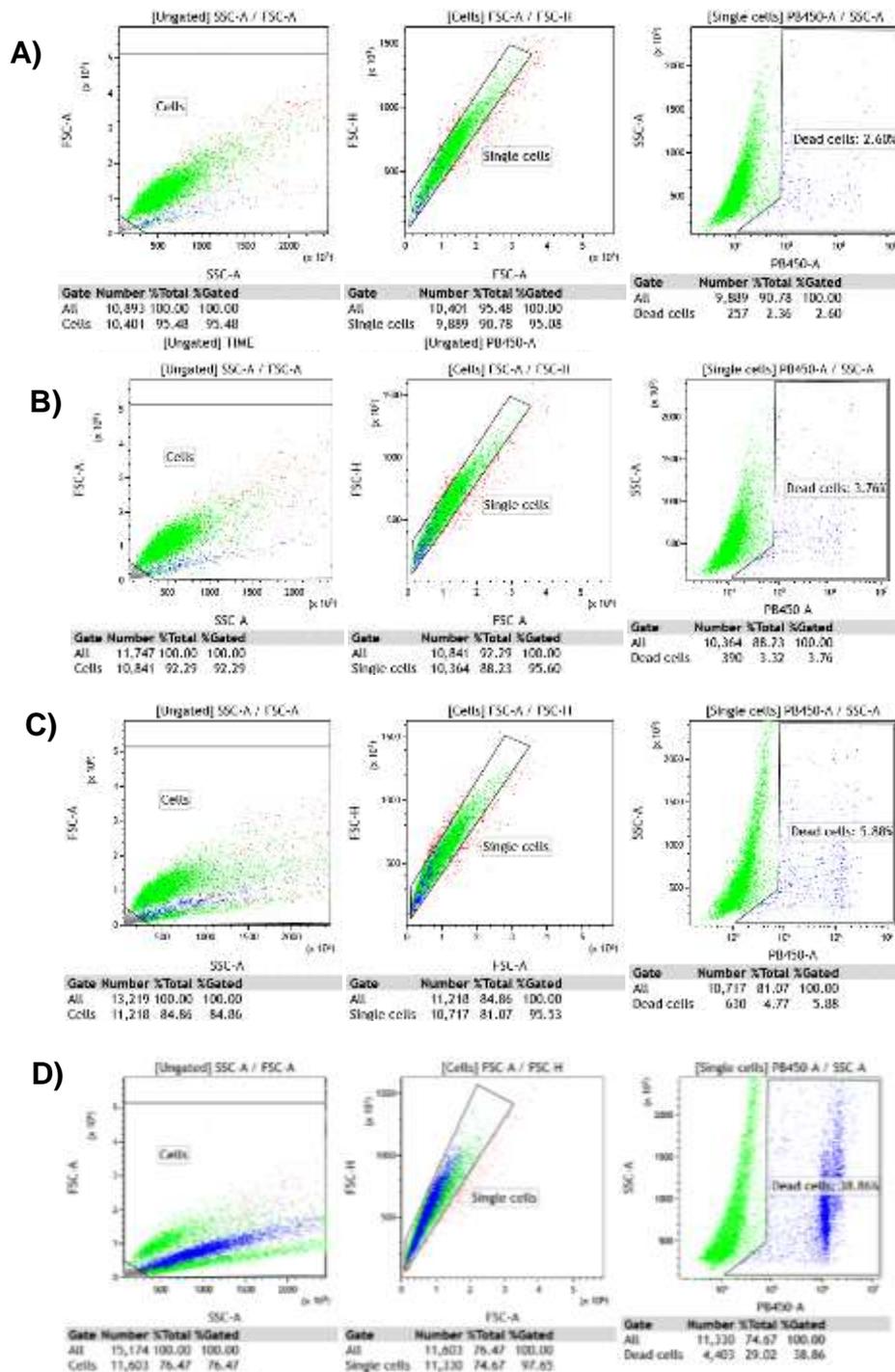


Figura A7.10 Actividad antiproliferativa de los extractos de verano de *P. watti*. Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de flores y frutos de verano obtenido de *P. watti*. **A)** 62.5 µg/mL, **B)** 125 µg/mL, **C)** 250 µg/mL, **D)** 500 µg/mL.

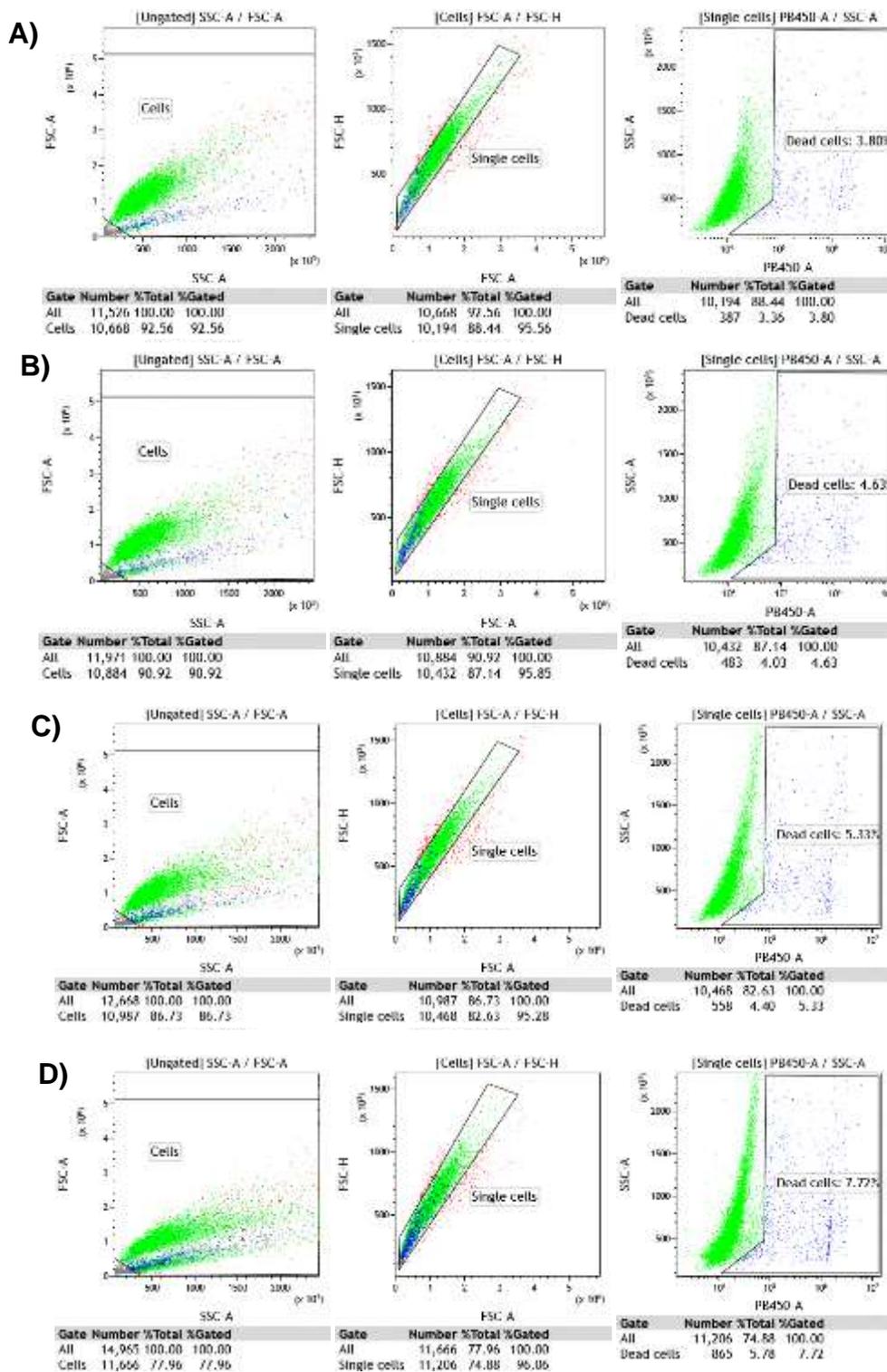


Figura A7.11 Actividad antiproliferativa de los extractos de verano de *P. watti*. Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de tallos de verano obtenido de *P. watti*. **A)** 62.5 µg/mL, **B)** 125 µg/mL, **C)** 250 µg/mL, **D)** 500 µg/mL.

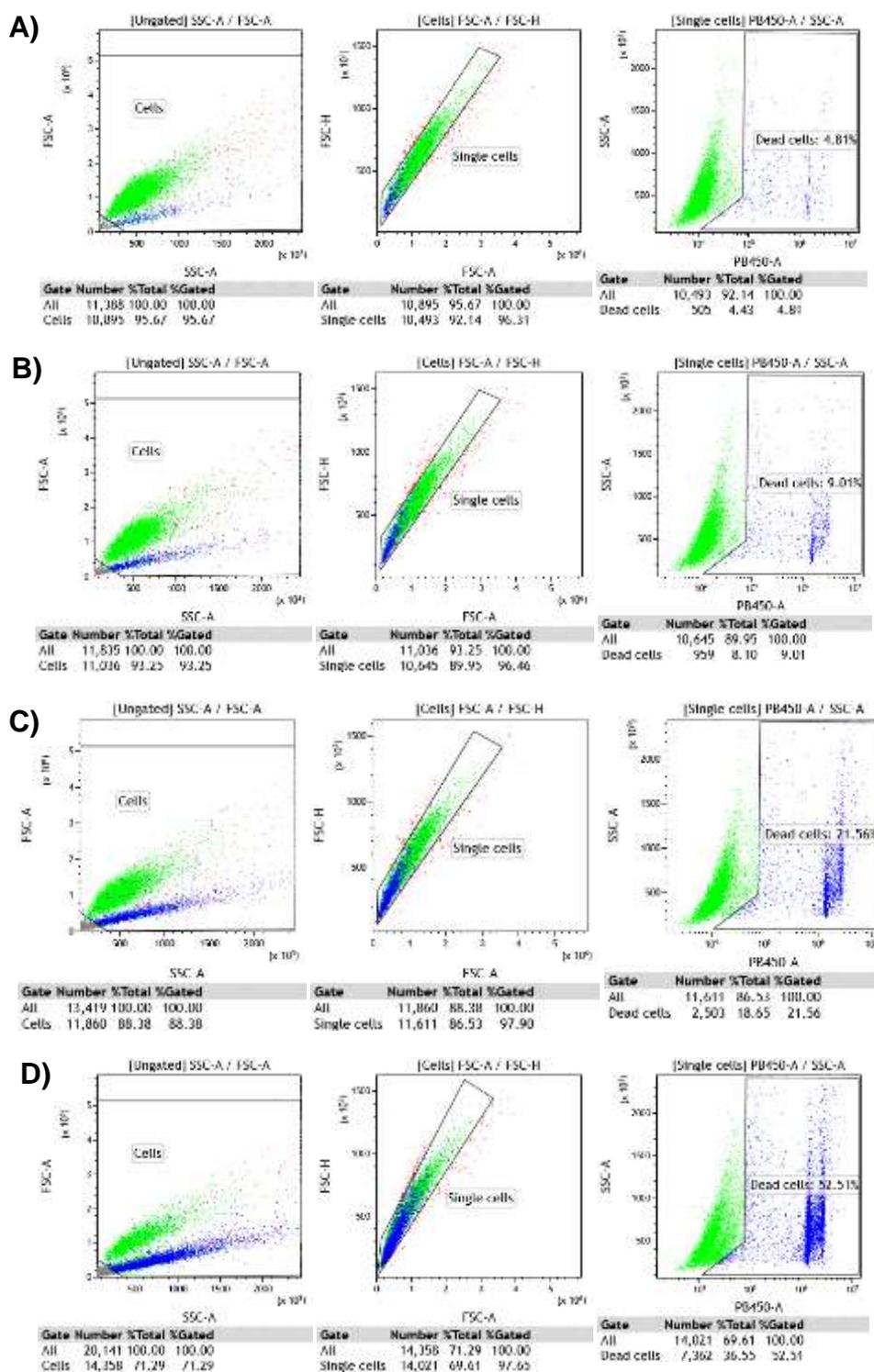


Figura A7.12 Actividad antiproliferativa de los extractos de verano de *P. watti*. Células K-562 durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con el extracto metanólico de hojas de verano obtenido de *P. watti*. **A)** 62.5 $\mu\text{g/mL}$, **B)** 125 $\mu\text{g/mL}$, **C)** 250 $\mu\text{g/mL}$, **D)** 500 $\mu\text{g/mL}$.

Anexo VIII. Efecto antiproliferativo de los extractos metanólicos de *P. watti* en células monocíticas de sangre periférica humana.

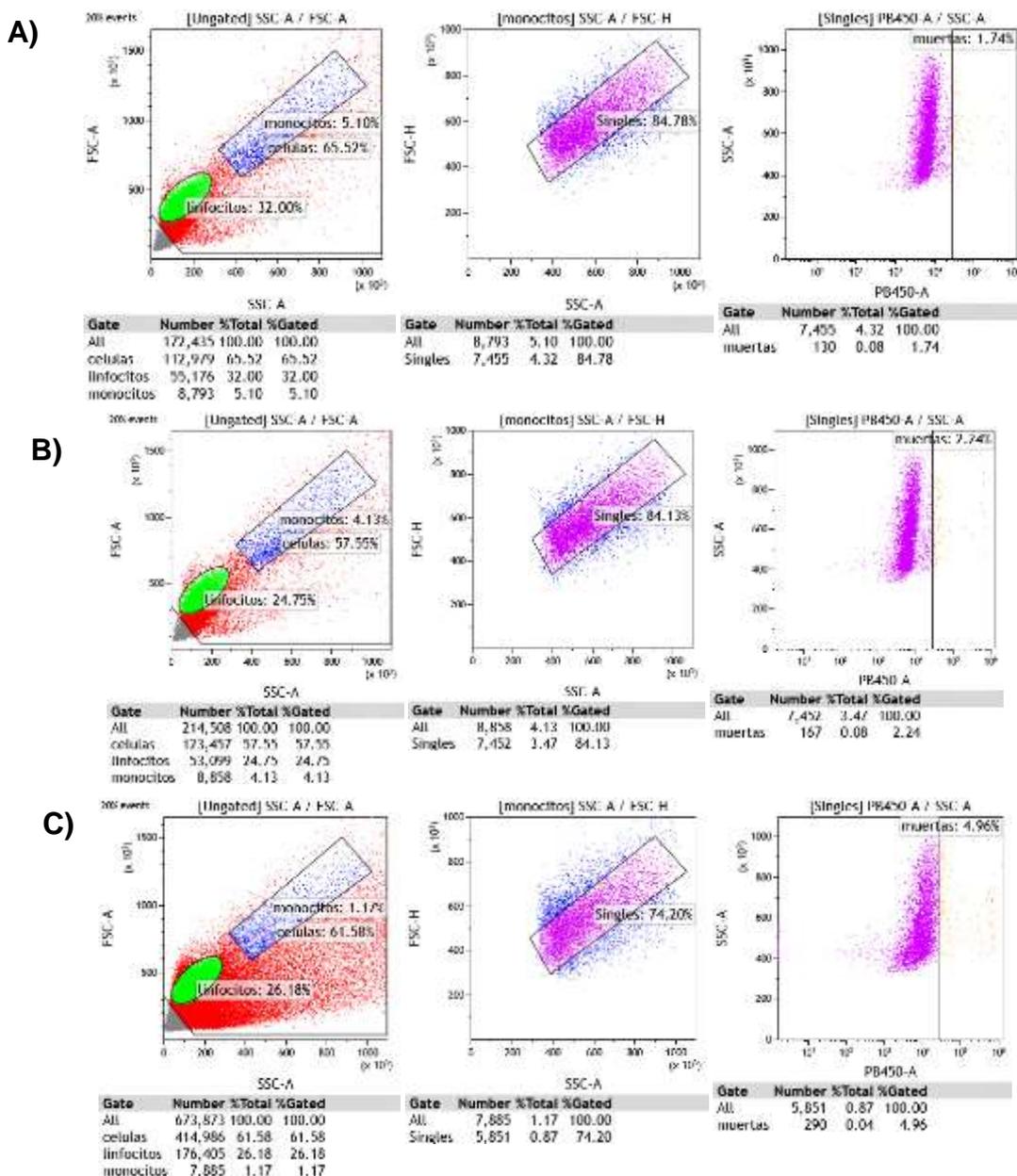


Figura A8.1 Actividad antiproliferativa de los extractos de *P. watti* en CMSP (1). Células monocíticas de sangre periférica humana (CMSP) durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con los extractos metanólicos de hojas de diferentes estaciones obtenido de *P. watti*. **A)** Control DMSO 1%, **B)** Primavera, **C)** Invierno.

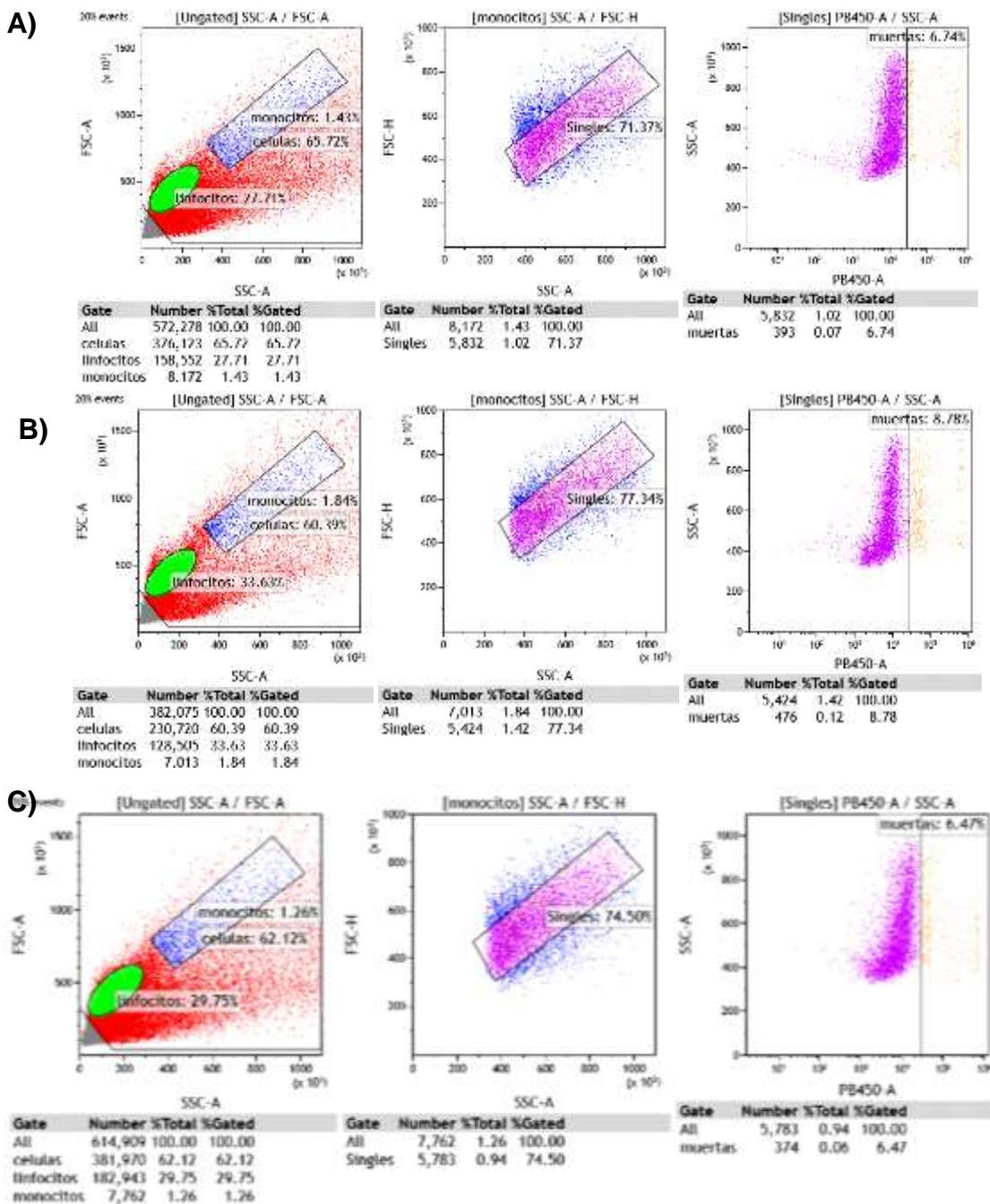


Figura A8.2. Actividad antiproliferativa de los extractos de *P. watti* en CMSP (2). Células monocíticas de sangre periférica humana (CMSP) durante el ensayo de antiproliferación utilizando DAPI y citometría de flujo con los extractos metanólicos de diferentes estaciones obtenido de *P. watti*. **A)** Hojas otoño, **B)** Hojas verano, **C)** Flores y frutos verano.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, S., Sukari, M., Ismail N., Ismail, I., Abdul, A., Bakar, M., Kifli, N. y Ee, G. (2015). Phytochemicals from *Mangifera pajang* Kosterm and their biological activities, *Complementary and Alternative Medicine*, 15, 1-8.
- Alías J., Sosa, T., Valares, C., Escudero, J. y Chaves N. (2012). Seasonal variation of *Cistus ladanifer* L. diterpenes. *Plants* 1, 6-15. doi:10.3390/plants1010006.
- Alonso-Castro, A., Juárez-Vázquez, M., Domínguez, F., González-Sánchez, I., Estrada-Castillón, E., López-Toledo, G., Chávez, M. Cerbón M. y García-Carranca, A. (2012). The antitumoral effect to the American mistletoe *Phoradendron serotinum* (Raf.) M.C. Johnst. (Viscaceae) is associated with the release of immunity-related cytokines. *Journal of Ethnopharmacology*, 142, 857-864.
- Amaral, R. G., Dos Santos, S. A., Andrade, L. N., Severino, P. y Carvalho, A. A. (2019). Natural products as treatment against cancer: A historical and current vision. *Clinics in Oncology*, 4(1562).
- Andrade-Cetto, A. y Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), 325-348. doi: 10.1016/j.jep.2005.04.019.
- Assanga, S., Luján, L., Ruiz, J., McCarty, M., Cota-Arce, J., Espinoza, C., Salido, A. y Angulo, D. (2020). Comparative analysis of phenolic content and antioxidant power between parasitic *Phoradendron californicum* (toji) and their hosts from Sonoran Desert. *Results in Chemistry*, 2. doi: 10.1016/j.rechem.2020.100079.
- Asociación Americana del Cancer. 2020. Leucemia. [Online]
Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/leukemia.html>
(Acceso 13 de noviembre 2020)
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.-M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E. H., Rollinger, J. M., Schuster, D., Breuss, J. M., Bochkov, V., Mihovilovic, M. D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V. M. y Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically

- active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33, 1582-1614. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.08.001.
- Ávalos-García, A. y Pérez-Urria, C. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. *Serie Fisiología Vegetal*, 2, 119-145.
- Baguley, B. (2002). A brief history of cancer treatment. *Anticancer Drug Development*. Academic Press, Universidad de Auckland, Nueva Zelanda, pp. 1-11. doi: 10.1016/B978-012072651-6/50002-4.
- Bastos, I., Oliveira, T., Rodrigues, M., Militão, G., Silva, T., Turatti, I., Lopes, N. y Melo, S. (2017). Use of GC/MS to identify chemical constituents and cytotoxic activity of the leaves of *Phoradendron mucronatum* and *Phoradendron microphyllum* (Viscaceae). *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 89, 991-1001. doi:10.1590/0001-3765201720160586.
- Bednarczyk-Cwynar, B., Więcaszek, T. y Ruszkowski, P. (2016). Cytotoxic activity of some lupeol derivatives. *Natural Product Communications*, 11, 1237-1238. doi:10.1177/1934578x1601100910.
- Borowski, E., Bontemps-Gracz, M. y Piwkowska, A. (2005). Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells. *Acta Biochimica Polonica*, 52, 609-627.
- Caamal-Fuentes, E., Torres-Tapia, L. W., Simá-Polanco, P., Peraza-Sánchez, S. R., y Moo-Puc, R. E. (2011). Screening of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms. *Journal of Ethnopharmacology*, 135, 719-724.
- Castro, M., Careaga, V., Sacca, P., Faraoni, M., Murray, A. y Calvo J. (2019). Lupane triterpenoids and new derivatives as antiproliferative agents against prostate cancer cells. *Anticancer Research*, 39, 3835–3845. doi:10.21873/anticancer.13533
- Challinor, V., y Bode, H. (2015). Bioactive natural products from novel microbial sources. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354, 82-97. doi:10.1111/nyas.12954
- Chen, B., Lee, J. B., Kang, H., Minden, M., y Zhang, L. (2018). Targeting chemotherapy-resistant leukemia by combining DNT cellular therapy with conventional

-
- chemotherapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37. doi:10.1186/s13046-018-0756-9.
- Croteau, R., Kutchan, T. y Lewis, N. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 24, 1250-1319.
- Demain, A. y Vaishnav, P. (2011). Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial Biotechnology*, 4, 687-699. doi: 10.1111/j.1751-7915.2010.00221.x.
- Desai, A., Qazi, G., Ganju, R., El-Tamer, M., Singh, J., Saxena, A., Bedi, Y., Taneja, S. y Bhat, H. (2008). Medicinal plants and cancer chemoprevention. *Current Drug Metabolism*, 9, 581-591. doi: 10.2174/138920008785821657.
- Eichhorn-Bilodeau S., Wu, B., Rufyikiri A., MacPherson S. y Lefsrud, M. (2019). An update on plant photobiology and implications for *Cannabis* production. *Frontiers in Plants Science* 10(296). doi: 10.3389/fpls.2019.00296
- Fahad-Ullah, M. (2008). Cancer multidrug resistance (MDR): a major impediment to effective chemotherapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 9, 1-6.
- Fatimata, N., Didjour, A. K., Manon, G., Tanoh, E. A., Wognin, E. L., Martin, H., Brostaux, Y., Félix Tomi, F., Logney, G. C., Tonzibo, Z. F. y Fauconnier, M. L. (2020) Composition, seasonal variation, and biological activities of *Lantana camara* essential oils from Côte d'Ivoire. *Molecules*, 25, doi:10.3390/molecules25102400.
- Feeney, K., Cain, M. y Nowak, A. (2007). Chemotherapy induced nausea and vomiting. Prevention and treatment. *Australian Family Physician*, 36, 702-706.
- Fernández, G., Tapia, J., Duno de Stefano, R., Ramírez, I., Can, L., Hernández, S. y Castillo, A. (2012). La flora de la Península de Yucatán Mexicana: 250 años de conocimiento florístico. *Biodiversitas*, 101, 6-10.
- Fulda, S. (2008). Betulinic acid for cancer treatment and prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 1096-1107.
- García-García, J., Anguiano-Cabello, J., Arredondo-Valdés, R., Candido del Toro, C, Martínez-Hernández, J., Segura-Ceniceros, E., Govea-Salas M., González-Chávez M., Ramos-González, R., Esparza-González, S., Ascacio-Valdés, J., López-Badillo,

-
- C. y Ilyina, A. (2021). Phytochemical characterization of *Phoradendron bollanum* and *Viscum album* subs. *austriacum* as Mexican mistletoe plants with antimicrobial activity. *Plants*, 10, 1299-1315. doi:10.3390/plants10071299.
- García-Regalado, G. (1998) La familia Loranthaceae (Injertos) del estado de Aguascalientes. *Polibotánica*. Vol. 7, pp 1-14.
- Gómez, R., Guzmán, J., Campos, M., Espitia, C. y Reyes, R. (2017). Natural compounds from Mexican medicinal plants as potential drug leads for anti-tuberculosis drugs. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89, 31-43. doi:10.1590/0001-3765201720160298.
- Gonzales, E., Iglesias, I., Carretero, E. y Villar, A. (2000). Gastric cytoprotection of bolivian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 70, 29-33. doi: 10.1016/S0378-8741(99)00183-X.
- Gottesman, M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual Review of Medicine*, 53, 615-627. doi: 10.1146/annurev.med.53.082901.103929.
- Gouvea, D., Gobbo-Netol, L., Sakamoto, H., Peporine-Lopes, N., Callegari-Lopes, J., Melonill, F. y Amaral, J. (2012). Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* Less (Asteraceae: Vernonieae) leaves. *Química Nova*, 35, 2139-2145. doi: 10.1590/S0100-40422012001100007
- Gunatilaka, L. (2008). Natural Products in Plants: Chemical Diversity. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, Wiley, Estados Unidos, Vol. 2, pp. 385-388. doi:10.1002/9780470048672.wecb163.
- Hata, K., Hori, K., Ogasawara, H. y Takahashi, S. (2003). Anti-leukemia activities of lup-28-al-20(29)-en-3-one, a lupane triterpene. *Toxicology Letters*, 143, 1-7.
- Hata, K., Hori, K., y Takahashi, S. (2002). Differentiation and apoptosis-inducing activities by pentacyclic triterpenes on a mouse melanoma cell line. *Journal of Natural Products*, 65, 645-648.
- Herbario del Centro de Investigación Científica de Yucatán. (2010). Flora de la península de Yucatán. [Online]. Disponible en:

https://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=1693

(Acceso 7 noviembre 2020)

- Hernández, G., Ruiz, J. y Peña, L. (2019). Natural products from the Yucatecan flora: structural diversity and biological activity. *Journal of Natural Products*, 82, 647-656. doi: 10.1021/acs.jnatprod.8b00959.
- Hernández, M. y Ríos, M. (1999). Oncogenes y cáncer. *Revista Cubana de Oncología*, 15, 131-139.
- Hordyjewska, A., Ostapiuk, A., Horecka, A. y Kurzepa, J. (2019). Betulin and betulinic acid: triterpenoids derivatives with a powerful biological potential. *Phytochemistry Reviews*, 18, 929-951. doi:10.1007/s11101-019-09623-1
- Huang, W., Bont, Z., Hervé, M., Robert, C. y Erb, M. (2020). Impact of seasonal and temperature-dependent variation in root defense metabolites on herbivore preference in *Taraxacum officinale*. *Journal of Chemical Ecology*, 46, 63-75. doi:10.1007/s10886-019-01126-9.
- Ibarra-Cantún, D., Delgado-Alvarado, A., Herrera-Cabrera, B. E., Soto-Hernández, R. M., Salazar-Rojas, V. M., y Aguilar, M. I. (2018). Effect of the environmental condition of *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews cultivation on phytochemical concentration. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 24, 151-165. doi: 10.5154/r.rchsh.2017.08.031
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (2018). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero). [online]. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_nal.pdf (Acceso 25 de noviembre 2020)
- Iqbal, J., Abbasi, B., Mahmood, T., Kanwal, S., Ali, B., Shah, S., y Khalil, A. (2017). Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7, 1129-1150. doi:10.1016/j.apjtb.2017.10.016.
- Jacobo-Salcedo, M., Alonso-Castro, A., Salazar-Olivo, L., Carranza-Álvarez, C., Gonzáles-Espíndola, L., Domínguez, F., Maciel-Torres, S., García-Luján, C., González-Martínez, M., Gómez-Sánchez, M., Estrada-Castillón, E., Zapata-Bustos, R.,

- Medellín-Milán, P. y García-Carrancá, A. (2011). Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican medicinal plants. *Natural Product Communications*, 6, 1925-1928.
- Jiménez-Herrera, R., Pacheco-López, B. y Peragón, J. (2019). Water stress, irrigation and concentrations of pentacyclic triterpenes and phenols in *Olea europaea* L. cv. Picual Olive Trees. *Antioxidants*, 8. doi:10.3390/antiox8080294.
- Joshi, N. (2015). Influence of light and temperature on secondary metabolite accumulation in callus cultures of *Helicteres isora* L. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 1, 73-76.
- Khanna, C., Rosenberg, M. y Vail, M. (2015). A review of paclitaxel and novel formulations including those suitable for use in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29, 1006-1012.
- Kessler, J., Mullauer, F., De Roo, G. y Medema, J. (2007). Broad *in vitro* efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types, *Cancer Letters*, 251, 132-145.
- Korkina, L. y Kostyuk, V. (2012). Biotechnologically produced secondary plant metabolites for cancer treatment and prevention. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13, 265-275. doi:10.2174/138920112798868692.
- Kuijt, J. (2003). Monograph of *Phoradendron* (Viscaceae). *Systematic Botany Monographs*, 66, 475-501.
- Lage, H., Duarte, N., Coburger, C., Hilgeroth, A., Ferreira, M. J. (2010). Antitumor activity of terpenoids against classical and atypical multidrug resistant cancer cells. *Phytomedicine*, 17, 441-448. doi: 10.1016/j.phymed.2009.07.009.
- Li, D., Heiling, S., Baldwin, I. y Gaquerel, E. (2016). Illuminating a plant's tissue-specific metabolic diversity using computational metabolomics and information theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 7610-7618. doi:10.1073/pnas.1610218113.

-
- Li, Y., He, Y., Huang, Y., Zhen, D., Gao, C., Cui, L. y Jin, Y. (2010). Betulin induces mitochondrial cytochrome C release associated apoptosis in human cancer cell, *Molecular Carcinogenesis*, 49, 630-640.
- Liscovitch, M. y Lavie, Y. (2002). Cancer multidrug resistance: a review of recent drug discovery research. *The Investigational Drugs Journal*, 5,349-355.
- Llusia, J., Peñuelas, J., Guenther, A. y Rapparini, F. (2013). Seasonal variations in terpene emission factors of dominant species in four ecosystems in NE Spain. *Atmospheric Environment*, 70, 149-158. doi: 10.1016/j.atmosenv.2013.01.005
- López, S., Navarrete, G., Estrada, S., León, I. y Rios M. (2013). Chemical constituents of the hemiparasitic plant *Phoradendron brachystachyum* DC Nutt (Viscaceae). *Natural Product Research*, 27, 130-136. doi: 10.1080/14786419.2012.662646
- Martínez, K., Marmolejo, A., Cortes, F., García, J., Sánchez, E., Barroso, J., Medina, L. y Esquivel, B. (2017). Toxicity assessment of structurally relevant natural products from Mexican plants with antinociceptive activity. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 61, 186-196. doi: 10.29356/jmcsv61i3.344
- Monsuez, J., Charniot, J., Vignat, N. y Artigou, J. (2010). Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. *International Journal of Cardiology*, 144, 3-15. doi: 10.1016/j.ijcard.2010.03.003.
- Moore, B., Andrew, R., Külheim, C. y Foley, W. (2014). Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytologist*, 201, 733-750. doi: 10.1111/nph.12526
- Moreno, L. P. (2009). Plant responses to water deficit stress. A review. *Agronomía Colombiana*, 27, 179-191.
- Nasrollahi, V., Mirzaie-asl, A., Piri, K., Nazeri, S. y Mehrabi, R. (2014). The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of triterpenoid saponins in liquorice (*Glycyrrhiza glabra*). *Phytochemistry*, 103, 32-37. doi: 101016/j.phytochem.2014.03.004.

- Neugart, S., Krumbein, A. y Zrenner, R. (2016). Influence of light and temperature on gene expression leading to accumulation of specific flavonol glycosides and hydroxycinnamic acid derivatives in kale (*Brassica oleracea* var. sabellica). *Frontiers in Plant Science*, 7, 1-16. doi:10.3389/fpls.2016.0032
- Observatorio global del cáncer. 2018. Hojas informativas de México, Globocan [Online]
Disponible:
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>
[Acceso 27 de noviembre 2020]
- Organización mundial de la salud. (2018). Cáncer [Online]
Disponible en:
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
[Acceso 27 de noviembre 2020]
- Organización mundial de la salud. (2014). World Cancer Report 2014
Disponible en:
<https://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>
[Acceso 27 de noviembre 2020]
- Partridge, A., Burstein, H. y Winer, E. (2001). Side effects of chemotherapy and combined chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 30, 135-142.
- Pillozzi, S., Masselli, M., De Lorenzo, E., Accordi, B., Cilia, E., Crociani, O., Amedei A., Veltron M., D'Amico A., Basso G., Becchetti A., Campana D. y Arcangeli, A. (2010). Chemotherapy resistance in acute lymphoblastic leukemia requires hERG1 channels and is overcome by hERG1 blockers. *Blood*, 117, 902-914. doi:10.1182/blood-2010-01-262691.
- Pulte, D., Redaniel, M., Jansen, L., Brenner, H. y Jeffreys, M. (2012). Recent trends in survival of adult patients with acute leukemia: overall improvements, but persistent and partly increasing disparity in survival of patients from minority groups. *Haematologica*, 98, 222-229. doi: 10.3324/haematol.2012.063602.
- Rahajanirinav, V., Faramalala, H., Roger, E., Zebrowski, C., Leong-Pock, H., Tsy, J. y Danthu, P. (2016). Effects of harvest frequency on leaf biomass and triterpenoid content of *Centella asiatica* (L.) Urb. from Madagascar. *Journal of Medical and Biological Science Research* 2,1-8.

- Ramírez, J., Ríos, M., López, S., López, F., Medina, J., Paoli, P., Camici, G., Navarrete, G., Ortiz, R. y Estrada, S. (2011). Antidiabetic activity of some pentacyclic acid triterpenoids, role of PTP-1B: *in vitro*, *in silico*, and *in vivo* approaches. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 2243-2251. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.03.005.
- Randle, C., Cannon, B., Faust, A., Hawkins, A., Cabrera, S, Lee, S., Lewis, M., Perez, A., Sopas, J., Verastegui, T. y Williams, J. (2018). Host cues mediate growth and establishment of oak mistletoe (*Phoradendron leucarpum*, Viscaceae), an aerial parasitic plant. *Castanea* 83, 249-262. doi:10.2179/18-173.
- Rangel-Méndez, J. A., Valencia-Chan, L. S., Peraza-Sánchez, S. R. y Moo-Puc, R. E. (2021). Season affects active metabolite composition and cytotoxic effect in *Phoradendron wattii* methanol extracts. *Natural Product Research*, 6, 1-4. doi: 10.1080/14786419.2021.1984466.
- Remali, J. y Aizat, W. (2021). A review on plant bioactive compounds and their modes of action against coronavirus infection. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 77-81. doi: 10.3389/fphar.2020.589044.
- Ríos, M., Salinas, D. y Villarreal, M. (2001). Cytotoxic activity of moronic acid and identification of the new triterpene 3,4-seco-olean-18-ene-3,28-dioic acid from *Phoradendron reichenbachianum*. *Planta Medica*, 67, 443-446. doi: 10.1055/s-2001-15823.
- Rodríguez, L., González-Llano, O., Mancias, M., Pompa, T., González, G., Sandoval, A., Palafox, M., Támez, L., Tovar, C. y Gómez-Almaguer, A. (2010). Observaciones sobre la incidencia de leucemias agudas en el Noreste de México. *Revista de Hematología*, 11, 78-81.
- Saeed Mohamed, E., Mahmoud, N., Sugimoto, Y., Efferth, T. y Abdel-Aziz, H. (2018). Betulinic acid exerts cytotoxic activity against multidrug-resistant tumor cells via targeting autocrine motility factor receptor (AMFR). *Frontiers in Pharmacology*, 9, 55-62 doi: 10.3389/fphar.2018.00481.
- Santoyo, A., Ramos, O., Saavedra, A., González, L., Martínez, A., Olarte, I. y Collazo, J. (2016). Frecuencias de edad y género de pacientes con leucemia observada en dos centros de referencia del Valle de México. *Gaceta Médica de México*, 152, 208-212.

-
- Setzer, W. y Setzer, M. (2003). Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 3, 540-556.
- Sobral, M., Xavier, A., Lima, T. y De Sousa, D. (2014). Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *Scientific World Journal*, 953421, 1-35. doi:10.1155/2014/953451.
- Twilley, D., y Lall, N. (2018). The role of natural products from plants in the development of anticancer agents, en: *Natural Products and Drug Discovery*. Elsevier Ltd., Sudáfrica, pp, 139-178. doi:10.1016/b978-0-08-102081-4.00007-1.
- Thoma, F., Somborn-Schulz, A., Schlehuber, D., Keuter, V. y Deerberg, G. (2020). Effects of light on secondary metabolites in selected leafy greens: A review. *Frontiers in Plants Sciences*, 11, 1-15. doi: 10.3389/fpls.2020.00497.
- Urruticoechea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Viñals, F. y Capellá, G. (2010). Recent advances in cancer therapy: an overview. *Current Pharmaceutical Design*, 16, 3-10. doi: 10.2174/138161210789941847.
- Vajira, P. B. (2013). *Plants Based Natural Products Extraction, Isolation and Phytochemical Screening Methods*. Indika Graphics, pp. 23-32.
- Valares, C. (2011). Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Tesis de doctorado. Universidad de Extremadura, España. pp. 13-20.
- Valencia-Chan, L. S. (2018). Evaluación del efecto citotóxico y antiproliferativo de metabolitos aislados de *Phoradendron vernicosum*. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. pp. 123-154.
- Valencia-Chan, L. S., García-Cámara, I., Torres-Tapia, L. W., Moo-Puc, R. E y Peraza-Sánchez, S. R. (2017). Lupane-type triterpenes of *Phoradendron vernicosum*. *Journal of Natural Products*, 80, 3038-3042.
- Varela, B., Fernandez, T., Ricco, R., Zolezzi, P., Hajos, S., Gurni, A., Álvarez, E. y Wagner, M. (2004). *Phoradendron liga* (Gill. ex H. et A.) Eichl. (Viscaceae) used in folk medicine: anatomical, phytochemical, and immunochemical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 109-116. doi: 10.1016/j.jep.2004.04.027.

- Vasconcellos, C. L., Vitório, K. C., Andrade, P. A., Cambuí, É. V., Lira, A. F., Cavalcante, S. C., Estevam, C. S., Antonioli, A. R. y Thomazzi, S. M. (2009). Antinociceptive, anti-inflammatory, and antioxidant properties of *Phoradendron piperoides* leaves. *Pharmaceutical Biology*, 47, 645-652. doi:10.1080/13880200902917065
- Vázquez-Collazo, I., Villa-Rodríguez, A. y Madrigal-Huendo, S. (2006). Los Muérdagos (Loranthaceae) en Michoacán, Litho Quality, México. pp. 11-52.
- Wójciak-Kosior, M., Sowa, I., Pucek, K., Szymczak, G., Kocjan, R. y Luchowski, P. (2016). Evaluation of seasonal changes of triterpenic acid contents in *Viscum album* from different host trees. *Pharmaceutical Biology*, 55, 1-4. doi:10.1080/13880209.2016.1225773.
- Yang, L., Yang, S., Li, J., Ma, J., Pang, T., Zou, C., He, B. y Gong, M. (2018). Effects of different growth temperatures on growth, development, and plastid pigments metabolism of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plants. Botanical Studies* 59, 17-28. doi:10.1186/s40529-018-0221-2.
- Zhang, J., Gu, Y. y Chen, B. (2019). Mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia. *Onco Targets and Therapy*, 12, 1937-1945 doi: 10.2147/OTT.S191621